



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Evaluación del efecto del aceite esencial
de *Decatropis bicolor* sobre la inducción
de micronúcleos en células binucleadas
en cultivo de linfocitos humanos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

ITZAYANA CHAVARRÍA QUINTANILLA

ASESORA:

M. EN C. MARITERE DOMINGUEZ ROJAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Evaluación del efecto del aceite esencial de *Decatropis bicolor* sobre la inducción de micronúcleos en células binucleadas en cultivo de linfocitos humanos.

Que presenta la pasante: **Chavarría Quintanilla Itzayana**

Con número de cuenta: **413026941** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de Noviembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barrigá Arceo	
VOCAL	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Dra. Dolores Molina Jasso	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Ma. Llasbeth Hernández Calderón	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS

A mis padres por ser mi ejemplo a seguir, por darme todo su amor, apoyo, consejos, sabiduría y todas las herramientas necesarias para triunfar en la vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por brindarme todo su amor, enseñanzas y paciencia. Gracias por estar junto a mí y procurarme siempre.

A mi padre por apoyarme en todas mis decisiones, por siempre darme consejos, apoyo y a veces regaños, todo necesario para ser quien soy hoy.

A mi hermana por enseñarme y apoyarme siempre, por acompañarme durante todos estos años. Gracias por las risas, los sustos y las aventuras.

A Carlos por todo su amor y apoyo. Gracias por siempre estar a mi lado en todos los momentos difíciles y felices.

A la profesora Maritere por confiar en mí y por haberme mostrado el increíble mundo de la genética.

A mí jurado por todo su apoyo, asesoría y paciencia.

A mis profesores por haberme formado como profesionista y por brindarme todo su conocimiento.

A todas las personas que me ayudaron durante el desarrollo de mi proyecto, a la doctora Sandra por su apoyo y a la profesora Larisa por su compañía y consejos.

A mis mejores amigos: Lesly, Daniel, Joel, y Omar. Gracias por toda la diversión.

A todos mis amigos y compañeros con los que conviví durante estos grandiosos años.

A mi *alma mater* por ser mi segundo hogar y brindarme todo para poder realizar mis estudios.

A. Un orden violento es desorden: y
B. Un gran desorden es orden.
Ambas cosas son una.
Wallace Stevens

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética L521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la dirección de la M. en C. Maritere Domínguez Rojas.

El aceite esencial de *Decatropis bicolor* fue proporcionado por el Dr. Guillermo Pérez Ishiwara de la ENMH-IPN.

ÍNDICE

1.	TABLA DE ABREVIATURAS	7
2.	ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	8
3.	RESUMEN	10
4.	INTRODUCCIÓN	12
4.1	Medicina tradicional.....	12
4.1.1	Antecedentes	12
4.1.2	La medicina tradicional en México.....	13
4.2	<i>Decatropis bicolor</i>	14
4.2.1	Clasificación taxonómica	14
4.2.2	Familia Rutaceae	15
4.2.3	Características de <i>D. bicolor</i>	15
4.3	Usos medicinales.....	16
4.4	Metabolitos secundarios y genotoxicidad	20
4.4.1	Metabolitos secundarios.....	20
4.4.3	Genotoxicidad	22
4.5	Micronúcleos <i>in vitro</i>	23
5.	JUSTIFICACIÓN.....	32
6.	OBJETIVOS	33
6.1	GENERAL.....	33
6.2	PARTICULARES.....	33
7.	DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL	34
8.	MATERIAL Y MÉTODOS	36
8.1	Obtención del extracto.....	36
8.2	Cultivo celular.....	36
8.3	Tratamientos	36
8.3.1	Control positivo	37
8.3.2	Control negativo, de vehículo y concentraciones del aceite esencial.....	37
8.3.3	Cosecha celular	38
8.3.4	Tinción	38
8.3.5	Evaluación del daño citotóxico y genotóxico	39

8.3.6 Análisis estadístico	39
9. RESULTADOS	40
9.1 Gradiente de MMS para el control positivo.....	40
9.2 Evaluación genotóxica y citotóxica del donador "A" y "B"	40
9.3 Resultados de genotoxicidad del donador "A", "B" y "AB"	42
9.4 Resultados del Índice de proliferación por bloqueo de citocinesis del donador "A", "B" y "AB"	47
9.5 Resultados del porcentaje de citostasis del donador "A", "B" y "AB"	51
10. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	54
11. Conclusiones.....	63
12. Referencias.....	64

1. TABLA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
CB	Células Binucleadas
CBMN	Células Binucleadas Micronucleadas
PHA	Fitohemaglutinina
KCl	Cloruro de potasio
C	Centígrados
DMSO	Dimetil sulfóxido
MN	Micronúcleos
MMS	Metil metanosulfonato
MMC	Mitomicina C
Cyt-B	Citocalasina B
SFB	Suero Fetal Bovino
rpm	Revoluciones por minuto
µL	Microlitros
µg/mL	Microgramo por mililitro
µL/mL	Microlitro por mililitro
mL	Mililitro
C (V)	Control de Vehículo
C (-)	Control Negativo
C (+)	Control Positivo
C1	Concentración 1
C2	Concentración 2
C3	Concentración 3
CBPI	Índice de proliferación por bloqueo de citocinesis
SEM	Error estándar de la media
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
AE	Aceite Esencial
OMS	Organización Mundial de la Salud
mg	Miligramo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HUMN	Proyecto humano de micronúcleos
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Diagrama de flujo de la experimentación de micronúcleos <i>in vitro</i> en linfocitos de sangre periférica.....	34 y 35
Figura 2. Evaluación genotóxica del donador “A” para las diferentes concentraciones de AE de <i>D. bicolor</i>	43
Figura 3. Evaluación genotóxica del donador “B” para las diferentes concentraciones de AE de <i>D. bicolor</i>	44
Figura 4. Evaluación genotóxica de los donadores “AB” para las diferentes concentraciones de AE de <i>D. bicolor</i>	45
Figura 5. Microfotografía de célula mononucleada vista a 1000x teñida con Giemsa.....	46
Figura 6. Microfotografía de célula binucleada vista a 1000x teñida con Giemsa	46
Figura 7. Microfotografía de célula trinucleada vista a 1000x teñida con Giemsa	47
Figura 8. Microfotografía de célula tetranucleada vista a 1000x teñida con Giemsa	47
Figura 9. Microfotografía de célula binucleada micronucleada vista a 1000x teñida con Giemsa	47
Figura 10. Evaluación citotóxica del donador “A” para las diferentes concentraciones de AE de <i>D. bicolor</i> , expresado con el CBPI.....	48
Figura 11. Evaluación citotóxica del donador “B” para las diferentes concentraciones de AE de <i>D. bicolor</i> , expresado con el CBPI.....	49
Figura 12. Evaluación citotóxica de los donadores “AB” para las diferentes concentraciones de AE de <i>D. bicolor</i> , expresado con el CBPI.....	50
Figura 13. Evaluación citotóxica del donador “A” para las diferentes concentraciones de AE de <i>D. bicolor</i> , expresado en % citostasis.....	51
Figura 14. Evaluación citotóxica del donador “B” para las diferentes concentraciones de AE de <i>D. bicolor</i> , expresado en % citostasis.....	52

Figura 15. Evaluación citotóxica de los donadores "AB" para las diferentes concentraciones de AE de <i>D. bicolor</i> , expresado en % citostasis.....	53
Tabla 1. Resultados del gradiente de MMS para el control positivo.....	40
Tabla 2. Resultados de los distintos tratamientos para el donador "A".....	41
Tabla 3. Resultados de los distintos tratamientos para el donador "B".....	42
Tabla 4. Resultados de la media y su error estándar de genotoxicidad obtenidos del donador "A".....	43
Tabla 5. Resultados de la media y su error estándar de genotoxicidad obtenidos del donador "B".....	44
Tabla 6. Resultados de la media y su error estándar de genotoxicidad obtenidos entre el donador "A" y "B".....	45
Tabla 7. Resultados de la media y su error estándar del CBPI obtenidos del donador "A".....	48
Tabla 8. Resultados de la media y su error estándar del CBPI obtenidos del donador "B".....	49
Tabla 9. Resultados de la media y su error estándar del CBPI obtenidos entre el donador "A" y "B".....	50
Tabla 10. Resultados de la media y su error estándar del % de citostasis obtenidos del donador "A".....	51
Tabla 11. Resultados de la media y su error estándar del % de citostasis obtenidos del donador "B".....	52
Tabla 12. Resultados de la media y su error estándar del % de citostasis obtenidos entre el donador "A" y "B".....	53
Tabla 13. Resultados del análisis estadístico "t" de muestras emparejadas para genotoxicidad, CBPI y % Citostasis de "AB".....	54

3. RESUMEN

La medicina tradicional se define según la OMS (Organización Mundial de la Salud) como el conjunto de conocimientos y prácticas basadas en creencias y experiencias propias de una cultura, usadas para el mantenimiento de la salud, prevención, diagnóstico, mejora o tratamiento de una enfermedad. En la mayoría de los tratamientos de la medicina tradicional se utilizan las plantas medicinales, las cuales son cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas como terapia o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (OMS, 1991; Schlaepfer y Mendoza 2010).

Este conocimiento está basado en aceptar y adoptar lo que se ve que sirve, lo que conlleva a problemas con la toxicidad de la planta, ya sea por la dosis o por las propiedades de la misma. La genotoxicidad, por ejemplo, es la capacidad que tiene una sustancia para causar daño en el material genético y este daño puede ser evaluado por técnicas moleculares o citogenéticas. Dentro de las técnicas citogenéticas se encuentra el ensayo de MN (micronúcleos), los cuales son corpúsculos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase y originados por la pérdida de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros durante la división nuclear (Fenech, 2000; Fenech et al, 2003; Fenech, 2006).

Una de las variantes del ensayo de MN es la realizada *in vitro* en linfocitos humanos de sangre periférica por bloqueo de la citocinesis con Cyt-B (Citocalasina B), esta técnica es más sensible y precisa para evaluar daño cromosómico porque permite registrar MN originados de fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros en células que se han dividido sólo una vez (Fenech, 2000; OECD, 2013).

En México existe una gran riqueza biológica, diversidad de ecosistemas y variabilidad genética debido a su topografía y variaciones climáticas. En particular, posee una gran variedad de plantas medicinales. *Decatropis bicolor* es un arbusto

conocido comúnmente como Aranto, pertenece a la familia Rutaceae y se encuentra en distintos estados de nuestro país como Nuevo León e Hidalgo. En la zona de Actopan, Hidalgo es muy utilizado en medicina tradicional para tratar diarreas, afecciones renales, cálculos biliares, cáncer, etc. En un estudio realizado por Estanislao y colaboradores en 2016 demostraron por medio de ensayos de citotoxicidad con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), el efecto citotóxico selectivo del AE (Aceite esencial) de *D. bicolor* en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Con este estudio como antecedente en el presente trabajo se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad del aceite esencial de *D. bicolor* utilizando el ensayo de micronúcleos en células binucleadas en linfocitos humanos. Los resultados indican que no existe actividad genotóxica por el AE de *D. bicolor* a las concentraciones utilizadas (20, 40 y 60µg/mL), además se determinó que el mayor efecto citotóxico en linfocitos humanos se obtuvo a una concentración de 60µg/mL, el efecto citotóxico menor a una concentración de 40µg/mL y no presentó efecto citotóxico a la concentración de 20µg/mL (Estanislao, 2016b; Irekani, 2010; Schlaepfer, 2010).

Aunque aún faltan muchos más estudios para garantizar la inocuidad y actividad de esta planta medicinal, el presente trabajo trata de colaborar a la ardua misión de la investigación de la misma, pues la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de padecimientos en especial para el cáncer de mama tiene mucha importancia a nivel de salud pública. De manera satisfactoria los resultados nos hacen pensar que la utilización de *D. bicolor* en el tratamiento del cáncer de mama puede ser en un futuro una alternativa que no sólo se utilice en las regiones de donde es originaria, sino que sea utilizada en otras regiones del país.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Medicina tradicional

4.1.1 Antecedentes

Hay evidencia que desde la aparición del ser humano en la tierra, éste ha hecho uso de todos los recursos naturales que le rodean, pues los ha utilizado no sólo para alimentarse y satisfacer sus necesidades básicas, sino que además con el fin de sanar sus enfermedades.

El conocimiento de la utilización de plantas con fines terapéuticos lo fue adquiriendo con el paso del tiempo de modo totalmente empírico, siendo transmitido de generación en generación de padres a hijos. Aunque este tipo de prácticas estaba asociado con ritos mágicos, religiosos y normalmente su éxito se atribuía a fuerzas divinas, existen documentos escritos de más de 6000 años de antigüedad que incluyen descripciones de algunas plantas medicinales (Sagrera, 1991).

Con el paso del tiempo y el desarrollo de la agricultura se intensificó el interés hacia las plantas medicinales, llegando a utilizar aceites esenciales obtenidos a partir de las plantas de interés. A medida que pasaba el tiempo cada vez se encontraban nuevas plantas con propiedades excepcionales para el uso terapéutico y llegado el momento en que era difícil su estudio, se hizo una clasificación de las mismas surgiendo así nombres ilustres en el campo de la botánica (Sagrera, 1991).

El conocimiento de las plantas medicinales en la actualidad ha llegado a un nivel muy elevado. Ahora además de saber las propiedades de cada planta se sabe el efecto sobre el organismo y los principios activos que provocan tal efecto. El poder aislar y conocer los principios activos de las plantas

medicinales dio comienzo a la síntesis orgánica de éstos y con ello a un desinterés, cada vez mayor, hacia la planta de la cual provenía. Sin embargo, los efectos secundarios que muchos de estos compuestos sintéticos han provocado durante el tratamiento de alguna enfermedad, nos lleva de nuevo a la medicina tradicional por ser al parecer la más tolerada por el cuerpo. No obstante, la medicina tradicional se encuentra con otro obstáculo, la aceptación de sus resultados (Sagrera, 1991; Taddei et al, 1999).

4.1.2 La medicina tradicional en México

Aunque la OMS establece como medicina tradicional al “*Conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales*” (OMS, 1991). La aceptación de esta misma está viéndose afectada por la falta de difusión por parte de las instituciones de salud y sus profesionales, pues existe mayor apoyo a la utilización de medicamentos que de plantas medicinales que pudiesen prevenir o aliviar síntomas de las enfermedades así como la regulación beneficiosa de las mismas en apoyo a los tratamientos médicos ya establecidos. Esto ocurre a pesar del reconocimiento que existe por parte de la población, que ha adquirido los conocimientos de generación en generación, razón por la cual es indispensable el estudio completo de las propiedades de la planta medicinal en cuestión, así como las posibles reacciones adversas que pudieran ocasionar sus demás componentes (Sagrera, 1991; Taddei et al, 1999; Zhang, 2016).

México posee una de las cubiertas vegetales más variadas de la tierra y esto se debe a la presencia de casi todos los biomas descritos en el planeta, la diversidad de condiciones fisiográficas y climáticas presentan una amplia gama de combinaciones que propician el desarrollo de una gran variedad de

vegetación. Como se ha mencionado anteriormente esta variedad representa tener en México un gran potencial en cuanto a plantas medicinales ya que se considera por especialistas en la materia, que una de cada siete especies posee una actividad curativa. Aunque el conocimiento que existe de la vegetación del país está lejos de ser perfecto, cabe destacar que es abundante el número de trabajos de estudios realizados a dicha vegetación (Huerta, 1997; Lozoya, 1997; Rzedowski, 2006).

En México existen alrededor de 4000 especies de plantas con propiedades medicinales y esto corresponde al 15% de la flora total, no obstante se calcula que sólo el 5% de estas especies tienen la validación química, farmacológica y biomédica necesaria para su aceptación y adecuada utilización para coadyuvar en el tratamiento de alguna enfermedad. Por esta razón actualmente, las industrias farmacéuticas cuentan con líneas de investigación de etnobotánica y quimiotaxonómica para poder clasificar las características químicas de las plantas medicinales y así ayudar a resolver algunas de las enfermedades más importantes de la humanidad (Huerta, 1997; Lozoya, 1997).

Basados en lo anterior este trabajo se realizó para hacer una evaluación *in vitro* del AE de *D. bicolor* para poder determinar si presenta actividad genotóxica ó citotóxica.

4.2 *Decatropis bicolor*

4.2.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *Decatropis bicolor* es la siguiente:

Reino: Plantae

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Rosanae

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Género: *Decatropis*

Especie: *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk (GBIF, 2016)

(Radlkofer,2016)

4.2.2 Familia Rutaceae

D. bicolor pertenece a la familia Rutaceae, que comprende 161 géneros y 1813 especies en todo el mundo, también es llamada como familia del naranjo o de la ruda y se caracteriza por su fuerte aroma y néctar abundante, la mayoría de los géneros son arbustos o árboles aromáticos, con presencia de triterpenos (limonenos: sustancias amargas) y a menudo también se presentan varios alcaloides. Su distribución es de regiones tropicales, subtropicales y templadas. Esta familia se encuentra relacionada con las familias del complejo Rutales-Salpindales (GBIF, 2016; Zolefer, 2004).

4.2.3 Características de *D. bicolor*

D. bicolor es un arbusto de 1.2 a 3 metros de altura, sus hojas tienen de 5 a 10 folíolos verdes en su parte superior, los cuales son café amarillento en la inferior. Las flores son pequeñas y blancas, se presentan en los meses de febrero a abril. Crece en bosque mesófilo y tropical perennifolio además del matorral xerófilo, es endémica de la región noreste de México y es una planta muy conocida y utilizada en el Valle del Mezquital. Tiene como nombre común: Aranthó, chile anchillo, palo de muerto y hoja dorada (Cortés, 2005; Estanislao, 2016a).

4.3 Usos medicinales

D. bicolor es una planta mexicana ampliamente utilizada por sus propiedades anti-inflamatorias, antifúngicas, antimicrobianas, cicatrizantes, como tratamiento del cáncer de mama y cervico uterino, además de ser empleado para enfermedades de hígado para lo cual se hierven uno o dos folíolos en medio litro de agua bebiendo una taza de infusión en la mañana y otra por la tarde (Bautista, 2007; Cortés, 2005; Estanislao, 2016^a; Estanislao, 2016^b; Ríos, 2012).

4.3.1 Actividad anti-inflamatoria

Las cumarinas son los metabolitos comunes en la familia Rutaceae, ya que se han encontrado aproximadamente 200 cumarinas. Estos compuestos se sintetizan por rutas similares a otras familias sintetizadoras de cumarinas, donde la umbeliferona se considera un intermediario de la biosíntesis de estas, ya sean lineales o angulares. Hay diversificación debido a la incorporación de unidades prenilo al núcleo cumerínico dando así a las plantas sintetizadoras propiedades anti-inflamatorias (García, 2003; Ríos, 2012).

Se ha determinado la actividad anti-inflamatoria de *D. bicolor* debido a los estudios que se le han realizado, García y colaboradores en 1999 evaluaron esta característica utilizando distintos compuestos cumarínicos que se obtuvieron por medio de cromatografía de las hojas y flores de la misma, encontrando los siguientes compuestos: heraclenina, seselina, psoralenina, imperatonina, skimmianina y heradenol. Dicha evaluación se llevó a cabo utilizando un modelo murino de edema producido por 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol, donde determinaron que los compuestos cumarínicos con mayor efecto anti-inflamatorio fueron la heraclenina y heradenol, pues

presentaron una inhibición de edemas en un 75 y 73% en una dosis de 1mg (García, 1999).

Se ha descrito que la preparación tradicional para la actividad anti-inflamatoria es realizar una infusión con ramas y lavar las zonas afectadas con esta infusión una o dos veces al día, además se puede utilizar como unguento el jugo de las hojas con aceite vegetal o vaselina, indicando que no solo sirve como anti-inflamatorio sino también detiene hemorragias, es astringente y cicatrizante (Bautista, 2007; Chateauneuf, 2011; Cortes, 2005).

4.3.2 Actividad anti-fúngica

El estudio de Cárdenas y colaboradores en 2005 evidenció la actividad anti-fúngica de *D. bicolor* en el estudio que realizaron a seis plantas sobre *Aspergillus flavus*. Para esto obtuvieron diferentes tipos de extractos: hexánico, clorofórmico y etanólico, utilizando como método de extracción percolación y calentamiento a temperatura de ebullición, los extractos hexano, cloroformo, diclorometano, etanol y metanol por maceración. Cabe destacar que al igual que García y colaboradores en 1999, obtuvieron del análisis fitoquímico cumarinas y esteroides. La evaluación anti-fúngica se realizó determinando los diámetros de inhibición en medio Czapek, donde se pudo determinar que *D. bicolor* posee actividad anti-fúngica en su extracto hexánico obtenido por maceración, a dosis de 25 µg de extracto por caja. Dichos resultados sugieren que los componentes con esta actividad son poco polares y termolábiles (Cárdenas, 2005; Moreno, 2009).

4.3.3 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana está documentada por los estudios de Tovar en 2010 y Cortes en 2005. Ambos estudios coincidieron en la actividad

antimicrobiana de *D. bicolor* con extractos de cloroformo y acetato de etidio, como los que presentaban mayor actividad, determinada al observar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida, al exponerse a cepas de *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* (Cortes, 2005; Tovar et al, 2010).

4.3.4 Actividad anticancerígena

Como ya se ha mencionado antes *D. bicolor* es ampliamente utilizado por la población central en especial en el estado de Hidalgo, como tratamiento para el cáncer de mama y cérvico uterino. Su modo de preparación es la infusión de 3 hojas por litro de agua, la cual se toma durante el día, sin embargo, en el trabajo de Cortes en 2005 y de Bautista en 2007 se expone el uso delicado de esta planta porque puede causar ceguera (Bautista, 2007; Cortes, 2005; Estanislao, 2016b).

Las propiedades que presenta esta planta han sido estudiadas recientemente, para avalar dichas propiedades. Estanislao y colaboradores en 2016, realizaron un estudio muy importante que evaluó en especial la propiedad anticancerígena de *D. bicolor* (Cortés, 2005; Estanislao et al, 2016b).

El estudio realizado por Estanislao y colaboradores en 2016, consistió en la recolección, clasificación y obtención de extractos así como del AE, para posteriormente evaluar la actividad antitumoral exponiendo células de la línea celular MDA-MB-231 (cáncer de mama) al aceite, encontrando así un efecto citotóxico a una CI_{50} de 58.81 $\mu\text{g/mL}$. Cabe destacar que el aceite esencial fue el que mostró una mejor actividad citotóxica, pues los extractos con solventes presentaron menor actividad, por lo que es evidente que en cada método de extracción la composición de sustancias polares y no

polares propias de la planta va a diferir, además de que se va a ver afectada por las condiciones que se le den a la extracción. Debido al método de extracción que utilizaron se sugiere que la propiedad antitumoral se debe a los compuestos no polares existentes en la planta (Estanislao et al, 2016b).

La actividad citotóxica que presentó el AE de *D. bicolor* es considerada selectiva, ya que se expuso también al aceite la línea celular epitelial mamaria MCF-10A, donde no se observó actividad citotóxica considerable en comparación a la que presentaba la línea MDA-MB-231. Se determinó, además, que los mecanismos moleculares por los cuales ejerce su efecto es la inducción de apoptosis, debido a las características típicas que presentaban las células, el tiempo en que se daba la fragmentación del DNA, les indicó que los componentes del AE inducen un daño celular casi inmediato. El AE de *D. bicolor* activa las caspasas 9 y 3 en tratamientos a tiempos cortos, lo que quiere decir que es por la vía intrínseca por la cual manda a las células cancerosas a apoptosis, mostrando los cambios morfológicos característicos y la aparición de los cuerpos apoptóticos. Sin duda alguna es una de las propiedades que se busca en un tratamiento para cáncer, ya que manda a las células a apoptosis en lugar de inducir efectos necróticos que afecten a las demás células. Por último, en este estudio se determinó que los principales compuestos que pudieran estar involucrados en la actividad citotóxica son el 1-5-ciclooctadieno, 3-propenilo (metil-2) y 1- (3-metil-ciclopent-2-enil-ciclohexeno (Estanislao et al, 2016b).

Otro estudio realizado por Cortes y colaboradores en 2005, evaluó la actividad de *D. bicolor* en cáncer cérvico uterino, ambos estudios ya mencionados concuerdan en la composición principal de esta planta, sin embargo, en este último estudio no se encontró actividad citotóxica de *D. bicolor* en la línea celular HeLa. Ya que el extracto utilizado fue etanólico se

puede inferir que aquellos compuestos no polares, que al parecer son los causantes de la citotoxicidad y que son mencionados en el estudio de Estanislao 2016, no se encuentran presentes en el extracto que fue utilizado por el carácter polar del etanol (Cortés, 2005; Estanislao et al, 2016b).

4.4 Metabolitos secundarios y genotoxicidad

4.4.1 Metabolitos secundarios

Los compuestos orgánicos sintetizados por las plantas que no poseen relación directa con el crecimiento y desarrollo de la misma, son llamados metabolitos secundarios o productos naturales y son precisamente estos compuestos, los que tienen propiedades curativas para ciertas enfermedades. Además de la clara diferencia en cuanto a función entre los metabolitos primarios y secundarios, estos últimos tienen una distribución restringida, es decir, se encuentran con frecuencia solo en una especie vegetal o especies relacionadas y en ciertas partes de la planta. Por ejemplo, se puede inferir que *D. bicolor* almacena sus metabolitos secundarios responsables de la actividad anticancerígena en las hojas, pues son las que se utilizan en la infusión que toman las personas que mantienen este tratamiento (Cortés, 2005; Lincon y Zaiger, 2006).

Dichos compuestos no fueron sintetizados a lo largo de la evolución para los fines con los que son utilizados ahora, sino más bien son una respuesta a la adaptación de los vegetales a lo largo del tiempo. Se sabe que los metabolitos secundarios cumplen funciones como: (Lincon y Zaiger, 2006)

- Proteger a la planta de ser ingerida por algún herbívoro o de las infecciones provocadas por las bacterias.

- Atraer a los polinizadores y dispensadores de semillas.

Relacionando un poco las funciones antes descritas y las propiedades de *D. bicolor*, se hace evidente la relación que existe entre ambas, siendo la actividad antimicrobiana encontrada en *D. bicolor* parte de su misma protección a infecciones y la atracción de los polinizadores, asociada a las cumarinas y esteroides que dan la característica no solo a *D. bicolor*, sino a la familia Rutaceae de tener un fuerte aroma. Sin embargo, hay que considerar que los metabolitos secundarios de una planta no son de un solo tipo o con propiedades similares, ya que dependiendo de la especie, las plantas tendrán una variedad y número establecido y estos no precisamente apoyarán los objetivos con los que se utilizan (Cortés, 2005; Lincon y Zaiger, 2006).

4.4.2 Estudios realizados a las plantas medicinales

Para poder utilizar una planta como parte de un tratamiento médico es indispensable realizar estudios que avalen que no representa riesgos a la salud. En 1991 la OMS dictaminó las “Pautas para la evaluación de medicamentos herbarios”, con el fin de facilitar el desarrollo, evaluación y registro realizado por los organismos de reglamentación, con fines científicos e industriales. Dichas pautas adaptadas a las necesidades de cada país pueden ser útiles para una clasificación futura de medicamentos herbarios, dentro de los estudios que se deberían realizar están los siguientes: (OMS, 1991)

- Evaluación de calidad: Evaluación farmacéutica, material vegetal bruto, preparaciones vegetales, producto acabado y estabilidad.
- Evaluación de la inocuidad: Estudios toxicológicos, documentación de la inocuidad basada en la experiencia.
- Evaluación de la eficacia: Actividad, pruebas exigidas para respaldar las indicaciones, productos combinados y uso previsto.

Además de las pautas antes descritas la NOM-220-SSA1-2002, Instalación y operación de la farmacovigilancia, estipula que se deberá de dar el adecuado seguimiento a las plantas medicinales o remedios herbolarios elaborados a partir de las primeras, pues aunque las propiedades han sido establecidas podrían generar reacciones adversas tardías. Un producto herbolario no solo debe cumplir con lo anterior sino que también debe cumplir la NOM-248-SSA1-2011, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios, ambas normas con la finalidad de que se garanticen productos herbolarios de calidad (DOF, 2002; DOF, 2011; OMS, 1991).

En las pautas descritas por la OMS se encuentra dentro de la evaluación de inocuidad un apartado para estudios toxicológicos, como parte de los estudios toxicológicos, los estudios genotóxicos son de gran importancia para poder garantizar que el producto herbolario a utilizar no es peligroso para la salud. La genotoxicidad se describe como el daño inducido al material genético, entendiendo como material genético a todo aquel componente celular que se encuentre relacionado con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula (Abrevaya, 2008; OMS, 1991).

4.4.3 Genotoxicidad

Los agentes que causan genotoxicidad son llamados genotóxicos y de acuerdo a su origen se clasifican en: físicos y químicos. En esta última categoría se encuentran los agentes de origen vegetal, los cuales en su mayoría representan plantas con propiedades medicinales que pueden representar un riesgo a la salud, ya sea por su dosis o por la falta de la caracterización en cuanto a su genotoxicidad. Es por eso que es imprescindible el reconocimiento, caracterización y seguimiento de los efectos en distintos niveles de análisis. Dicho trabajo es objetivo de la Genética Toxicológica, la cual se encarga del monitoreo ambiental y humano por distintos tipos de exposición. Como ejemplo

de ello, *D. bicolor*, por la propiedad anticancerígena que presenta tiene la necesidad de ser estudiado a fondo en este aspecto, ya que Bautista en 2007 y Cortes en 2005, han indicado en sus respectivos trabajos, el delicado uso que debe tener *D. bicolor* pues pueden llegar a presentar serias reacciones adversas relacionadas a la dosis, como la ceguera, de la cual aún no se conocen los mecanismos de acción. (Abrevaya, 2008; Bautista, 2007; Cortés, 2005)

4.5 Micronúcleos *in vitro*

4.5.1 Antecedentes

En la actualidad tiene un gran impacto el estudio de la relación que existe entre factores ambientales y sus repercusiones a nivel genético, debido a que el daño en el DNA a nivel de cromosomas es un evento importante para la carcinogénesis. Las anormalidades cromosómicas entonces, son consecuencia de daños a nivel del DNA, las roturas cromosómicas pueden ser causadas por roturas en la doble hélice de DNA, además que la pérdida de cromosomas y la mala segregación son acontecimientos importantes para el envejecimiento y por supuesto para el cáncer (Fenech et al, 1999; Fenech, 2000; Fenech, 2006).

Anteriormente la citogenética clásica estudiaba el daño cromosómico mediante la observación minuciosa de metafases, lo que proporciona un análisis más detallado si éste se realiza por personal experto en el área; debido a que es una técnica compleja y dentro de su metodología existe el peligro de la pérdida de cromosomas en metafase, se han desarrollado nuevos sistemas más sencillos que permiten medir el daño cromosómico. Fue así como Schmid y Heddle desarrollaron una manera más simple de poder evaluar el daño cromosómico *in vivo* con los llamados micronúcleos, también conocidos por los hematólogos como cuerpos de Howell Jolly (Fenech et al, 1999; Fenech, 2000).

4.5.2 Micronúcleos

Los MN se originan a partir de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que no serán parte de los núcleos de las células hijas, la aparición de los MN está inducida por el daño genético a nivel de cromosoma y como consecuencia el porcentaje normal que se presenta se puede ver aumentado por la presencia de agentes genotóxicos. Debido a los mecanismos por los que se forman los MN, éstos proporcionan una medida de ruptura o la pérdida completa del cromosoma, además ha mostrado tener la misma sensibilidad de la observación minuciosa de la metafase. El ensayo de MN tiene ventajas importantes además de facilitar el trabajo por ser una metodología más sencilla, como la facilidad de lectura y la ventaja estadística que aporta al utilizar un número mucho mayor de células en comparación con las metafases que se deben contar y analizar para dar un resultado (Fenech et al, 1999; Bull et al, 2011).

Los MN se forman a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos (no presentan centrómero) o cromosomas enteros. Para el caso de los primeros, éstos se originan cuando la carga de daño al DNA supera la capacidad de diversos mecanismos de reparación, como la recombinación homóloga y reparación por escisión, además de una sobrecarga de daño también se ve promovida la aparición de micronúcleos, cuando hay errores en genes que participan en la transcripción de enzimas involucradas en estos mismos mecanismos, por ejemplo ATM, BRCA1, BRCA2 y RAD51. Incluso los MN se pueden presentar por simple fragmentación cromosómica durante la telofase (Cheong et al, 2013; Nakamura et al, 2016; Speit et al, 2012).

Cuando el micronúcleo está formado por un cromosoma completo puede deberse a distintos mecanismos, el más sencillo es el aumento de micronúcleos que hay cuando envejecemos, normalmente con un porcentaje mayor para el sexo femenino, por la inactivación del cromosoma X. Sin embargo, existen varios mecanismos por los cuales existe la segregación

errónea de los cromosomas en la anafase, por ejemplo, la hipometilación de la citosina (Cheong et al, 2013; Speit et al, 2012).

4.5.3 Ensayo de micronúcleos

El ensayo de MN en medula ósea y eritrocitos en sangre periférica se convirtió en uno de los mejores ensayos citogenéticos *in vivo* en el campo de la genética toxicológica, sin embargo, no es aplicable para otro tipo de células ni para ser usadas *in vitro*. Como respuesta a esta necesidad se desarrollaron nuevas técnicas en una vasta variedad de células nucleadas *in vitro*, las cuales no solo solucionaron las limitaciones en cuanto a células empleadas, sino que también se garantiza que sólo se evalúen células con una sola división (Fenech, 2000).

Los MN entonces, se presentan en células que han completado la división celular, durante la telofase se forma la membrana nuclear alrededor de los cromosomas rezagados y fragmentados, teniendo una morfología igual a un núcleo, pero de menor tamaño y de ahí el nombre de “micronúcleos”. Antes de la citocinesis, la célula se presenta binucleada y presenta un micronúcleo, del cual, su destino es incierto tras esta misma. Además, de vez en cuando podría presentar puentes nucleoplásmicos, los cuales son cromosomas dicéntricos, en los que los dos centrómeros migraron a polos opuestos de la célula. Por lo anterior es evidente que el ensayo aunque es capaz de evaluar el daño al DNA, no puede tomar en cuenta aquellas células que no se dividen o no se completa su cinética de división. La necesidad de desarrollar un ensayo donde se pudiera distinguir entre células que se dividen y las que no, llevó a Fenech y Morley en 1985 a utilizar la Cyt-B (Fenech, 1999; Fenech, 2000; Fenech, 2006).

4.5.4 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis

Es así como surge el ensayo de MN con bloqueo de citocinesis, el cual se fundamenta en la evaluación de células que han completado una división

celular y cuya apariencia es binucleada, gracias al bloqueo de la citocinesis derivado del uso de Cyt-B. La Cyt-B inhibe la polimerización de la actina requerida para el anillo de microfilamentos que se forma cuando se constriñe el citoplasma durante la citocinesis. Por lo tanto existe una gran concentración de células en división, mayormente binucleadas independiente de la sincronía y proporción de células que se encuentran en división (Fenech et al, 1999; Fenech, 2000; Fenech, 2006).

Aunque el método fue utilizado en sus inicios con linfocitos humanos, en la actualidad también se utilizan células de médula ósea y diversas líneas celulares. Además se han reportado numerosos desarrollos en esta misma técnica que han permitido una mejor y más completa evaluación genotóxica, tales como la distinción del origen del micronúcleo (cromosomas enteros o fragmentos), el conteo de puentes nucleoplásmicos, la conversión de los sitios de escisión dentro de una división celular, el uso de sondas moleculares para la identificación de la no disyunción y la integración de las células necróticas y apoptóticas al ensayo. Incluso se ha planteado que sea utilizado para la evaluación de genotoxicidad de nuevos productos químicos en lugar del análisis de metafases. Para la parte de citotoxicidad el ensayo permite la determinación del índice de proliferación por bloqueo de citocinesis (CBPI), el cual sirve para evaluar si el compuesto problema induce una disminución en la proliferación celular. Además del CBPI, se determina el % de citostasis, el cual indica qué tanto bloqueo del proceso de mitosis ejerce la sustancia problema (Fenech et al, 1999; Fenech, 2000; Fenech, 2006; Cheong et al, 2013).

4.5.5 El proyecto humano de micronúcleos y sus criterios de puntuación

La importancia que ha adquirido este ensayo es tal, que es imprescindible mencionar el HUMN (proyecto humano de micronúcleos), en el cual participan más de 30 laboratorios de todo el mundo con el objetivo de mejorar la aplicación y comprensión del ensayo de MN con bloqueo de citocinesis como medida *ex vivo* del rompimiento de cromosomas y pérdida de los mismos en

poblaciones humanas. Principalmente este proyecto se encarga de mejorar el rendimiento del ensayo identificando variables en la metodología que pudieran afectar y de ese modo aminorar la confusión y el error que representa. Como consecuencia se aumenta la precisión y con ella la fiabilidad al identificar las condiciones que aumentan la tasa de daño al DNA (Fenech, 2002; Fenech, 2003; Kirsch et al, 2014).

Actualmente el ensayo CBMN es el más utilizado para medir la frecuencia de MN en linfocitos humanos y debido a esto la necesidad de estandarizar la metodología se hizo evidente más aun con el primer estudio que realizó el HUMN, que consistió en recopilar datos de frecuencias de MN en linfocitos en 6583 sujetos de 25 laboratorios en 16 países, donde se encontró que el 47% de la variación observada en dichos resultados era a causa de variables metodológicas y criterios de puntuación. Por lo tanto, se llevó a identificar los criterios de puntuación adecuados para homogenizar la manera de seleccionar las células, MN, puentes nucleoplásmicos, células apoptóticas y necróticas. (Fenech, 2000; Kirsch et al, 2014).

- Criterios para la selección de células binucleadas (CB) (Fenech, 2000).
 1. Las células deben ser binucleadas.
 2. Los dos núcleos en una célula binucleada deben tener membranas nucleares intactas y se encuentren dentro del mismo límite citoplasmático.
 3. Los dos núcleos en una CB deben ser aproximadamente iguales en tamaño, patrón de tinción e intensidad de tinción.
 4. Los dos núcleos dentro de una CB pueden estar unidos por un puente nucleoplásmico fino que es no más ancho que un cuarto del diámetro nuclear más grande.
 5. Los dos núcleos principales en una CB pueden tocar, pero idealmente no deben superponerse entre sí. Una célula con dos núcleos

superpuestos se puede marcar sólo si los límites nucleares de cada núcleo son distinguibles.

6. El límite citoplásmico o membrana de una célula binucleada debe estar intacto y claramente distinguible de la frontera citoplasmática de las células adyacentes.
- Criterios para la puntuación de MN (Fenech, 2000).
 1. El diámetro del MN en linfocitos humanos por lo general varía entre $1/16$ y $1/3$ del diámetro medio de los principales núcleos que corresponde a $1/256$ y $1/9$ de la zona de uno de los principales núcleos en una CB, respectivamente.
 2. Son redondos o de forma oval.
 3. No son refringentes y por lo tanto se puede distinguir fácilmente de artefactos tales como partículas de tinción.
 4. No están relacionados o conectados con los principales núcleos.
 5. Los MN pueden tocar, pero no se superponen los principales núcleos y el límite micronuclear debe ser distinguible de la frontera nuclear.
 6. Por lo general tienen la misma intensidad de tinción que los núcleos, pero puede ser más intensa.
 - Criterios para el recuento de puentes nucleoplásmicos (Fenech, 2000).
 1. Son un enlace nucleoplásmico continuo entre los núcleos en una célula binucleada.
 2. La anchura de un puente nucleoplásmico puede variar considerablemente, pero por lo general no es superior a la cuarta parte del diámetro de los núcleos dentro de la célula.
 3. Deben tener las mismas características de tinción de los núcleos principales.
 4. En raras ocasiones se pueden observar más de un puente nucleoplásmico dentro de una CB.

5. Una CB con un puente nucleoplásmico puede o no contener uno o más micronúcleos.
- Los criterios para calificar las células apoptóticas (Fenech, 2000).
 1. Se pueden identificar por la presencia de condensación de la cromatina dentro del núcleo y los límites citoplasmáticos y nucleares intactos.
 2. Se observa fragmentación nuclear en cuerpos nucleares más pequeños dentro de una membrana citoplasmática intacta.
 3. Intensidad de la tinción en el núcleo, fragmentos nucleares y citoplasma son generalmente más fuerte que en las células viables.
 - Criterios para células necróticas (Fenech, 2000).
 1. Se pueden identificar por la presencia de un citoplasma pálido con numerosas vacuolas (principalmente en el citoplasma y algunas en el núcleo) y la membrana citoplasmática dañada con un núcleo intacto.
 2. La intensidad de la tinción del núcleo y el citoplasma es generalmente menor que la observada en las células viables.

Además del HUMN, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) ha realizado una guía de ensayos para productos químicos, donde la número 487 pertenece a los MN *in vitro* e indica todas las consideraciones de la realización de este ensayo y la manera correcta de reportar los resultados, dicha guía fue utilizada para el presente estudio (OECD, 2013; Rosefort et al, 2004).

4.6 El futuro del ensayo de MN con bloqueo de citocinesis

En resumen, la técnica de MN *in vitro* proporciona una amplia base para la evaluación del daño cromosómico en distintos tipos de células sometidas a división celular durante o después de la exposición a las sustancias de ensayo, las cuales pueden ser tanto aneugénicas como clastogénicas (OECD, 2013; Rosefort et al, 2004).

El estudio realizado en 2004 por Rosefort y colaboradores comprobó una hipótesis que ya se había planteado por Elhajouji en 1998, la cual consistía en permitir diferenciar el daño inducido por un agente clastogénico y aneugénico en este ensayo. Se mostró que la frecuencia de MN producida por aneugénicos era mayor en células mononucleadas y binucleadas a diferencia de los agentes clastogénicos que solo muestra aumento de MN en células binucleadas. Aunque para afirmar dicho acontecimiento se deben realizar diversos estudios con el fin de confirmar no solo dicha hipótesis sino además dilucidar los mecanismos moleculares que lo acontecen, Rosefort y colaboradores explican en su estudio que pudiera ser una sinergia desconocida entre el agente aneugénico y la Cyt-B, ya que como se ha mencionado, el hecho de encontrar un MN en una célula que no ha estado en división representa con mayor probabilidad que sea más un evento aleatorio normal que el daño causado por dicho agente, sin embargo, el conteo de MN en controles negativos marca una diferencia representativa que lleva a pensar en que dicha sinergia podría hacerlas insensibles a la acción de la Cyt-B. Lógicamente esta nueva oportunidad de desarrollo para esta técnica necesita de más estudios para determinar si es factible y enriquecedor a la evaluación del ensayo el conteo de MN en células mononucleadas (OECD, 2013; Rosefort et al, 2004).

La técnica de CBMN se ha desarrollado en los últimos años de manera tal, que ya no solamente es útil para la medición de MN, sino también para medir puentes nucleoplásmicos, brotes nucleares, tasa de división celular, necrosis y apoptosis. Por lo que, durante los últimos 17 años, se ha vuelto un ensayo integral que ha sido combinado también con el uso de sondas centroméricas o anticuerpos de anti-cinetocoro, además de medir los puentes nucleoplásmicos como un biomarcador de cromosomas dicéntricos, siendo el resultado de telómeros fusionados o mala reparación del DNA. También los brotes nucleares se consideran un biomarcador para detectar la amplificación génica y dosificación (Fenech, 2006; Speit et al, 2012).

En resumen, se ha hecho del CBMN un "cytome" de inestabilidad cromosómica. Donde el concepto "cytome" implica que cada célula estudiada se obtuvo citológicamente por su estado de viabilidad (necrosis y apoptosis), su estado mitótico (mononucleadas, binucleadas, multinucleadas) y su inestabilidad cromosómica o el estado de daños (presencia de MN, puentes nucleoplásmicos o el número de señales de la sonda centrómero entre núcleos de célula si se llegaran a usar). Esto representa más resultados para una evaluación más completa y como era de esperarse este ensayo se ha automatizado en los últimos años y se ha adaptado a la Citometría de Barrido Laser para la biodosimetría de radiación (Fenech, 2006; Fenech, 2013; Bull et al, 2011; Maxime et al, 2014; Nakamura et al, 2016).

5. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se ha vuelto muy importante la investigación de nuevas alternativas para el tratamiento de numerosas enfermedades que aquejan la vida del ser humano, esta ardua investigación se lleva a cabo debido a las reacciones adversas que tienen ciertos medicamentos en el paciente. Tratando de evitar esta situación se ha optado por regresar a la medicina tradicional, buscando nuevas plantas que no solo tengan propiedades que puedan ayudar al tratamiento de dichas enfermedades, sino que además no presenten reacciones adversas.

El conocimiento de las plantas medicinales ha perdurado de generación en generación en regiones determinadas, basándose en conocimientos empíricos y en la flora característica de la zona. Por ejemplo *D. bicolor* es una planta muy utilizada en el estado de Hidalgo como tratamiento para diversas enfermedades, entre ellas y la que hasta ahora tiene estudios más especializados es el cáncer de mama. El que haya estudios que validen esta propiedad como el realizado por Estanislao y colaboradores en 2016, hace que se centre la atención en dicha planta por la importancia a nivel de salud pública que tiene el cáncer de mama.

No obstante antes de poder ser utilizada como tratamiento se debe descartar la posibilidad de que *D. bicolor* tenga efectos genotóxicos y citotóxicos, por lo que evaluarla con el ensayo de MN con bloqueo de citocinesis representa un paso más en la serie de estudios que aún faltan por realizar para confirmar del todo sus propiedades y garantizar su inocuidad.

6. OBJETIVOS

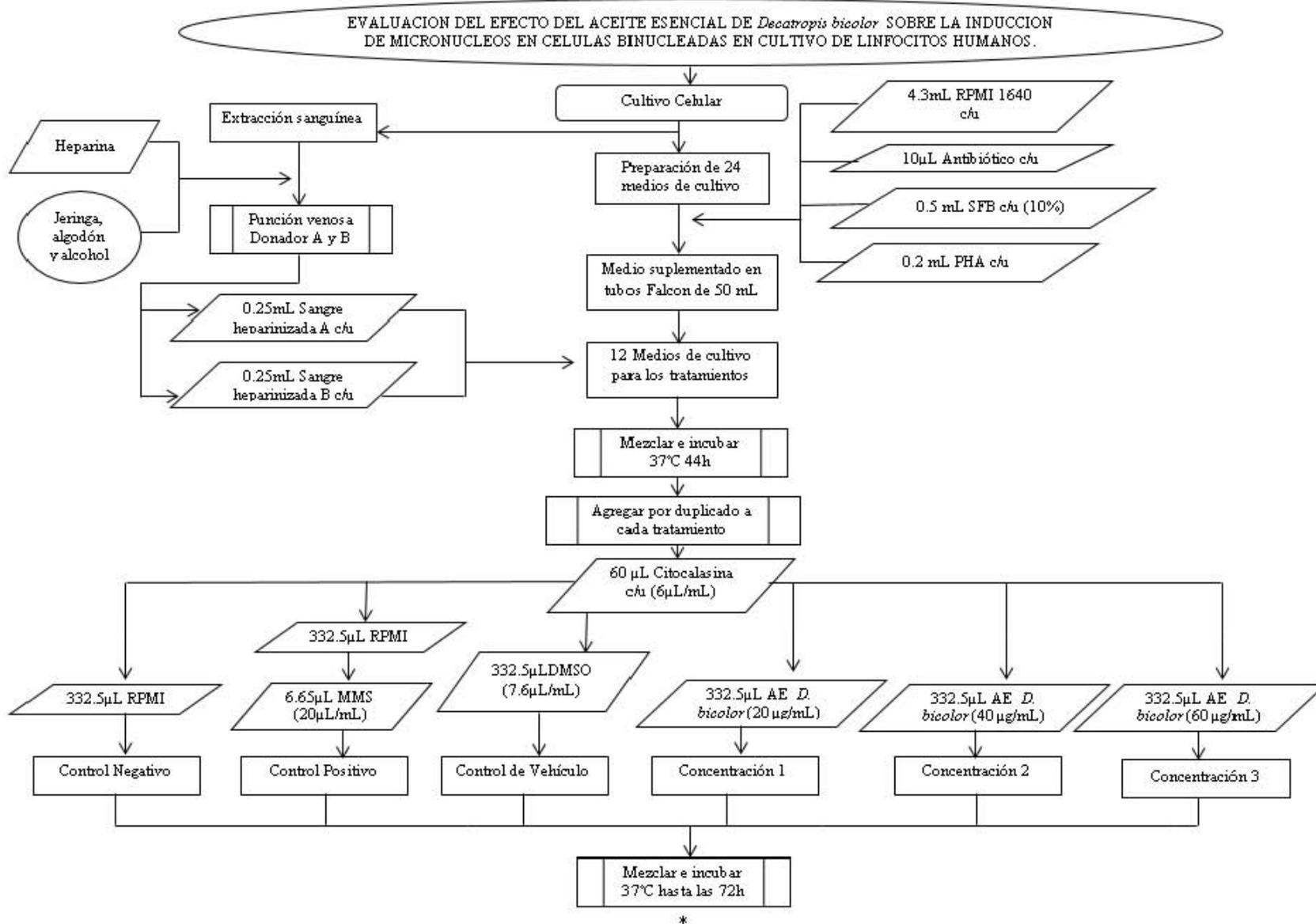
6.1 GENERAL

Evaluar la actividad genotóxica del AE de *D. bicolor*, mediante la prueba de micronúcleos en células binucleadas obtenidas a partir de cultivo celular de linfocitos humanos.

6.2 PARTICULARES

- Obtener la frecuencia de CBMN bajo tres diferentes concentraciones del AE de *D. bicolor* en cultivo de linfocitos humanos como evidencia del efecto genotóxico que pudiera tener sobre dichas células.
- Determinar el efecto citotóxico del AE de *D. bicolor*, mediante la determinación del CBPI y % de Citostasis.
- Determinar la concentración ideal de metil metanosulfonato (MMS) como control positivo para la técnica de MN con bloqueo de citocinesis a las condiciones experimentales del Laboratorio de Citogenética L521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

7. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL



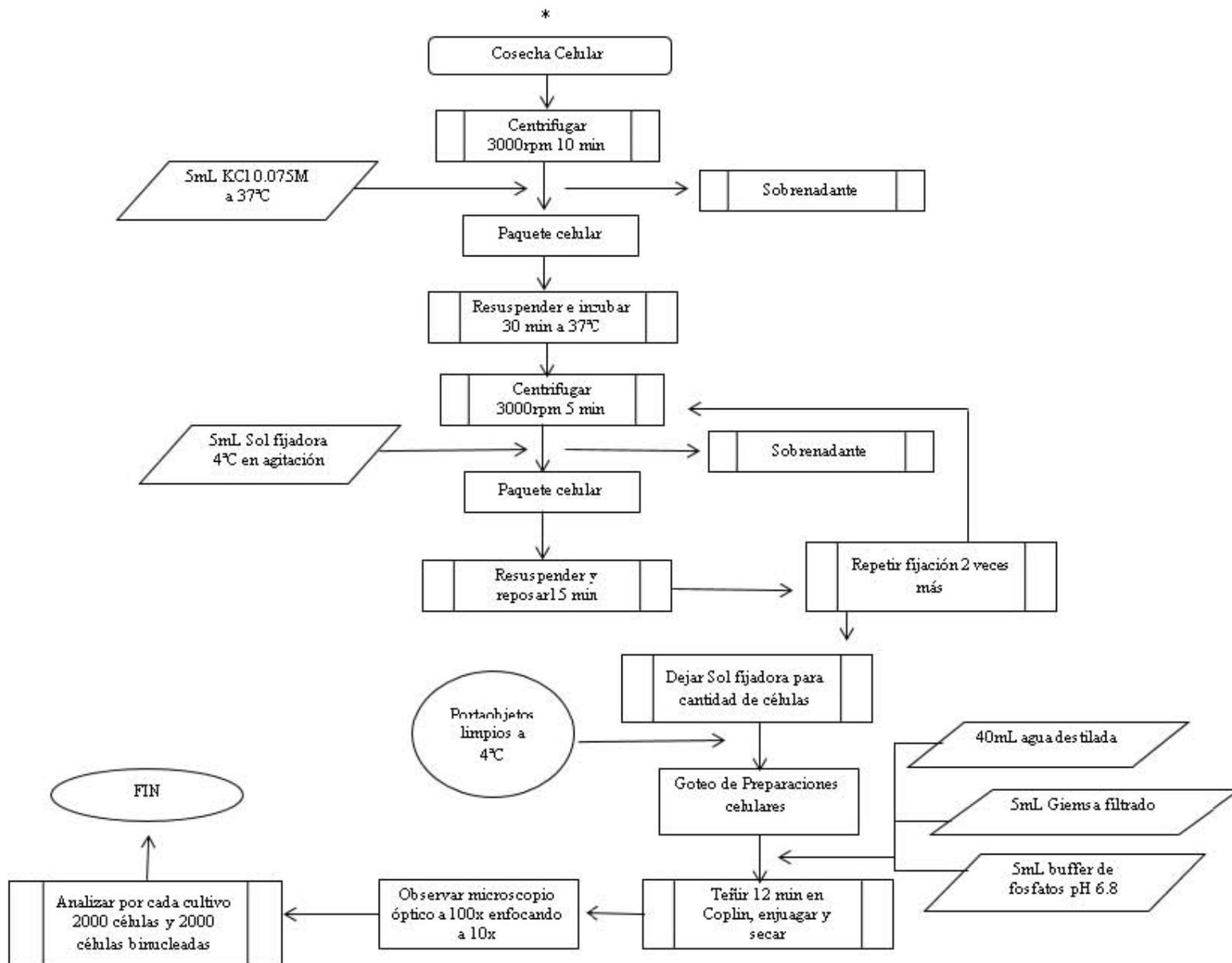


Figura 1. Diagrama Experimental

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Obtención del extracto

El AE utilizado para este estudio fue proporcionado por el Instituto Politécnico Nacional (IPN) y fue extraído en la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del mismo modo que fue realizado por Estanislao y colaboradores. (Estanislao, 2016b)

8.2 Cultivo celular

Se utilizó un cultivo de linfocitos humanos para lo cual se seleccionaron dos donantes femeninos, clínicamente sanos y no fumadores. La sangre se obtuvo por punción venosa con jeringa estéril previamente heparinizada con Inhepar 1000UI/mL solución inyectable. El cultivo celular se preparó y manejó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar tipo A2 Labconco con material nuevo, estéril y desechable. El medio utilizado fue RPMI 1640 (por sus siglas en inglés: Roswell Park Memorial Institute Medium), suplementado por cada 5mL con el 10% de SFB además de 10 μ L de antibiótico (Estreptomicina/Penicilina 1%) y 200 μ L de PHA GIBCO. Se agregaron 250 μ L de sangre heparinizada a cada cultivo por 5mL de medio suplementado. Se realizó un cultivo para cada tratamiento por duplicado y por donante, haciendo un total de 24 cultivos. Los tratamientos utilizados fueron: Control negativo, control positivo, control de vehículo, concentración 1 (20 μ L/mL), concentración 2 (40 μ L/mL), y concentración 3 (60 μ L/mL), Todos los cultivos se incubaron a 37°C durante 44h, posteriormente fueron sometidos a las condiciones de cada tratamiento. (Chein, 2014)

8.3 Tratamientos

Después de las 44h se adicionaron a cada cultivo 60 μ L de una solución de Cyt-B (0.5 μ g/ μ L) para obtener una concentración final en cada cultivo de 6 μ L/mL.

Posteriormente se adicionaron los agentes correspondientes a cada tratamiento como se indica a continuación. (Chein, 2014)

8.3.1 Control positivo

Para el control positivo se utilizó Metil metanosulfonato (MMS) al 99% Aldrich en una concentración inicial de 50µg/mL, ya que en el estudio de Günter y colaboradores en 2012 se utilizaban concentraciones similares. La lectura de dicho tratamiento evidenció una severa citotoxicidad lo cual impidió según los criterios de la OECD que fuera tomado como control positivo, por lo que posteriormente se realizó un gradiente con las siguientes concentraciones: 15µg, 25µg y 35µg/mL, basándonos en las diferentes concentraciones que utilizaban distintos investigadores en sus ensayos *in vitro* con MMS como control positivo. Después de la lectura del gradiente se llegó a la concentración ideal de 20µg/mL para el control positivo bajo nuestras condiciones experimentales. El mutágeno se adicionó 44h después de ser incubado el cultivo celular en una cantidad de 6.65µL se obtuvo una concentración final de 20µg/mL en el cultivo, se adicionó 325.85µL de medio RPMI 1640 para igualar el volumen entre los tratamientos. (Ahmad et al, 2015; Günter et al, 2012; Hosseinimehr et al, 2012; Malini et al, 2009; Ogawa et al, 1998)

8.3.2 Control negativo, de vehículo y concentraciones del aceite esencial

Para el control negativo se adicionaron 332.5µL de medio RPMI para igualar el volumen de los demás tratamientos. En el caso del control de vehículo se tomó la concentración mayor utilizada en los tratamientos con el aceite esencial de *D. bicolor*, la concentración fue de 7.6µL/mL del vehículo que es DMSO para lo cual se adicionó 332.5µL de una solución de DMSO (0.1154µL/µL) para alcanzar la concentración antes mencionada.

Para los tratamientos con el AE de *D. bicolor* las concentraciones utilizadas en esta evaluación se eligieron de acuerdo a los antecedentes previos obtenidos por Estanislao y colaboradores en el IPN. Se prepararon soluciones cuyo volumen

igualado a 332.5 μ L dio una concentración de 20 μ L/mL (C1), 40 μ L/mL (C2) y 60 μ L/mL (C3) respectivamente y los cuales se adicionaron a cada cultivo.

Todos los cultivos fueron nuevamente incubados a 37°C hasta las 72h y después se realizó de la cosecha celular.

8.3.3 Cosecha celular

A las 72h de incubados los cultivos, fueron centrifugados a 3000rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se procedió a realizar el shock hipotónico, se adicionó 5mL de KCl 0.075M a una temperatura de 37°C y se dejaron reposar durante 30 minutos a la misma temperatura. Después de la incubación se centrifugaron a 3000rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante para realizar la primera fijación, para lo cual se agregó en agitación constante 5mL de solución fijadora recién preparada (metanol/ácido acético) en una concentración 6:1 a 4°C, se dejó reposar durante 15 min. Las siguientes dos fijaciones se realizaron de manera similar centrifugando a 3000rpm por 5 min, retirando el sobrenadante y agregando 5mL de solución fijadora por cada repetición. En la tercera fijación se dejó el volumen necesario de solución fijadora para resuspender las células y se obtuvo una solución de células concentrada, la cual se utilizó para el goteo en portaobjetos previamente limpios y mantenidos en etanol a 4°C. El goteo se realizó dejando caer a lo largo del portaobjetos gotas de la solución a una distancia no mayor a los 10 cm y se dejaron secar. Se gotearon 3 portaobjetos por cultivo. (Chein, 2014)

8.3.4 Tinción

Para la tinción se utilizó colorante Giemsa, en un vaso Coplin se agregaron 40mL de agua destilada, 5mL de colorante Giemsa previamente filtrado y 5mL de buffer de fosfatos pH 6.8. Las preparaciones secas se tiñeron durante 12 minutos, se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire. (Chein, 2014)

8.3.5 Evaluación del daño citotóxico y genotóxico

Para el daño genotóxico, se observaron las preparaciones de cada tratamiento en microscopio óptico en el objetivo de 100x y se contaron 2000 células binucleadas, se determinó el número de células binucleadas micronucleadas de cada tratamiento. Para el caso del daño citotóxico, se contaron un total de 2000 células, se determinó el total de células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas para cada tratamiento. Se calculó el CBPI para la evaluación de la citotoxicidad con la siguiente formula: (OECD, 2013)

$$CBPI = \frac{((N^{\circ} \text{ mononucleadas}) + (2 \times N^{\circ} \text{ binucleadas}) + (3 \times N^{\circ} \text{ multinucleadas}))}{N^{\circ} \text{ total de células}}$$

Además del CBPI se calculó el % de citostasis, utilizando al control negativo como referencia control para los demás tratamientos:

$$\% \text{Citostasis} = \frac{((N^{\circ} \text{ binucleadas}) + (2 \times N^{\circ} \text{ multinucleadas})) \div (N^{\circ} \text{ total células})T}{((N^{\circ} \text{ binucleadas}) + (2 \times N^{\circ} \text{ multinucleadas})) \div (N^{\circ} \text{ total células})C} \times 100$$

T= Cada tratamiento

C= Valores obtenidos del control negativo

8.3.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se reportaron con la media y error estándar, para el donador “A” y “B”, los cultivos fueron duplicados para cada tratamiento y la comparación entre tratamientos se realizó con un análisis de varianza (ANOVA), donde se consideraron resultados estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$. Para el análisis estadístico de “AB” se utilizó T-student (OECD, 2013; Barrón y Téllez, 2004).

9. RESULTADOS

9.1 Gradiente de MMS para el control positivo

A continuación se muestran los resultados obtenidos del gradiente que se realizó para determinar la concentración ideal de MMS como control positivo, en la Tabla 1 se muestra tanto el porcentaje como número de células que se diferenciaron a las diferentes concentraciones utilizadas.

Tabla 1. Resultados del gradiente de MMS para el control positivo

Gradiente de Metil metanosulfonato			
Concentración	15µg/mL	25µg/mL	35µg/mL
N° Células mononucleadas	904	1107	1428
% Células mononucleadas	45.2	55.35	71.4
N° Células binucleadas	1059	808	518
% Células binucleadas	52.95	40.4	25.9
N° Células multinucleadas	37	85	54
% Células multinucleadas	1.85	4.25	2.7
Total de Células contadas	2000		
N° Células binucleadas micronucleadas	9	16	20
Total de Células binucleadas	2000		

9.2 Evaluación genotóxica y citotóxica del donador "A" y "B"

Para evaluar el efecto genotóxico y citotóxico del AE de *D. bicolor* se realizó el ensayo de micronúcleos *in vitro* utilizando la sangre del donador "A" y "B" se obtuvieron los resultados mostrados a continuación en la tabla 2 y 3, los cuales se expresan en porcentaje y número de células, divididas en mononucleadas, binucleadas y multinucleadas, estas últimas engloban trinucleadas y tetranucleadas. En la parte de genotoxicidad se detalla el número de micronúcleos en 2000 células binucleadas, además del CBPI y el % de citostasis.

Tabla 2. Resultados de los distintos tratamientos para el donador "A".

DONADOR "A"												
CITOTOXICIDAD	Control Negativo		Control vehículo		C1 20µg/mL		C2 40µg/mL		C3 60µg/mL			
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2		
% Cel. Mononucleadas	47.0	47.1	52.3	53.6	52.5	49.1	52.37	51.95	55.69	52.99		
No. Cel. Mononucleadas	940	942	1046	1072	1050	982	1048	1039	1114	1060		
% Cel. Binucleadas	46.2	47.0	44.9	44.3	45.45	48.2	44.18	42.85	43.08	45.34		
No. Cel. Binucleadas	924	940	898	886	909	964	884	857	862	907		
% Cel. Multinucleadas	6.8	5.9	2.8	2.1	2.05	2.7	3.4	5.2	1.2	1.65		
No. Cel. Multinucleadas	136	118	56	42	41	54	68	104	24	33		
CBPI	1.598	1.588	1.505	1.485	1.494	1.536	1.51	1.532	1.455	1.486		
% Citostasis			14.84	18.22	16.53	9.62	14.00	10.21	23.28	17.96		
Total de Células	2000											
GENOTOXICIDAD	Control Negativo		Control Positivo		Control vehículo		C1 20µg/mL		C2 40µg/mL		C3 60µg/mL	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
CBMN	1	0	13	14	2	1	2	1	1	2	0	0
Total de Células binucleadas	2000											

Para hacer más representativa esta evaluación en cuanto al número de datos analizados, el ensayo se realizó bajo las mismas condiciones con un segundo donador denominado "B", con lo que también se garantiza la reproducibilidad de los resultados. En la tabla 3 se pueden observar el mismo comportamiento que en el caso del donador "A", indicando el porcentaje y número de células de cada tratamiento así como el CBPI y el % Citostasis.

Tabla 3. Resultados de los distintos tratamientos para el donador “B”.

DONADOR B												
CITOTOXICIDAD	Control Negativo		Control vehículo		C1 20µg/mL		C2 40µg/mL		C3 60µg/mL			
	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2		
% Cel. Mononucleadas	44.63	45.7	48.1	48.95	49.1	48.1	51.85	50.5	54.7	52.5		
No. Cel. Mononucleadas	893	914	962	979	982	962	1037	1010	1094	1050		
% Cel. Binucleadas	48.53	47.75	46.1	45.4	44.55	46.15	45.15	44.4	42.75	44.9		
No. Cel. Binucleadas	971	955	922	908	891	923	903	888	855	989		
% Cel. Multinucleadas	6.8	6.55	5.8	5.65	6.35	5.75	3.0	5.1	2.55	2.6		
No. Cel. Multinucleadas	136	131	116	113	127	115	60	102	51	52		
CBPI	1.621	1.608	1.575	1.567	1.572	1.576	1.511	1.546	1.478	1.501		
% Citostasis			6.19	7.73	6.84	6.19	16.77	11.15	22.14	18.48		
Total de Células	2000											
GENOTOXICIDAD	Control Negativo		Control Positivo		Control vehículo		C1 20µg/mL		C2 40µg/mL		C3 60µg/mL	
	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
CBMN	1	1	14	14	1	1	0	1	2	1	0	1
Total de Células binucleadas	2000											

9.3 Resultados de genotoxicidad del donador “A”, “B” y “AB”

Los resultados de la actividad genotóxica del donador “A” se muestran en la Tabla 4, expresados en media y error estándar de los resultados que se muestran en la Tabla 2, en la Figura 2 se presenta la gráfica del comportamiento de los resultados. Así mismo se encuentran los resultados del donador “B” en la Tabla 5 y Figura 3.

Tabla 4. Resultados de la media y su error estándar de genotoxicidad obtenidos del donador "A".

GRUPO	GENOTOXICIDAD	
	MEDIA	SEM +/-
Control (-)	0.5000	0.7071
Control (+)	13.500	0.7071
Control (V)	1.500	0.7071
Conc. 1	1.500	0.7071
Conc. 2	1.500	0.7071
Conc. 3	0.000	0.000

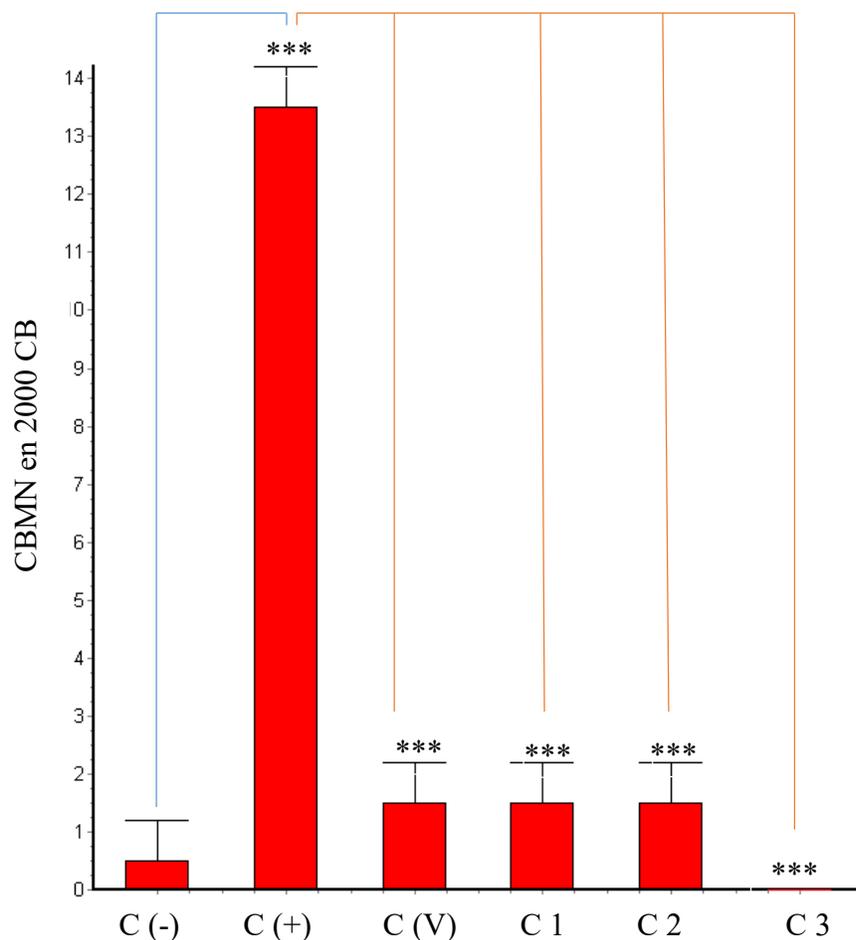


Figura 2. Evaluación genotóxica del donador "A" para las diferentes concentraciones de AE de *D. bicolor*. Con una $F=126.92$ se consideran diferencias extremadamente significativas con un valor de $P < 0.0001$ entre C (-) y C (+) (***) , así como de C (+) hacia C (V) (***) , C1 (***) , C2 (***) , C3 (***) . Siendo C (-)=Control negativo, C (+)= Control positivo, C (V)=Control de vehículo, C1=Concentración 1, C2=Concentración 2, C3=Concentración 3.

Tabla 5. Resultados de la media y su error estándar de genotoxicidad obtenidos del donador "B".

GRUPO	GENOTOXICIDAD	
	MEDIA	SEM +/-
Control (-)	1.000	0.000
Control (+)	14.000	0.000
Control (V)	1.000	0.000
Conc. 1	0.5000	0.7071
Conc 2.	1.500	0.7071
Conc. 3	0.5000	0.7071

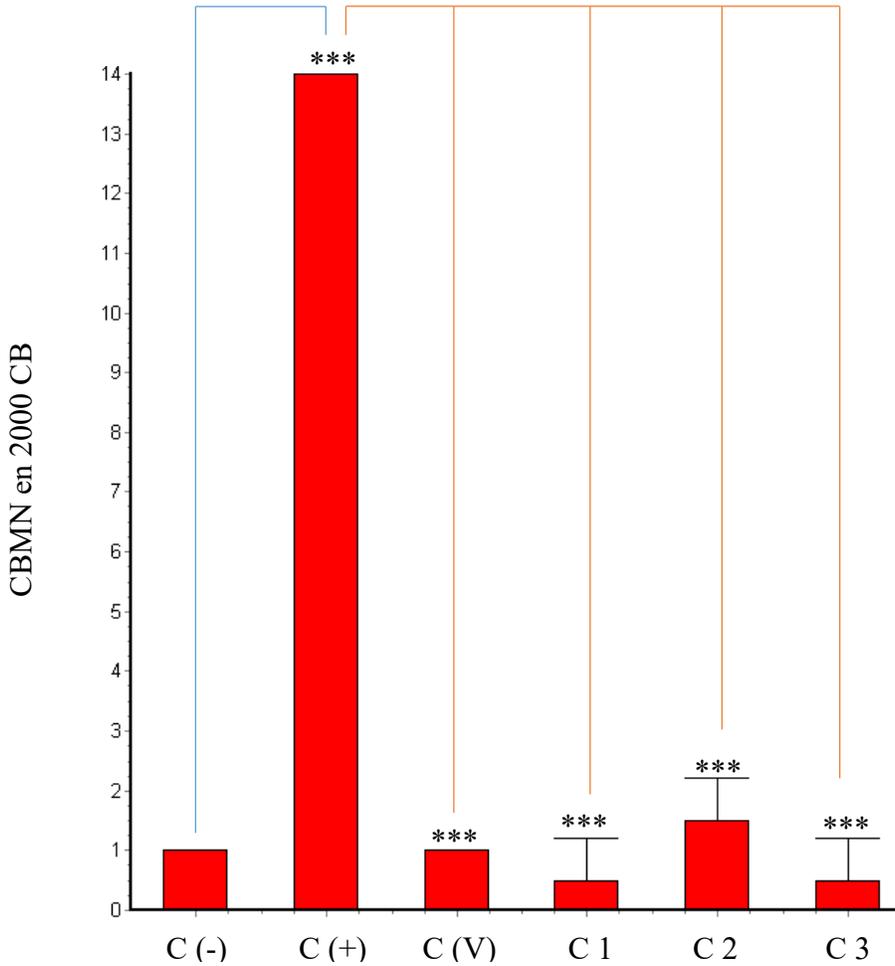


Figura 3. Evaluación genotóxica del donador "B" para las diferentes concentraciones de AE de *D. bicolor*. Con una $F=229.93$ se consideran diferencias extremadamente significativas con un valor de $P < 0.0001$ entre C (-) y C (+) (***), así como de C (+) hacia C (V) (***), C1 (***), C2 (***), C3 (***). Siendo C (-)=Control negativo, C (+)= Control positivo, C (V)=Control de vehículo, C1=Concentración 1 , C2=Concentración 2, C3=Concentración 3.

La importancia de tener dos donadores con los que se pueda realizar el ensayo además de proporcionar una muestra estadísticamente representativa y de cumplir con los criterios de la OECD, ayuda a garantizar que haya reproducibilidad en el ensayo, ya que entre los resultados de ambos donadores no debe haber diferencias significativas para un mismo tratamiento y deben coincidir las diferencias que haya entre los distintos tratamientos. Es por eso que se muestran en la Tabla 6, 7 y Figura 4 los resultados del análisis estadístico y en las figuras 5, 6, 7, 8 y 9 se muestran las diferentes células observadas en el ensayo y un ejemplo de una CBMN. (OECD, 2013)

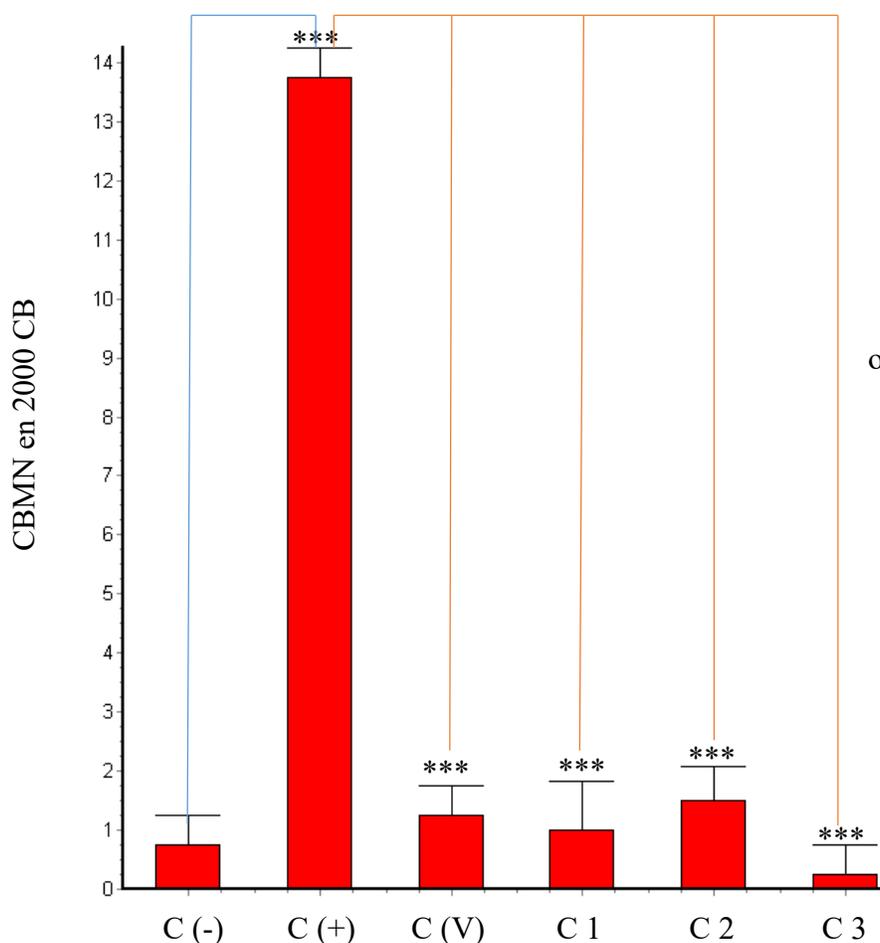


Tabla 6. Resultados de la media y su error estándar de genotoxicidad obtenidos entre el donador “A” y “B”.

GRUPO	GENOTOXICIDAD	
	MEDIA	SEM +/-
Control (-)	0.7500	0.5000
Control (+)	13.7500	0.5000
Control (V)	1.2500	0.5000
Conc. 1	1.0000	0.8165
Conc 2.	1.5000	0.5774
Conc. 3	0.2500	0.5000

Figura 4. Evaluación genotóxica de los donadores “AB” para las diferentes concentraciones de AE de *D. bicolor*. Con una $F=329.90$ se consideran diferencias extremadamente significativas con un valor de $P < 0.0001$ entre C (-) y C (+) (***) , así como de C (+) hacia C (V) (***) , C1 (***) , C2 (***) , C3 (***) . Siendo C (-)=Control negativo, C (+)= Control positivo, C (V)=Control de vehículo, C1=Concentración 1, C2=Concentración 2, C3=Concentración 3.

A continuación se muestran las imágenes de los distintos tipos de células tomadas de las preparaciones celulares de la experimentación en el laboratorio L-521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

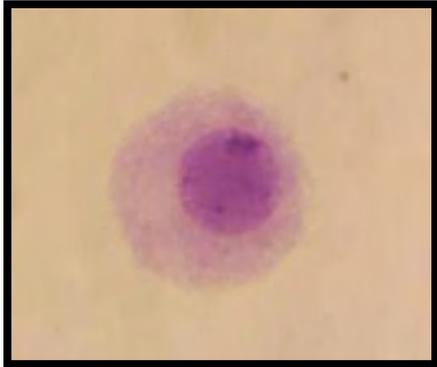


Figura 5. Microfotografía de célula mononucleada vista a 1000x teñida con Giemsa.

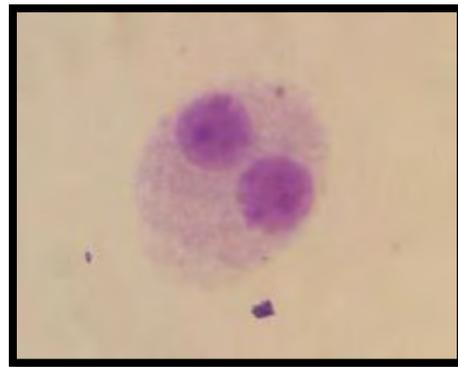


Figura 6. Microfotografía de célula binucleada vista a 1000x teñida con Giemsa.



Figura 7. Microfotografía de célula trinucleada vista a 1000x teñida con Giemsa.

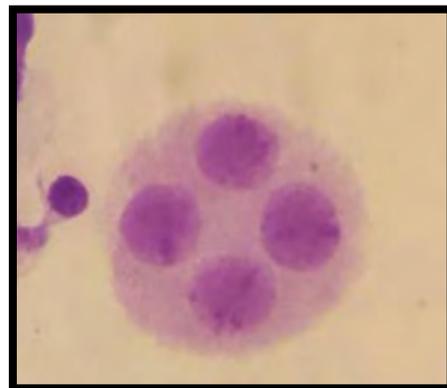


Figura 8. Microfotografía de célula tetranucleada vista a 1000x teñida con Giemsa.



Figura 9. Microfotografía de célula binucleada micronucleada vista a 1000x teñida con Giemsa.

9.4 Resultados del Índice de proliferación por bloqueo de citocinesis del donador "A", "B" y "AB"

A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico de los resultados del CBPI del donador "A", "B" y "AB", todos los resultados se presentan en la Tabla 7, 8, y 9 respectivamente indicando la media, el error estándar y estadístico t. En las Figuras 10, 11 y 12 se muestran los comportamientos de los datos en una gráfica.

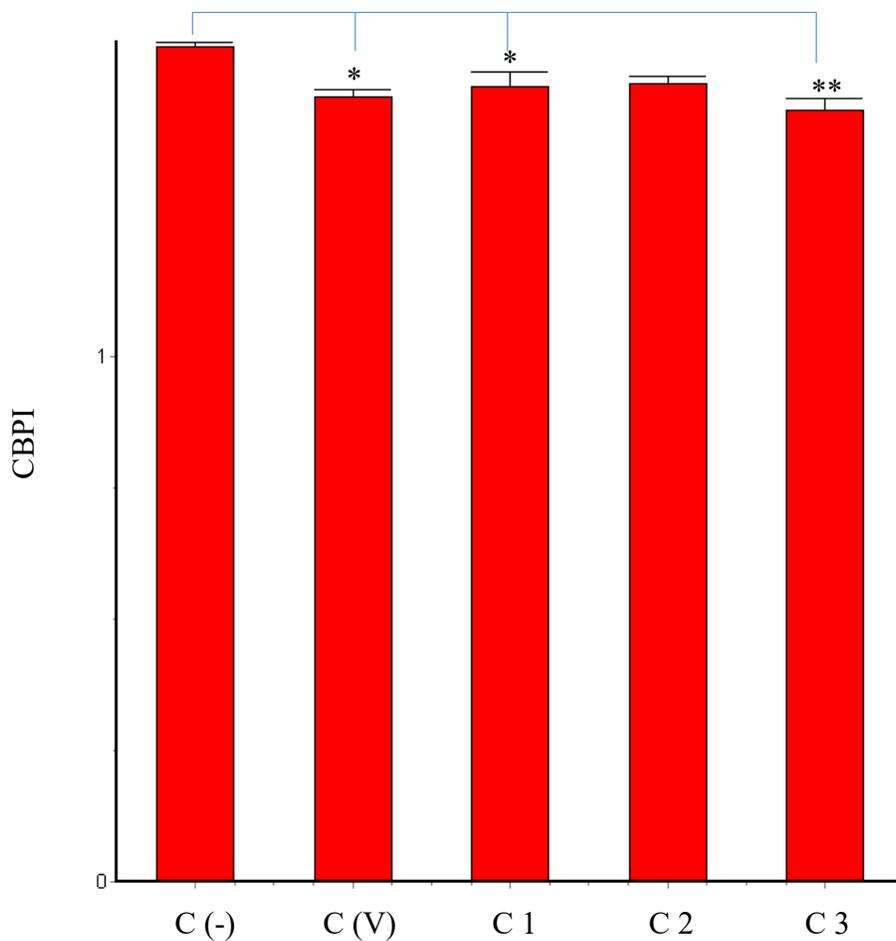


Tabla 7. Resultados de la media y su error estándar del CBPI obtenidos del donador "A".

GRUPO	CBPI	
	MEDIA	SEM +/-
Control (-)	1.593	0.007071
Control (V)	1.495	0.01414
Conc. 1	1.515	0.02970
Conc. 2	1.521	0.01556
Conc. 3	1.471	0.02192

Figura 10. Evaluación citotóxica del donador "A" para las diferentes concentraciones de AE de *D. bicolor*, expresado con el CBPI. Con una $F=11.356$ se consideran diferencias significativas con un valor de $P=0.0101$ entre C (-) con C (V) (*), C1 (*) y C3 (**). Siendo C (-)=Control negativo, C (+)= Control positivo, C (V)=Control de vehículo, C1=Concentración 1, C2=Concentración 2, C3=Concentración 3.

Tabla 8. Resultados de la media y su error estándar del CBPI obtenidos del donador “B”.

GRUPO	CBPI	
	MEDIA	SEM +/-
Control (-)	1.615	0.009192
Control (V)	1.571	0.005657
Conc. 1	1.574	0.002828
Conc 2.	1.529	0.02475
Conc. 3	1.490	0.01626

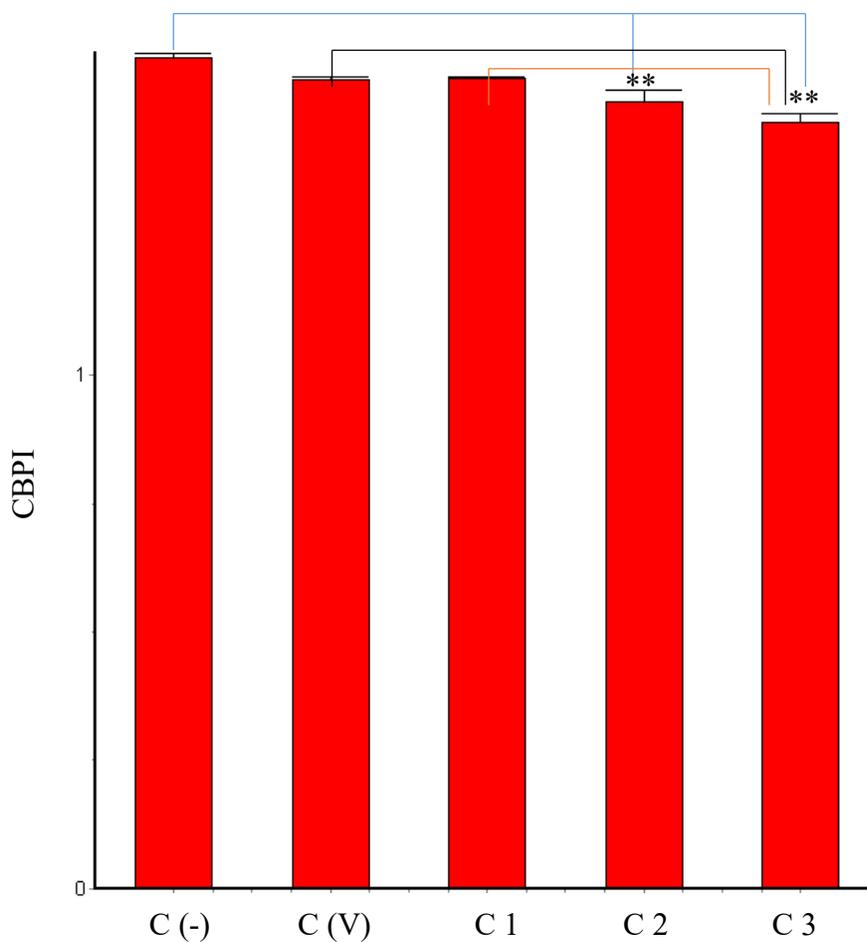


Figura 11. Evaluación citotóxica del donador “B” para las diferentes concentraciones de AE de *D. bicolor*, expresado con el CBPI. Con una $F=22.837$ se consideran diferencias muy significativas con un valor de $P=0.0021$ entre C (-) con C2 (**) y C3 (**), respectivamente; C (V) con C3 (**), y C1 con C3 (**). Siendo C (-)=Control negativo, C (+)= Control positivo, C (V)=Control de vehículo, C1=Concentración 1, C2=Concentración 2, C3=Concentración 3.

Tabla 9. Resultados de la media y su error estándar del CBPI obtenidos de los donadores “A” y “B”.

GRUPO	CBPI	
	MEDIA	SEM +/-
Control (-)	1.604	0.01410
Control (V)	1.533	0.04475
Conc. 1	1.545	0.03817
Conc 2.	1.525	0.1742
Conc. 3	1.480	0.01920

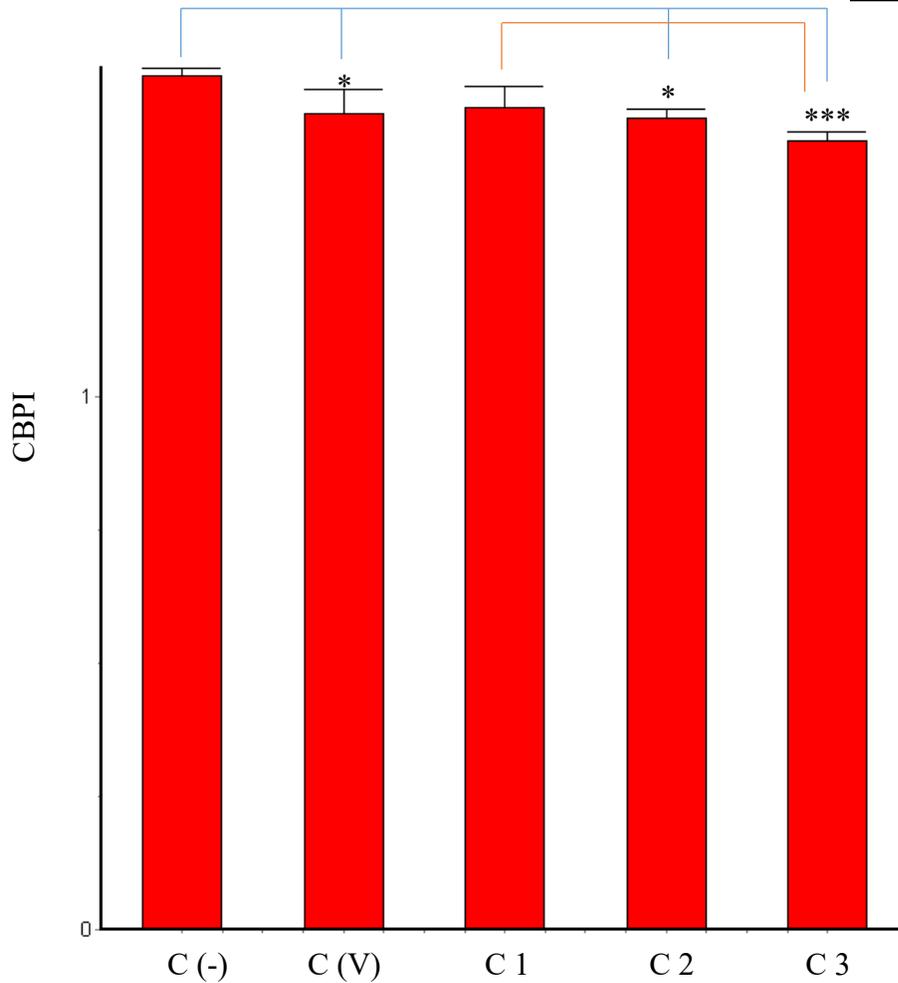


Figura 12. Evaluación citotóxica de los donadores “AB” para las diferentes concentraciones de AE de *D. bicolor*, expresado con el CBPI. Con una $F=9.151$ se consideran diferencias extremadamente significativas con un valor de $P=0.0006$ entre C (-) con C (V) (*), C2 (***) y C3 (***) respectivamente; además de C1 con C3 (*). Siendo C (-)=Control negativo, C (+)= Control positivo, C (V)=Control de vehículo, C1=Concentración 1, C2=Concentración 2, C3=Concentración 3.

9.5 Resultados del porcentaje de citostasis del donador "A", "B" y "AB"

Así como en los resultados anteriores, los provenientes del % de citostasis también están expresados en media, error estándar y estadístico "t" en las Tablas 10, 11, 12 y 13 y en las Figuras 13, 14 y 15.

Tabla 10. Resultados de la media y su error estándar del % de citostasis obtenidos del donador "A".

GRUPO	% CITOSTASIS	
	MEDIA	SEM +/-
Control (V)	16.530	2.390
Conc. 1	13.075	4.886
Conc. 2	12.105	2.680
Conc. 3	20.620	3.762

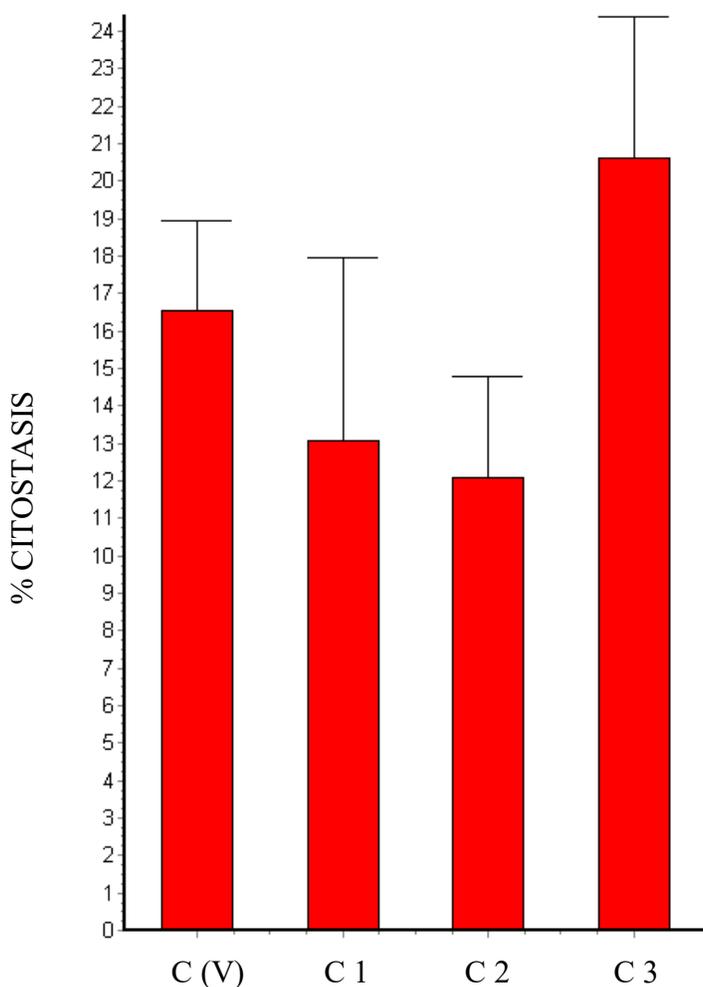


Figura 13. Evaluación citotóxica del donador "A" para las diferentes concentraciones de AE de *D. bicolor*, expresado en % citostasis. Con una $F=2.339$ se consideran diferencias no significativas con un valor de $P=0.2149$ entre los tratamientos. Siendo C (-)=Control negativo, C (+)= Control positivo, C (V)=Control de vehículo, C1=Concentración 1, C2=Concentración 2, C3=Concentración 3.

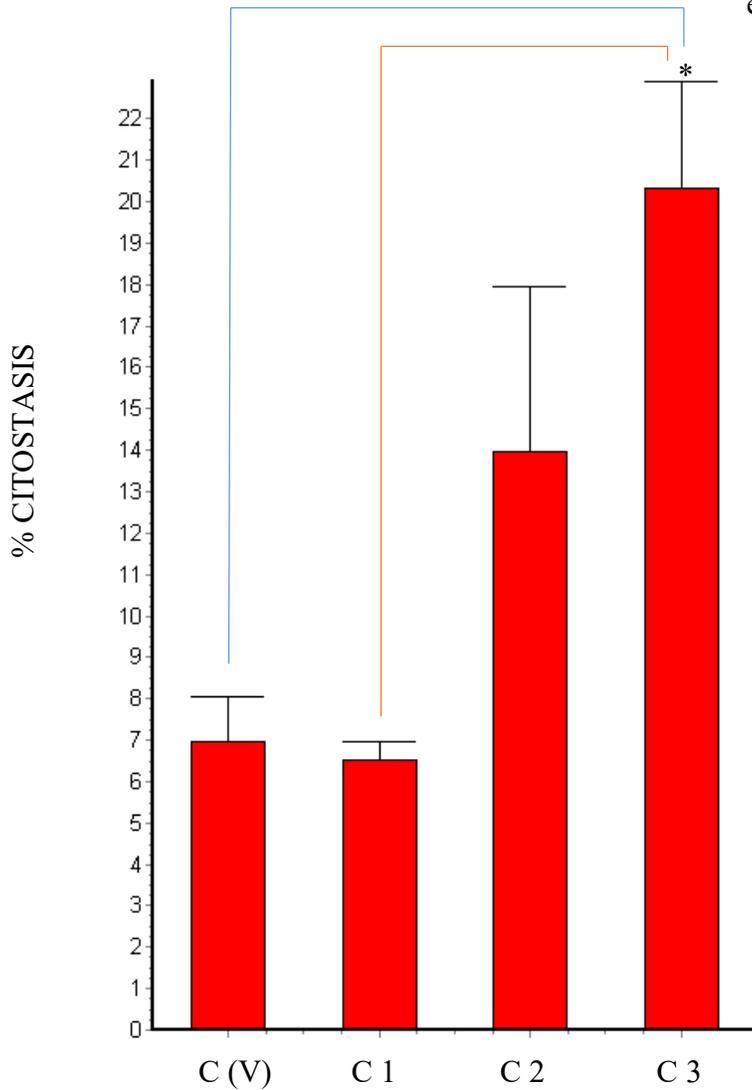


Tabla 11. Resultados de la media y su error estándar del % de citostasis obtenidos del donador "B".

GRUPO	% CITOSTASIS	
	MEDIA	SEM +/-
Control (V)	6.960	1.089
Conc. 1	6.515	0.4596
Conc 2.	13.960	3.974
Conc. 3	20.310	2.588

Figura 14. Evaluación citotóxica del donador "B" para las diferentes concentraciones de AE de *D. bicolor*, expresado en % citostasis. Con una $F=14.331$ se consideran diferencias significativas con un valor de $P=0.0132$ entre C (V) y C3 (*), así como entre C1 y C3 (*). Siendo C (-)=Control negativo, C (+)= Control positivo, C (V)=Control de vehículo, C1=Concentración 1 , C2=Concentración 2, C3=Concentración 3.

Tabla 12. Resultados de la media y su error estándar del % de citostasis obtenidos de los donadores “A” y “B”.

GRUPO	% CITOSTASIS	
	MEDIA	SEM +/-
Control (V)	11.745	2.865
Conc. 1	9.795	2.365
Conc. 2	13.033	1.484
Conc. 3	20.465	1.321

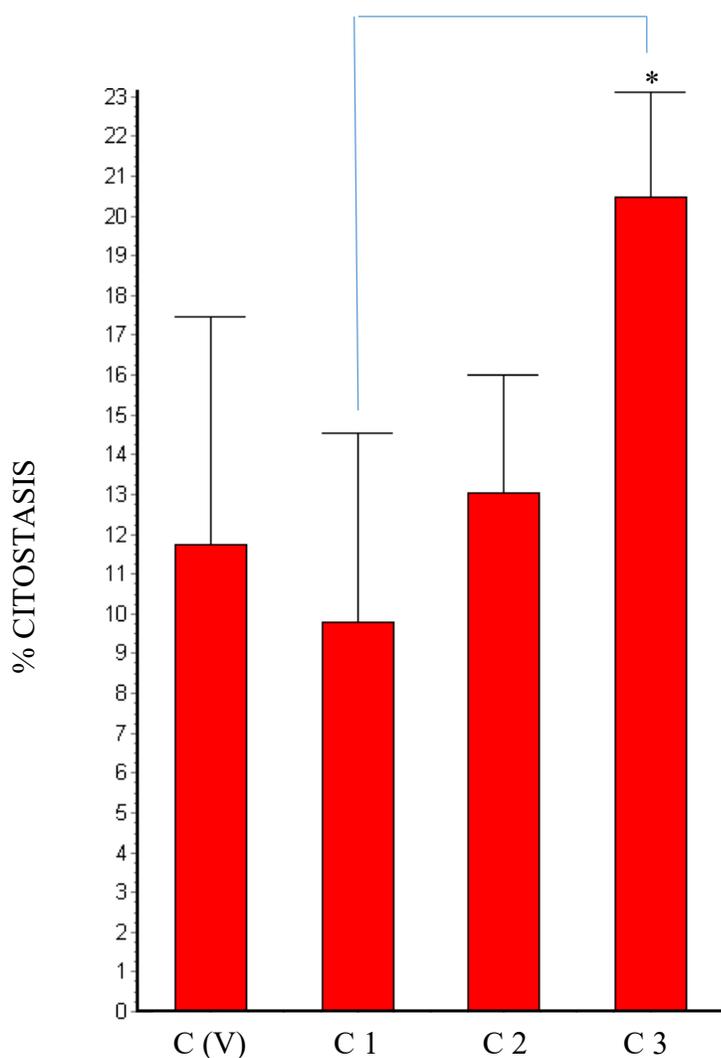


Figura 15. Evaluación citotóxica de los donadores “AB” para las diferentes concentraciones de AE de *D. bicolor*, expresado en % citostasis. Con una $F=4.904$ se consideran diferencias significativas con un valor de $P=0.0189$ entre C 1 y C3 (*). Siendo C (-)=Control negativo, C (+)= Control positivo, C (V)=Control de vehículo, C1=Concentración 1, C2=Concentración 2, C3=Concentración 3.

Tabla 13. Resultados del análisis estadístico “t” de muestras emparejadas para genotoxicidad, CBPI y % Citostasis de “AB”.

Donador	Genotoxicidad		CBPI		% Citostasis	
	“A”	“B”	“A”	“B”	“A”	“B”
Media	3.0833	3.0833	1.519	1.555	15.5825	11.9362
Varianza	26.4417	28.7416	0.0020	0.0022	14.8849	42.7894
Estadístico t	0.0000		-2.8245		1.3702	

10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En nuestro país la medicina tradicional es muy importante pues además de ser parte de nuestra cultura, se ha comprobado las propiedades curativas de diversas plantas medicinales por medio de diferentes estudios, sin embargo el hecho de tener establecida la acción que tienen estas plantas sobre nuestro organismo o los mecanismos moleculares en los que participan no garantiza la inocuidad de las mismas. Es por eso que resultó importante evaluar la actividad genotóxica y citotóxica de *D. bicolor* utilizando el ensayo de micronúcleos *in vitro*, ya que en la actualidad *D. bicolor* está siendo utilizada en distintas patologías, entre ellas el cáncer de mama.

En este estudio, se realizó un gradiente para el control positivo ya que anteriormente se utilizó una concentración inicial de 50µg/mL en cada cultivo para el control positivo. Al revisar las preparaciones celulares se observó que el MMS había tenido un efecto citotóxico elevado y según los criterios del HUMN y de la OECD en su guía número 487 no era posible su análisis. Esta citotoxicidad también fue observada por Kimura y colaboradores en 2013 a una concentración de 30µg/mL. (Kimura et al, 2013; OECD, 2013)

De acuerdo a las concentraciones utilizadas por Ahmad en 2015, Hosseinimehr en 2012, Malini en 2009 y Ogawa en 1998 se determinó la necesidad de realizar dicho gradiente de MMS para determinar la concentración ideal de mutágeno para

el control positivo, utilizando las concentraciones: 15µg/mL, 25µg/mL y 35µg/mL. Los resultados obtenidos de dicho gradiente se muestran en la Tabla 1, donde se hace evidente la acción citotóxica y genotóxica del MMS en los cultivos teniendo una disminución del número de células binucleadas y aumento en el número CBMN, todo en función del aumento de la concentración del mutágeno. Con estos resultados se determinó que la concentración ideal para el control positivo era de 20µg/mL, para obtener un % de células binucleadas entre 40.4-52.95% y entre 9-16 CBMN. (Ahmad et al, 2015; Günter et al, 2012; Hosseinimehr et al, 2012; Malini et al, 2009; Ogawa et al, 1998)

Aunque comúnmente el mutágeno utilizado es la mitomicina C, el MMS está indicado también como mutágeno que no requiere biotransformación en la guía número 487 de la OECD. Entre las ventajas más importantes que hay de este mutágeno es el costo ya que es menor que el de la mitomicina C. El MMS es un agente alquilante que puede agregar su grupo alquilo a las bases nitrogenadas por la alta densidad electrónica que poseen, pues el MMS es altamente electrofílico. Para este caso en particular es la primera vez que se utiliza como mutágeno para control positivo en este ensayo con el objetivo de optimizar los recursos destinados a los trabajos de pregrado en el laboratorio de citogenética L521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, razón por la cual se realizó el gradiente y posteriormente los cultivos para el control positivo. (Ahmad, 2015; Günter et al, 2012; Hosseinimehr et al, 2012; Malini et al, 2009; OECD, 2013)

Para evaluar el efecto de *D. bicolor* se utilizó su aceite esencial, el cual fue proporcionado por el IPN y utilizado por los antecedentes de Estanislao y colaboradores en las concentraciones de 20, 40 y 60µg/mL respectivamente. Como se puede ver en la Tabla 2 y 3 correspondientes a los resultados tanto del donador "A" como el "B" el % de células binucleadas para cada tratamiento entra dentro del rango ideal de 30-60% según el HUMN. También se muestra el CBPI y % citostasis para cada tratamiento exceptuando el % citostasis para el control

negativo pues fue el utilizado como control en la determinación del mismo. (Estanislao et al, 2016b; Fenech, 2000)

El conteo de CBMN se realizó para determinar si *D. bicolor* tenía actividad genotóxica, para lo cual se contaron 2000 CB y de ellas se diferenció si eran CBMN. En la Tabla 4 los resultados de genotoxicidad del donador “A”, después del análisis estadístico ANOVA, mostraron un error estándar bajo y una marcada diferencia significativa entre el control positivo y todos los demás tratamientos, diferencia que es evidente desde la tabla 2, por el número de CBMN. Como control positivo fue utilizado el mutágeno establecido MMS a la concentración determinada por el gradiente que se realizó, con estos resultados se hace notorio que *D. bicolor* no tiene una actividad genotóxica a ninguna de las concentraciones ocupadas (20µg/mL, 40µg/mL, 60µg/mL), el control de vehículo tampoco muestra actividad genotóxica y al no haber diferencias significativas entre el control negativo y algún otro tratamiento exceptuando el positivo, comprobamos su validez (Ver figura 2).

Para el caso del donador “B” nuevamente los resultados de genotoxicidad son significativos después del análisis estadístico ANOVA, en la Tabla 5 se observan las medias y error estándar, el cual es bajo. Como se puede observar en la Figura 3, las diferencias significativas se dan entre el control positivo y todos los demás tratamientos, resultados semejantes a los observados con el donador “A”. Esto quiere decir que no se observa genotoxicidad en ninguna concentración del AE de *D. bicolor* y se corrobora dicho hallazgo con la verificación del control positivo.

Los resultados de genotoxicidad de la Tabla 6 corresponden al análisis de los resultados de los donadores “A” y “B” a lo que denominaremos “AB”. El error estándar obtenido es bajo y existen las mismas diferencias significativas entre ambos análisis estadísticos individuales que se tenían, incluso es el mismo comportamiento en la Figura 4 entre el análisis de “A”, “B” y “AB”. En la Tabla 13, se observa el análisis estadístico “t” realizado a “AB”, el resultado de “t” indica que

no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos resultados, además los valores de la media son iguales. Por lo que no se observa actividad genotóxica por parte de *D. bicolor* a las concentraciones utilizadas en este ensayo. En las figuras 5, 6, 7, 8 y 9 se encuentra una célula representativa de lo observado en todas las preparaciones celulares, las cuales cumplieron con todas las características descritas en los criterios del HUMN, en la figura 9 se presenta una CBMN donde se aprecia un MN en el citoplasma (Barrón y Téllez, 2004).

Además de evaluar la actividad genotóxica el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis o micronúcleos *in vitro*, también se evalúa la citotoxicidad por medio del Índice de proliferación por bloqueo de citocinesis (CBPI) y % de Citostasis. Para el caso del donador "A" los resultados del CBPI después del análisis estadístico ANOVA, muestran que hay diferencias significativas entre el C (-) con el C (V), C 1, y C 3 respectivamente (Figura 10), lo que significa una disminución en el CBPI para C (V), C1 y C3 en comparación con el obtenido en el control negativo, lo cual verifica a este mismo. En la tabla 7 se puede observar que el error es bajo por lo que aseguramos datos estadísticamente adecuados para su posterior análisis. (Fenech, 2000; Fenech, 2003; OECD, 2013)

Cabe mencionar que no se ha tomado en cuenta el control positivo con MMS, debido a la diferencia de condiciones a las que se realizaron todos los cultivos y posteriormente el control positivo con la concentración ideal obtenida del gradiente, cuyos resultados se vieron alterados por el cambio de condiciones experimentales que se tuvieron durante el cultivo celular. Si bien lo más correcto hubiera sido repetir todos los tratamientos bajo las mismas condiciones, los resultados obtenidos mostraron datos estadísticamente significativos y congruentes, por lo que se decidió hacer un análisis según los criterios de la OECD, donde se indica que deben realizarse bajo las mismas condiciones, esto derivó en solo utilizar el control positivo en la parte de genotoxicidad pues no interfiere directamente con las condiciones del manejo del medio, sino más bien con la exposición al mutágeno. (OECD, 2013)

En el caso del donador "B" los resultados del CBPI resultaron significativos como se muestra en la Figura 11, los resultados de la media y su error estándar se muestran en la Tabla 8, donde el error estándar es bajo, siendo el C (-) significativo con la C 2 y C 3 respectivamente. El C (V) con la C 3 y la C 1 con la C 3, por lo que se hace evidente la disminución del CBPI a una concentración de 60µg/mL. Al haber diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo, la C2 y la C3 hablamos de una notoria disminución del CBPI, que además de verificar nuestro control negativo, nos indica que si bien el vehículo utilizado posee un efecto citotóxico, no es significativo al compararlo con el negativo y la disminución en la concentración C3, que es el valor de CBPI más bajo se deriva de la acción citotóxica que tiene el AE *D. bicolor* sobre el cultivo. Este comportamiento también se observa en los resultados del donador "A", fortaleciendo la idea del efecto citotóxico que tiene el AE a una concentración de 60µg/mL.

Después del análisis estadístico de los resultados del CBPI de ambos donadores "AB" los cuales se muestran en la Tabla 9 y 13 podemos observar que el error es muy bajo y no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos resultados, pues el valor del estadístico "t" es cercano a cero. Sin embargo, si existen diferencias significativas entre el C(-) y el C(V), C2 y C3 respectivamente (Figura 12), que el control negativo tenga el CBPI más alto de los demás tratamientos nos confirma un buen control negativo, hay diferencias entre el C(V), por la acción que tiene el DMSO sobre el cultivo y para el caso de la C1 no se presentan por que la concentración de vehículo no es tan alta como la del mismo control, al aumentar la concentración de AE y de vehículo disminuye el CBPI, por lo que al comparar la disminución que ejerce el DMSO con la disminución obtenida de las últimas dos concentraciones (C1 y C2) se observa que hay un acción citotóxica por parte del AE de *D. bicolor* (Barrón y Téllez, 2004).

Por otro lado hay diferencias significativas entre la C1 y la C3, resultado normal, ya que el efecto citotóxico que ejerce la C3 por el vehículo y por el AE es mucho mayor al que tiene la C1.

Como ya se mencionó anteriormente el % citostasis es muy importante debido a que indica el grado en que una sustancia puede detener la mitosis. Los resultados obtenidos del donador "A" también se analizaron por ANOVA (Tabla 10), encontrando que entre los resultados no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 13). Los resultados del tratamiento negativo para este caso muestran un % menor comparado con el que presentan los demás tratamientos y aunque el análisis estadístico no resultó significativo, dándolo como un control inadecuado. Sin embargo, falta el análisis entre el duplicado del ensayo con la sangre del donador "A" y "B". Resultados con la misma tendencia entre "A" y "B" confirmarían un control negativo inadecuado para el análisis del % de citostasis.

A diferencia de los resultados obtenidos en el análisis estadístico del donador "A", en el donador "B" sí hay diferencias significativas entre el C (V) y la C 3, así como entre la C 1 y la C 3 esto se puede observar en la Figura 14. Además en la Tabla 11 se observa que el error estándar no es tan alto como en el donador "A", estas variaciones se deben principalmente a errores experimentales de tipo sistemáticos ya que aunque existe una diferencia en cuanto al valor del error estándar, el comportamiento de los resultados es similar en cuanto a tener un porcentaje que disminuye del C (V) a la C1 y después aumenta en C2 y C3. La razón por la que disminuye el % citostasis del C (V) a la C1 es porque el C (V) se realizó con la concentración máxima de vehículo utilizada, por lo que aunque el AE de *D. bicolor* tenga una acción de citostasis no será mayor a la causada por la concentración máxima de vehículo, es decir, la concentración de 20µg/mL (C1) tiene menos acción citostática que la causada por el vehículo (DMSO). Para el caso de la C2 el aumento es mayor porque la concentración de AE y por consecuencia la del DMSO, también aumenta, sin embargo, al no haber diferencias significativas con el C (V) no podemos decir que tenga una actividad citostática. Por último la C3 si tiene diferencias significativas con el C (V) y la C1, es evidente el aumento tanto

en los valores de la media de la Tabla 11 como en la Figura 14, por lo que a una concentración de 60µg/mL de AE *D. bicolor* existe un aumento en la actividad citostática en el cultivo.

Resumiendo lo anterior decimos que los resultados obtenidos del % de citostasis del donador "A" resultaron no significativos, a diferencia del donador "B" donde hubo diferencias significativas entre el C (V) con la C3 y la C1 con la C3, como ya se explicó anteriormente estas diferencias son resultado de errores experimentales, sin embargo, el comportamiento del fenómeno era similar. Haciendo el análisis estadístico realizado entre los resultados de los donadores "AB" (Tabla 12 y 13, Figura 15) se reveló en conjunto una diferencia significativa entre la C 1 y la C 3. Sin embargo, estas diferencias significativas entre tratamientos no pueden considerarse ya que el análisis estadístico "t" muestra diferencias significativas entre los resultados de los donadores a consecuencia del aumento en el error estándar que se presenta en comparación con los otros análisis realizados, es decir, que no hayamos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el C(V) y la C3 se debe a que los resultados del donador "A" tienen un error estándar mayor y difieren con los obtenidos del donador "B". Aunque los comportamientos entre ambos resultados sean similares el resultado numérico influyó al realizar el análisis conjuntamente, disminuyendo el error estándar pero afectando la media que ya no fue significativa con la C3, por lo que los resultados del donador "A" quedan descartados. Considerando solo los resultados del donador "B" se demuestra que hay un aumento en el % de citostasis independiente del que causa el vehículo, la diferencia significativa que existe entre la C1 y C3 nuevamente se debe a las concentraciones utilizadas en C1 y la diferencia significativa entre C(V) y C3 es consecuencia de la citostasis del DMSO más la que ejerce el AE a una concentración de 60µL/mL (Barrón y Téllez, 2004).

La evaluación genotóxica realizada mostró que no hay evidencia de dicha actividad a ninguna de las concentraciones utilizadas (20µg/mL, 40µg/mL, 60µg/mL) para este ensayo. La actividad citotóxica se evaluó con dos distintos parámetros que es el índice de proliferación por bloqueo de citocinesis (CBPI) y la determinación del % de citostasis.

Los resultados del CBPI mostraron que hay una disminución significativa desde la concentración 2 (C2) y que aumenta en la concentración 3 (C3). Dicho hallazgo demuestra la actividad citotóxica de *D. bicolor* ya que una disminución en el CBPI significa que hay actividad sobre la proliferación celular, la cual se ve estrechamente relacionada con el % de citostasis pues un CBPI igual a 1 indicaría 100% de citostasis.

Estos resultados concuerdan con la actividad que tienen las plantas medicinales utilizadas para el tratamiento del cáncer y para el caso específico de *D. bicolor* el estudio realizado por Estanislao y colaboradores demostró el efecto citotóxico del AE en células MDA-MB-231, línea celular proveniente de cáncer de mama. Aunque los ensayos utilizados fueron diferentes, estos estudios concuerdan con el efecto citotóxico obtenido del ensayo de micronúcleos *in vitro*. Además el efecto citotóxico lo encontraron a una concentración de 53.81µg/mL y los resultados que obtuvimos presentan el efecto a una concentración de 40µg/mL y 60µg/mL aumentando en función del aumento de la concentración de AE. (Estanislao et al, 2016b)

Para el caso de la evaluación citotóxica pero utilizando el % de citostasis obtuvimos que hay un aumento de % de citostasis en la concentración 3 (60µg/mL). Para el tratamiento del cáncer que es el padecimiento para el cual se utiliza *D. bicolor* con más frecuencia es sumamente importante esta acción, más cuando hay afinidad por algún tipo de células. Como ya se había explicado antes Estanislao y colaboradores demostraron el efecto citotóxico del AE de *D. bicolor* en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, además de esta línea celular ellos utilizaron otra línea celular proveniente de epitelio mamario MCF10A y no observaron efecto citotóxico a concentraciones de 20 a 80µg/mL, intervalo donde

se encuentra la concentración utilizada en la línea celular de cáncer de mama, la cual presentó actividad citotóxica. (Estanislao et al, 2016b)

El estudio realizado ha demostrado en resumen que *D. bicolor* no tiene actividad genotóxica y posee actividad citotóxica a concentraciones de 40 y 60µg/mL. Sin embargo, hace falta evaluar este AE en otros ensayos de la genética toxicológica para validar dicho hallazgo y seguir con los estudios posteriores para esta planta medicinal hasta que pueda llegar a ser parte de algún tratamiento empleado en el cáncer de mama.

11. Conclusiones

- El AE de *D. bicolor* no presentó efecto genotóxico en linfocitos humanos a ninguna de las concentraciones empleadas en el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis las cuales fueron de 20, 40 y 60µg/mL, pues el promedio de CBMN no mostró diferencias significativas entre estas y el control negativo.
- El AE de *D. bicolor* tuvo el mayor efecto citotóxico en linfocitos humanos a una concentración de 60µg/mL con un CBPI= 1.480 y citostasis= 20.465%, a una concentración de 40µg/mL se observó menor efecto citotóxico con un CBPI=1.525 y citostasis= 13.033% y no presentó efecto citotóxico a la concentración de 20µg/mL con un CBPI= 1.545 y citostasis= 9.795, pues no mostró diferencias significativas entre estas y el control de vehículo.
- La concentración ideal del control positivo obtenida del gradiente realizado para el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis a las condiciones del Laboratorio de Citogenética L521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán fue de 20µg/mL, con un promedio de CBMN de 13.75.

12. Referencias

1. Abrevaya, X. (2008). ¿Qué es la genotoxicidad? Genotóxicos o xenobióticos. IntraMed. Recuperado de: <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=47111>
2. Ahmad, S., Ali, A., Afzal, M. (2015). Anticarcinogenic and antimutagenic activity of *Alstonia scholaris* on the albino mice bone marrow cells and peripheral human lymphocyte culture against methyl methane sulfonate induced genotoxicity. *Advanced Biomedical Research*, DOI: 10.4103/2277-9175.183140.
3. Barrón, F., Téllez, F. (2004). Apuntes de Bioestadística: Tercer Ciclo en Ciencias de la Salud y Medicina. Universidad de Malaga. Recuperado de: <https://www.bioestadistica.uma.es/baron/apuntes/ficheros/cap01.pdf>
4. Bautista, M. R. (2007). Monografías de plantas utilizadas como anticancerígenas en la medicina tradicional hidalguense. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México.
5. Bull, C., Beetstra, S., Benasi, B., Crott, J., Kimura, M., Teo, T., Wu, J., Fenech, M. (2011). Application and adaptation of the in vitro micronucleus assay for the assessment of nutritional requirements of cells for DNA damage prevention. *Mutagenesis*, Vol. 26 (No. 1) 193-197 pp.
6. Cárdenas, N. C., Pérez, S., Zavala, M. A., Aguirre, J. R., Pérez, C. (2005). Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspergillus flavus* Link. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Vol. 36 (No. 3). 21-26 pp.
7. Chateaneuf, R. (2011). El aranto o auluga, *Kalanchoe daigremontiana* o *Bryophyllum daigremontiana*, interesante planta medicinal con grandes propiedades anticancerígenas y para otros varios usos. Recuperado de: <http://www.rochade.cl/?p=1340>
8. Chein, C. (2014). Estudio del efecto del compuesto LQM731 sobre la inducción de células binucleadas micronucleadas en cultivo de linfocitos humanos. (Tesis de pregrado). UNAM-FESC, México.
9. Cheong, H., Seth, I., Joiner, M., Tucker, J. (2013). Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 28 (No. 4) 433-440 pp.
10. Cortés, J. (2005). Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México.
11. DOF, (2002). NORMA Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2002, Instalación y operación de la farmacovigilancia. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/220ssa102.html>

12. DOF, (2011). NORMA Oficial Mexicana NOM-248-SSA1-2011, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios. Recuperado de: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4676/salud/salud.htm>
13. Estanislao, C. C. (2016a). Evaluación citotóxica de *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk en un modelo in vitro e in vivo de cáncer de mama. (Tesis doctoral). ENMH-IPN, México.
14. Estanislao, C. C., Aquino, A., Pérez, D. G., Martín, E., Morales, J., Pérez, N., Gómez, C. (2016b). *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk essential oil induces apoptosis of the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *BMC Complement Altern Med*, Vol. 16 (No. 266) 2-11 pp.
15. Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*, Vol. 600, 58-66 pp.
16. Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, Vol. 455, 81-95 pp.
17. Fenech, M., Chang, W., Kirsch, M., Holland, N., Bonassi, N., Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 534 65-75 pp.
18. Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., Bonassi, S. (1999). The Human Micronucleus Project an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, Vol. 428, 271-283 pp.
19. Fenech, M., Kirsch, M., Chang, M., Holland W. P., Zeiger, E., Bonassi, S. (2002). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 534, 65-75 pp.
20. Fenech, M., Kirsh, M., Rossnerova, A., Sram, R., Romm, H., Bolognesi, C., Ramakumar, A., Soussaline, F., Schunck, C., Elhajouji, A., Anwar, W., Bonassi, S. (2013). HUMN project initiative and review of validation, quality control and prospects for further development of automated micronucleus assays using image cytometry systems. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Vol. 216 541-552 pp.
21. García, A. N., González, N. M., Márquez, C., Martínez, M. (2003). Cumarinas presentes en especies del género *Casimiroa*. *Revista de la Sociedad Química de México*, Vol. 47 (No. 2). 151-154 pp.
22. García, A. N., Ramírez, A., Parra, H., Velázquez, G., Martínez, M. (1999). Anti-inflammatory Activity of Coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA Ear Mice Model. *Planta Med*, Vol 66 (No. 2000). 279-281 pp.

23. Global Biodiversity Information Facility (GBIF). (2016). *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk. Recuperado de: <http://www.gbif.org/species/3831874>
24. Günter, S., Linsenmeyer, R., Schütz, P., Kuehner, S. (2012). Insensitivity of the in vitro cytokinesis-block micronucleus assay with human lymphocytes for the detection of DNA damage present at the start of the cell culture. *Mutagenesis*, Vol. 27 (No. 6). 743-747 pp.
25. Hosserinimehr, S., Mahmoudzadeh, A., Rafiei, A. (2013). Arginine increases genotoxicity induced by methyl methanesulfonate in human lymphocytes. *Cytotechnology*, Vol. 65. 379-384 pp.
26. Huerta, C. (1997). La herbolaria: mito o realidad. CONABIO. *Biodiversitas*, Vol. 12, 1-7 pp.
27. Irekani, P. (2010). *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk. Recuperado de: <http://siba.ibiologia.unam.mx/irekani/handle/123456789/16500?proyecto=Irekani>
28. Kimura, A., Miyata, A., Honma, M. (2013). A combination of in vitro comet assay and micronucleus test using human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutagenesis*, Vol. 28 (No. 5). 583-590 pp.
29. Kirsch, M., Bonassi, S., Knasmueller, S., Holland, N., Bolognesi, C., Fenech, M. (2014). Commentary: Critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals—A HUMN project perspective. *Mutation Research*, Vol. 759, 49-58 pp.
30. Lincon, T., Zaiger E. (2006). *Fisiología Vegetal (Volumen I)*. España: Universitat Jaume, 533-535 pp.
31. Lozoya, X. (1997). *Plantas, medicina y poder: Breve historia de la herbolaria Mexicana*. México D. F.: Editorial Pax México.
32. Malini, M., Marin, M., Mantovani, M., Masrouah, C., Nati, N., Silva, T., Tamie, S. (2010). Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. *Genetics and Molecular Biology*, Vol. 33 (No. 1) 176-181 pp.
33. Maxime, F., Hochstenbach, K., Wayne, L., Fenech, M. (2014). Automation of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay by laser scanning cytometry and its potential application in radiation biodosimetry. *Bio Techniques, Benchmarks*, Vol. 57. 309-312 pp.
34. Moreno, L. (2009). *Actividad anti-fúngica de extractos de plantas con y sin cera de cadelilla, contra hongos de postcosecha en frutos de interés comercial. (Tesis de Maestría)*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila.
35. Nakamura, A., Monzen, S., Takasugi, Y., Wojcik, A., Mariya, Y. (2016). Application of cell sorting for enhancing the performance of the cytokinesis-

- block micronucleus assay. *Journal of Radiation Research*, Oxford, Vol. 57 (No. 2) 121-126 pp.
36. OECD (2013). Guideline for the testing of chemicals. Proposal for updating Test Guideline 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Francia.
 37. Ogawa, A., Murate, T., Izuta, S., Takemura, M., Furuta, K., Koba, J., Nimura, Y., Yoshida, S. (1998). Sulfated glycolipid from archaeobacterium inhibits eukaryotic DNA polymerase α , β and retroviral reverse transcriptase and affects methyl methanesulfonate cytotoxicity. *Cancer*, Vol. 76. 512-518 pp.
 38. OMS, (1991). Pautas para la evaluación de medicamentos herbarios. Ottawa, WHO/TRM/91.4
 39. Radlkofer, L. A. T., (2016). Tropicos: *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk. Recuperado de: <http://www.tropicos.org/Name/28101722>
 40. Ríos, Y. M., Ramirez, M. A., León, I., Estrada, S., Navarrete, G., Aguilar, A. B. (2012). Complete NMR assignment of 3, 4-seco-lup-20(29)-en-3-oic acid from *Decatropis bicolor*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, Vol. 50 (No. 4). 329-331 pp.
 41. Rosefort, C., Fauth, E., Zankl, H. (2004). Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis*, Vol. 19 (No. 4) 277-284 pp.
 42. Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México*. D.F.: Editorial Limusa
 43. Sagrera, J. (1991). *Plantas Medicinales*. Edo de México: Editorial del Valle de México.
 44. Schlaepfer, L., Mendoza, J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer; Relevancia para México. *Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Vol. 41 (No. 4) 18-27 pp.
 45. Speit, G., Linsenmeyer, R., Schutz, P., Kuehner, S. (2012). Insensitivity of the in vitro cytokinesis-block micronucleus assay with human lymphocytes for the detection of DNA damage present at the start of the cell culture. *Mutagenesis*, Vol. 27 (No. 6) 743-747 pp.
 46. Taddei, G. A., Santillana, M. A., Romero, J. A., Romero, M. B. (1999). Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. *Salud Pública de México*, Vol. 41 (No.3), 216-219 pp.
 47. Tovar, J. C., Villavicencio, M. A., Pérez, B. E. (2010). Actividad Antibacteriana de *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk. (Rutaceae) de Tres Zonas Ecológicas del Estado de Hidalgo, México. Abstract Book of XIX Congress "Fernando Cabieses Molina". Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 214 pp., México.
 48. Zhang, X. (2016). Organización Mundial de la Salud: Medicina tradicional; definiciones. Recuperado de: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/

49. Zolefer, W. B. (2004). Guía de las familias de plantas con flor. España:
Acribia