



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO
INDUCIDO POR EL EXTRACTO DE *CECROPIA
OBTUSIFOLIA* EN LINFOCITOS HUMANOS *IN
VIVO*, MEDIANTE EL ENSAYO DE
MICRONÚCLEOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

VARENKA MARTÍNEZ TOLEDO



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:
M. EN C. MARÍA GUADALUPE ORDAZ TÉLLEZ

m351514

2005



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Varenga Martínez

Talero

FECHA: 28/Noviembre/2005

FIRMA: ~~Roberto A. Varenga~~
TC



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 14
MEXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Determinación del efecto genotóxico inducido por el extracto de Cecropia obtusifolia en linfocitos humanos in vivo, mediante el ensayo de micronúcleos."


realizado por Varenka Martínez Toledo

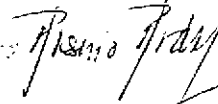
con número de cuenta 40107289-7 ,pasante de la carrera de Biología


Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.


Atentamente

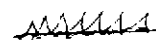
Directos de Tesis

Propietario M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez 

Propietario Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz 

Propietario Dra. María Cristina Revilla Monsalve 

Suplente Dr. Adolfo Andrade Cetto 

Suplente Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán 

Consejo Departamental de Biología


M. EN C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ CHÁVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

DEDICATORIA

A mis padres

A ti mamá por tu gran ejemplo de lucha y constancia; por enseñarme que con dedicación, esfuerzo y paciencia todo lo que me proponga lo puedo lograr. Y sobre todo, te la dedico por que eres la persona que más admiro y quiero en este mundo.
Estoy muy orgullosa de ser tu hija.

A ti papá porque te siento a mi lado en todo momento, dándome fortaleza para seguir adelante en busca de mi metas y sueños. Puedes estar seguro de que nos dejaste en excelentes manos.

Gracias a los dos.

AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos:

A tí Berenice (La princesa) por brindarme siempre tu apoyo, tu tiempo, tus consejos y amor. Gracias por ser más que una hermana para mí.

A tí Iván (Septiembre negro) por los momentos tan alegres que hemos compartido, por haberme cuidado y ayudado a crecer.

A tí Iranía (Piernas perfumadas) porque me has ayudado a controlar mi carácter y porque siempre has estado pendiente de mí y sé que cuento contigo en todo momento.

A tí Delta (mi Deta), con quien compartí hasta el vientre materno, te agradezco tu amor y apoyo constante. Tú sabes lo importante que eres en mi vida: formas parte de mí. Te amo y admiro mucho gemela malvada.

A mis cuñados

A tí Uriel por cuidarme y quererme como a una hija, por tu ejemplo de entrega en todo lo que haces y por el amor que nos brindas a todos.

A tí Mónica, mi cuñada consentida, porque desde que te conozco me has abierto tu corazón y porque has hecho muy feliz a mi hermano.

A tí Paco, por haber estado junto a mí en los momentos difíciles y ayudarme a salir adelante. Si no fuera por tí, no me habría dado una segunda oportunidad para estar en esta universidad.

A mis sobrinas

A Tannya, Italy, Paola e Irene; por toda su ternura, sus ocurrencias y su inmenso amor. No saben cuanto las quiero y todo lo que estaría dispuesta a hacer por ustedes.

A mi segunda familia

A la Sra. Elia, al Sr. Enrique y a Javier les agradezco su inmenso apoyo y cariño. Gracias porque a pesar de mis "latas" siempre me dedican una sonrisa y me tienen presente en sus vidas. Prometo ya no acabarme las galletas. Los quiero.

A los tíos, tías, abuelos y sobrinos; porque desde el primer momento en que los conocí me ofrecieron su amistad y apoyo. En especial le agradezco a Ale sus consejos y su amistad. Eres uno de mis ejemplos a seguir

Te agradezco sobre todo a ti **ENRIQUE**, por tu apoyo incondicional, porque has estado a mi lado en todo momento y porque nunca has dejado que me rinda. Eres la persona más increíble que he conocido en mi vida; y son tantas cosas que quiero agradecerte que no cabrían todas en estas páginas. Solo puedo decirte que me siento muy orgullosa de ti y que TAZ.

A mis amigos inseparables

A Jocelyn porque a pesar del poco tiempo compartido siempre sé que puedo contar contigo, por ser mi mejor amiga y porque admiro tu constancia y perseverancia. Tatiana te agradezco tu amistad incondicional, tu ternura, tu simpatía y tus ocurrencias que me alegran enormemente el día. Y a ti Erick te agradezco tu cariño y las porras que me hechas.

A ti Karina te agradezco por tantos buenos momentos juntas, y por estar ahí cuando más te necesité.

Carolina gracias por esa amistad que das, gracias por enseñarme que lo que importa es la calidad y no la cantidad en todo lo que haces. Y gracias por tus comentarios que me ayudan a no perder los pies de la tierra.

A ti Mónica te agradezco por las palabras de aliento y apoyo que siempre me has dado, por hacerme ver que la mayoría de las veces es uno solo el que se limita.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio

A Judith, Ruth, Memo, Horacio, América, Lupita y la Dra. Rosario; por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo y crecer profesionalmente.

Gracias por soportar mis malos ratos y por su apoyo incondicional.

A Mary: porque siempre has creído en mí, porque has sido parte importante de mi formación, por tomarme en cuenta como una colega y por ser mi amiga.

A todos mis amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias

Les agradezco todos los momentos que compartimos durante clases, prácticas de campo, fiestas y sorteos de grupos. Me hicieron más divertida, educativa y alegre esta etapa de mi vida.

A todos mis amigos del Museo de Ciencias Universum

A quienes no nombro por temor a omitir a alguno. Gracias por hacer tan hermosa mi estancia como becaria. Todos los días aprendo algo nuevo gracias a ustedes.

Los quiero mucho.

ÍNDICE

Justificación	3
Resumen	5
Introducción	7
Plantas medicinales	7
<i>Cecropia obtusifolia</i>	9
Distribución	10
Uso medicinal	11
La diabetes	12
Aspectos históricos de la diabetes	13
Clasificación de la diabetes	16
Síntomas	19
Inducción de aberraciones cromosómicas por agentes químicos y físicos	20
Sistemas biológicos de prueba	21
Ensayo de Micronúcleos	22
Ventajas y desventajas del ensayo de micronúcleos	24
Criterios utilizados para el registro de células con micronúcleos	24
Criterios para analizar los micronúcleos	25
Hipótesis	27
Objetivos	27
Materiales y Métodos	27
Grupos de estudio	27
Obtención de la muestra	29

Procesamiento de la muestra	29
Técnica de Micronúcleos	29
Siembra	29
Cosecha	30
Análisis de resultados	32
Resultados	34
Frecuencia de micronúcleos	37
Análisis estadístico: Kruskal Wallis	41
Análisis estadístico: Prueba de hipótesis	43
Índice de proliferación de la citocinesis bloqueada	45
Muestras tratadas con MMC	46
Discusión	49
Conclusión	54
Referencias	55

RESUMEN

En el año 2000, cinco enfermedades fueron responsables de más de la mitad de las muertes que ocurrieron en el país: las enfermedades del corazón, los tumores malignos, la cirrosis hepática, las enfermedades cerebro vasculares y la diabetes mellitus.

Esta última es sin duda uno de los problemas de salud más importantes que enfrentará México en los próximos años. Se trata de una enfermedad en la cual la característica más importante son los altos niveles de glucosa en la sangre.

En México, la diabetes mellitus más común es la tipo 2 (con un 90% de frecuencia) y en el 2001 fue considerada como la primera causa de muerte (SSA, 2004).

Entre los tratamientos que existen para la diabetes mellitus tipo 2 en México, se encuentra el de la herbolaria, la cual se basa en la utilización de plantas medicinales. Es en base a esta medicina tradicional como surge la etnofarmacología, la cual utiliza la información obtenida directamente de las comunidades donde se reporta el usos de plantas medicinales, para su posterior recolección, almacenamiento, preparación y finalmente la realización de la fitoquímica con el fin de determinar sus principios activos (Andrade-Cetto, 1999). Además la etnofarmacología busca regresar los beneficios de estos trabajos a la misma comunidad.

Como ejemplo tenemos a *Cecropia obtusifolia* comúnmente llamada "guarumbo" que es un árbol perennifolio, que está ampliamente distribuido en México y que es utilizado para el tratamiento de la diabetes.

Estudios hechos por varios investigadores han demostrado, que el extracto obtenido de *Cecropia obtusifolia* tiene acción hipoglucemiante. También se ha demostrado su acción hipolipidémica e hipotensora (en animales de laboratorio), lo que valida algunos de sus usos; sin embargo su efecto tóxico es

dudoso. Así mismo se ha demostrado su efecto hipoglucemiante en pacientes que tienen baja respuesta al tratamiento médico convencional.

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto genotóxico inducido por el extracto de *Cecropia obtusifolia* en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 por medio del ensayo de micronúcleos (MN). Este ensayo permite conocer, *in vivo* o *in vitro*, si una sustancia está causando aberraciones cromosómicas, ya sea rompiendo a los cromosomas (agente clastogénico) o afectando el huso mitótico (agente aneuploidogénico).

Es importante señalar que esta investigación no es un trabajo aislado, sino que forma parte de un proyecto más amplio en el cuál colaboramos con el Centro Médico Siglo XXI, donde se trabaja con el extracto de *C. obtusifolia* en un grupo piloto de pacientes con diabetes mellitus.

En esta investigación la población de estudio consistió en: 1) pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que estén bajo tratamiento con un extracto de *C. obtusifolia*, provenientes del Centro Médico Siglo XXI; 2) muestra control de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que no estén bajo tratamiento con *C. obtusifolia*, y 3) muestra control de personas sanas.

Los resultados que se obtuvieron indican que tanto la diferencia en la frecuencia de MN como en el índice de proliferación de la citocinesis bloqueada (CBPI) en los grupos de estudio no fue estadísticamente significativo; por lo que se concluye que el extracto de *Cecropia obtusifolia* no mostró un efecto genotóxico ni citostático en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, y que por lo tanto, esta planta podría servir como una buena alternativa para el tratamiento de esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud en 1978 definió el término "planta medicinal" como, cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o que son precursores para la hemi-síntesis químico-farmacéutica. Su uso se remonta a la antigüedad, donde inicialmente fueron usadas por ensayo y error, y más tarde se fue entendiendo su uso y determinando sus propiedades terapéuticas (Martínez, 2004).

Se sabe que el primer escrito sobre el uso de plantas medicinales tiene unos 3000 años de antigüedad y aparece en la cultura de los sumerios, un antiguo pueblo que vivía al sur de los ríos Eufrates y Tigris, que actualmente es Irak. Los asirios y hebreos, sabían como hacer uso de las plantas con poder curativo; los egipcios describieron en sus papiros las propiedades de plantas tales como la mirra, el cáñamo, el opio, el aloe y la cicuta. Cabe mencionar que los egipcios utilizaron los principios de las plantas medicinales de una manera sistemática y controlada ya que, se conocen más de 700 fórmulas en las que aparecen estas plantas y el documento impreso más relevante es el Papiro de Ebers del año 1500 a.C. En la India el uso de plantas medicinales, conocido como Ayurveda, ha dejado referencias escritas del año 800 a.C., donde aparecen descritas unas 800 especies (Martínez, 2004).

Los griegos y los romanos recopilaron la tradición de Mesopotamia y de Egipto e hicieron uso de las plantas para curar las enfermedades y mantener una buen salud. Así, por ejemplo, el griego Hipócrates (460-a.C.-377 a.C.), considerado el padre de la medicina, otorgaba mucha importancia a la medicina preventiva, la cual incluía el tratamiento con plantas (Martínez, 2004).

En México la "medicina tradicional" indígena es fundamentalmente herbolaria, y está siempre acompañada de oraciones religiosas. Esta "medicina tradicional" mexicana se conoce a través de las costumbres de los grupos étnicos actuales, así como por los escritos tempranos de fray Bernardino de Sahagún, Martín de la Cruz, Juan Badiano, Francisco Bravo, Hernando Ruiz

de Alarcón y Francisco Hernández, y por las descripciones geográficas de los jesuitas; aportaciones posteriores fueron otras obras como la de Francisco Javier Clavijero (Barba de Piña, 2002).

En el siglo XVI, los curanderos sólo se preocupaban por los síntomas de las enfermedades y no de la enfermedad en sí, aunque hay regiones étnicas, como la maya-yucateca, donde a la diabetes se le llamó enfermedad dulce, y para detectarla hacían orinar al enfermo cerca de un hormiguero y observaban si las hormigas eran atraídas por el azúcar que quedaba al secarse la orina (Barba de Piña, 2002).

En este siglo, la tecnología ha permitido desarrollar sustancias artificiales parecidas a los productos naturales o que tienen el mismo efecto. Sin embargo, debido al deterioro del ambiente, y a la conciencia que se ha formado con respecto a que los productos sintéticos pueden ser dañinos, existe una tendencia a volver a los productos naturales y al uso de hierbas medicinales (comunicación personal de Jorge Arancibia).

Una de las ciencias que se encarga del estudio de las plantas medicinales es la etnofarmacología, la cual es una ciencia interdisciplinaria, donde la observación en campo, la descripción del uso de los remedios tradicionales, la descripción botánica y los estudios fitoquímicos y farmacológicos, son parte de su trabajo. Es por ello que todo estudio etnofarmacológico se inicia en principio con la documentación del conocimiento tradicional del uso de las plantas medicinales en la comunidad de estudio y posteriormente se realiza una descripción y clasificación taxonómica de las plantas de interés (Andrade-Cetto, 1999).

Finalmente, y como uno de los principales objetivos de las investigaciones etnofarmacológicas, es la producción de fitomedicamentos hechos a partir de las plantas. Llamamos fitomedicamentos a todos aquellos medicamentos cuyos principios activos proceden exclusivamente plantas medicinales (Herrera-Arellano, 2003).

Es por medio de estos estudios etnofarmacológicos que se calcula que de las 260,000 especies de plantas que se conocen en la actualidad el 10% se pueden considerar medicinales, ya que éstas se encuentran recolectadas en los tratados médicos de fitoterapia, de épocas pasadas y modernos, por presentar algún uso. De estas plantas medicinales se han realizado diversos estudios sobre sus componentes, los cuales se centran en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano u otros animales (Hiriart, 2002). Los principales principios químicos de las plantas medicinales se pueden clasificar en los siguientes grupos: flavonoides, taninos, vitaminas, alcaloides, saponinas, minerales, aceites esenciales, glucósidos, sustancias amargas y mucílagos (Martínez, 2004).



Fig.1 *Cecropia obtusifolia* (Guarumbo). Las hojas se utilizan para el tratamiento de la diabetes.

Entre las plantas medicinales utilizadas en México se encuentra *Cecropia obtusifolia* comúnmente llamada guarumbo, chancarro, trompeta o trompetillo. Es un árbol perennifolio, de 20 a 25 m (hasta 35 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 50 cm. Las flores son de color crema y están agrupadas; presenta además una infrutescencia de verde amarillenta a pardo oscura; las semillas son muy pequeñas, de 1 a 2.8 mm de largo y 0.8 a 1.3 mm de ancho, cilíndricas, pardo brillantes. Las hojas son

grandes en forma de mano extendida (palmeada), están dispuestas en espiral y aglomeradas en las puntas de las ramas y tienen un jugo lechoso (Fig. 1). Son plantas dioicas (<http://www.conabio.gob.mx>). En la tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica de la planta.

Tabla I. Clasificación taxonómica de *Cecropia obtusifolia* (http://plants-usda.gov/cgi_bin/plant_profile.cgi?symbol=CEOB)

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
Superdivisión: Spermatophyta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Hamamelidae
Orden: Urticales
Familia: Cecropiaceae
Género: *Cecropia*
Especie: *Cecropia obtusifolia*

Es una especie originaria de América tropical con amplia área de distribución, se extiende desde el sur de México hasta el norte de Sudamérica. En selvas centroamericanas se puede encontrar a una altitud desde los 0 hasta los 800 m.s.n.m. Habita en climas cálidos, semicálidos y templados desde el nivel del mar hasta los 1500 m.s.n.m. Presente en vegetación perturbada derivada de bosque tropical caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio o perennifolio, algunas veces asociada a matorral xerófilo de cactáceas o cedros, en pastizal y bosque mixto de pino-encino (Argueta, 1994).

En México se encuentra en los estados de Chiapas, Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Quintana Roo, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Hidalgo, Veracruz, Yucatán, Guanajuato y Michoacán (Fig. 2). Se desarrolla tanto en suelos con buen drenaje como en aquellos con impedimentos de drenaje, tanto de origen volcánico, como sedimentario o metamórfico. Esta planta ha sido evaluada farmacológicamente y se reportan 30 usos medicinales y 23 compuestos químicos. Usos: antitusivo, antidiabético, afecciones nerviosas, antipirético, afecciones cardiacas, enfermedades hepáticas y pulmonares, asma, diurético, entre otros (<http://www.conabio.gob.mx>).



Fig. 2 Distribución de *Cecropia obtusifolia* (estados en color rosa) en la República mexicana.

En nuestro país se utiliza principalmente para el tratamiento de la diabetes. Como remedio a este padecimiento, se emplean las hojas secas las cuales son hervidas en agua, y posteriormente se filtran y se toman como agua de uso. La infusión fría es consumida durante todo el día o cuando la gente tiene sed (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Ya en el siglo XX, Maximino Martínez la indica como antidiabético, diurético, para padecimientos hepáticos, asma, corea, obesidad y verrugas (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2001).

El efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *C. obtusifolia* fue demostrado en ratones diabéticos (Pérez *et al.*, 1984), en ratas hiperglicémicas (Román-Ramos *et al.*, 1991) y en ratas diabéticas estreptozotonizadas (Andrade-Cetto *et al.*, 2000). También se ha demostrado experimentalmente que es hipolipémica e hipotensora en animales pancreatectomizados y con pancreatectomía y duodenotomía, lo que valida algunos de sus usos (Argueta, 1994). Estudios realizados con el extracto de *C. obtusifolia* han mostrado que presenta una baja toxicidad en ratas y ratones (Pérez *et al.*, 2001).

Por lo que se refiere a la fitoquímica de *C. obtusifolia*, Andrade-Cetto y Wiedenfeld (2001) han aislado (del extracto butanólico) isorientina y ácido clorogénico, los cuales son de gran importancia ya que están involucrados en el efecto hipoglucemiante. Además, se han aislado e identificado el estigmasterol y tres compuestos (dos de ellos isómeros): 4- etil -5-(n-3-valeroil)-6-hexahidrocumarina, y el 1-(2 -metil-1-nonen-8-il)-aziridina. Del extracto hexánico de la planta (en las hojas) se ha caracterizado el beta-sitosterol (Argueta, 1994).

En 1998 Alarcón y colaboradores reportaron que en México se utilizan cerca de 150 plantas con acción hipoglucemiante. Posteriormente Andrade-Cetto y Heinrich, en el 2005 estimaron que son cerca de 500 especies de plantas las utilizadas de manera tradicional en México para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

La diabetes

Islas y Revilla (2004) definen a la diabetes mellitus como “una enfermedad determinada genéticamente en la que el sujeto que la padece sufre alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, junto con una deficiencia relativa o absoluta en la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a ésta”.

La diabetes puede definirse como un síndrome, ya que comprende un grupo heterogéneo de padecimientos. En esta enfermedad, el organismo no produce insulina o no la produce en la cantidad necesaria. La insulina es una hormona (mensajero químico) segregada por el páncreas que controla la concentración en sangre de la glucosa, compuesto necesario como complejo energético en numerosas reacciones químicas. En una persona sana, la digestión de los alimentos aumenta la concentración de glucosa en sangre, lo cual estimula a las células β de los islotes pancreáticos a secretar la hormona insulina, que promueve la entrada de glucosa en diferentes tipos de células del organismo, denominadas células blanco (Fig. 3). Dentro de las células, la glucosa se aprovecha inmediatamente o bien se almacena, principalmente en el hígado,

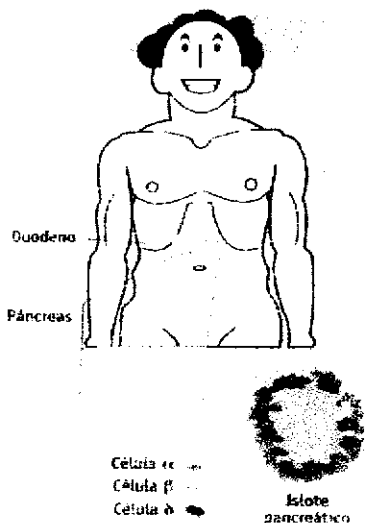


Fig. 3 Esquema del páncreas e islote pancreático (tomado de Ciencia, 2002)

en los músculos y en el tejido graso. Al entrar la glucosa en las células, su concentración en la sangre disminuye, y cesa por tanto el estímulo que inició la liberación de insulina. En una persona con diabetes mellitus, existe un desequilibrio en los mecanismos que controlan los niveles de glucosa en la sangre. Este defecto puede deberse a la falta total de insulina o bien, a que los tejidos que normalmente responden a la insulina dejan de hacerlo, es decir, se vuelven resistentes (Hiriart y Vidaltamayo, 2002).

Aspectos históricos de la diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad que ha estado presente desde tiempos muy antiguos. En 1862 George Ebers descubrió en Egipto un papiro, escrito aproximadamente en el año 1,550 a.C., en el cual se describe una enfermedad que se caracteriza por la abundante emisión de orina y recomienda para su tratamiento el uso de extractos de plantas (Figuerola, 1990). Posteriormente, el griego Areteus de Capadocia (30 a 90 d. C.) le dio el nombre de *diabetes*, que significa *sifón*. Se refirió a esta patología como una fusión de la carne y los miembros en la orina (Cahill, 1990). En el siglo II, Galeno señaló a los riñones como origen del trastorno, y que consistía en una excreción anormal de fluidos (Rodríguez, 2002).

La medicina árabe no fue ajena a las observaciones sobre la diabetes, así, describieron la *polidipsia*, la *poliuria* y la *polifagia* como los síntomas más importantes (Rodríguez, 2002). En la India (siglo VI), se reconoció la dulzura de la orina como señal de la enfermedad, característica que se incorporó a su nombre, pues el adjetivo *mellitus* viene del griego y significa *de miel*. No fue sino hasta la segunda mitad del siglo XIX cuando se avanzó en el estudio sobre

el páncreas y la insulina, lo que permitió empezar a entender la diabetes (Hiriart, 2002).

En el siglo XIX investigadores como Langerhans (1847-1888) y Minkowski (1858-1931) pusieron atención a los islotes pancreáticos y a su posible papel en el origen de la diabetes mellitus. Así, comprobaron que la extirpación del páncreas en perros inducía diabetes. En 1921 los trabajos de Banting y Best culminaron con el aislamiento de un extracto pancreático que denominaron *isletina* y que mostró ser eficaz para evitar la muerte en perros pancreatizados (Rodríguez, 2002).

Desde inicios del siglo XX empezaron a encontrarse evidencias de que algunos fármacos administrados por vía oral son capaces de reducir los niveles de glucosa. A partir del empleo de las biguanidas en 1926 y el posterior descubrimiento de los efectos hipoglucemiantes de algunas sulfamidas en 1944, hasta la actualidad, se han desarrollado distintos tipos de tratamientos antidiabéticos que han permitido ampliar notablemente las opciones de tratamiento en los diabéticos tipo 2 (Rodríguez, 2002).

No fue sino hasta fines del siglo XIX y durante el XX cuando se precisó la patología de la diabetes, y los laboratorios occidentales desarrollaron múltiples terapias (Barba de Piña, 2002). Es por ello que en México todos los remedios botánicos referentes a esta enfermedad son de reciente aparición (Andrade-Cetto, 1995). A pesar de que en México no se ha encontrado alguna referencia directa de la enfermedad en escritos antiguos, se cree que los síntomas de la enfermedad si eran conocidos por las civilizaciones antiguas, quienes reconocían como tales al aumento en el número de orinas al día, la sed y el hambre constante (Aguilar y Xolalpa, 2002).

Posteriormente el dulzor en la orina y, por consiguiente en la sangre, se convirtió en la característica del padecimiento y la base para la identificación de muchas de las plantas que fueron utilizadas para su atención. Así, la población mexicana empezó el proceso de ensayo de innumerables plantas para el

tratamiento, y descubrió algunas variantes que han resultado eficaces en el tratamiento popular de la diabetes (Aguilar y Xolalpa, 2002).

Para el primer tercio del siglo XX, el profesor Maximino Martínez, en su libro *plantas medicinales de México*, cita para la diabetes las plantas de cuajilote, damiana, eucalipto, matarique y tronadora. A mediados de siglo, el doctor Luis G. Cabrera recomienda además el aguacate. Poco a poco van aumentando las investigaciones científicas de las plantas mexicanas hipoglucemiantes, y el Instituto Nacional Indigenista cita muchas más: *Acrocomia mexicana* (cocoyol); *Allium sativum* (ajo); *Brickellia* (prodigiosa); *Capraria biflora* (claudiosa o lengua de gallina), *Cecropia obtusifolia* (guarumbo); *Coix lachryma-Jobiria gaumeri* (elemuy); *Larea tridentata* (gobernadora); *Malmea depressa* (nazareno prieto) y *Tecoma stans* (tronadora) (Barba de Piña, 2002).

En los años 70's a partir del registro etnobotánico del nopal (*Opuntia sp.*), con el trabajo de Ibáñez (1978), en el Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, se le da un nuevo impulso al estudio de las plantas con acción hipoglucemiante. La última década del siglo XX ofrece los trabajos farmacológicos de Román y colaboradores (1992), Alarcón y su grupo (1993) y Andrade-Cetto y colaboradores (2000) y en el aspecto de nuevos registros etnobotánicos de especies de acción hipoglucemiante se tiene el de Aguilar y colaboradores (1994) (Aguilar y Xolalpa, 2002).

En 1995 la Organización Mundial de la Salud (WHO) calculó que había 135 millones de diabéticos en el mundo y que este número podría duplicarse para el 2025 (López y López, 1998). Los 10 países con mayor número de personas con diabetes mellitus (DM) son la India (3.7 millones), China (20.7 millones), Estados Unidos de América (17.7 millones), Indonesia (8.4), Japón (6.7 millones), Pakistán (4.3 millones), Federación Rusa (4.5 millones), Brasil (4.5 millones, Italia (4.2 millones) y Bangla Desh (3.1 millones) (WHO, 2005).

Clasificación de la diabetes

En 1979, el National Diabetes Data Group (NDDG), de los institutos nacionales de salud en Estados Unidos, publicó la clasificación de la diabetes mellitus. Posteriormente en mayo de 1995 la Asociación estadounidense de Diabetes efectuó cambios en el diagnóstico y clasificación de esta enfermedad, donde se distinguieron 4 tipos diferentes: 1) diabetes tipo 1 (destrucción de células betas); 2) diabetes tipo 2 (puede caracterizarse desde predominantemente resistencia a la insulina con deficiencia relativa de insulina a un defecto secretor con resistencia a la insulina); 3) otros tipos específicos (relacionados a trastornos en el metabolismo de la glucosa) y 4) diabetes gestacional (aparece en 2% a 5% de las mujeres embarazadas durante el tercer trimestre de embarazo pero desaparece al término del embarazo) (Islas y Revilla, 2004; WHO, 1999).

La nueva clasificación contiene etapas que reflejan los diversos grados de hiperglucemia en individuos con alguno de los procesos de la enfermedad que pueden provocar la diabetes mellitus. Todas las personas con diabetes mellitus pueden ser clasificados de acuerdo con su etapa clínica, y ésta clasificación puede asignarse en todas las circunstancias. La etapa de glucemia puede cambiar con el tiempo dependiendo de la existencia de los procesos debidos a la enfermedad (WHO, 1999).

En la diabetes tipo 1, también llamada juvenil, el sistema inmune destruye las células que secretan la insulina, lo que produce deficiencia de insulina, y hace necesario que se inyecte esta hormona de manera regular. La diabetes tipo 2, denominada también Diabetes mellitus no Insulinodependiente (DMNI), es el tipo de diabetes más frecuente, de hecho, el 90% de las personas diabéticas tienen este tipo de enfermedad. Aparece en edades superiores a 35-40 años y afecta con mayor frecuencia a individuos obesos. Lo que sucede en este tipo de diabetes es que, las células del hígado, del tejido graso y de los músculos, entre otros, dejan de responder apropiadamente a la insulina (debido a la disminución o al mal funcionamiento de los receptores de insulina en las

células blanco), lo cual se conoce como resistencia a la insulina. Esto ocasiona que el nivel de glucosa en la sangre permanezca siempre alto, estimulando a las células beta a secretar insulina incesantemente, hasta que estas células dejan de producirla en cantidades suficientes (Hiriart, 2002). El efecto resultante es una incapacidad para la biotransformación normal de la glucosa y un aumento en su producción por parte del hígado, lo que produce una elevación de los niveles de glucosa en sangre (Rodríguez, 2002).

La diabetes tipo 2 es también una enfermedad hereditaria, pero a diferencia de la diabetes tipo 1, los factores genéticos son de mayor peso que los ambientales, ya que, se ha visto que la tendencia familiar llega a ser del 60 al 90 % (Guillén, 2002).

Según resultados de la Encuesta Nacional de Salud realizada en el 2000, el papel de la genética en el desarrollo de la diabetes es de gran importancia, lo que sugiere que los mexicanos tenemos una alta predisposición genética a padecer esta enfermedad. También esta encuesta mostró que la proporción de sujetos con diabetes mellitus es de dos a cinco veces más elevada en los grupos de personas con antecedentes familiares de diabetes que en los grupos que no presentan esa característica (Hernández y Olaíz, 2002).

No queda duda que los factores genéticos son muy importantes para el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, existen varios factores ambientales que pueden desencadenar la diabetes mellitus en sujetos con o sin predisposición genética.

Para que la diabetes se desarrolle en un individuo deben cumplirse dos condiciones: 1) existir predisposición genética, y 2) haber exposición a distintos factores ambientales, tales como: la edad, los embarazos continuos, el empleo de ciertos medicamentos o la ingestión fuerte de grasas (Tusié, 2002), así como a la hipertensión (Más de 140/90 mm de mercurio -Hg- o dislipidemia), la obesidad (Peso mayor al 120% del peso recomendable -cierto para aproximadamente el 90% de los pacientes con diabetes tipo 2-) y el sedentarismo (Votey y Peters, 2005).

Uno de los problemas en el estudio de la genética de la diabetes es que en la mayoría de los pacientes y las familias afectadas, el padecimiento es resultado de la alteración de múltiples genes, y sólo en algunas formas poco frecuentes, como la llamada “diabetes juvenil tipo adulto”, la diabetes se debe a la alteración de un único gen.

Al tratarse de una enfermedad multifactorial, los genes que participan en el desarrollo de la misma (los llamados diabetogenes) tienen efecto parcial, es decir, ninguno de ellos por sí solo es suficiente para que la diabetes se desarrolle; por tanto la acción o la no función de ciertos genes podría predominar, siendo su efecto más importante que el de otros. Pero, sólo la suma estos defectos, en ciertas combinaciones, dan la susceptibilidad genética, lo que determinará el desarrollo de la enfermedad, siempre y cuando existan los factores de riesgo (ambientales) que promuevan su expresión (Tusié, 2002).

La diabetes tiene una importancia socioeconómica enorme, ya que se trata de un padecimiento crónico e incurable. Los pacientes pueden desarrollar una variedad de complicaciones que los incapacitan permanentemente, como ceguera o amputación de miembros, insuficiencia renal crónica provocando esta última, la muerte (Tusié, 2002).

La diabetes mellitus representa la principal demanda de atención médica y una de las causas más importantes de hospitalización en México. Solamente en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se registran cada año cerca de 180 mil nuevos casos y se otorgan más de 5 millones de consultas relacionadas a esta enfermedad (Hernández y Olaíz, 2002).

Los casos de diabetes mellitus en la población mexicana han aumentado más de treinta veces durante los últimos 50 años. En 1955 por ejemplo, se registraron 1500 muertes por esta enfermedad, y en el 2000, más de 47 mil (Hernández y Olaíz, 2002).

Frecuentemente la diabetes pasa desapercibida debido a que sus síntomas aparentan ser inofensivos, o en ocasiones estos no se presentan (Tabla 2). Muchos pacientes con diabetes tipo 2 son asintomáticos, y su padecimiento permanece sin diagnosticar por varios años. Diversos estudios sugieren que los pacientes a los que se les acaba de diagnosticar diabetes tipo 2 ya han padecido esta enfermedad desde hace al menos entre 4 y 7 años (en promedio) antes de que se les detectara (Votey y Peters, 2005). Nuevos estudios indican que la detección temprana de los síntomas de la diabetes y su tratamiento pueden disminuir la posibilidad de desarrollar las complicaciones de la diabetes (A.D.A., 2004).

Usualmente antes de que se diagnostique como tal a la diabetes mellitus, los pacientes presentan el llamado síndrome metabólico (SM). Chávez y colaboradores (2004) definen este síndrome como “una enfermedad que engloba a distintas entidades que comparten como eje fisiopatológico la obesidad y la resistencia a la insulina”. También es característico del SM la presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas, y el incremento en las concentraciones de ácido úrico. La gran trascendencia del síndrome metabólico radica en que las personas que lo padecen presentan un riesgo elevado de sufrir enfermedades cardiovasculares y diabetes (Acosta y Escalona, 2005). Cuando la diabetes ya es diagnosticada, los pacientes pueden presentar diversos síntomas (Tabla 2).

Tabla 2. Síntomas de la diabetes tipo 2. Los 4 primeros son los más característicos.

- Poliuria: orina frecuente, y en grandes cantidades.
- Polidipsia: sed excesiva.
- Polifagia: hambre excesiva a toda hora.
- Sensación de cansancio.

Cambios repentinos en la visión, o visión borrosa.

Náuseas y vómitos.

Infecciones frecuentes, generalmente en las encías u orina.

Hormigueo, entumecimiento en manos y pies.

Picazón en la piel y genitales.



Por lo dicho anteriormente, es indispensable realizar investigaciones que ayuden a entender y controlar mejor esta enfermedad, ya que, se estima que en la actualidad existen 100 millones de personas en el mundo que padecen diabetes, y se calcula que por cada persona que se sabe diabética existe otra que la padece y que no lo sabe (Tusié, 2002).

Inducción de aberraciones cromosómicas por agentes químicos y físicos.

Las aberraciones cromosómicas son modificaciones que dan lugar a variaciones en el número de cromosomas concretos así como a reordenamientos del material genético dentro o entre cromosomas (Klug y Cummings, 1999). Las aberraciones cromosómicas pueden producirse de manera espontánea, o bien, ser inducidas por agentes físicos o químicos.

Entre los agentes químicos se encuentran los siguientes (Miller y Therman, 2001):

- Antibióticos/ citostáticos (Bleomicina).
- Oxipurinas metiladas (Cafeína, teobromina, teofilina).
- Agentes alquilantes (Mostazas nitrogenadas y de azufre, metil y etil metanosulfonato, nitrosoguanidina).
- Agentes intercalantes (Profavina, naranja de acridina, mostaza de quinacrina, rojo neutro).
- Análogos de purinas y pirimidinas (2-aminopurina, 5-bromouracilo).
- Disolventes orgánicos industriales (Benceno, tolueno, tñer).
- Compuestos nitrosados (Acido nitroso).
- Metales (Arsénico, cromo).
- Aminas aromáticas.

Los agentes físicos son las radiaciones ya sean radiaciones ionizantes (rayos X, radiación alfa) o radiaciones no ionizantes (radiación ultravioleta).

El estudio de las aberraciones cromosómicas inducidas por agentes físicos y químicos tiene un significado biológico importante, ya que: 1) constituye un indicador de exposición a agentes genotóxicos y mutágenos, los cuales pueden estar presentes en el ambiente o bien puede tratarse de una exposición ocupacional o médica (Solans y Hernández, 1994). También, en enfermedades congénitas que además implican la predisposición a ciertos tipos de cáncer, como son el Síndrome de Bloom, la ataxia telangectasia y la anemia de Fanconi, se ha observado una mayor frecuencia de formación de aberraciones cromosómicas espontáneas así como una hipersensibilidad al efecto de los agentes clastógenicos (Russell, 1998).

Estos estudios se llevan a cabo utilizando sistemas biológicos de prueba, los cuales tienen el propósito de evaluar los efectos producidos por agentes físicos y químicos en organismos de bioensayo. Las características que debe tener todo sistema de prueba son de forma general la sensibilidad y su reproducibilidad. La sensibilidad se refiere a la capacidad del sistema para detectar con facilidad y precisión estadística un pequeño efecto mutagénico inducido. La reproducibilidad implica la similitud de respuesta de un sistema en y entre laboratorios.

Los diferentes sistemas de prueba deben detectar todo tipo de mutaciones, aunque no necesariamente de manera simultánea. Estas mutaciones son: 1) las mutaciones génicas; 2) las alteraciones en la integridad del DNA; 3) los cambios en la segregación cromosómica y 4) los cambios en la integridad cromosómica o estructural. Aunque en la actualidad existen más de 150 sistemas de prueba, solamente se emplean unos pocos para evaluar agentes químicos ambientales. Entre los más utilizados están:

1) *Prueba microsomal*. Tecnología *in vitro* que permite la activación de promutágenos en presencia de organismos indicadores (como *Salmonella*).

2) *Ensayo de micronúcleos*. Los fragmentos cromosómicos o cromosomas con centrómero inactivado no se incorporan a las células hijas.

3) *Prueba del locus específico*. Método para detectar y medir las proporciones de mutación en un *locus* recesivo.

4) *Daño al DNA*. Detecta rompimientos en una hebra, ligamientos cruzados inter o intrabanda, y otros.

5) *Reparación del DNA*. Rastrea la reparación del DNA.

6) *Inhibición del DNA*. Detecta la inhibición en la síntesis del DNA.

7) *Recombinación mitótica*. Pérdida de la heterocigosis y recombinación intragénica.

8) *Análisis citogenético*. Células o líneas celulares en cultivo para determinar aberraciones cromosómicas.

9) *Intercambio de cromátidas hermanas*. Detecta el intercambio de DNA en cromosomas en metafase entre los productos de réplica en *loci* homólogos.

10) *Prueba de letales dominantes*. Mide los cambios genéticos inducidos de manera dominante, que matan al cigoto. En mamíferos, la reducción en el tamaño de la camada, midiendo y contando el número de implantes que sobreviven (Rodríguez-Arnaiz, 1995).

Ensayo de Micronúcleos

En citogenética humana, el ensayo de genotoxicidad más empleado es el ensayo de micronúcleos (MN).

Durante los años 1930 y 1940 un número de citogenetistas pioneros describieron la ocurrencia de micronúcleos en diversas muestras con exposición a radiación X (ocuparon neuroblastos de saltamontes y meristemos apicales de cebolla). Esta inducción de daño cromosómico seguido de la exposición a radiación ionizante fue un tópico interesante para los genetistas y citogenetistas desde la demostración de efectos mutagénicos por radiación en *Drosophila melanogaster* y *Zea mays*. Fue desde entonces que el estudio de

mutagénesis y genotoxicidad por medio del ensayo de micronúcleos empezó a cobrar importancia. Rieger en 1968 definió el término de micronúcleo como un núcleo separado y adicional al núcleo de la célula, producido durante la telofase de la mitosis o meiosis por un rezago cromosómico o por un fragmento cromosómico derivado espontáneamente o inducido experimentalmente (Evans, 1997).

El ensayo de micronúcleos (MN) en cultivo de linfocitos de sangre periférica permite detectar aberraciones cromosómicas y también permite detectar tanto agentes clastogénicos (que rompen cromosomas), así como aneuploidogénicos (que afectan el huso mitótico) (Eastmond y Tucker, 1989).

La formación de micronúcleos se da por la condensación de fragmentos de cromosomas acéntricos o por cromosomas completos, los cuales tuvieron un rezago durante la etapa de anafase y por consecuencia son excluidos del reparto cromosómico en las células hijas, y forman pequeños núcleos o micronúcleos (Ramírez y Cuenca, 2000) (Fig. 4).

Este método es aplicable a varios tipos celulares por lo que se han realizado diversos estudios sobre de la frecuencia de micronúcleos en poblaciones humanas que han estado expuestas a radiación ionizante, pesticidas y compuestos químicos industriales, entre otros (Fenech, 2005).

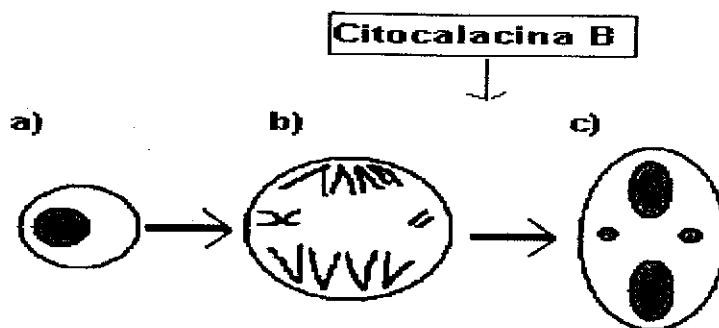


Fig. 4 Mecanismos de formación de micronúcleos en células binucleadas (por la adición de la citocalasina B): a) Célula mononucleada; b) Anafase con un fragmento acéntrico y un cromosoma entero que no se incorporaron a los polos y c) Célula binucleada con dos micronúcleos.

Las ventajas de utilizar este tipo de ensayo son, entre otras, que es sencillo, rápido, reproducible, capaz de estimar el rezago mitótico, apoptosis y además se pueden obtener un gran número de células. La desventaja de éste, es que no puede detectar todas las aberraciones cromosómicas estructurales (sólo fragmentos acéntricos).

Un importante paso en el desarrollo y perfeccionamiento del ensayo de micronúcleos fue el reconocimiento de que éste, puede dar datos confiables si se escogen MN que estén en células que hayan completado una división nuclear por medio del bloqueo de la citocinesis usando **citocalasina B**, la cual detiene la división del citoplasma (o citocinesis) sin inhibición de la división nuclear, lo que permite a tales células ser reconocidas como células binucleadas (Fenech *et al.*, 1999). La citocalasina B (a una concentración de 3.0 microgramos/ml) por sí sola no interviene en la producción de MN, lo que valida su uso en este ensayo (Fenech y Morley, 1985).

Este método de bloqueo de la citocinesis con citocalasina B fue desarrollado por Fenech y Morley en 1985 y al ser combinado con el ensayo de micronúcleos en células en interfase, constituye una excelente herramienta para detectar aberraciones cromosómicas tanto en células en división como en no división (Kirsch-Volders, 1997).

Criterios utilizados para el registro de células con micronúcleos.

1. Deben ser células binucleadas (se vuelven binucleadas al agregar citocalasina B).
2. Los dos núcleos de la célula binucleada tienen que tener su membrana nuclear intacta y además éstos tienen que encontrarse dentro del citoplasma de la célula.
3. Los dos núcleos de la célula binucleada tienen que tener aproximadamente el mismo volumen y tamaño.
4. Los dos núcleos pueden estar unidos por un fino puente de nucleoplasma, pero éste no debe ser más ancho que una cuarta parte del diámetro del núcleo.

5. La membrana que rodea al citoplasma debe verse intacta, es decir, que se distinga a la célula como una unidad (Fig. 5 y 6) (Fenech *et al.*, 2002).

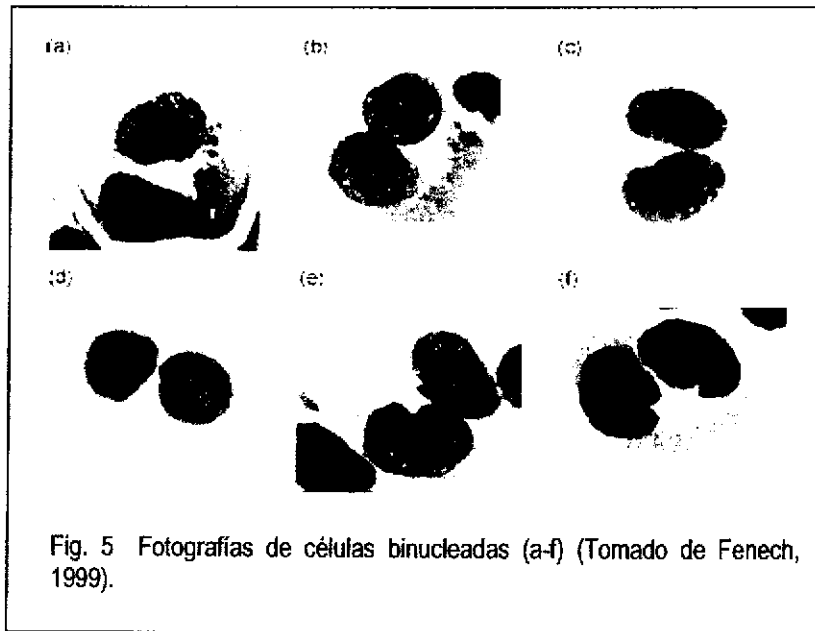


Fig. 5 Fotografías de células binucleadas (a-f) (Tomado de Fenech, 1999).

Las células mononucleadas con micronúcleos pueden ser consideradas en el registro de micronúcleos, ya que indican daño en el DNA que estaba presente en las células antes de que ellas fueran expuestas al tratamiento, mientras que células binucleadas pueden contener también MN pre-existentes así como MN expresados durante el tiempo de cultivo como resultado de rompimientos cromosómicos acumulados durante la fase *Go in vivo*. El conteo de MN en células mononucleadas y en células binucleadas puede asegurar que todos los eventos de daño al DNA expresados como MN sean registrados (Fenech *et al.*, 1999).

Criterios para analizar los micronúcleos

1. Los micronúcleos son morfológicamente más pequeños que el núcleo.
2. El diámetro del micronúcleo en linfocitos humanos usualmente varía entre $1/6$ y $1/3$ de la media del diámetro del núcleo.

3. Los micronúcleos tienen que ser redondos u ovalados de preferencia.
4. Los micronúcleos no deben estar unidos a los núcleos de la célula binucleada.
5. Usualmente los micronúcleos están más intensamente teñidos que los núcleos (Fenech *et al.*, 2002).

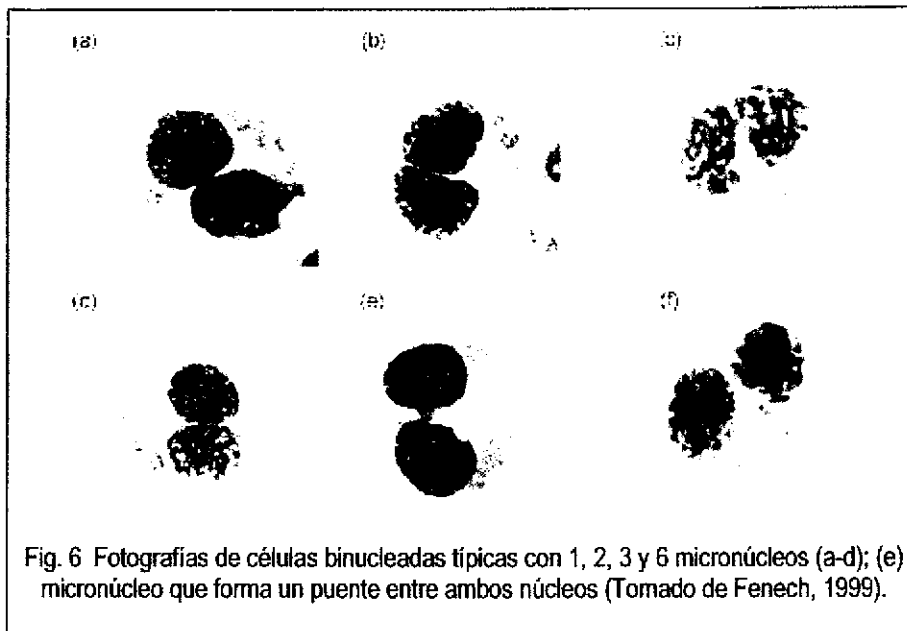


Fig. 6 Fotografías de células binucleadas típicas con 1, 2, 3 y 6 micronúcleos (a-d); (e) micronúcleo que forma un puente entre ambos núcleos (Tomado de Fenech, 1999).

El presente trabajo forma parte de un proyecto de investigación que se lleva a cabo en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la UNAM, y tiene como propósito contribuir a las investigaciones realizadas con plantas medicinales en el tratamiento de la diabetes mellitus.

JUSTIFICACIÓN

El mundo recibe al siglo XXI con una enfermedad que algunos ya catalogan como una epidemia: la diabetes mellitus. Esta enfermedad se puede definir como un conjunto de padecimientos caracterizados por altos niveles de glucosa en sangre.

Es una enfermedad tan común en nuestro país, que prácticamente todos tenemos un familiar, amigo o conocido que la padece. Por tanto, es natural que la población mexicana busque algunas opciones terapéuticas (además de la atención médica) que puedan ayudar a controlar los síntomas de la diabetes y que además, disminuyan los efectos secundarios.

Es aquí donde entra a escena la herbolaria (la ciencia y arte de las plantas medicinales), que se ha convertido en una de las opciones que los pacientes han tomado para tratar su enfermedad. Esta medicina tradicional representa un recurso de gran importancia en nuestro país, debido a que se cuenta con una gran variedad de plantas medicinales, de las cuales se han realizado varios estudios fitoquímicos para encontrar sus posibles principios activos.

Es así como surge la etnofarmacología definida como la observación, identificación, descripción e investigación experimental de los efectos de las drogas utilizadas en la medicina tradicional (Schultes, 1991). Tiene como principal objetivo, el rescatar, a través de la documentación, ésta herencia cultural antes de que se pierda.

Por esto, el presente trabajo tiene como propósito contribuir a las investigaciones realizadas con plantas medicinales como opción terapéutica en la enfermedad de la diabetes mellitus; mediante el estudio genotóxico inducido por el extracto de *Cecropia obtusifolia*, planta medicinal empleada para este padecimiento, y en la que se ha demostrado experimentalmente su acción hipoglucemiante, hipolipémica e hipotensora en animales de laboratorio.

Para determinar el efecto genotóxico de una sustancia, uno de los ensayos más utilizados en citogenética humana es el ensayo de micronúcleos (MN) en cultivos de linfocitos de sangre periférica, que permite detectar dos tipos de eventos genéticos: los rompimientos cromosómicos y las que afectan el huso mitótico.

Este ensayo se ha realizado en poblaciones humanas que han estado expuestas a radiación ionizante, pesticidas, compuestos químicos industriales; y también se ha utilizado para evaluar otros mutágenos ambientales.

Las ventajas de utilizar este tipo de ensayo son, entre otras, que es sencillo, rápido, reproducible, capaz de estimar el rezago mitótico y la apoptosis; además de que se puede obtener un gran número de células. La desventaja, es que no puede detectar todas las aberraciones cromosómicas estructurales (sólo fragmentos acéntricos).

Los resultados de este trabajo permitirán evaluar la pertinencia o no de este tratamiento para el control de la diabetes mellitus tipo 2.

HIPÓTESIS

El extracto de *Cecropia obtusifolia* administrado a pacientes con diabetes mellitus tipo 2 no tiene un efecto genotóxico monitoreado por el aumento en la frecuencia de micronúcleos.

El extracto de *C. obtusifolia* administrado a pacientes con diabetes mellitus tipo 2 no tiene un efecto citostático monitoreado por el incremento en el índice de proliferación de la citocinesis bloqueada.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto genotóxico y citostático del extracto de *Cecropia obtusifolia* en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, por medio del ensayo de micronúcleos.

Objetivos particulares

1. Determinar si el extracto de *Cecropia obtusifolia* tiene efecto genotóxico en los linfocitos de los pacientes a los que se les suministró.
2. Determinar si el extracto de *Cecropia obtusifolia* tiene efecto citostático en los linfocitos de los pacientes a los que se les suministró.
3. Con base en los resultados derivados de los dos objetivos anteriores, determinar si el extracto de *Cecropia obtusifolia* puede ser considerado como un buen candidato para ser usado como fitomedicamento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupos de estudio:

- Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que estén bajo tratamiento con el extracto de *Cecropia obtusifolia*, provenientes del Centro Médico Nacional Siglo XXI.
 - Los pacientes toman 13.5g diarios de *C. obtusifolia* (en forma de té). Cada paciente empezó el tratamiento de forma independiente, por lo que

el tiempo que habían estado tomando el extracto antes de la primera muestra varía de paciente a paciente desde 0 días hasta 145 días (Tabla 3).

- Muestra control de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que no estén bajo tratamiento con *Cecropia obtusifolia* (Tabla 4).
- Muestra control de personas sanas (Tabla 4).

Tabla 3. Grupo de estudio: 7 pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Paciente	Edad	Sexo	Fecha inicio tratamiento	Fecha primera muestra
LMM	58	Femenino	19-09-03	28-11-03
RSS	49	Masculino	19-09-03	28-11-03
LQH	48	Masculino	31-10-03	28-11-03
RLR	42	Femenino	24-10-03	20-01-04
AHM	58	Femenino	12-09-03	20-01-04
GLA	59	Femenino	24-10-03	20-01-04
RRC	56	Masculino	02-02-04	02-02-04

Tabla 4. Grupo control: 6 pacientes diabéticos y 2 personas sanas, todos sin tratamiento de *C. obtusifolia*.

Paciente	Edad	Sexo
CONTROLES DIABÉTICOS		
RII	74	Masculino
EPN	70	Femenino
All	63	Masculino
NLR	58	Femenino
OBR	48	Masculino
ABM	41	Masculino
CONTROLES SANOS		
CEIA	22	Masculino
VMT	23	Femenino

Obtención de la muestra

Las muestras fueron de sangre periférica las cuales se obtuvieron por venopunción y se utilizó como anticoagulante heparina de 1000 unidades. Las muestras fueron rotuladas y posteriormente procesadas para la prueba de micronúcleos.

Procesamiento de las muestras

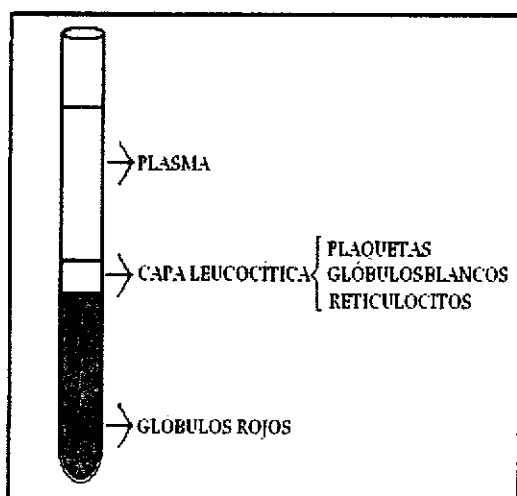


Fig. 7 Obtención de las fracciones sanguíneas por centrifugación de sangre anti-coagulada (Tomado de Morán, 2001).

Las muestras se separaron por el método de "obtención de las fracciones sanguíneas" con el fin de obtener la fracción de células nucleadas. Todas las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 30 min., con lo cual se obtuvieron tres capas principales (Fig. 7). La capa leucocítica se aspiró con cuidado por medio de una pipeta Pasteur estéril.

TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS

Siembra:

- (1) Se limpió el área de trabajo (campana de flujo laminar) con alcohol.
- (2) Se sembraron dos tubos por paciente. A uno de ellos, que fungirá como control positivo se le agregó mitomicina C (MMC)* a una concentración 80ng.
- (3) El otro tubo se procesó sin el mutágeno. Se utilizaron tubos de plástico estériles de 10 ml de capacidad con fondo cónico en los cuales se agregó 5 ml de medio McCoy 5A Gibco (suplementado con 2.5ml de fitohemaglutinina Gibco y 1ml de antibiótico penicilina-estreptomicina Gibco para 100 ml de medio).
- (4) Al medio de cultivo se adicionaron los leucocitos que se obtuvieron de la centrifugación.

- (5) Posteriormente se taparon los tubos y se resuspendieron. Los cultivos se incubaron a 37°C.
- (6) A las 24 hrs. después de la siembra, se adicionó 0.2 ml de Mitomicina C, Sigma [80 ng] (a un tubo de cada paciente) y se incubó a 37° C.
- (7) A las 44hrs se adicionó a todos los cultivos 0.3 ml de citocalasina B, Sigma [3mg/ml].
- (8) A las 72 hrs. se procedió á a realizar la cosecha de todos los cultivos.

Cosecha:

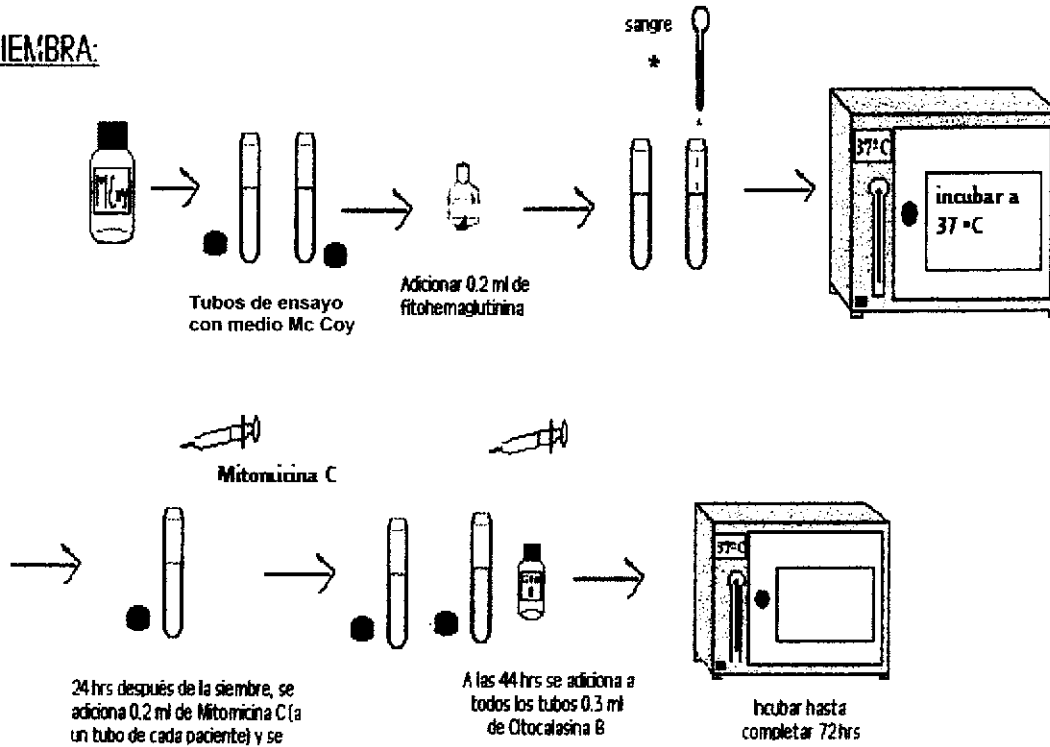
- (1) Se sacaron los cultivos de la incubadora y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min.
- (2) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular.
- (3) Se agregó solución hipotónica fría (4 °C) por 5 minutos.
- (4) Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos.
- (5) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1ml de fijador a 4°C (metanol, Merck y ácido acético glacial, Merck. 3:1).
- (6) Se centrifugó a 500 rpm.
- (7) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en pocas gotas de fijador.

Preparación de laminillas: con ayuda de una pipeta Pasteur, se resuspendió el botón celular y se goteo la suspensión celular en un portaobjetos limpio y seco, se dejó secar al aire, y se tiñó con Giemsa (Merck) por 3 minutos. Finalmente las preparaciones se analizaron en un microscopio óptico marca Nikon con objetivo 40 X. En la Fig. 8 se muestra un diagrama con la metodología empleada.

* La mitomicina C que se extrae de *Streptomyces caesipitosus* tiene propiedades de antibiótico y de agente antitumoral. Se emplea en el tratamiento de adenocarcinomas, leucemia mielocítica crónica y en la enfermedad de Hodgkin. Este antibiótico requiere ser metabolizado, y el producto electrofílico actúa como agente alquilante monofuncional o bifuncional, por lo tanto se une covalentemente al DNA produciendo ligamientos cruzados intra e interbanda, especialmente en el O⁶ de la guanina.

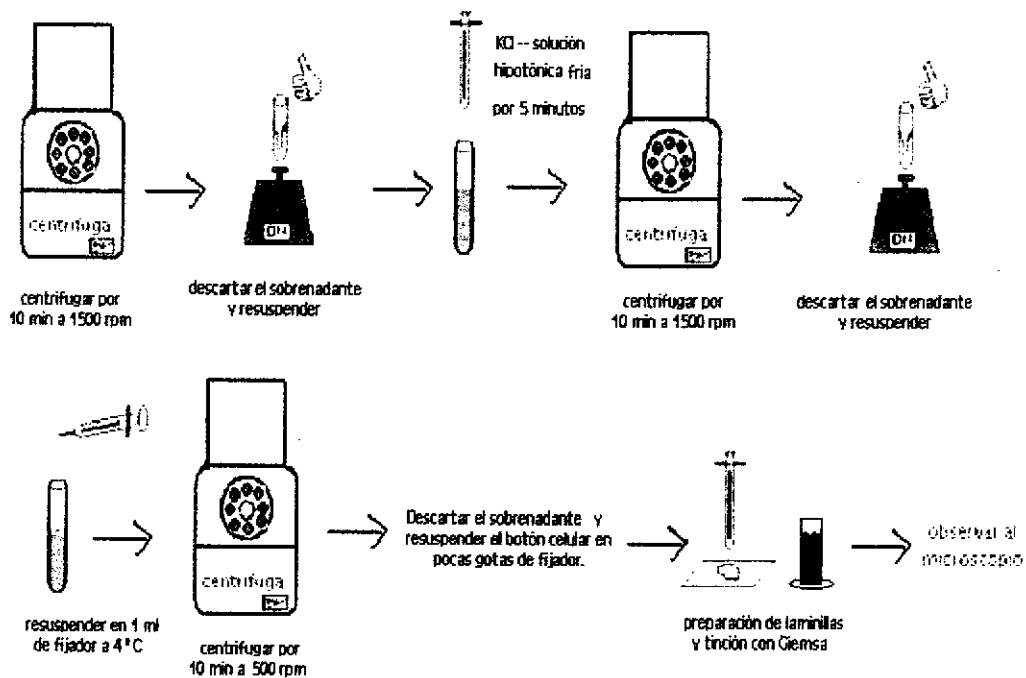
A)

SIEMBRA:



B)

COSECHA



* leucocitos que se obtuvieron de la centrifugación

Fig.8 Metodología para realizar el ensayo de micronúcleos. A) siembra y B) cosecha.

Análisis de los resultados

Por cada muestra del paciente se analizaron 2000 células binucleadas, para el registro de micronúcleos, (1000 sin MMC y 1000 con MMC).

Se cuantificó el número de micronúcleos (0,1, 2, 3, 4, 5 > 6) por célula y el número de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas presentes en las preparaciones. Esto último, para obtener el índice de proliferación de la citocinesis bloqueada (CBPI); el cual se obtiene con base en la siguiente fórmula:

$$CBPI = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4 + 5M_5}{N}$$

Donde M_1 - M_5 indica el número de células con 1-5 núcleos y N el número total de células analizadas.

Análisis estadístico

Para evaluar la distribución de los micronúcleos en las células binucleadas se utilizó la prueba de Kruskal Wallis y la Prueba de hipótesis: Diferencia entre las proporciones de dos poblaciones (estadístico Z), ambas con un nivel de significancia de 0.05.

+ Kruskal Wallis

Donde:

n_j = el número de elementos de la muestra j .

R_j = la suma de rangos de todos los elementos en la muestra j

K = en número de muestras

n = $n_1+n_2+n_3+\dots+n_k$, el número total de observaciones en todas las muestras

$$K = \frac{12}{n(n+1)} \sum \frac{R_j^2}{n_j} - 3(n+1)$$

+ Prueba de hipótesis (estadístico Z)

Donde:

$$Z = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{\frac{pq}{n_1} + \frac{pq}{n_2}}}$$

P_1 = proporción de la muestra de éxito del grupo 1

P_2 = proporción de la muestra de éxito del grupo 2

n_1 = tamaño de la muestra del grupo 1

n_2 = tamaño de la muestra del grupo 2

q_1 = proporción de la muestra de fracasos en el grupo 1

q_2 = proporción de la muestra de fracasos del grupo 2

Para el índice de proliferación (CBPI) se utilizó la prueba t de Student con un nivel de significancia de 0.05.

+ t de Student

Donde:

$$T = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma_p \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

\bar{X}_1 = valor promedio del grupo 1

\bar{X}_2 = valor promedio del grupo 2

σ_p = desviación estándar de ambos grupos

N_1 = tamaño de la muestra del grupo 1

N_2 = tamaño de la muestra del grupo 2

RESULTADOS

El ensayo de micronúcleos permite determinar el efecto genotóxico y citostático de agentes mutagénicos. Se realizó en linfocitos de sangre periférica de los tres grupos de estudio. Todas las muestras fueron sometidas a las mismas condiciones experimentales y analizadas bajo los mismos criterios.

En la tabla 5 se indica el número de muestras totales de los pacientes tratados con *Cecropia obtusifolia*, así como el número de muestras reales (las que se tomaron en cuenta para este trabajo). Se observa también el número total de células binucleadas analizadas.

Tabla 5. Grupo de estudio: 7 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que están bajo tratamiento de <i>C. obtusifolia</i>, provenientes del Centro Médico Siglo XXI.			
Pacientes	Número de muestras totales	Número de muestras reales	Número de células binucleadas analizadas
LMM	6	4	8,000
RSS	4	3	4,626
LQH	6	4	7,000
RLR	5	3	6,000
AHM	4	3	6,000
GLA*	1	1	2,000
RRC	5	1	2,000
TOTAL	31	19	35, 626

Por cada toma se analizaron 1000 células binucleadas con MMC y 1000 sin MMC

En las tablas 6 y 7 se presentan las muestras de los controles diabéticos y de los controles sanos, en donde también se ve el número de células binucleadas analizadas. En este caso sí se pudieron tomar en cuenta todas las muestras.

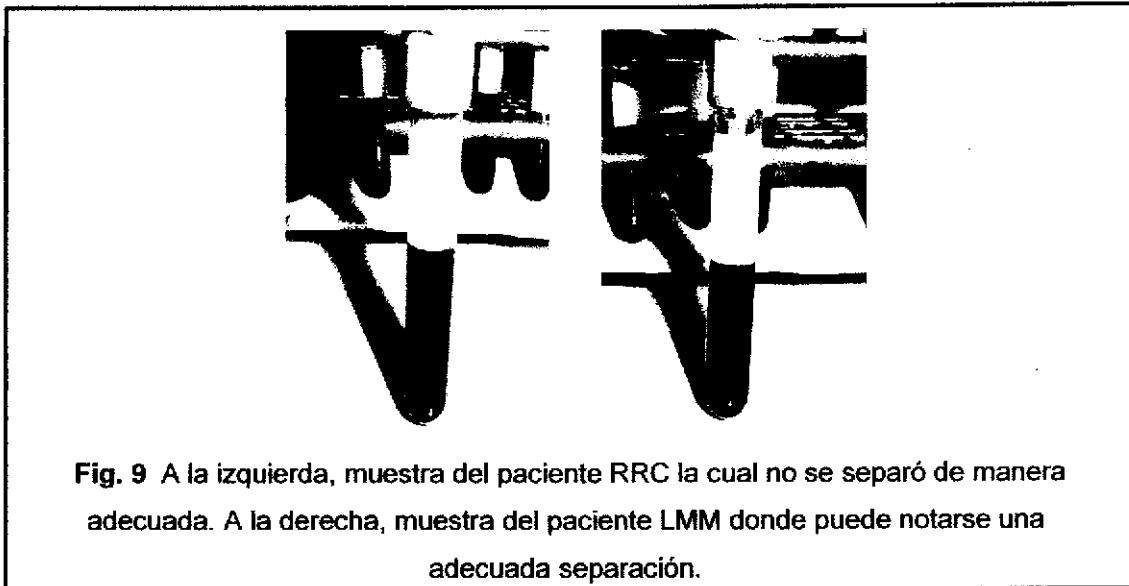
Tabla 6: Controles diabéticos: 6 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 sin tratamiento.		
Controles diabéticos	Número de muestras	Número de células binucleadas analizadas
RI	2	4,000
EP	2	4,000
AI	2	4,000
NLR	2	4,000
OBR *	1	2,000
ABM *	1	2,000
TOTAL	10	20,000

* De los pacientes GLA (Tabla 5), OBR y ABM (Tabla 6) se obtuvo una única muestra debido a que sólo se presentaron una vez a la toma de sangre, es decir abandonaron el estudio con el tratamiento de *C. obtusifolia*.

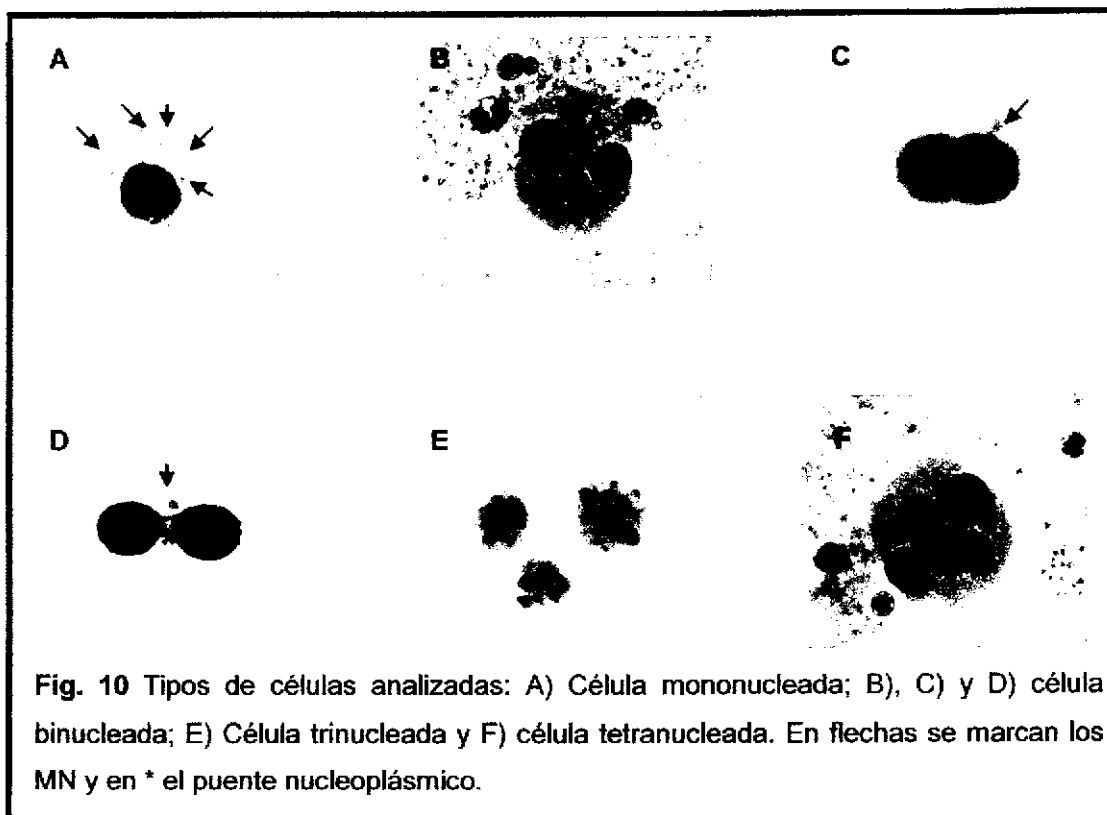
Tabla 7. Controles sanos: un varón de 22 años y una mujer de 23 años.		
Controles	Número de muestras	Número de células binucleadas analizadas
CEIA	2	4,000
VMT	2	4,000
TOTAL	4	8,000

Durante el procesamiento de las muestras (por el método de obtención de las fracciones sanguíneas), se observó que la sangre de tres pacientes (RRC, RSS y EPN) no se separaba de manera adecuada, es decir, que no se obtenían las tres fracciones sanguíneas (plasma, capa leucocítica y glóbulos rojos) (Fig. 9), por lo que se aumentó la velocidad de centrifugación de 1500 a 2500 rpm y se disminuyó el tiempo de la centrifugación de 30 a 15 min. En algunas muestras esta modificación si ayudó a una buena separación, sin embargo, en otras, la separación seguía siendo incompleta. En este último caso lo que se hizo fue tomar con mucho cuidado la capa leucocítica que se alcanzaba a observar.

Es importante mencionar que durante la realización de la técnica de micronúcleos (en la fase de cosecha), algunas muestras de los pacientes diabéticos – con y sin tratamiento de *C. obtusifolia* – presentaron una capa que al parecer era de grasa, la cual impidió que se pudiera completar la técnica y por ende no se tomaron en cuenta para este trabajo (Tabla 5).



En la figura 10 se muestran imágenes de células que fueron tomadas en cuenta para el análisis de MN. Dichas células (tanto mono, bi, tri y tetranucleadas) cumplieron con los criterios de inclusión mencionados anteriormente. Se puede apreciar que el citoplasma está bien conservado y que los núcleos y MN se encuentran cerca del centro de la célula y no en los extremos. Estas imágenes corresponden a los diferentes grupos de estudio y fueron tomadas con un objetivo de 40X.



En la tabla 8, se muestran los datos de la distribución de los micronúcleos en células binucleadas de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tratados *in vivo* con *C. obtusifolia*; la de los controles diabéticos y controles sanos (controles negativos). También se muestra la frecuencia de células de acuerdo al número de núcleos (mono, tri, tetra y penta), y finalmente se muestra el índice de proliferación celular de la citocinesis bloqueada (última columna).

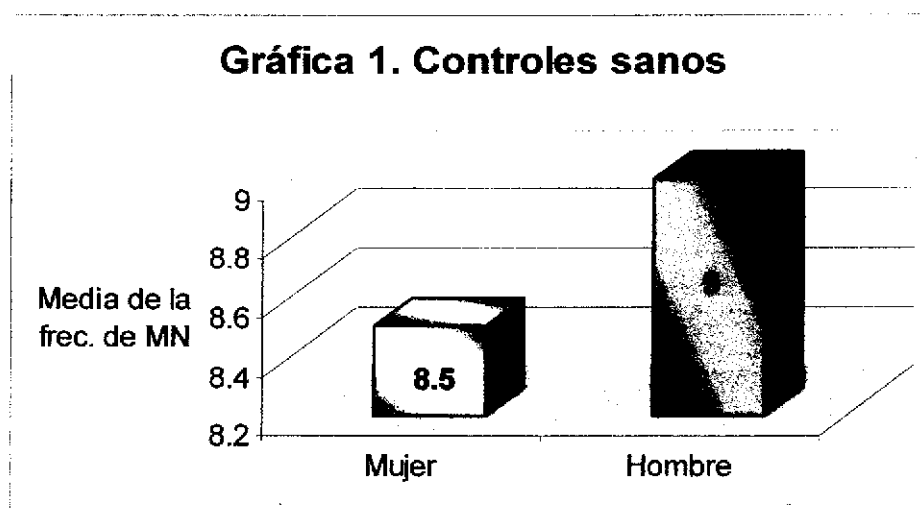
En dicha tabla se puede observar que existe una variabilidad en la frecuencia de MN dentro de cada grupo de estudio. Por ejemplo en el grupo de los pacientes tratados con *C. obtusifolia*, el paciente AHM presenta una frecuencia de 85 MN en 3000 células binucleadas analizadas, mientras que en el paciente RLR la frecuencia es de 24 (con el mismo número de células binucleadas analizadas).

Tabla 8. Distribución de micronúcleos y de las células de acuerdo al número de núcleos en linfocitos de sangre periférica en los tres grupos de estudio.

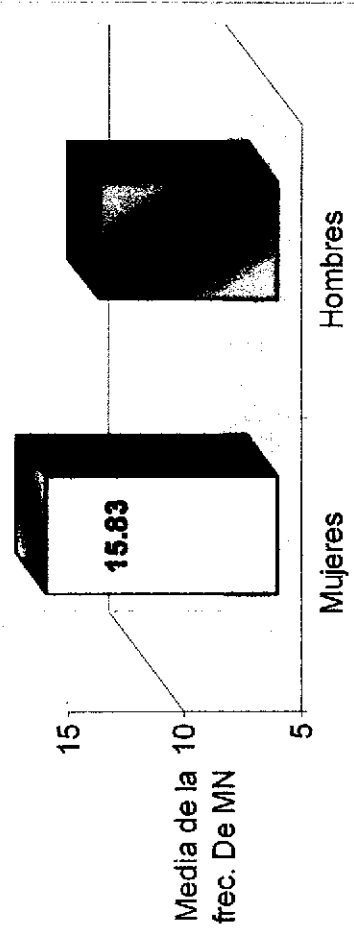
MUESTRAS	Células binucleadas			Total de binucleadas	No. Total de MN	Células Binucleadas con MN	Distribución de células de acuerdo al número de núcleos					Total de células	% BN	CBPI		
	Distribución de micronúcleos (MN)						1	2	3	4	5					
	0	1	2												3	
CEIA	Masculino	1983	16	1	0	2000	18	17	805	2000	132	85	0	3022	66.18	1.83
VMT	Femenino	1985	13	2	0	2000	17	15	208	2000	279	144	0	2631	76.02	2.14
RI	Masculino	1985	14	1	0	2000	16	15	879	2000	72	40	0	2991	66.87	1.76
EP	Femenino	1977	20	3	0	2000	26	23	353	2000	44	63	0	2460	81.30	1.93
AII	Masculino	1980	18	2	0	2000	22	20	431	2000	162	183	4	2780	71.94	2.04
NLR	Femenino	1978	21	1	0	2000	23	22	564	2000	209	244	0	3017	66.29	2.04
OBR	Masculino	992	7	1	0	1000	9	8	114	1000	57	42	0	1213	82.44	2.02
ABM	Masculino	990	10	0	0	1000	10	10	209	1000	24	14	0	1247	80.19	1.87
SANGRE PERIFÉRICA																
LMM	Femenino	3969	26	5	0	4000	36	31	1136	4000	297	380	1	5814	68.80	1.99
RSS	Masculino	2611	11	4	0	2626	19	15	203	2626	422	540	14	3805	69.01	2.35
LQH	Masculino	3954	40	6	0	4000	52	46	974	4000	358	353	5	5690	70.30	2.02
RLR	Femenino	2981	15	3	1	3000	24	19	853	3000	129	157	0	4139	72.48	1.90
AHM	Femenino	2937	44	16	3	3000	85	63	1184	3000	91	131	2	4408	68.06	1.81
GLA	Femenino	983	16	1	0	1000	18	17	139	1000	127	222	3	1491	67.07	2.30
RRC	Masculino	984	14	2	0	1000	18	16	552	1000	18	10	0	1580	63.29	1.67

MN= micronúcleos; CBPI= índice de proliferación de la citocinesis bloqueada.; % BN= porcentaje de células binucleadas.

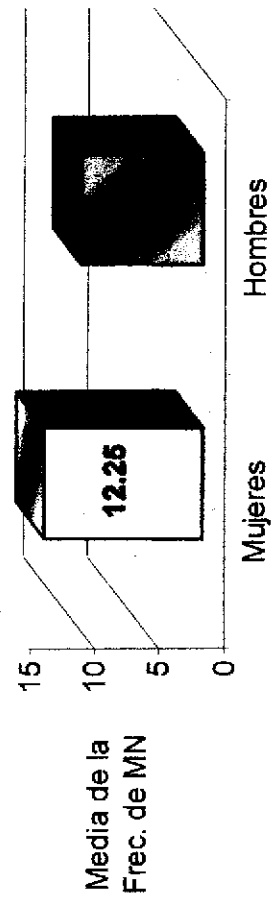
Con base en los datos de la tabla 8 (columna 8) se obtuvieron diferentes gráficas para mostrar si existen diferencias con respecto a la frecuencia de MN entre los hombres y mujeres de cada uno de los 3 grupos de estudio. En las gráficas 2 y 3 se puede observar que la frecuencia de MN entre mujeres y hombres no es estadísticamente significativa. En la gráfica 1 ocurre lo mismo, pero en este caso es en el hombre donde la frecuencia de MN es mayor. Por tanto, se puede establecer que la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica es independiente del género.



**Gráfica 2. Pacientes tratados con
*C. obtusifolia***



Gráfica 3. Controles diabéticos



Análisis estadístico

Debido a la variabilidad dentro de los 3 grupos de estudio, se tuvo que comprobar que las frecuencias de MN en las muestras de cada paciente eran sumables entre sí, para lo cual se utilizó la prueba estadística de Kruskal Wallis, con un nivel de significancia de 0.05.

Kruskall Wallis:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \longrightarrow$ Las distribuciones de micronúcleos en los tres grupos son idénticas.

$H_A: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \longrightarrow$ las distribuciones de micronúcleos no son idénticas, al menos un grupo es diferente.

Con los datos de la tabla 8 (columna 8) se obtuvieron las medias de la frecuencia de MN de cada una de las personas de los 3 grupos de estudio: 1) pacientes tratados con *C. obtusifolia*, 2) controles diabéticos y 3) controles sanos. En la tabla 9 se muestran las jerarquías asignadas a estas medias.

Tabla 9. Jerarquías asignadas a las medias de las frecuencias de MN en cada una de las personas en los grupos de estudio.					
X de pacientes tratados	Jerarquías	X de controles diabéticos	Jerarquías	X de controles sanos	Jerarquías
9	6	8	2.5	9	6
7.23	1	13	11.5	8.5	4
13	11.5	11	9		
8	2.5	11.5	10		
28.3	15	9	6		
18	13.5	10	8		
18	13.5				
Suma de jerarquías	R₁= 63		R₂= 47		R₃= 10

A partir de las sumas de las jerarquías de la tabla 9, y utilizando la ecuación de Kruskal Wallis se obtuvo:

$$H = \frac{12}{15(15+1)} \left[\frac{(10)^2}{2} + \frac{(47)^2}{6} + \frac{(63)^2}{7} \right] - 3(15+1)$$

H = 1.258

Al consultar la tabla de Ji-cuadrada con 2 grados de libertad (k-1), se encuentra que la probabilidad de obtener un valor de $H > 1.258$ debido sólo al azar, cuando no hay diferencia entre las muestras es menor que $H_T = 5.991$. Por lo tanto se acepta la hipótesis nula (H_0): la distribución de micronúcleos en las tres poblaciones es idéntica.

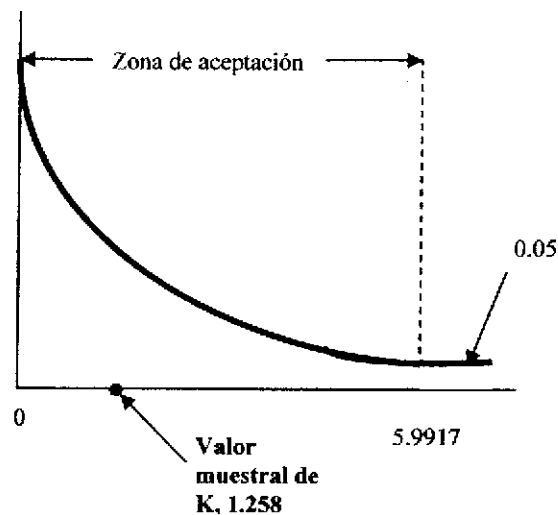


Fig. 11 Prueba de Kruskal Wallis con una $\alpha = 0.05$, que muestra la región de aceptación y el estadístico muestral K

Prueba de hipótesis: diferencia entre las proporciones de dos poblaciones.

Al demostrar que son sumables los datos dentro y entre los grupos de estudio, se procedió a realizar el análisis estadístico para determinar el efecto genotóxico inducido por el extracto de *C. obtusifolia* en pacientes con diabetes tipo 2.

Para ello, el análisis de la frecuencia de MN (tabla 8, columna 8) se hizo entre las siguientes categorías establecidas (con un α de 0.05):

- 1) Controles diabéticos vs. Controles sanos
- 2) Pacientes tratados con *C. obtusifolia* vs. Controles diabéticos
- 3) Pacientes tratados con *C. obtusifolia* vs. Controles sanos

Las hipótesis para las 3 categorías fueron las mismas:

- $H_0: p_1 = P_2 \longrightarrow$ No hay diferencia entre las proporciones de los dos grupos.
- $H_A: p_1 \neq P_2 \longrightarrow$ Existe diferencia entre las proporciones de ambos grupos.

Además de que la prueba se realizó para mostrar si existían diferencias entre los grupos (determinando así el efecto genotóxico del extracto de *C. obtusifolia*), en el caso específico de la prueba hecha con la categoría 1 (controles diabéticos vs. controles sanos), esta también se realizó para establecer si la frecuencia basal de MN se veía afectada por la presencia de la diabetes mellitus tipo 2, es decir, si la enfermedad por si misma elevaba esta frecuencia o no.

Las tablas 10, 11 y 12 muestran tanto el error estándar (EE) de la diferencia entre dos proporciones, el valor P y el estadístico Z de las tres categorías.

Tabla 10. Prueba de Z para la categoría 1: Controles diabéticos vs. Controles sanos

Muestras	Medias	Proporción	q	EE estimado de la diferencia entre dos proporciones	Diferencia p_1-p_2	Z	P
P ₁ : Diabéticos	10.41	0.010417	0.990	0.0043	0.002	0.383	0.648
P ₂ : Sanos	8.75	0.008750	0.991				

Tabla 11. Prueba de Z para la categoría 2: Pacientes tratados con C. obtusifolia vs. Controles diabéticos

Muestras	Medias	Proporción	q	EE estimado de la diferencia entre dos proporciones	Diferencia p_1-p_2	Z	P
P ₁ : Pacientes	14.509	0.014509	0.985	0.004961	0.004	0.82	0.412
P ₂ : Diabéticos	10.41	0.010417	0.990				

Tabla 12. Prueba de Z para la categoría 3: Pacientes tratados con C. obtusifolia vs. Controles sanos.

Muestras	Medias	Proporción	q	EE estimado de la diferencia entre dos proporciones	Diferencia p_1-p_2	z	P
P ₁ : Pacientes	14.509	0.014509	0.985	0.004793	0.006	1.20	0.230
P ₂ : Sanos	8.750	0.008750	0.991				

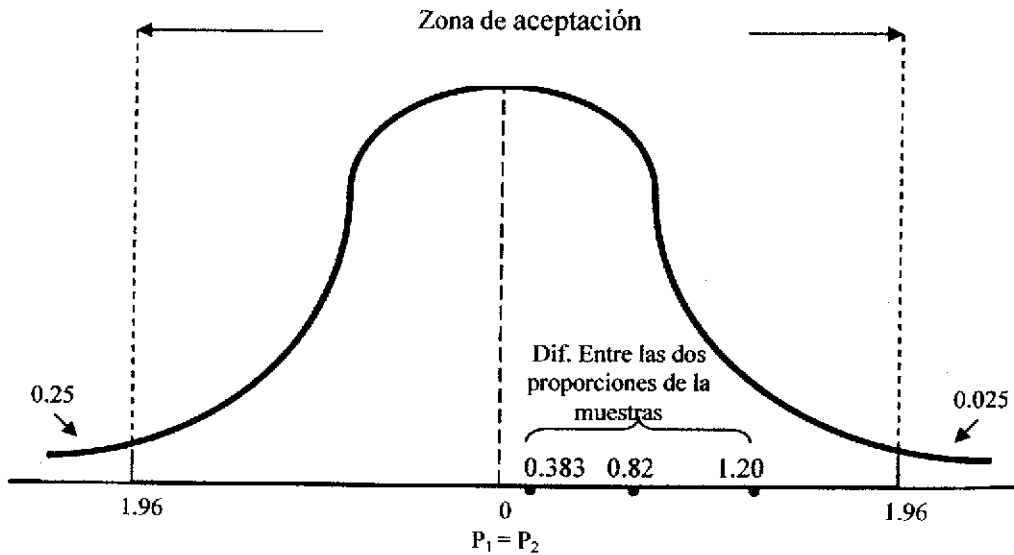


Fig. 12 Prueba de hipótesis de dos extremos para la diferencia entre dos proporciones con un nivel de significancia de 0.05, que muestra la región de aceptación y la diferencia entre las proporciones muestrales.

En las tres categorías establecidas los datos sugieren que no existen diferencias entre los tres grupos: categoría 1 (P =0.648); categoría 2 (P =0.412) y categoría 3 (P =0.230). Por lo tanto se acepta la hipótesis nula (H_0): No hay diferencia entre los tres grupos.

Análisis estadístico del índice de proliferación de la citocinesis bloqueada (CBPI).

Para analizar el CBPI se utilizó la prueba t de Student para grupos independientes con un nivel de significancia de 0.05.

Para esta prueba (tabla 13) se juntaron las muestras de los controles diabéticos y de los controles sanos, debido a que al realizar la t de Student entre estos dos grupos no hubo una diferencia significativa, por lo que se estableció que las dos muestras pertenecían a la misma población. Por lo tanto el análisis se realizó entre:

- Controles vs. Pacientes tratados con *C. obtusifolia*

Las hipótesis fueron:

$H_0: X_1 = X_2 \longrightarrow$ La media del CBPI es igual entre los dos grupos.

$H_A: X_1 \neq X_2 \longrightarrow$ La media del CBPI es diferente entre los dos grupos.

$\alpha = 0.05$

Tabla 13. Prueba t de Student.: Tamaño de muestra, Media, desviación estándar ponderada y el estadístico t del CBPI.					
Muestras	n	x de la muestra	Desviación estándar ponderada	gl	t
Pacientes	7	2.01	0.191	13	0.606
Controles	8	1.95			

Como el valor de t encontrado (0.606) es menor que el valor de t en tablas para un α de 0.05 (1.771), se acepta la hipótesis nula (H_0): la media de ambas poblaciones no muestra diferencias significativas.

Muestras tratadas con Mitomicina C (MMC).

La tabla 14 resume los resultados de las muestras que fueron tratadas con MMC. En ella se observa la distribución de MN en células binucleadas así como el CBPI.

A estas muestras se les dio el mismo tratamiento estadístico realizado con las muestras sin MMC y estos no mostraron diferencias estadísticamente significativas, tanto para la frecuencia de MN como para el CBPI. A continuación se muestran los resultados de dichas pruebas:

1.- Determinación del efecto genotóxico (frecuencia de MN)

Kruskal-Wallis: **H = 5.303**

$$5.303_{H \text{ calculada}} < 5.99_{H \text{ tablas}}$$

Prueba de Hipótesis:

- 1) Controles diabéticos vs. sanos: **Z= 1.22**
- 2) Pacientes tratados con *C. obtusifolia* vs. controles sanos: **Z= 1.52**
- 3) Controles diabéticos vs. Pacientes tratados con *C. obtusifolia*: **Z= 0.75**

$$1.22, 1.52 \text{ y } 0.75_{Z \text{ calculada}} < 1.96_{z \text{ tablas}}$$

2.- Determinación del efecto citostático (CBPI):

En este caso no se aplicó la t de Student, debido que los datos no cumplían con los criterios estadísticos para esta prueba (varianzas iguales); por lo que se aplicó una prueba no paramétrica:

Prueba U de Mann-Whitney:

Hipótesis

$H_0: X1 = X2$ No hay diferencia entre la media de los dos grupos.

$H_A: X1 \neq X2$ Hay diferencias entre la media de los dos grupos.

$\alpha = 0.05$

Estadístico U = 18

$$11.06_{\text{Lim. inferior}} < 18 < 44.93_{\text{Lim. superior}}$$

Se advierte que el estadístico muestral U (18) se encuentra dentro de la región de aceptación. Por tanto, aceptamos la H_0 : no hay diferencia significativa entre las medias del CBPI de los dos grupos, es decir, son iguales.

Para finalizar se hizo una comparación entre las muestras tratadas con MMC y sin MMC, esto con el fin de comprobar que la MMC actuó como control positivo.

Los resultados muestran que a pesar de que si se observó un aumento en la frecuencia de MN y en el CBPI en las muestras tratadas con MMC, esta no fue estadísticamente significativa -frecuencia de MN ($H= 0.8579$) y CBPI ($U= 4$)-, es decir, que las muestras que fueron tratadas sin MMC son iguales a las tratadas con MMC.

Cabe aclarar, que a pesar de que como grupo las muestras sin MMC y con MMC no mostraron diferencias significativas, si las hubo al comparar algunas muestras entre cada paciente, es decir: si comparamos por ejemplo, el control diabético NLR sin MMC (tabla 8) contra su muestra con MMC (tabla 14) podemos observar que en la primera la frecuencia de MN es de 23 mientras que la segunda es de 61, casi el triple.

Tabla 14. Experimento con Mitomicina C (MMC): Distribución de micronúcleos y de las células de acuerdo al número de núcleos en linfocitos de sangre periférica de los tres grupos de estudio.

MUESTRAS	Células binucleadas				Total de binucleadas	No. Total de MN	Células Binucleadas con MN	Distribución de células de acuerdo al número de núcleos					Total de células	% BN	CBP1
	Distribución de micronúcleos (MN)							1	2	3	4	5			
	0	1	2	3											
CONTROLES SANOS															
CEIA Masculino	1973	27	0	0	2000	27	27	443	2000	145	100	0	2688	74.40	1.96
VMT Femenino	1974	24	2	0	2000	28	26	510	2000	433	194	0	3137	63.76	2.10
CONTROLES DIABÉTICOS															
RI Masculino	1966	33	1	0	2000	35	34	598	2000	90	63	1	2752	72.67	1.86
EP Femenino	1968	27	3	2	2000	39	32	403	2000	52	69	1	2525	79.21	1.92
AII Masculino	1968	29	3	0	2000	35	32	891	2000	65	114	1	3071	65.13	1.81
NLR Femenino	1952	36	11	1	2000	61	48	1039	2000	117	83	0	3239	61.75	1.77
OBR Masculino	981	18	1	0	1000	20	19	118	1000	57	30	0	1205	82.99	2.00
ABM Masculino	983	15	1	1	1000	20	17	456	1000	70	64	1	1591	62.85	1.84
PACIENTES TRATADOS CON C. obtusifolia															
LMM Femenino	2952	40	7	1	3000	57	48	516	3000	290	431	2	4239	70.77	2.15
RSS Masculino	1989	10	1	0	2000	12	11	100	2000	220	317	3	2640	75.76	2.29
LQH Masculino	2959	37	4	0	3000	45	41	550	3000	335	287	8	4180	71.77	2.09
RLR Femenino	2965	33	2	0	3000	37	35	738	3000	130	180	1	4049	74.09	1.94
AHM Femenino	2955	42	3	0	3000	48	45	1008	3000	117	71	0	4196	71.50	1.82
GLA Femenino	982	17	1	0	1000	19	18	143	1000	106	295	0	1544	64.77	2.36
RRC Masculino	975	23	2	0	1000	27	25	439	1000	10	8	0	1457	68.63	1.72

MN= micronúcleos; CBP1= índice de proliferación de la citocinesis bloqueada y % BN= porcentaje de células binucleadas.

DISCUSIÓN

En una investigación realizada por Bonassi y colaboradores (2005), para determinar cuales eran los biomarcadores citogenéticos más utilizados en estudios de poblaciones humanas, encontraron dentro de los principales a los micronúcleos, los cuales se sabe que se presentan en las etapas tempranas de enfermedades crónicas, especialmente el cáncer, y pueden por lo tanto jugar un papel importante en la prevención. Cabe resaltar que el ensayo de micronúcleos ha sido ampliamente usado para evaluar el efecto genotóxico de diversas plantas medicinales; ya que se considera muy eficaz para evaluar agentes mutagénicos y genotóxicos, lo que la hace ideal para avalar la utilización de las plantas medicinales y es la razón de que sea aceptada internacionalmente y lo que valida su utilización en este estudio en particular.

En el caso particular de este trabajo, el ensayo de micronúcleos fue muy útil para determinar tanto el efecto genotóxico como el citostático del extracto de *Cecropia obtusifolia*, ya que es sencillo, rápido y tiene un alto índice de confiabilidad por su gran sensibilidad para detectar agentes clastogénicos y aneuploidogénicos.

Sin embargo, es importante señalar que durante cualquier estudio *in vivo*, existen variables que no se pueden controlar. La continuidad de los pacientes en la asistencia a la toma de muestra, fue una variable de este tipo, debido a que hubo pacientes que sólo se presentaron una vez. Este factor determinó que el número de muestras no fuera igual para cada paciente, pero no influyó en los resultados obtenidos.

En lo que respecta al papel que juega el género en la diabetes mellitus tipo 2, no se han establecido patrones claros de comportamiento, pero en términos generales, la enfermedad es más frecuente en mujeres que en hombres, lo cual es cierto en México (Escobedo y González, 1999); tal como lo demostró la Encuesta Nacional de Salud 2000, en la cual, en todos los grupos de edades (20 - 44, 45 - 64, 65 - 74 y 75 y más), excepto en el de 20 - 44, el número

estimado de personas con diabetes mellitus tipo 2 es más elevado en mujeres (Hernández y Olaíz, 2002).

Se observó que la frecuencia de MN en las personas con diabetes mellitus tipo 2, tanto pacientes como controles, es más elevada en mujeres que en hombres, lo que concuerda con lo observado en la población mexicana. Sin embargo en esta investigación, la diferencia en la frecuencia de MN entre hombres y mujeres no fue significativa; por lo tanto el sexo no representa una variable que intervenga directamente en el aumento de los MN.

Para analizar los resultados del ensayo de MN es necesario comparar la frecuencia obtenida de la muestra de estudio con una frecuencia basal. En el mejor de los casos, se toman muestras antes, durante y después del tratamiento, y se utiliza la frecuencia antes del tratamiento como la frecuencia basal. Esto garantiza que haya una continuidad en el estudio y propicia que los resultados sean más confiables.

A pesar de ello, en este trabajo no se pudo obtener una muestra antes del tratamiento, debido a que al iniciar esta tesis, el grupo de la Dra. Cristina Revilla ya había empezado a administrar el extracto de *C. obtusifolia* a los pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Por lo tanto fue necesario tomar como la frecuencia basal, la frecuencia de MN de los controles sanos, por que se supuso no estaban expuestos a agentes mutagénicos y por ende su frecuencia de MN debe ser baja (no podría ser nula, ya que existe una tasa de mutación espontánea).

Las pruebas estadísticas para analizar la frecuencia de MN (en las muestras tratadas con o sin MMC), nos muestran que el extracto de *C. obtusifolia* no presentó un efecto genotóxico, ya que, el incremento de MN que se observa entre los grupos no fue estadísticamente significativo.

Al comparar el CBPI de los diferentes grupos tampoco se encontraron diferencias significativas, por lo que, además de no mostrar efecto genotóxico,

el extracto de *C. obtusifolia* tampoco mostró efecto citostático, es decir, que no altera el ciclo celular.

Cuando se contrastaron los muestras con MMC con aquellas sin MMC, se descubrió que a pesar de que la frecuencia de MN y el CBPI se elevaron en las muestras tratadas con MMC, este aumento no fue suficiente para considerarse significativo, es decir que la concentración de MMC aplicada a este trabajo no mostró el efecto deseado de un control positivo. No obstante, lo anterior no implica que los resultados obtenidos con MMC no se puedan usar como controles positivos, ya que a nivel individual varios pacientes mostraron este efecto: aumentar de manera significativa la frecuencia de MN y el CBPI.

Es necesario destacar que este tipo de estudios son de gran importancia, pues permiten validar el uso que de manera tradicional se le da a algunas plantas para el tratamiento de diversos padecimientos. Además, se debe señalar que el uso de plantas medicinales se hace cada vez más patente en diversos países (tanto en vías de desarrollo como del primer mundo). En Pakistán por ejemplo, se estima que un 80% de las personas dependen de éstas para el tratamiento de sus dolencias; en los Estados Unidos es del 60% y en Japón hay más demanda de plantas medicinales que de medicinas alópatas (<http://www.botanical-online.com/medicinals>).

En nuestro país, el uso de plantas medicinales es muy alto, sobre todo en las zonas rurales. De hecho en un estudio realizado por el Rodríguez (2004), se muestra que la prevalencia de uso de alternativas de tratamiento no médico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en comunidades rurales de Veracruz es muy alto; incluso, Andrade-Cetto y Heinrich, (2005) mencionan que los pacientes con diabetes prácticamente siempre usan plantas estén o no bajo tratamiento médico y además, estimaron que cerca de 500 especies de plantas son usadas por la población mexicana para tratar la diabetes mellitus tipo 2. Estudios como el de Heinrich y colaboradores (1998) y el de Román y colaboradores (1991), con respecto a la diabetes mellitus tipo 2 muestran la importancia de la investigación en el área de la etnofarmacología en México.

En el caso particular de *Cecropia obtusifolia*, se han hecho diversos estudios para determinar sus propiedades medicinales. Herrera-Arellano y colaboradores (2004), en un estudio donde trataron con *C. obtusifolia* y *Marrubium vulgare* a pacientes con diabetes mellitus, demostraron que existe una reducción clínica y estadística de la glucosa en sangre, colesterol en suero y triglicéridos (más marcada en *C. obtusifolia* que en *M. vulgare*). Los efectos secundarios de *C. obtusifolia* fueron excesiva salivación, cansancio y agruras. También proponen que si se utiliza un extracto de *C. obtusifolia* más enriquecido con componentes activos en altas concentraciones, podría incrementar el potencial de esta planta.

Por otra parte Revilla y colaboradores (En prensa) administraron a seis pacientes con diabetes tipo 2 recientemente diagnosticados un extracto acuoso de las hojas de *C. obtusifolia* durante un periodo de 34 semanas, y observaron que tras 4 meses de administración, los niveles de glucosa en sangre disminuyeron significativamente, pero no se observó un efecto significativo en los niveles de insulina, triglicéridos y colesterol. Por lo anterior, concluyeron que el extracto acuoso de *C. obtusifolia* tiene un efecto hipoglucemiante significativo y que su mecanismo de acción no es a través de la estimulación de la secreción de insulina.

Es importante mencionar que durante el presente estudio, los pacientes diabéticos tratados con el extracto de *C. obtusifolia* no presentaron los efectos secundarios mencionado anteriormente.

Uno de los compuestos activos obtenidos del extracto de *C. obtusifolia* es el ácido clorogénico, y se ha demostrado en ratones, que existe una relación lineal entre el efecto hipoglicémico y el contenido de este ácido (Nicasio *et al.*, 2005). El ácido clorogénico es un inhibidor específico de un componente de la glucosa – 6 – fosfato translocasa (Gl – 6 – p translocasa) en microsomas de hígado de rata (Hemmerle *et al.*, 1997). Este sistema enzimático, juega un papel importante en la regulación homeostática de la glucosa en sangre debido a que es responsable de la formación de glucosa endógena, producida en la

gluconeogénesis y la glucogenolisis. Por lo tanto, si el ácido clorogénico inhibe a esta enzima, éste podría estar reduciendo la producción de glucosa hepática.

Si enlistáramos las principales características que hacen de *Cecropia obtusifolia* una excelente planta medicinal para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 estas serían: 1) mostrar efecto hipoglucémiante en diversos organismos (incluyendo los seres humanos), 2) reducir el colesterol en suero y los triglicéridos (en humanos) y 3) presencia de principios activos tales como la isorientina y el ácido clorogénico que reducen la producción de glucosa hepática.

Por lo dicho anteriormente *C. obtusifolia* podría convertirse en un excelente fitomedicamento, ya que tiene un bajo costo, lo que sería de gran importancia en México, porque podría estar al alcance de personas con bajos recursos económicos que viven en zonas rurales y en comunidades indígenas, quienes desde hace mucho tiempo tienen los conocimientos sobre el uso de las plantas medicinales, así que, se podría retornar a estas comunidades los beneficios de estas investigaciones.

No se trata de elegir entre las plantas medicinales y los medicamentos alópatas. Lejos de excluirse, ambos se complementan. Es mediante el enfoque multidisciplinario en el estudio científico de las plantas medicinales; el aumento de las personas de ciencia que se dedican al estudio de las plantas y a los logros obtenidos en la fitoquímica que se verá un mayor aumento en el empleo de medicamentos a base de plantas medicinales en la medicina moderna.

CONCLUSIÓN

El extracto de *Cecropia obtusifolia* no mostró un efecto genotóxico ni citostático en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Se recomienda aumentar la concentración de MMC en el ensayo de MN para obtener una frecuencia inducida mayor, es decir, que pueda servir como un buen control positivo.

Cecropia obtusifolia puede servir como un buen fitomedicamento para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

REFERENCIAS

- Acosta B A. y Escalona O M.** (2005) Síndrome metabólico. En: http://www.labnutricion.cl/sindrome_metabolico.htm
- A.D.A.** 2004. American Diabetes Association. En: www.diabetes.org
- Aguilar C. A. y Xolalpa M. S.** (2002) La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. *Ciencia* 53 (3): 24-35.
- Andrade-Cetto A.** 1995. Estudio Etnobotánico y fitoquímico de Plantas Útiles en la Región de Xochipala Gro., Para el control de la Diabetes tipos NID. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 93p.
- Andrade-Cetto, A.** 1999. Estudio Etnofarmacológico de Equisetum myriochaetum Schlechtendal & Chalm. y Cecropia obtusifolia Bertol. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. 100p.
- Andrade-Cetto A. y Heinrich M.** (2005) Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99: 325-348.
- Andrade-Cetto A., Wiedenfeld H., Revilla M.C. e Islas S.** (2000) Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 72: 129-133.
- Andrade-Cetto A. y Wiedenfeld H.** (2001) Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol* 78: 145-149.
- Argueta A.** (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana II. INI, México. p 706.
- Barba de Piña C. B.** (2002) Diabetes y medicina tradicional en México. *Ciencia* 53 (3): 18-23.

Bonassi S., Ugolini D., Kirsch-Volders M., Stromberg U., Vermeulen R. y Tucker J. D. (2005) Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ. Mol. Mutagen.* 45 (2-3): 258-70.

Cahill G. F. (1990) Conceptos actuales en diabetes. En: Diabetes mellitus. Joslin (Editor). Buenos Aires Argentina: Inter-médica. pp 1-11.

Chávez T. N., Almeda V., Motola K., Sánchez K. y Méndez-Sánchez (2004) Síndrome metabólico. Aspectos fisiopatológicos e importancia epidemiológica. *Med Sur.* 11 (3): 160-168.

Eastmond, D.A. y Tucker J.D. (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13: 34-43.

Escobedo de la Peña J. y González V. C. (1999) Epidemiología de la diabetes mellitus. En: Diabetes mellitus. (Islas A. S. y Lifshitz G. A. Eds.) 2ª ed. México: McGraw-Hill interamericana. pp 15-28.

Evans, H. J. (1997) Historical perspectives on the development of the *in vitro* micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res.* 392: 5-10.

Fenech M. (2005) *In vitro* micronucleus technique to predict chemosensitivity methods. *Mol. Med.* 111: 3-22.

Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S. y Zeiger E. (2002) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534: 65-75.

Fenech M., Holland N., Chang W.P., Zeiger E. y Bonassi S. (1999) The Human MicroNucleus Project- An international collaborative study on the use of

the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428: 271-283.

Fenech M. y Morley A. A. (1985) Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 148: 29-36.

Figuerola D. (1990) Diabetes. 2ª ed. Barcelona España: Salvat Editores S.A. pp 1-14.

Guillén González M. A. (2002) Diabetes mellitus: cómo se manifiesta, cómo evoluciona y cómo se complica. *Ciencia* 53 (3): 54-62.

Heinrich M., Ankli A., Frei B., Weimann C. y Sticher O. (1998) Medicinal plants in México: healers' consensus and cultural importance. *Soc. Sci. Med.* 74 (11): 1859-1871.

Hemmerle H., Burger H. J., Below P., Schubert G., Rippel R., Schindler R. W., Paulus E. y Herling A. W. (1997) Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: Nobel inhibitors of hepatic glucose – 6 – phosphate translocase. *J. Med. Chem.* 40 (2): 137-145.

Hernández-Ávila M. y Olaíz Fernández G. (2002) La diabetes y el mexicano: un reto para la salud pública. *Ciencia* 53 (3): 8-17.

Herrera Arellano A. (2003) La Jamaica: especie vegetal para el tratamiento de la presión alta (hipertensión arterial). *Hypatia* 10 En: <http://hypatia.morelos.gob.mx/No10/notasjamaica.html>

Herrera-Arellano A., Aguilar-Santamaria L., Garcia-Hernandez B., Nicasio-Torres P. y Tortoriello J. (2004) Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomed.* 11: 561–566.

Hiriart M. (2002) La historia natural de la diabetes. *Ciencia* 53 (3): 4-7.

- Hiriart M. y Vidaltamayo R.** (2002) Cuestión de hormonas: el papel de las hormonas del páncreas en la salud y en la diabetes. *Ciencia* 53 (3): 36-45.
- Islas A. S. y Revilla M. MC.** (2004) Diabetes mellitus: concepto y nueva clasificación. En: Diabetes mellitus. (Islas A. S. y Revilla M. MC. Eds.) 3ª ed. México: McGraw-Hill. pp. 3-20.
- Kirsch-Volders M.** (1997) Towards a validation of the micronucleus test. *Mutat. Res.* 392: 1-4.
- Klug W. S. y Cummings M. R.** (1999) Conceptos de Genética. 5ª ed. Madrid: Prentice Hall Iberia. pp 233-234.
- López-Antuñano S. y López-Antuñano F. J.** (1998) Diabetes mellitus y lesiones del pie. *Salud pública de México* 40 (3): 3-10.
- Martínez C. Vicent.** (2004) El mundo de las plantas En: www.botanical-online.com
- Miller O. J. y Therman E.** (2001) Human chromosomes 4ª ed. Nueva York: Springer-Verlag. pp 207-221.
- Morán V. L.** (2001) Obtención de muestras sanguíneas de calidad analítica, mejoría continua de la etapa preanalítica. México: Panamericana. pp 102-103.
- Nicasio P., Aguilar S. L., Aranda E., Ortiz S. y González M.** (2005) Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. *Phytother. Res.* 21; 19(8):661-664.
- Pérez Guerrero C., Herrera Ma. D., Ortiz R., Álvarez de Sotomayor María y Fernández Ma.** (2001) A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* 76: 279-284.

- Pérez R.M., Ocegueda A., Muñoz J. L., Avila J.G. y Morrow W.W. (1984)** A study of the hypoglycemic effect of some Mexican plants. *J. Ethnopharmacol.* 12(3):253-62.
- Ramírez V. y Cuenca P. (2000)** Micronuclei frequency in lymphocytes of individuals occupationally exposed to pesticides. Instituto de Investigaciones en Salud (INISA). Universidad de Costa Rica.
- Revilla-Monsalve MC., Andrade-Cetto A., Palomino-Garibay M. A., Wiedenfeld H. e Islas-Andrade S. En prensa 2005** Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. (Enviado a *J. Pharmacy and Pharmacology*).
- Rodríguez-Arnaiz R. (1995)** Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. México: Fondo de cultura económica. En: <http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/124/html/toxinas.html>
- Rodríguez G. L. (2004)** Prevalencia de uso de alternativas de tratamiento no médico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en comunidades rurales. En: <http://www.uv.mx/medmina/Feria/presantnmsimp.htm>
- Rodríguez J. S. (2002)** La diabetes. México: Editorial Alfaomega. pp 9-28.
- Román R.R., Flores S.J., Partida H.G., Lara L.A. y Alarcón A.F. (1991)** Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Arch. Invest. Med.* 22: 87-93.
- Russell P. J. (1998)** Genetics. 5ª ed. California, EUA: Addison-Wesley Longman. pp 610-611.
- Schultes, O. 1991.** Historical perspective and future of ethnopharmacology. *J. of Ethnopharmacol.* 32: 7-24.

Solans X. y Hernández M. R. (1994) NTP 354: Control biológico de la exposición a genotóxicos: técnicas citogenéticas. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. España. http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_354.htm

S.S.A. (2004) Secretaria de Salud. En: www.salud.gob.mx

Tusié L. M. T. (2002) La genética de la diabetes. *Ciencia* 53 (3): 46-53.

Votey S. R. y Peters A. L., (2005) Diabetes Mellitus, Type 2 - A Review *Emedicine* 14. En: <http://www.emedicine.com/emerg/topic134.htm>

WHO (1999) Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications

WHO (2005) World Health Organization. En: <http://www.who.int/diabetes/facts/world>