



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Evaluación genotóxica y citotóxica del
extracto de *Bacopa procumbens* en
sangre periférica de ratones CD1
machos por la técnica de micronúcleos
in vivo.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA
P R E S E N T A

RUIZ CHAVEZ ANGELICA SARAHI

ASESORES:

M. EN C. MARITERE DOMINGUEZ ROJAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética L-521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la dirección de la M. en C. Maritere Domínguez Rojas.

Parte de este estudio fue financiado por la sección de posgrado de la ENMyH del IPN, bajo la dirección del Dr. Guillermo Pérez Ishiwara.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por su infinito esfuerzo y valor que ha inspirado mi lucha y me ha motivado a trabajar para alcanzar mis sueños. Por ti estoy aquí, te amo.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México no solo por la formación profesional que me ha brindado, sino también por todos los momentos, experiencias y personas encontradas dentro de sus instalaciones, siempre será mi segundo hogar.

A la M. en C. Maritere Domínguez Rojas por su confianza, tiempo, dedicación y motivación en la realización y revisión de este trabajo y sobre todo por ser una excelente profesora que despertó mi gusto a la genética y biología molecular, gracias.

A la Dra. Sandra Díaz Barriga, Dra. Dolores Jasso y QFB. Nydia González por su tiempo y comentarios en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Jorge Aldana, Itzá Chavarría, Paula Espíritu, Omar Pastor, Alejandra Brugada y Ana Ortiz por su apoyo en la parte experimental del proyecto.

A mis compañeros de la carrera Estefanía Arandas, Jorge Aldana, Itamar Moreno, Marian Cruz, Isabel González y Osiris Martínez por su apoyo, tiempo, desvelos y sobre todo su amistad.

DEDICATORIAS

A mis padres Herlinda Chávez y Martín Ruiz por su apoyo, tiempo, amor, enseñanzas y motivación a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Martín Ruiz y Mayte Ruiz por su apoyo y momentos compartidos.

A mi hermanito Alan Josué por ser un guerrero en esta vida y haber compartido y vivido conmigo momentos de tristezas y alegrías.

A mis niños Liz, Kenia, Sofía, Yolo, Vane, Mateo y Albi por brindarme enormes momentos de felicidad.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE GRÁFICAS	5
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Las plantas medicinales.....	7
1.1.1 Definiciones	7
1.1.2 Antecedentes	7
1.1.3 Situación actual	9
1.2 <i>Bacopa procumbens</i>	10
1.2.1 Clasificación taxonómica.....	11
1.2.2 Sinonimias y nombres comunes.....	11
1.2.3 Identificación y descripción.....	12
1.2.4 Distribución y hábitat	14
1.2.5 Usos y formas de usos.....	14
1.2.6 Fitoquímica.....	15
1.3 Técnica de micronúcleos	15
1.3.1 Definición	16
1.3.2 Antecedentes	16
1.3.3 Fundamento	17
1.3.4 Características de los micronúcleos.....	20
1.3.5 Sistemas de ensayo.....	20
1.3.6 Ventajas y desventajas.....	23
2. JUSTIFICACIÓN	24
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos particulares	26
5. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	27
6. MATERIAL Y MÉTODOS	28
6.1 Material biológico	28
6.2 Justificación de las dosis administradas	29
6.2.1 Dosis de MMS	29
6.2.2 Dosis de <i>Bacopa procumbens</i>	29
6.3 Obtención del extracto	30
6.5 Tratamientos	30
6.6 Administración de tratamientos y tiempos de muestreo	31
6.7 Obtención de muestra y preparación de laminillas	31
6.8 Análisis de micronúcleos.....	32
6.9 Análisis estadístico	32
7. RESULTADOS.....	33
7.1 Actividad genotóxica del extracto de <i>B. procumbens</i>	33

7.2 Actividad citotóxica del extracto de <i>B. procumbens</i>	36
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	45
10. REFERENCIAS.....	46

ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
cm	Centímetros
Cols.	Colaboradores
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ENC	Eritrocitos Normocrómico
ENMyH	Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
EPC	Eritrocitos Policromáticos
EPCMN	Eritrocitos Policromáticos Micronucleados
et.al	Y otros
FESC- C1	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1
g	Gramos
µm	Micrómetros
hrs	Horas
IF	Ifosfamida
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IPN	Instituto Politécnico Nacional
Kg	Kilogramos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros

MMC	Mitomicina C
MMS	Metil Metanosulfonato
MN	Micronúcleos
Msnm	Metros sobre nivel del mar
NER	Reparación por Escisión de Nucleótidos
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
RNA	Ácido Ribonucleico
SSF	Solución Salina Fisiológica

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Bacopa procumbens</i> (Costea, M. & Garcia, I. 2013).....	13
Figura 2. Flor de <i>Bacopa procumbens</i> fresca (izquierda) y seca (derecha) (Costea, M. & Garcia, I. 2013)	13
Figura 3. Distribución de <i>Bacopa procumbens</i> (Hughey, M. 2011)	14
Figura 4. Mecanismo de formación de micronúcleos en médula ósea inducida por agentes aneugenos y clastogenos (Dominguez, M. 2005).....	19
Figura 6. Frotis de sangre periférica con ENC, EPC (esquina superior izquierda) y EPCMN (flecha) (Gómez, P. 2015).....	20
Figura 7. Diagrama experimental	27
Figura 8. Muestreo y administración de tratamientos.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones de la administración de compuestos en los diferentes lotes.....	28
Tabla 2. Genotoxicidad del extracto de <i>B. procumbens</i>	35
Tabla 3. Citotoxicidad del extracto de <i>B. procumbens</i>	38

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Genotoxicidad del extracto de <i>B. procumbens</i>	34
Gráfica 2. Citotoxicidad del extracto de <i>B. procumbens</i>	37

RESUMEN

El uso de plantas para fines terapéuticos ha sido empleado desde el hombre primitivo hasta nuestros días. De acuerdo a la OMS las plantas medicinales son cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Dichas características, junto a la gran diversidad y riqueza de plantas en México y la creciente necesidad en la mejora de medicamentos hacen de la medicina tradicional un campo de investigación activo (OMS, 2010).

Bacopa procumbens, también conocida como "Metatera", ha sido reportada por la medicina tradicional a lo largo de la República Mexicana para aliviar diferentes padecimientos, de los cuales solo ha sido avalado su efecto cicatrizante en los estudios realizados por Hidalgo, O. en 2010, demostrando su capacidad para incrementar la migración, adhesión y proliferación de fibroblastos de manera *in vitro*.

Los estudios toxicológicos realizados a los compuestos y metabolitos de las plantas ayudan a determinar los riesgos y beneficios de su uso en la salud humana. Dentro de estos ensayos se incluyen los estudios genotoxicológicos, que permiten evaluar el daño que se ejerce sobre el material genético. En la actualidad hay disponibles diversos ensayos moleculares y citogenéticos, entre ellos se encuentra la técnica de micronúcleos *in vivo*, en la cual se identifican sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas originadas por clastogénesis y aneuploidogénesis (OCDE, 2014).

En este trabajo se realizó la técnica de micronúcleos *in vivo* para evaluar la actividad genotóxica y citotóxica del extracto acuotánico de *B. procumbens* utilizando dosis de 50, 100 y 200 mg/kg en ratones machos CD1 en un estudio agudo y se llevó a cabo un análisis microscópico de la relación EPCMN/ EPC y EPC/ ENC en muestras de sangre periférica obtenidas de la cola de cada animal de experimentación a las 0, 24, 48 y 72 horas de su exposición, una vez obtenidos los valores se realizó un análisis estadístico de ANOVA y comparaciones múltiples de Tukey-Kramer con una $p < 0.05$. Los controles utilizados fueron solución salina fisiológica estéril, como control negativo, y metilmetanosulfonato (40 y 100 mg/Kg), como control positivo.

Los resultados obtenidos de la frecuencia de EPCMN inducido por el extracto, nos indican que no es genotóxico. En cuanto a la frecuencia de EPC/ ENC no se demostró citotoxicidad a las dosis administradas; sin embargo, a las 24 hrs se obtuvo un incremento de EPC en los ratones administrados con 200mg/kg, este aumento fue significativo al compararlo con los controles positivo y negativo de las 72 horas, lo cual indica la capacidad del extracto de incrementar la relación EPC/ ENC en sangre periférica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las plantas medicinales

1.1.1 Definiciones

La OMS define las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. La medicina tradicional o herbolaria se ha encargado de su uso y práctica basada en teorías, creencias y experiencia de diferentes culturas adquiridas a lo largo del tiempo con la finalidad de mantener la salud (Pérez, R. 2010).

1.1.2 Antecedentes

Desde la antigüedad toda sociedad, por primitiva que parezca, ha establecido sistemas de salud basado en el uso de plantas, minerales y componentes de origen animal con la finalidad de aliviar o curar los males que les aquejaban.

Aunque el inicio de plantas con fines terapéuticos se desconoce. Se piensa que nuestros ancestros, cazadores y recolectores nómadas, al observar cómo sanaban animales con apariencia enfermiza tras el consumo de ciertas plantas, imitaron dicha acción y por medio de pruebas de ensayo y error lograron conocer y recolectar aquellas plantas útiles para sanar sus enfermedades, pero también plantas tóxicas que podían producir alucinaciones o la muerte, lo cual fue útil en la caza y conflictos bélicos con otras sociedades (Cortez, V. et.al. 2004). Estos conocimientos quedaron a cargo de los llamados brujos o chamanes y fueron asociados a creencias mágico-religiosas consolidándose a través del tiempo con el sedentarismo y desarrollo del lenguaje, esto permitió que estos conocimientos se transmitieran de generación en generación hasta el desarrollo de la escritura, facilitando la recopilación de conocimientos y su intercambio por las grandes

civilizaciones; los cuales representan una evidencia de dichos conocimientos que siguen estudiándose y validándose en la actualidad.

El continente asiático albergó diversas culturas importantes en la historia de la herbolaria. Mesopotamia es la cultura que cuenta con los registros más antiguos, datan del año 2600 a.C. y fueron escritos en tablillas de arcilla. La cultura China e India también contaban con un amplio y diverso conocimiento de plantas utilizadas en la medicina, dichos conocimientos se pueden apreciar en el Pen tsao kang-mou y el Indian Ayurvedic, respectivamente. (Cortez, V. et.al. 2004; Prieto, S. et.al. 2004).

Las grandes aportaciones del Continente Africano nacen principalmente en el antiguo Egipto, donde el reporte farmacéutico más conocido es el Papiro de Ebers del año 1500 a.C., pero también existen otros papiros de gran importancia y conocimiento como el papiro de Kahun, Hearst, Grapow y Deines (Cortez, V. et.al. 2004) (Prieto, S. et.al. 2004).

Del Continente Europeo los escritos más importantes pertenecen a Grecia y Roma. Entre otros Dioscórides, Hipócrates, Galeno y Teofrasto fueron los encargados de ejercer la medicina y recopilar la información de las plantas, su uso, recolección y preparación. Después del imperio romano la herbolaria pasó a formar parte de los países que surgieron; España fue ampliando sus conocimientos de la herbolaria a través del comercio proveniente de Italia, Arabia, Asia y el Báltico; sin embargo, estos conocimientos se enriquecieron mucho más tras la conquista de América. (Cortez, V. et.al. 2004; Prieto, S. et.al. 2004).

En el Continente Americano se desarrollaron varias culturas conocedoras de la herbolaria, siendo la cultura azteca de la que se tiene mayor información gracias a su ubicación durante la conquista. El Códice Florentino es el principal documento escrito en náhuatl por Fray Bernardino de Sahagún. Por otro lado, Martín de la Cruz un curandero indígena, describe los métodos curativos de su cultura en el código Libellus de medicinalibus indorum herbis (Cortez, V. et.al. 2004). Con el

mestizaje esta área se desarticuló, pero jamás se perdió, logró sobrevivir a la prohibición del clero durante la colonia y renació después de la Independencia, pasando a formar parte del conocimiento popular por campesinos e indígenas. El conocimiento tradicional de las plantas medicinales ayudo a superar condiciones de salud difíciles como las que predominaron durante la guerra civil y las intervenciones extranjeras en el siglo XIX (Cedeño, C. 2010); esta permaneció transmitiéndose de generación en generación y por medio de las migraciones de los campesinos fue llevada a las ciudades (Domínguez, M. 2005).

1.1.3 Situación actual

En México se estima que el 55.7% de las localidades disponen de clínicas o centros de salud y 12.1% cuentan con consultorios médicos particulares. La presencia de la medicina tradicional, representada por las figuras de la partera y curandero, registran porcentajes de 30.6% y 22.8%, respectivamente (INEGI, 2010).

De acuerdo a lo anterior se sabe que la herbolaria juega un papel importante en grandes núcleos de la población mexicana, principalmente en zonas rurales y comunidades indígenas, por ser el recurso más accesible debido a su conocimiento milenario y disponibilidad económica. Por otro lado, en las zonas urbanas y ciudades, ha sido sustituida por la medicina alópata u ortodoxa utilizándose en algunos casos como complementaria a ésta y en otros casos retomada como medicina alternativa.

Entre las razones por las cuales ha caído en desuso la herbolaria son: la dificultad de llevar un control sobre la dosis, la calidad del producto, factores como contaminación microbiológica, presencia de restos de plaguicidas, herbicidas o metales pesados, autenticidad de la planta, existencia de sustancias más activas y específicas y efectos adversos debidos a la interacción con el fármaco de síntesis si el paciente se encuentra en tratamiento (Schlaepfer, L. & Mendoza, J. 2010).

Considerando que las plantas desde hace varios años han sido fuente directa de agentes terapéuticos, materia prima, modelos de estructuras químicas y marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Bermúdez, A. y Velázquez, D. 2005), es importante continuar su estudio; pues, se estima que alrededor de 4000 especies de plantas poseen propiedades medicinales y que sólo el 5% cuenta con validación química, farmacológica, biomédica y toxicológicas (Sánchez, A. 2000). Pese a esto la disponibilidad de las plantas medicinales se encuentra en riesgo por la destrucción de sus entornos naturales, así como la pérdida del conocimiento tradicional de su uso (Bermúdez, A. & Velázquez, D. 2005).

1.2 *Bacopa procumbens*

Bacopa procumbens (Mill) Greenm, pertenece a la familia *Scrophulariaceae*, la cual tiene una distribución cosmopolita y alberga 269 géneros y alrededor 5100 especies. El género *Bacopa* cuenta con 60 especies distribuidas principalmente en el continente americano, de las cuales la especie *procumbens* fue descrita por Mill y Greenm en *Scrophulariaceae Bacopa procumbens* Greenm en 1907 (IPNI. 2005).

En estudios recientes se ha demostrado que esta planta también conocida como “*Metatera*” tiene un efecto cicatrizante, asociado principalmente a procesos de proliferación, adhesión y migración celular (Hidalgo, O. 2010).

1.2.1 Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

Súperdivisión: *Spermatophyta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Scrophulariales*

Familia: *Scrophulariaceae*

Género: *Bacopa*

Especie: *Bacopa procumbens* (Figura 1 y 2) (Mill) Greenm (Heike, V. 2009).

1.2.2 Sinonimias y nombres comunes

Los sinónimos reportados para esta especie son:

Bacopa chamaedryoides (Kunth) Cook & Coll, *Bacopa chamaedryoides* (Kunth) Wettst, *Bacopa chamaidryoides* Wettst, *Bacopa dianthera* (Sw) Descole & Borsini, *Bacopa montevidensis* (Spreng) Hert. & Melchior, *Bacopa peduncularis* (Benth) Standl, *Bacopa procumbens* var *peduncularis* (Benth) Fernald, *Bacopa procumbens* var *schottii* Greenm, *Erinus procumbens* Mill, *Gratiola repens* Sessé & Moc, *Herpestis caprarioides* Kunth, *Herpestis chamaedryoides* Kunth, *Herpestis chamaedryoides* var *peduncularis* (Benth) Gray, *Herpestis colubrina* Kunth, *Herpestis flagellaris* Cham & Schldl, *Herpestis montevidensis* Spreng, *Herpestis peduncularis* Benth, *Herpestis procumbens* (Mill) Urb, *Herpestis vandellioides* Kunth, *Lindernia dianthera* (Sw), *Mecardonia dianthera* (Sw) Pennell, *Mecardonia montevidensis* (Spreng) Pennell, *Mecardonia peduncularis* (Benth) Small, *Mecardonia procumbens*(Mill) Small, *Mecardonia tenuis* Small, *Mecardonia vandellioides* (Kunth) Pennell, *Mecardonia viridis* Small, *Moniera dianthera* (Sw)

Millsp, *Monniera chamaedryoides* var *peduncularis* (Benth) Mohr, *Monniera dianthera* (Sw) Millsp, *Monniera dianthera* Millsp, *Monniera montevidensis* (Spreng) Kuntze, *Monniera procumbens* (Mill) Kuntze, *Monniera procumbens* var *flagellaris* (Cham & Schltl) Kuntze, *Monniera procumbens* var *montevidensis* (Spreng) Kuntze, *Pagesia dianthera* (Sw) Pennell, *Pagesia peduncularis* (Benth) Pennell, *Pagesia procumbens* (Mill) Pennell y *Pagesia vandellioides* (Spreng) Pennell.

De las anteriores el más utilizado es *Mecardonia procumbens* (Mill) Greenm (Trópicos, 2016).

Los nombres comunes de esta planta pueden depender de la región en la que se encuentre. En Tabasco es conocida como Escabiosa y Flución, en Veracruz como *Chotecte* y Quina, en San Luis Potosí como Huitzil a k'iicha, Tsakam wichab (tenek); Nayarit: Quita manchas de la cara y en Hidalgo como Metatera (Biblioteca Digital de Medicina Tradicional Mexicana, 2009). En maya se le nombra Xcanlum, Xnocac, Xakan-lum, X-mok'aak y Xaaxkoch; mientras que en inglés es llamada Waterhyssop y Baby jump-up. Otros nombres que también recibe son: Hierba te, Trencilla, Esperanza, Hoja de quebranto y Violetilla (Heike, V. 2009).

1.2.3 Identificación y descripción

Es una hierba perenne que al secarse se ennegrece. Sus tallos miden de 4-30 cm de largo, son procumbentes, glabros y ramificados desde la base. Las hojas llegan a medir de 7-25 mm de largo y de 3-16 mm de ancho, son opuestas, ovadas-lanceoladas, pecioladas, con márgenes aserrados, la base es redondeada y el ápice es agudo. Sus pedúnculos miden 1 cm de largo y son bractíoles. Tiene inflorescencia solitaria y axilar. El cáliz tiene 5 sépalos desiguales que llegan a medir de 5- 9.5mm de largo y 3- 6 mm de ancho, es glabro e imbricado. La corola es bilabiada y llega a medir de 6- 12 mm de largo, es escariosa, tiene 4 lóbulos amarillos y 4 estambres. El fruto es una cápsula oblonga de hasta 1 cm de largo y

semillas cilíndricas y reticuladas. (Hughey, M. 2011) (Hidalgo, O. 2010) (Trópico. 2016).



Figura 1. *Bacopa procumbens* (Costea, M. & García, I. 2013).



Figura 2. Flor de *Bacopa procumbens* fresca (izquierda) y seca (derecha) (Costea, M. & García, I. 2013)

1.2.4 Distribución y hábitat

Esta especie se distribuye desde el sur de Estados Unidos a Sudamérica, es originaria de México y cuenta con una distribución secundaria en Asia (Figura 3). Habita climas semisecos y húmedos entre 200 a 3850 msnm. Está asociada principalmente a pastizales y matorrales xerófilos, aunque también se encuentra en bosques, selvas tropicales y como planta ruderal (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009) (Heike, V. 2009) (Hidalgo, O. 2010) (Hughey, M. 2011) (ATRP 2010).



Figura 3. Distribución de *Bacopa procumbens* (Hughey, M. 2011).

1.2.5 Usos y formas de usos

En la medicina tradicional el uso de *B. procumbens* es destinado para diversos fines dependiendo de las localidades de las que se trate. En Tabasco se bebe el cocimiento de toda la planta para quitar la fatiga del cuerpo; el mismo remedio es utilizado en Veracruz como antimalárico, en desórdenes biliares y contra la anemia, por otro lado, para bajar la calentura se emplea un preparado con alcohol o aguardiente; en Guanajuato se realiza una cocción de toda la planta para su aplicación oftálmica; en Nayarit con la finalidad de quitar las manchas de la cara es colocado sobre estas el agua previamente refrigerada con la hoja, flor y fruto; en Hidalgo se hierve la planta completa y la infusión se bebe como agua de tiempo con la finalidad de cicatrizar todo tipo de heridas. Otros usos que se le dan a esta planta son para el tratamiento de erupciones, sabañones, en el baño para las

parturientas y antiséptico (Molina, J. 2013) (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

De las propiedades anteriores solo se ha validado el efecto cicatrizante de esta especie (Hidalgo, O. 2010).

1.2.6 Fitoquímica

Las investigaciones acerca de la fitoquímica de *B. procumbens* se han realizado en la planta completa (raíz, tallo, hojas, flores y semillas) identificando saponinas, como los procumbósidos A y B; flavonoides, como la diosmina y linarin; azúcares, como la A-D glucosa, B-D- glucosa, manitol, arbutina, sucrosa, 3'-hidroxi-4'-metoxiscutellareina-7-O-D-glucopiranosido, 4-hidroxifenil-6'-(3'',4''-dihidroxicinamoil)-O-D-glucopiranosido y 4-hidroxifenil-6'-hidroxicinamoil)-O-D-glucopiranosido.

Además de triterpenos, como el lupeol y fitoesteroles, como el B-sitoesterol, B-sisterol-B-D-glucósido.

De los compuestos anteriores se ha demostrado que el lupeol, diosmina y los B-sitoesteroles, poseen un efecto cicatrizante (Hidalgo, O. 2010) (Pathak, S. et.al. 2005).

1.3 Técnica de micronúcleos

Con el objeto de evaluar la interacción y/o el efecto mutagénico potencial sobre el DNA que distintos xenobióticos pueden ejercer, se utilizan biomarcadores (López, M. et. al. 2009). En sentido amplio, un biomarcador es un parámetro en el organismo, sobre sus componentes celulares, bioquímicos, procesos, estructuras o funciones, los cuales son medibles en una muestra biológica tras la exposición al agente (Martínez, M. 2009).

Las pruebas de evaluación genotóxica son diversas, pueden ser *in vivo* o *in vitro* y cada una de ellas se enfoca en distintos tipos de daños al DNA (Paniagua, L. 2010). Los ensayos aprobados oficialmente por la OCDE, son: el ensayo de mutación inversa en bacterias, intercambio de cromátides hermanas, micronúcleos y aberraciones cromosómicas (Hun, S. et.al. 2013). Además, el ensayo de micronúcleos (MN) ha sido recomendado por la “Internacional Conference on Harmonization (ICH) of Genotoxic Guidelines”, “Environmental Protection Agency (EPA)”, “Food and Drug Administration (FDA)” y la “Internacional Agency for Research on Cancer (IARC)” (Ramos, J. 2016). El propósito de esta prueba es identificar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas, originadas por clastogénesis o aneuploidogénesis (OCDE, 2014).

1.3.1 Definición

Los micronúcleos son pequeños cuerpos de cromatina que aparecen en el citoplasma por la condensación de cromátides o cromosomas completos o fragmentos acéntricos formados a partir de un rezago anafásico o una ruptura durante la división celular (Domínguez, M. 2005) (Zaizuhana, 2006) (Hun, S. et.al. 2013) (Torres, O. et.al. 2014).

1.3.2 Antecedentes

El primero en encontrar micronúcleos (MN) en un frotis sanguíneo fue Howell en 1891; posteriormente, fue descrito por Jolly como pequeños restos nucleares de forma redonda o almendrada con un diámetro entre $0.4\mu - 1.6\mu$ y de apariencia picnótica igual a la del núcleo. Por esta razón en hematología son conocidos como cuerpos de Howell- Jolly (Rocha, 2008).

Más tarde, Evans y colaboradores (1959) utilizaron la frecuencia de micronúcleos como una medida de daño citogenético al exponer células de *Vicia faba* a neutrones rápidos y rayos gamma en presencia y ausencia de oxígeno, encontraron que las cromátides, cromosomas e isocromátides rotas, dan origen a

la aparición de fragmentos acéntricos en la mitosis y éstos son excluidos del núcleo principal, apareciendo en la siguiente interfase como micronúcleos (Domínguez, 2005).

En 1975 y 1976 Schmid y Heddle, respectivamente, determinaron que la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) era un indicador de daño citogenético en médula ósea de roedores. Posteriormente, McGregor y colaboradores en 1980 utilizaron EPCMN de sangre periférica como marcador de daño citogenético (Domínguez, 2005; Zalacain, et.al. 2005).

Fue en 1999 cuando el ensayo de micronúcleos fue considerado un biomarcador efectivo de daño al DNA, fue validado a nivel mundial y se creó el programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: Human Micronucleus Project), diseñado por Michael Fenech y Stefano Bonassi, con la finalidad de recopilar la información obtenida por este ensayo (Zalacain, 2005).

En la actualidad es uno de los ensayo más recomendado por diversas agencias que estudian daños al DNA, y es utilizado en una gran variedad de sistemas para pruebas *in vivo* e *in vitro* (Tweats et al., 2007).

1.3.3 Fundamento

La formación de MN se da en células en proliferación; en la eritropoyesis, los proeritroblastos localizados en los órganos hematopoyéticos comienzan a proliferar y diferenciarse dando lugar a eritroblastos basófilos y posteriormente eritroblastos policromáticos, todos los anteriores tienen capacidad mitótica (Figura 4). Durante la anafase un agente puede producir MN por dos causas, las cuales se esquematizan en la Figura 5. La primera y más común es por la formación de fragmentos acéntricos que no logran ser incluidos en los núcleos hijos al finalizar la telofase (daño clastógeno), dichos fragmentos se originan por la ruptura de cadena doble o sencilla que no ha sido reparada o su reparación es incompleta

debido a que la carga de daño en el DNA supera la capacidad de reparación de la célula dentro de un marco de tiempo específico. Algunos mecanismos asociados a errores de reparación se deben al daño de genes y enzimas involucrados en las vías de reparación; por ejemplo, defectos en los genes BRCA1 y BRCA2 afectan la reparación por recombinación homóloga originando una reparación incompleta o una reparación nula si las enzimas que participan en la vía de unión de extremos no homólogos son defectuosas. La segunda causa es que el agente provoque un daño a nivel de las proteínas involucradas directa o indirectamente en la segregación de cromosomas, esto incluye inhibición en el ensamble o desensamble de microtúbulos, remoción de cinetocoros, daños al centriolo, centrómero inactivado, hipometilación de secuencias repetidas en DNA centromérico o pericentromérico y fallo en genes “check point” en la anafase (daño aneuploidógeno) (Fenech et al., 2003) (Fenech, M. et. al. 2011).

La diferenciación continua de eritroblastos policromáticos a eritroblastos ortocromático, en el cual no se realiza mitosis y se lleva a cabo la expulsión del núcleo 6 horas después de la última mitosis, en caso de que el agente administrado se comporte como un agente aneugénico o clastógeno el micronúcleo no será expulsado y seguirá presente en el citoplasma de la siguiente fase de maduración, recibiendo el nombre de eritrocito policromáticos micronucleados (EPCMN) y eritrocito policromático (EPC), reticulocito o eritrocito inmaduro en caso de no contar con restos de DNA en su citoplasma. El EPC o EPCMN pueden pasar de médula ósea a sangre periférica por medio de la diapédesis cumpliendo un tiempo de vida media de 12-24 hrs en ambos compartimentos; sus características tintoriales y morfológicas facilitan su identificación, pues cuenta con un mayor tamaño, restos de RNA, ribosomas y vestigios del aparato de Golgi para continuar con la síntesis de aproximadamente el 20% de hemoglobina, esto hace que sea basofílico y que los colorantes, como Giemsa, le den una tonalidad azul- morada y al micronúcleo morado; además, por ser la etapa que recientemente han salido a sangre periférica se utiliza como marcador para evaluar las exposiciones agudas. Cuando el EPC o EPCMN ha completado la hemoglobinización del protoplasma pasa a eritrocito, eritrocito

normocrómico (ENC), eritrocito maduro o ENCMN y adquiere características acidófilas, por lo cual los colorantes antes mencionados le dan una tonalidad de anaranjado-rosa y el micronúcleo morado. En esta última etapa es donde se evalúan exposiciones crónicas, puesto que el tiempo de vida media de los ENC en roedores es de 20- 30 días (Hernández, C. 2012) (Hernández, B. 2012) (Mavorunin, et. al. 1990) (Hernández, L. 2015) (Gómez, A. 2012).

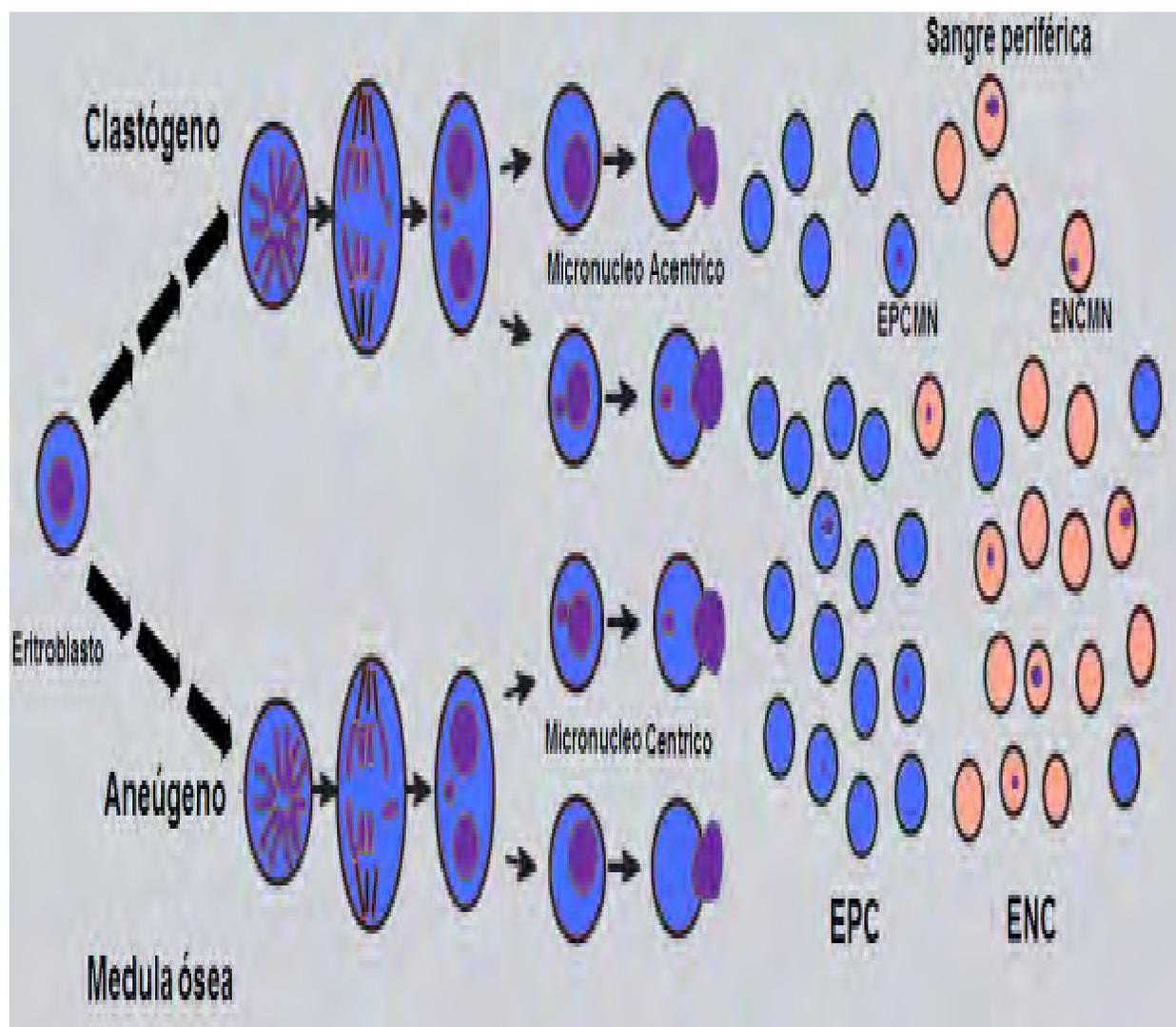


Figura 4. Mecanismo de formación de micronúcleos en médula ósea inducida por agentes aneugénicos y clastógenos (Domínguez, M. 2005).

1.3.4 Características de los micronúcleos

Los MN son cuerpos intracitoplasmáticos de forma redonda, con un diámetro aproximado de $1/20$ a $1/5$ de un eritrocito, no refringen la luz por lo cual son fácilmente distinguidos de precipitado de colorantes y se tiñen de la misma intensidad que el núcleo (Figura 6) (Fenech, et.al. 2003).



Figura 4. Frotis de sangre periférica con ENC, EPC (esquina superior izquierda) y EPCMN (flecha) (Gómez, P. 2015).

1.3.5 Sistemas de ensayo

Los sistemas generalmente utilizados para evaluar MN *in vitro* son linfocitos humanos, utilizando citocalasina B y queratinocitos, células CHO, L5178Y, TK6, CHL y V79 sin citocalasina B. Además ha sido reportado el uso de células HepG2 y células embrionarias de hámster Sirio; sin embargo no han sido estandarizadas (Kirsch-Volders, M. 2011).

Los ensayos *in vivo* en mamíferos tienen la ventaja de considerar el metabolismo, farmacocinética y la reparación del DNA; así mismo, resultan útiles para la

investigación adicional de la genotoxicidad detectada por un sistema *in vitro* (OCDE, 2014). La prueba de micronúcleos *in vivo* requiere de células en proliferación y su análisis se puede realizar en estas mismas o en sus fases de maduración. Pueden ser células anucleadas, como los eritrocitos o células nucleadas, como espermatogonias, mieloblastos, mielocitos, células de exfoliación de la mucosa oral, nasal, hepatocitos, células de descamación renal, epitelio del cuello uterino, vejiga, esófago, bazo, colón, piel y células pulmonares (Torres, O. et.al. 2014) (Hernández, B. 2012).

El uso de sangre periférica se recomienda en animales donde el bazo no elimine eritrocitos micronucleados, generalmente ratones, mientras que para médula ósea se utilizan ratas o ratones. Las cepas de laboratorio más utilizadas en ratones son: BALB / c , C57BL / 6, CD - 1 , ddy , MNRI y negro Suizos; mientras que en ratas son: F344 , Dakota del Sur y Wistar (FDA, 2000) (Hernández, L. 2015)(Hun, S. et.al. 2013). El ensayo puede ser realizado de tres maneras (OCDE 2014):

- Tratar a los animales con la sustancia de ensayo una vez, tomando al menos dos muestras; para médula ósea el muestreo es de 24-48 hrs después del tratamiento en grupos independientes de animales, en sangre periférica se inicia de 36-72 hrs después del tratamiento en el mismo grupo de animales.
- Administrar dos tratamientos en intervalos de 24 hrs; las muestras deben ser recogidas de 18-24 hrs después de la última administración para médula ósea y de 36-48 hrs después de la última administración en sangre periférica.
- Administración de tres o más tratamientos en intervalos de 24 hrs; las muestras de médula ósea deben recogerse a más tardar 24 hrs después de la última administración y en sangre periférica deben no debe exceder de las 40 hrs después del último tratamiento.

La obtención de sangre periférica puede ser de un vaso sanguíneo (por ejemplo, la punta de la cola de un ratón), punción cardíaca o de grandes vasos después del

sacrificio de los animales, para médula ósea se obtienen el fémur o la tibia inmediatamente después de la eutanasia.

Las muestras pueden ser analizadas por microscopía óptica utilizando una tinción supravital directa o se extienden en un frotis, se fijan y tiñen con colorantes convencionales (como Giemsa) o colorantes DNA específicos (como naranja de acridina, Hoechst 33258 más pironina-Y) que tienen la ventaja de eliminar los artefactos generados por colorantes no específicos de DNA. Además, se puede utilizar microscopía de fluorescencia para el análisis de muestras tratadas con anticuerpos anti-cinetocoros o sondas pancentroméricas por FISH, con la finalidad de detectar el centrómero y con ello la naturaleza del agente (aneugénico o clastógeno). El análisis por citometría de flujo se realiza utilizando marcadores CD71 y marcadores de DNA; también se ha reportado el uso de columnas de celulosa para eliminar células nucleadas y su uso se recomienda siempre y cuando sea debidamente justificado (Serrano, G. 2011) (OCDE, 2014) (Sun, J. et. al. 1999).

Para el estudio se analizarán mínimo 5 animales por grupo, incluyendo un grupo para control positivo, control negativo y grupos donde se administre el agente de prueba a diferentes concentraciones. Los animales deben ser jóvenes, sanos y la variación en el peso no debe exceder +/- 20% del peso medio. La proporción de EPC se determinará para cada animal en un recuento de al menos 500 eritrocitos totales (ENC+EPC) en médula ósea y 2000 eritrocitos totales en sangre periférica, con lo que se evaluará la citotoxicidad del agente administrado, la cual no deberá ser menor del 20% con respecto al control negativo. La genotoxicidad del compuesto se determina contando la cantidad de EPCMN en al menos 4000 EPC por animal (OCDE, 2014).

1.3.6 Ventajas y desventajas

El ensayo de MN *in vivo* utilizando sangre periférica se caracteriza por su simplicidad, fiabilidad, sensibilidad y rapidez; ya que la obtención de la muestra es fácil, puede obtenerse en repetidas ocasiones del mismo animal sin necesidad de sacrificarlo, con tan solo una gota de sangre se tiene una gran cantidad de células analizables, el MN formado durante la división celular persiste hasta la destrucción del eritrocito, el parámetro contado es reconocido fácilmente por personal con poca experiencia en citogenética, no requiere de un cariotipo favorable y no se requiere de ningún otro agente químico más que el de prueba (Domínguez, M. 2005) (Hernández, L. 2015).

Las principales limitaciones del ensayo es que no detecta la diferencia entre los agentes que rompen cromosomas de los que causan rezago anafásico, ni los cromosomas involucrados. Además, la prueba no detecta agentes que no producen pérdidas de material genético o rezago anafásico, y tampoco es útil en poblaciones celulares que no se dividen. (Hayashi et al., 2000) (Zúñiga, G. et.al. 2006)

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad las enfermedades que carecen de tratamientos satisfactorios van en aumento, esta creciente problemática depende de varios factores, entre los que se destaca el uso de medicamentos poco efectivos y que inducen reacciones adversas. Por lo anterior la validación de los efectos terapéuticos y el estudio toxicológico de las plantas ha ido incrementado en los últimos años, pues la ciencia ha podido diseñar (a partir del descubrimiento de nuevos compuestos) medicamentos y modelos de estructuras químicas para tratar diversos tipos de padecimientos.

Las investigaciones realizadas en la ENMyH del IPN demostraron el efecto cicatrizante de *Bacopa procumbens* mill (Grenm). Pues, al utilizar una fracción acuosa, clorofórmica y n- hexánica del extracto acuoetanólico en ensayos con MTT y análisis de la proteína PCNA, se observa un aumento en la proliferación de fibroblastos; además, la fracción acuosa induce un efecto de adhesión de fibroblastos a la fibronectina y migración celular por el ensayo de "herida" por rayadura, así como el incremento en la expresión de α -SMA que ayuda a la diferenciación de fibroblastos a miofibroblasto, los cuales promueven el cierre y contracción de la herida. Lo anterior muestra una gran importancia médica, pues a pesar de contar con medicamentos para esta acción, los efectos secundarios de los mismos son importantes (Hidalgo, O. 2010).

Teniendo como antecedentes las investigaciones de Hidalgo, O. en 2010 se propone investigar la genotoxicidad y citotoxicidad del extracto acuoetanólico de *Bacopa procumbens* por la técnica de micronúcleos *in vivo* para conocer el efecto sobre el material genético y la seguridad de su uso terapéutico.

Para llevar a cabo lo anterior se propone determinar su actividad genotóxica y citotóxica por la técnica de micronúcleos *in vivo* en ratones de la cepa CD1, utilizando dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg del extracto acuoetanólico de *B. procumbens*.

3. HIPÓTESIS

Si el extracto de *Bacopa procumbens* presenta actividad genotóxica y/o citotóxica en un estudio agudo por la técnica de micronúcleos *in vivo*; entonces, la frecuencia de EPCMN se verá aumentada y la relación de EPC/ ENC será modificada.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad genotóxica y citotóxica del extracto de *Bacopa procumbens* en un estudio agudo utilizando dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg en ratones de la cepa CD1 por la técnica de micronúcleos *in vivo* con la finalidad de conocer los efectos genotóxicos de la planta por esta técnica.

4.2 Objetivos particulares

- Determinar la actividad genotóxica del extracto de *Bacopa procumbens* a las dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg a través de la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en sangre periférica de ratones CD1.
- Determinar la actividad citotóxica del extracto de *Bacopa procumbens* a las dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg a través de la frecuencia de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos en sangre periférica de ratones CD1.
- Establecer las concentraciones de Metilmetanosulfonato para su uso como control positivo en la técnica de micronúcleos *in vivo* en ratones machos de la cepa CD1.

5. DIAGRAMA EXPERIMENTAL

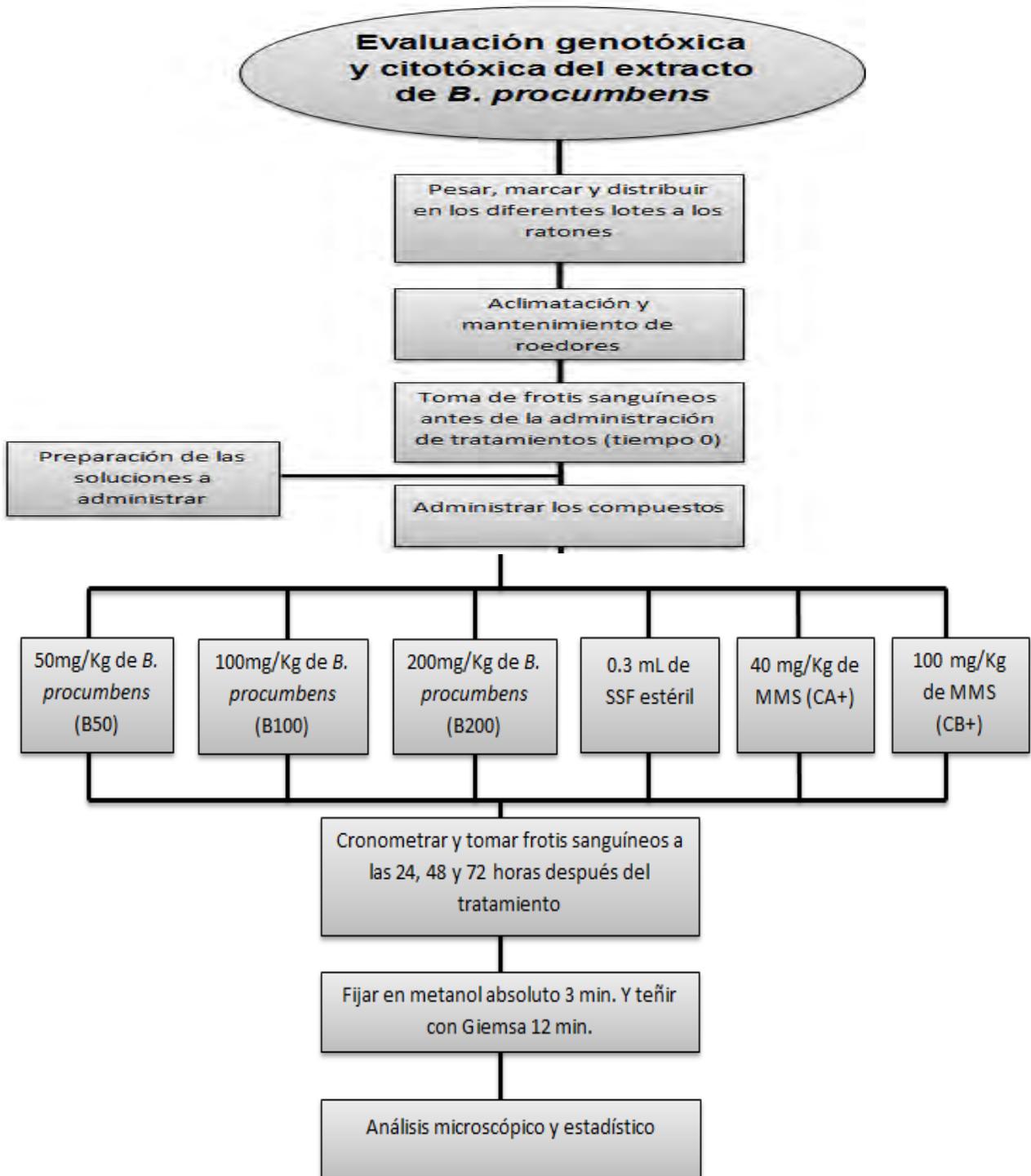


Figura 5. Diagrama experimental

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Se emplearon 25 ratones machos de la cepa CD1, con un peso de 20+/- 5g, provenientes del bioterio de la FES Iztacala, UNAM. Los ratones fueron aclimatados en el bioterio de posgrado de la FES-C Campo 1, donde se mantuvieron bajo las mismas condiciones ambientales (temperatura y hábitat), con fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas de oscuridad y bajo una dieta a base de alimento comprimido (Nutri-cubos Purina^{MR}) y agua a libre acceso.

Para el estudio los ratones fueron marcados por el código de punto y barras (1-30) y se distribuyeron en 6 lotes con 5 ratones cada uno. La administración de los tratamientos se realizó de acuerdo a las dosis reportadas en la tabla 1.

Tabla 1. Especificaciones de la administración de compuestos en los diferentes lotes.

Lote	Compuesto	Dosis y vía de administración
Control positivo A (CA+)	MMS	40 mg/Kg vía intraperitoneal
Control positivo B (CB+)	MMS	100 mg/ Kg vía intraperitoneal
Control negativo (C-)	Solución inyectable	0.3 mL Vía intraperitoneal
<i>B. procumbens</i> 50mg/Kg (B50)	<i>Bacopa procumbens</i>	50 mg/kg vía intraperitoneal
<i>B. procumbens</i> 100mg/Kg (B100)	<i>Bacopa procumbens</i>	100 mg/kg vía intraperitoneal
<i>B. procumbens</i> 200mg/Kg (B200)	<i>Bacopa procumbens</i>	200 mg/kg vía intraperitoneal

6.2 Justificación de las dosis administradas

6.2.1 Dosis de MMS

Las dosis administradas de MMS se basaron en los resultados reportados en diferentes estudios en los cuales se observa genotoxicidad a las concentraciones manejadas.

El uso de 40 mg/Kg de MMS como control positivo para la técnica de micronúcleos *in vivo* ha sido reportado en numerosos estudios, entre ellos, los realizados por Angeloni, M. en 2010, Munari, C. y colaboradores en 2014 y Leandro, L. y colaboradores en 2013, en los cuales se ocupan distintas cepas de ratones para ensayos agudos y se obtiene un incremento de la frecuencia de EPCMN.

Por otro lado, los estudios realizados por Branda, R. y colaboradores en 2007 y Vrzoc, M. y Petras, M. en 1997, utilizan dosis de 100 mg/Kg de MMS en ratones para ensayos agudos de micronúcleos y se sugieren el uso de esta dosis por inducir un incremento de MN en EPC.

6.2.2 Dosis de *Bacopa procumbens*

Las determinaciones de las dosis administradas en este ensayo se basaron en los antecedentes directos de la ENMyH del IPN, donde se utilizaron 160 mg/mL del extracto de *B. procumbens* en hidrogel para estudiar el efecto cicatrizante comprobado de manera *in vitro* en cultivos de la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón (Hidalgo, O. 2010).

Los estudios toxicológicos *in vivo* y la validación de las propiedades medicinales (en roedores) con plantas de su familia (*Scrophulariaceae*) también han sido consideradas para establecer las dosis utilizadas, sobre todo los realizados con *Bacopa monnieri*, debido a su similitud fitoquímica y encontrarse disponibles una mayor cantidad de investigaciones.

Entre los estudios realizados con *B. monnieri* destacan los de Vijayan, V. y colaboradores en 2007 y los de Mannan, A. y colaboradores en 2015 que menciona el uso de dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg del extracto de *B. monnieri* sin observar la inducción de micronúcleos o signos de daño a los animales de laboratorio al evaluar las propiedades de esta planta.

Los estudios de la toxicidad de *B. monnieri* realizados por Sireeratawong, S. y colaboradores en 2016 muestran que un estudio agudo a dosis de 5000 mg/Kg (monitoreando parámetros toxicológicos durante 14 días post-administración) y en un estudio crónico administrando dosis de 30, 60, 300 y 1500 mg/Kg vía oral por 270 días no se induce ningún tipo de toxicidad en ratas Sprague- Dawley. Además, en 2007 también se descartaba sus efectos tóxicos en los estudios realizados por Joshua, J. y colaboradores utilizando dosis de 2400 mg/Kg en un estudio agudo y 85, 210 y 500 mg/Kg en un estudio crónico vía oral.

Otros estudios genotoxicológicos realizados en plantas de su familia, son el realizado por Langeswaran, K. y colaboradores en 2012, donde se muestra el efecto antimutágeno y hepatoprotector de *Scoparia dulcis* a dosis de 500 mg/Kg contra el daño hepático producido por N-Nitrosodietilamina.

6.3 Obtención del extracto

El extracto de *Bacopa procumbens* fue extraído y proporcionado por la sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN a cargo del Dr. Guillermo Pérez Ishiwara, contando con financiamiento por parte de esta sección para el desarrollo de este estudio.

6.5 Tratamientos

El MMS (Sigma Aldrich^{MR}) y el extracto de *B. procumbens* se disolvieron en agua inyectable estéril, de acuerdo a las concentraciones indicadas en la tabla 1. Una

vez preparadas las soluciones fueron administradas vía intraperitoneal en un volumen aproximado de 0.3 ml por ratón.

6.6 Administración de tratamientos y tiempos de muestreo

Se realizó un muestreo antes de administrar los tratamientos indicados en la tabla 1, considerando como tiempo 0 dicho muestreo, posteriormente se muestreo a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la administración, como se indica a continuación.

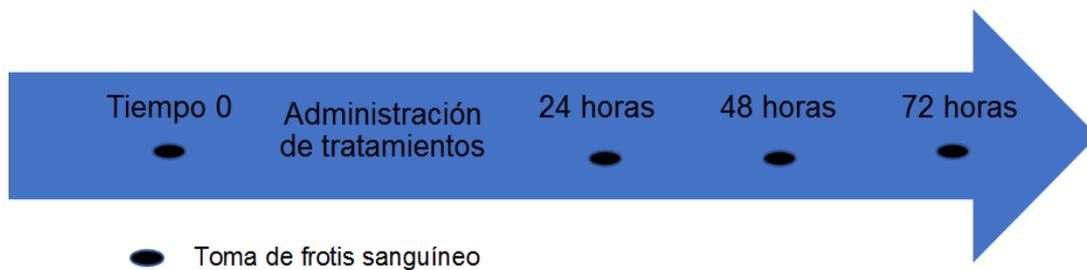


Figura 8. Muestreo y administración de tratamientos.

6.7 Obtención de muestra y preparación de laminillas

Se aplicó anestésico local (Lidocaína Vademecum^{MR}) en la porción terminal de la cola del ratón y se realizó un pequeño corte de la punta. Una gota de la sangre obtenida se colocó directamente sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, con ayuda de otro portaobjetos se realizó un extendido en un ángulo de 45° y se corrió en un ángulo de 30° por la superficie del primer portaobjetos de un solo movimiento, después de secar al aire se fijaron con metanol absoluto durante 3 minutos y se tiñeron con Giemsa (Sigma^{MR}) durante 12 minutos. La obtención de laminillas se realizó por triplicado para cada ratón (Domínguez, M. 2005).

Una vez obtenidas las laminillas de las 72 horas los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y dispuestos al bioterio de la FES-C.

6.8 Análisis de micronúcleos

El análisis de las laminillas se realizó en un microscopio óptico (Leica), donde la tinción de los eritrocitos que se observó con Giemsa, permitió diferenciar a los ENC de los EPC, ya que estos últimos se tiñeron de color azul- morado debido a la presencia de RNA – ribosomal y los ENC de rosa por la presencia de hemoglobina; además, los MN fueron fácilmente identificables debido a sus características; tales como, su forma redonda, que no refringen la luz y se tiñen de morado. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Evaluación de la actividad genotóxica (AG): Se realizó el conteo de 2000 EPC por ratón observando cuántos de ellos presentaban MN (EPCMN).

$$AG = \frac{EPCMN}{2000EPC} \times 100$$

Un aumento en la AG nos indica la capacidad del compuesto para inducir la formación de MN, ya sea por acción clastogénica o aneugénica.

- Evaluación de la actividad citotóxica (AC): Se contaron 2000 eritrocitos totales (ENC + EPC) y se determinó la cantidad de EPC en estos.

$$AC = \frac{EPC}{2000 \text{ eritrocitos totales}}$$

Una disminución en la AC nos indica una eritropoyesis disminuida debido a la cantidad de daños provocada sobre el DNA durante la división celular de las fases de proliferación (OCDE, 2014).

Un aumento en la relación de EPC/ENC se debe a la capacidad del agente para inducir un aumento en la eritropoyesis.

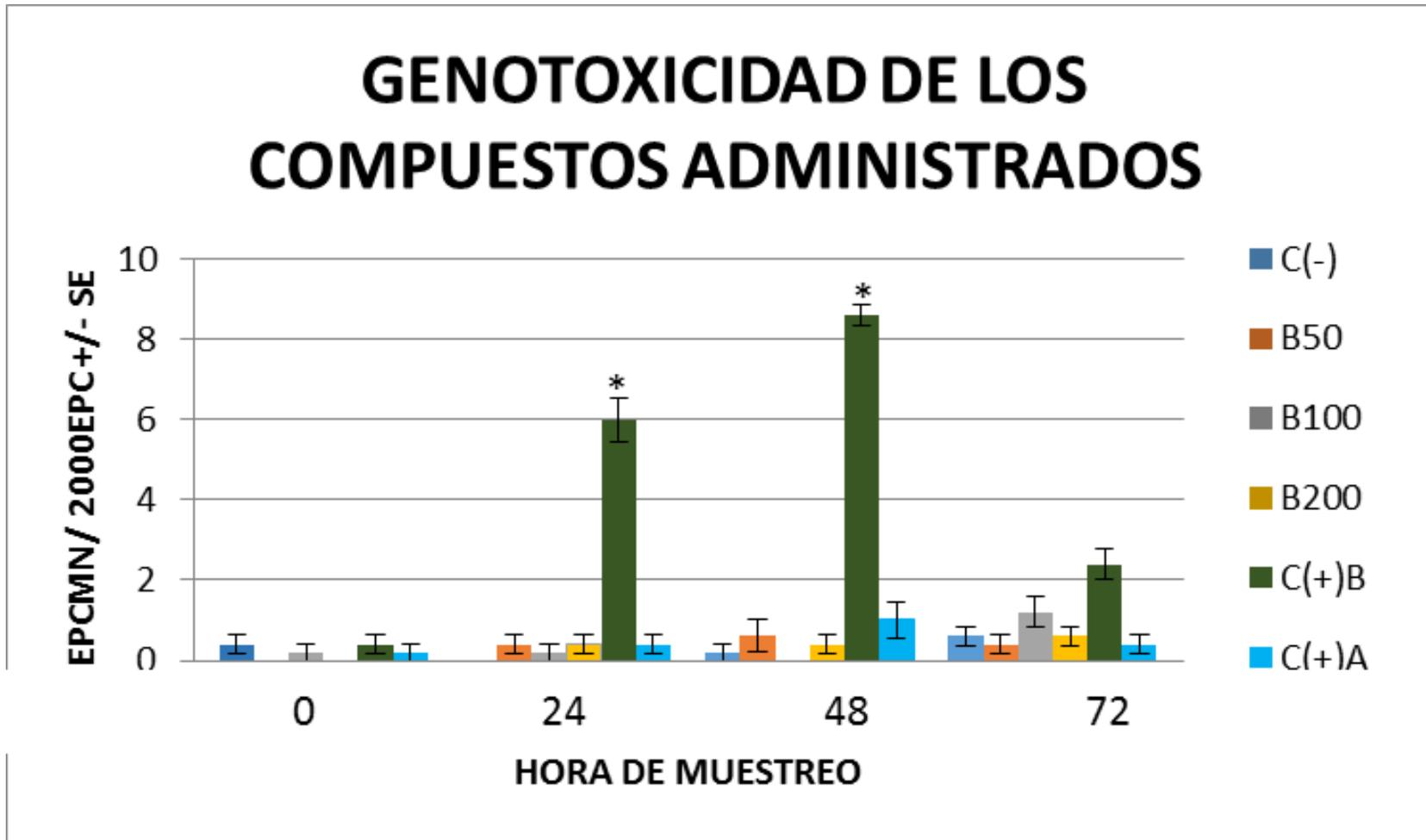
6.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa Graph Pad InStata versión 3.10, utilizando la prueba de ANOVA y las comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, donde se consideraron resultados estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$

7. RESULTADOS

7.1 Actividad genotóxica del extracto de *B. procumbens*

Como se puede observar en la tabla 2 y gráfica 1 al tiempo 0 se contaba con un promedio de 0-0.6 MN en todos los lotes, valores que se mantienen de manera similar (0-0.8) en el control negativo a los diferentes tiempos de muestreo. A las 24 después de administrar los compuestos se puede apreciar leves incrementos y decrementos en los lotes administrados con *B. procumbens*, los cuales no son significativos. En cuanto al control positivo tanto a 40 y a 100 mg/Kg se observa un aumento desde las 24 horas alcanzando su máxima frecuencia de EPCMN a las 48 horas para posteriormente descender a las 72 horas, siendo estos incrementos estadísticamente significativos a la dosis de 100mg/ Kg a las 24 y 48 horas.



Gráfica 1. Genotoxicidad del extracto de *B. procumbens*

Las barras representan el promedio de EPCMN/ EPC de 5 animales tratados, las líneas representan el error estándar. * Diferencias estadísticamente significativa con respecto al control negativo por la prueba de Tukey-Kramer en comparación múltiple $p < 0.05$

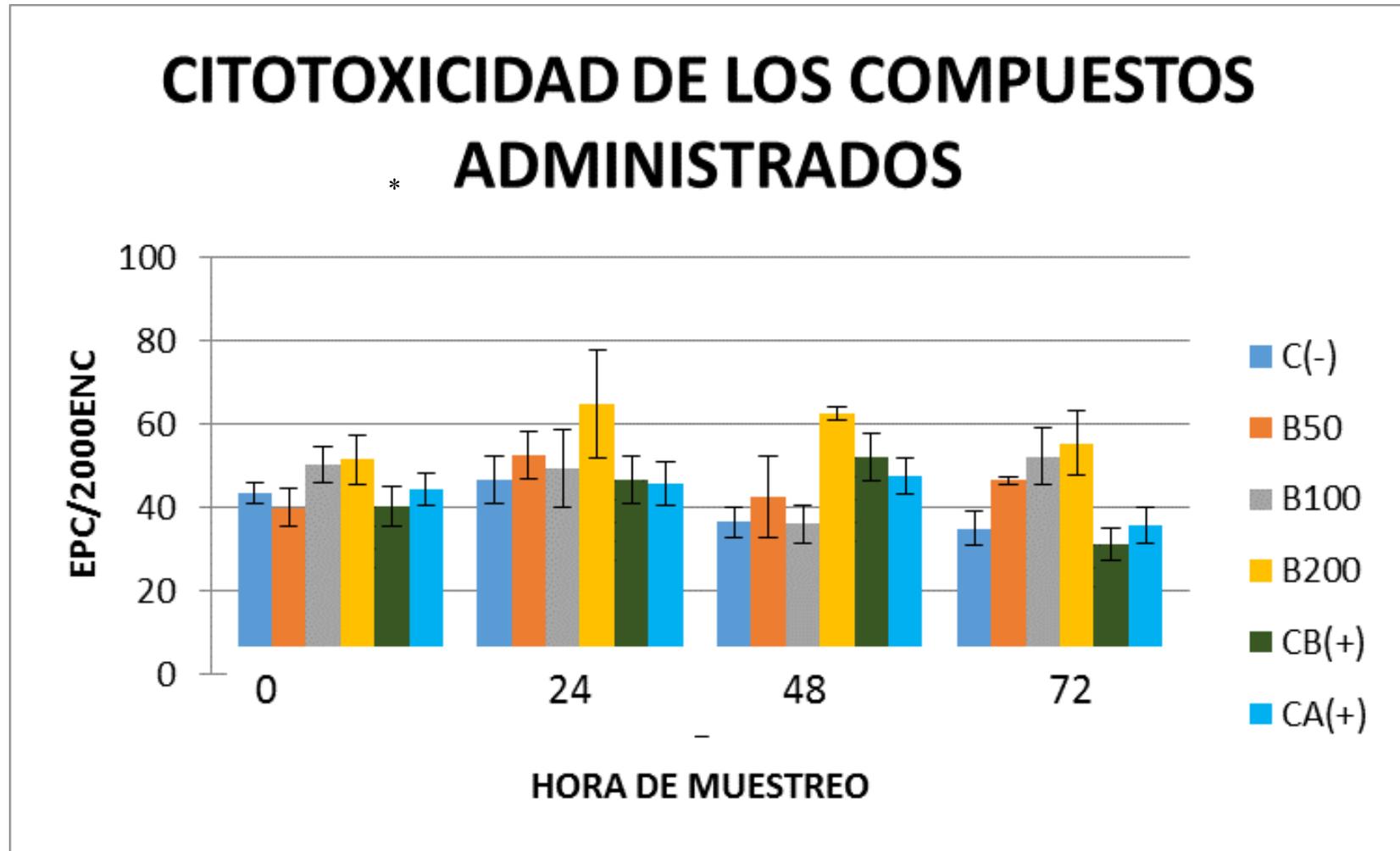
Tabla 2. Genotoxicidad del extracto de *B. procumbens*

LOTE	COMPUESTO	DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN	N	EPCMN/ 2000 EPC +/- SE			
				0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
B50	Extracto de <i>B. procumbens</i>	50mg/ Kg i.p.	5	0 +/- 0	0.4 +/- 0.2449	0.6 +/- 0.4	0.4 +/- 0.2449
B100	Extracto de <i>B. procumbens</i>	100 mg/Kg i.p.	5	0.2 +/- 0.2	0.2 +/- 0.2	0 +/- 0	1.2 +/- 0.3742
B200	Extracto de <i>B. procumbens</i>	200 mg/Kg i.p.	5	0 +/- 0	0.4 +/- 0.2449	0.4 +/- 0.2449	0.6 +/- 0.2449
C (-)	SSF	0.3 mL i.p.	5	0.4 +/- 0.2449	0 +/- 0	0.2 +/- 0.2	0.6 +/- 0.2449
C (+)	A MMS	40 mg/ Kg i.p.	5	0.2 +/- 0.2	0.4 +/- 0.2449	1 +/- 0.4472	0.4 +/- 0.2449
	B MMS	100 mg/Kg i.p.	5	0.4 +/- 0.2449	6 +/- 0.5447	8.6 +/- 0.2449	2.4 +/- 0.4

EPCMN: Eritrocitos Policromáticos Micronucleados; EE: Error estándar; hrs: hora de muestreo; i.p.: vía intraperitoneal; MMS: Metil metanosulfonato; SSF: Solución Salina Fisiológica.

7.2 Actividad citotóxica del extracto de *B. procumbens*

En la tabla 3 y gráfica 2 se puede observar que la relación de EPC/ENC oscila de 35.3- 54 antes de administrar los compuestos (t0) y se mantiene similar (31- 51EPC) en todos los tiempos de muestreo para el control negativo. En cuanto a los lotes administrados con *B. procumbens* se dan aumentos y decrementos no significativos comparando los demás lotes a diferentes tiempo; sin embargo, el lote B200 a las 24 y 48 horas tiene una diferencia estadísticamente significativa con el lote CB(+) a las 72 horas. El control positivo tiene un comportamiento similar a la dosis de 40 y 100 mg/ Kg alcanzando a las 48 horas su máxima frecuencia de EPC/ENC (43 y 57) para descender a valores inferiores al inicial a las 72 horas (31 y 28 respectivamente).



Gráfica 2. Citotoxicidad del extracto de *B. procumbens*

Las barras representan el promedio de EPCMN/ EPC de 5 animales tratados, las líneas representan el error estándar. * Diferencias estadísticamente significativa con respecto a los controles por la prueba de Tukey-Kramer en comparación múltiple $p < 0.05$

Tabla 3. Citotoxicidad del extracto de *B. procumbens*

LOTE	COMPUESTO	DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACIÓN	N	EPC/ 2000 ENC +/- SE			
				0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
B50	Extracto de <i>B. procumbens</i>	50mg/ Kg i.p.	5	40+/-4.701	52.6+/-5.706	42.6+/-9.652	46.4+/-6.668
B100	Extracto de <i>B. procumbens</i>	100 mg/Kg i.p.	5	50.2+/-4.329	49.4+/-9.464	36+/-4.637	52.2+/-6.8
B200	Extracto de <i>B. procumbens</i>	200 mg/Kg i.p.	5	51.4+/-5.896	64.8+/-13.067	62.6+/-1.536	55.4+/-7.652
C (-)	SSF	0.3 mL i.p.	5	43.6+/-2.542	46.6+/-5.68	36.4+/-3.816	35+/-4.147
C (+)	A MMS	40 mg/ Kg i.p.	5	44.2+/-3.904	45.6+/-5.202	47.6+/-4.411	35.8+/-4.341
	B MMS	100 mg/Kg i.p.	5	40.4+/-4.792	46.6+/-5.715	52.2+/-5.616	31.2+/-3.693

EPC: Eritrocitos Policromáticos; ENC: Eritrocitos Normocrómico; SE: Error estándar; hrs: hora de muestreo; i.p.: vía intraperitoneal; MMS: Metil metanosulfonato; SSF: Solución Salina Fisiológica.

8. DISCUSIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, el estudio de las propiedades medicinales de las plantas para fines terapéuticos o modelos de estructuras químicas sigue siendo de gran importancia, pues se estima que existen cerca de 4000 especies y que solo el 5% cuenta con validación química, farmacológica y toxicológica (Sánchez, A. 2000).

Un ejemplo de lo antes mencionado es *B. procumbens*, la cual es utilizada a lo largo de la República Mexicana contra una gran variedad de padecimientos reportados por la medicina tradicional mexicana; sin embargo, solo se cuentan con 2 estudios de su fitoquímica y 1 estudio en el cual se comprueba de manera *in vitro* sus propiedades cicatrizantes.

La investigación de Hidalgo, O. en 2010 en la sección de posgrados de la ENMyH del IPN comprobó que la fracción acuosa del extracto acuoetanólico de *B. procumbens* presentaba un efecto cicatrizante en la línea 3T3 de fibroblastos de ratón, asociado a eventos de proliferación, migración y adhesión; debido a estos antecedentes previos se decidió evaluar su actividad genotóxica y citotóxica, puesto que las investigaciones genotoxicológicas son un paso importante para evaluar los riesgos y beneficios de su uso y consumo para la salud humana (Hidalgo, O. 2010; OCDE, 2014).

En este trabajo se realizó un estudio agudo de la técnica de micronúcleos *in vivo* para evaluar la actividad genotóxica y citotóxica del extracto acuoetanólico de *B. procumbens* a dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg en ratones macho CD1. Las dosis utilizadas fueron establecidas a partir de los estudios realizados en plantas de la familia *Scrophulariaceae* y los antecedentes directos de las investigaciones del IPN (Hidalgo, O. 2010).

Los resultados del ensayo demostraron que la frecuencia de EPCMN a diferentes dosis del extracto (50, 100 y 200 mg/Kg) no muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al lote del control negativo. Como se puede apreciar en

la gráfica 1 y tabla 2 el número de EPCMN tanto para el control negativo como los grupos experimentales se mantuvo dentro de un intervalo de 0 a 1.5 EPCMN, valores que se encuentran dentro del rango normal reportado para la cepa CD1 (1 a 3 MN) (Domínguez, M. 2005), además se puede apreciar que los grupos experimentales son estadísticamente significativos al compararlos con el control positivo a la dosis de 100 mg/Kg a las 24 y 48 hrs, lo cual nos indica que el extracto acuotánico de *B. procumbens* no genera daño clastogénico o aneugénico a las dosis manejadas por la técnica de micronúcleos *in vivo*.

Los resultados encontrados concuerdan con los estudios genotoxicológicos realizados en algunas de las plantas de su familia, como: *Verbascum thapsus*, *Calceolaria chelidonioides*, *Bacopa monnieri*, *Limosella aquatica*, *Linaria genistifolia*, entre otras, en los cuales no solo se descarta su genotoxicidad sino que también se menciona los efectos anticancerígeno y antioxidantes de algunas de ellas, propiedades de gran importancia para uso medicinal, investigación y búsqueda de nuevos modelos de estructuras químicas con actividad anticancerígenas y antioxidante (Escobar, F. et.al. 2011; Falcão, D. et.al. 2009; Vishnoi, S., & Agarwal, R.; Deb, D. et.al. 2008).

Tanto el extracto de *B. procumbens* como el MMS fueron resuspendidos en SSF, debido a sus características hidrosolubles. Por esta razón se decidió utilizar SSF como control negativo, además que su administración no modifica los valores normales de MN y/o EPC, motivos que lo hacen un buen control negativo de acuerdo a los lineamientos establecidos por la OCDE para esta técnica (OCDE, 2014).

En estudios realizados por Hernández, B. en 2012 y García, G. en 2014 se muestra que la relación de EPCMN/EPC en ratones de la cepa CD1 tratados con SSF va de 0 a 2.4 y 0 a 1.7, respectivamente, valores que concuerdan con los resultados obtenidos para el lote tratado con SSF (gráfica 1 y tabla 2).

Por otro lado, el control positivo utilizado fue el MMS, su uso para la técnica de micronúcleos *in vivo* es recomendado por la OCDE debido a su comportamiento

clastogénico, por esta razón, su costo y facilidad de adquisición frente a otros mutágenos fue el de elección en este estudio.

El MMS es un agente alquilante que genera daño al DNA por la metilación de los nitrógenos de las bases (vía SN 2) formando en mayor proporción 7-metilguanina; un aducto incapaz de bloquear la síntesis de DNA, sin embargo, la inestabilidad del enlace glicosil puede provocar sitios apurínicos. Otra metilación formada es 3-metiladenina (3MeA) y un pequeño porcentaje de O6-metilguanina y O4-metilimidina; las dos últimas lesiones provocan transiciones en las bases nitrogenadas causando un desapareamiento del DNA, mientras que 3MeA bloquea la replicación y genera la acumulación de sitios apurínicos debido a su reparación por la vía NER (Hryciw T. et al, 2002).

La capacidad clastogénica del MMS es atribuida a los sitios apurínicos (Hryciw T. et al, 2002). Su DL50 en ratones es de 290 mg/Kg, se distribuye rápidamente en todo el cuerpo incluido el sistema nervioso central y se elimina dentro de las primeras 30 horas en orina (34%) y por vía inhalatoria (27%) (Pubchem. 2004).

Como se observa en la gráfica 1 y tabla 2 a la dosis de 40mg/Kg de MMS no se obtiene una inducción de MN significativa, por lo cual se aumentó la dosis a 100 mg/ Kg donde se obtuvo un incremento desde las 24 hrs (6.54 EPCMN) y a las 48 hrs alcanza la máxima inducción de MN (8.84 EPCMN), siendo ambos tiempos estadísticamente significativos con el lote del control negativo y los grupos experimentales, indicando su actividad genotóxica.

Los estudios realizados por Leandro, L. y colaboradores en 2013 muestran que al administrar MMS a 40mg/kg se induce un máximo de 52 EPCMN, por otro lado Vrzoc, M. y Petras, M. en 1997 reportan que a 100mg/kg de MMS se obtienen un pico máximo de 42 EPCMN; en ambos estudios se contó un total de 2000 EPC y se puede apreciar que el incremento se da a las 48 hrs, tiempo de muestreo que concuerda con la máxima inducción de MN en este ensayo; sin embargo, como se puede observar en el apartado anterior los resultados de la frecuencia de MN no concuerdan con los obtenidos en este estudio, estas diferencias pueden ser

atribuibles a las diferentes cepas de roedores utilizadas en cada estudio y a las condiciones bajo las cuales se mantuvieron los animales de experimentación.

A la dosis de 100 mg/Kg de MMS se obtiene una buena inducción de EPCMN, siendo a esta dosis un buen agente genotóxico para el ensayo de micronúcleos *in vivo* de acuerdo a los lineamientos de la OCDE. Los mutágenos comúnmente utilizados para esta técnica en el laboratorio L-521 de citogenética toxicológica de la FESC- C1 son la lfosfamida (IF) y la Mitomicina C (MMC).

Los resultados de la genotoxicidad de estos compuestos son reportados por Hernández, C. en 2012, para la mitomicina C (60 mg/Kg), donde se menciona que a las 48 horas se induce su máxima frecuencia de EPCMN/2000EPC en un promedio de 20.8, después de este tiempo se da un decremento que persiste después de las 72 horas. Por otro lado, Hernández, B. en 2012 reporta que la lfosfamida induce su máxima genotoxicidad a las 48 horas, encontrando alrededor de 8.25 EPCMN/1000EPC. Comparando los resultados obtenidos con los mutágenos anteriores en la cepa CD1 se puede apreciar que la capacidad clastogénica del MMS es menor que la inducida con MMC e IF; sin embargo, su costo y facilidad de adquisición siguen representando una ventaja contra estos otros agentes genotóxicos.

En cuanto a la citotoxicidad se puede apreciar (en la gráfica 2 y tabla 3) que el control negativo tiene un intervalo que va de 30.9 a 52.28 EPC, comparando la relación de EPC/ ENC con los grupos experimentales, se puede observar que para las 3 dosis utilizadas (50, 100 y 200 mg/Kg) se aumenta ligeramente esta relación; sin embargo, estos aumentos son significativos solo a la dosis de 200 mg/ Kg a las 24 hrs con los controles positivo y negativo de las 72 hrs, lo cual nos indica que el extracto acuotánico de *B. procumbens* no es citotóxico a estas dosis y por esta técnica, contrario a esto muestran un aumento en la relación de EPC/ ENC dependiente de la dosis y el tiempo.

Los resultados del estudio citotóxico se relacionan con lo reportado en la medicina tradicional mexicana, pues en Veracruz se bebe el cocimiento de toda la planta

como tratamiento para la anemia (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009); sin embargo, esta propiedad carece de estudios científicos que la validen.

Comparando la fitoquímica de *B. procumbens* con plantas en las cuales ha sido comprobado su actividad anti-anémica, se destaca la presencia de flavonoides, saponinas y taninos (Hidalgo, O. 2010), metabolitos que pueden estar asociados a este efecto de manera independiente o en conjunto, ya que en estudios realizados por Abere, T. y colaboradores en 2015, se atribuye el efecto antipolimerizante para combatir la anemia falciforme del extracto de *Scoparia dulcis* a las saponinas y flavonoides. Por otro lado, Ekpenyong, C. y colaboradores en 2015 mencionan que los taninos, saponinas, alcaloides y flovonoides presentes en *Cymbopogon citratus* tienen la capacidad de aumentar significativamente los niveles de hematocrito, hemoglobina y eritrocitos en voluntarios humanos (Ekpenyong, C., Daniel, N., & Antai, A. B. 2015; Abere, T., Okoye, C., Agoreyo, F., Eze, G., Jesuorobo, R., Egharevba, C., & Aimator, P. 2015).

En cuanto a la citotoxicidad de los controles utilizados, en la gráfica 2 y tabla 3 se puede apreciar que el control negativo se mantuvo de 30.8 a 52.28, valores similares a los reportados por Carvente, M. en 2014 y Hernández, B. en 2012, en los cuales se ocupa como control negativo SSF vía intraperitoneal en la cepa CD1 y se obtiene de 31.1 a 74.0 y 43.4 a 66.4 EPC, respectivamente. En cuanto al control positivo a la dosis de 40 y 100 mg/ Kg no se obtiene citotoxicidad, pues, aunque se induce una leve disminución en la relación de EPC/ ENC, no es estadísticamente significativa al compararla con el control negativo.

En los estudios realizados por Munari, C. y colaboradores en 2014 se obtiene un porcentaje de 0.09+/- 0.03 EPC/ENC, valores similares a los del control negativo (0.09+/-0.04). Además, Angeloni, M. y colaboradores en 2011 obtuvieron 231.8+/- 7.73 EPC/ ENC para el lote tratado con 40mg/Kg de MMS y 230.6+/- 4.51 ECPC/ENC en el lote del control negativo. Estos estudios indican que el MMS induce una citotoxicidad baja, lo cual coincide con los resultados encontrados en

este estudio y representan una ventaja puesto que nos permiten realizar de manera sencilla el conteo de EPCMN, EPC y ENC.

El resultado de este ensayo pone de manifiesto que el extracto acuoetanólico de *B. procumbens* no es genotóxico ni citotóxico a la dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg por la técnica de micronúcleos *in vivo*; sin embargo, es de vital importancia realizar pruebas adicionales que evalúen otros tipos de daño al DNA para su posterior uso y comercialización, así como estudios que permitan validar o descartar sus demás propiedades medicinales reportadas en la medicina tradicional.

9. CONCLUSIONES

El extracto de *B. procumbens* no aumentó la frecuencia de EPCMN en un estudio agudo de la técnica de micronúcleos *in vivo* a dosis de 50, 100 y 200 mg/ Kg en ratones de la cepa CD1, lo que nos indica que, a dichas concentraciones, condiciones y por esta técnica no es genotóxico.

La relación de EPC/ ENC a la dosis de 50 y 100 mg/Kg no mostró diferencias significativas con el control negativo, por otro lado, se obtuvo un aumento en la relación EPC/ ENC a dosis de 200 mg/ Kg, lo cual nos indica que el extracto de *B. procumbens* no es citotóxico a estas concentraciones por la técnica de micronúcleos *in vivo* en ratones de la cepa CD1.

En cuanto al control positivo (MMS) se observa una buena inducción genotóxica a 100 mg/Kg; sin embargo, la citotoxicidad inducida por este compuesto es baja a esta dosis. Esto nos indica que es buen agente genotóxico de acuerdo a los lineamientos de la OCDE para el ensayo de micronúcleos *in vivo*.

10. REFERENCIAS

1. Abere, T., Okoye, C., Agoreyo, F., Eze, G., Jesuorobo, R., Egharevba, C., & Aimator, P. (2015). "Antisickling and toxicological evaluation of the leaves of *Scoparia dulcis* linn (*Scrophulariaceae*)". *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 1-7
2. Angeloni, M. (2010). "Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico de *melissa officinalis*". (tesis de maestría en ciencias). UNESC. Brasil.
3. Bermúdez, A., Olivera, M. & Velázquez, D. (2005). "La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales". *Interciencia*, 30(8), 453-459.
4. Biblioteca Digital de Medicina Tradicional Mexicana. (2009). "*Bacopa procumbens*". México. BDMTM. Consultado el 07 de junio del 2016. Recuperado de: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&i d=7972>.
5. Branda, R., Oneill, J., Brooks, E., Powden, C., Naud, S., & Nicklas, J. (2007). "The effect of dietary folic acid deficiency on the cytotoxic and mutagenic responses to methyl methanesulfonate in wild-type and in 3-methyladenine dna glycosylase-deficient aag null mice". *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 615(1), 12-17.
6. Carvente, M. (2014). "Efecto de los antioxidantes del té verde (extracto de Polifenoles [p60], Catequinas y Kaemferol) sobre la inducción de micronucleos y de apoptosis en ratones tratados con Cr (VII)". (tesis de licenciatura en Biología). UNAM. México, D.F.
7. Cedeño, C. (2010). "Diseño de libro virtual para la difusión de la herbolaria mexicana". (tesis de licenciatura en Diseño y Comunicación Visual). UNAM. México.
8. Cortez, V., Macedo, J., Hernández, M., Arteaga, G., Espinoza, D. & Rodríguez J. (2004). "Farmacognosia: Breve historia de sus orígenes y su

- relación con las ciencias médicas”. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15(2), 123-136.
9. Costea, M. & García, I. (2013). “Phytoimages: plantaginaceae *Bacopa procumbens*”. Estados Unidos de América. *Phytoimages*. Consultado el 07 de Junio del 2016. recuperado de: http://www.phytoimages.siu.edu/imgs/cusman1/r/plantaginaceae_bacopa_procumbens_79072.html
 10. Deb, D., Kapoor, P., Dighe, R., Padmaja, R., Anand, M., D'SOUZA, P., & Agarwal, A. (2008). “*In vitro* safety evaluation and anticlastogenic effect of BacoMind™ on human lymphocytes”. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21(1), 7-23.
 11. Domínguez, M. (2005). “Actividad genotóxica del ácido 6-nonadecil salicílico aislado de la corteza de Cuachalalate y de su ester metílico evaluada en sangre periférica de ratones CD1 con la prueba de micronúcleos”. (tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo). UNAM. Estado de México.
 12. Ekpenyong, C., Daniel, N., & Antai, A. (2015). “Bioactive natural constituents from lemon grass tea and erythropoiesis boosting effects: potential use in prevention and treatment of anemia”. *Journal of Medicinal Food*, 18(1), 118-127.
 13. Escobar, F., Sabini, M., Zanon, s., Cariddi, L., Tonn, C., & Sabini, L. (2011). “Genotoxic evaluation of a methanolic extract of *Verbascum thapsus* using micronucleus test in mouse bone marrow”. *Natural Product Communications*, 6(7), 989-991.
 14. Falcão, D., Costa, E., Kuster, R., Nielloud, F., Vian, L., & Menezes, F. (2007). “Evaluation of cytotoxicity, phototoxicity and genotoxicity from *Calceolaria chelidonioides* (scrophulariaceae) flowers ethanol extract”. *Planta Medica*, 73(09), p_477.
 15. Fenech, M., Chang, W., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003). “Humn project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human

- lymphocyte cultures". *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1), 65-75.
16. Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, a., Surralles, J., Crott, J., Parry, J., & Thomas, P. (2011). "Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells". *Mutagenesis*, 26(1), 125-132.
17. Food and Drug Administration. (2013). "Mammalian erythrocyte micronucleus test" . Estados Unidos de América. FDA. Consultado el 07 de Juni de 2016. Recuperado en: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm078338.htm>
18. García, G. (2014). "Estudio del efecto del sulfato de talio sobre la frecuencia de micronúcleos y de la inducción de apoptosis en células de sangre periférica de ratones de la cepa CD1". (tesis de licenciatura de biología). UNAM, México.
19. Gómez, A. (2012). "Determinación de DL50 y evaluación de la toxicidad mediante la prueba de micronúcleos de los compuestos monotiomorfolínicos LQM318, 339 y los compuestos monopiperidínicos LQM336, 334". UNAM. México.
20. Gómez, P. (2015). Evaluación de la capacidad genotóxica y oxidativa de la Venlafaxina en ratón. *Emaze*, 21(4), 1-4.

21. Gopala, K. & Makoto, H. (2000). "In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation". *Mutation Research* 455; pp 155–166.
22. Hayashi, M., James T. MacGregor, G., Gatehouse, I., Blakey, D., Dertinger, G., K., Morita, Russo, A. & Shizuyo, S. (2000). "In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay II. some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring". *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: pp 234-252.
23. Heike, V. (2009). "Malezas de México". México. Conabio. Consultado el 7 de Juni de 2016. Recuperado de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/scrophulariaceae/bacopa-procumbens/fichas/ficha.htm>
24. Hernández, B. (2012). "Evaluación antigenotóxica del compuesto LQM 335 mediante el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratones CD1. (tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo). UNAM. México.
25. Hernández, C. (2012). "Evaluación del efecto genotóxico y citotóxico del compuesto coordinado de cobre LQM402 mediante el ensayo de micronúcleos in vivo". (tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo). UNAM. México.
26. Hernández, L. (2015). "Efecto de las vitaminas C (ácido ascórbico) y (α -tocoferol) sobre la inducción de micronúcleos y de apoptosis en ratones CD1 tratados con pentóxido de Vanadio". (tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo). UNAM. México.
27. Hidalgo, O. (2010). "Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuotánico de la planta *Bacopa procumbens* en la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón". (tesis de maestría de ciencias en Biomedicina Molecular). IPN. México.
28. Hryciw, T., Tang, M., Fontanie, T., & Xiao, W. (2002). "MMS1 protects against replication-dependent DNA damage in *saccharomyces cerevisiae*". *Springer*, 266(5), 266-848.

-
29. Hughey, M. (2011). "Eol: baby jump-up". Estados Unidos de América. EOL. Consultado el 07 de junio del 2016. Recuperado de: <http://eol.org/pages/482860/overview>
30. Hun, S., Young, J., Kown, J. & Rok, Y. (2013). "Recent avances *in vivo* genotoxicity testing: predicción of carcinogenic potencial using and micronúcleos assay in animal models". *Journal of Cancer Prevention*, 18 (4), 277-288.
31. INEGI. (2010). "Sistema de cuentas nacionales de México cuenta satélite del sector salud de México, 2008-2011". México. INEGI. Consultado el 07 de junio del 2016. Recuperado de: http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/cn/salud/doc/csssm_08_1_1_b2008.pdf
32. IPNI. (2005). "Scrophulariaceae *Bacopa procumbens* (mill.) Greenm". Estados Unidos de América. IPNI. Consultado el 7 de Junio de 2016. Recuperado de: http://www.ipni.org/ipni/idplantnameSearch.do;jsessionid=c00c7af259252a30073c777910f44b4a?id=28352-2&back_page=&show_history=true
33. Joshua, J., Damodaran, A., Deshmukh, N., Goudar, K. & Amit, A. (2007). Safety evaluation of a standardized phytochemical composition extracted from *Bacopa monnieri* in Sprague–Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*. 45(1), 1928-1937.
34. Kirsch-Volders M., Decordier I., Elhajouji A., Plas G., Aardema M. & Fenech M. (2011). "*In vitro* genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models". *Mutagénesis*, 26(1), 177-184
35. Langeswaran, K., Jagadeesan, A., Vijayaprakash, S. & Balasubramanian, M. (2012). "Hepatoprotective and antioxidant activity of *Scoparias dulcis* Linn, against N- Nitrosodiethylamine (DEN) induced Hepatotoxicity in experimental Rats". *International Journal of Drug Development & Research*. 4 (1), 292-303

- http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do;jsessionid=C00C7AF259252A30073C777910F44B4A?id=28352-2&back_page=&show_history=true
36. Leandro, L., Munari, C., Sato, V., Alves, J., De Oliveira, P., Mastrocola, D., & Cunha, W. (2013). "Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and swiss mice by the micronucleus and comet assays". *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 753(2), 101-106
 37. Lopez, M., Portmann, E., Gurni, A. & Carballo, M. (2009). "Biomarcadores para evaluación de genotoxicidad potencial". *Boletín ILtinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (2), 154-159.
 38. Mannan, A., Abir, A., & Rahman, R. (2015). "Antidepressant-like effects of methanolic extract of *Bacopa monniera* in mice". *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1.
 39. Martínez, M. (2009). "Evaluación del daño genotóxico en personas ocupacionalmente expuestas a plaguicidas en las grullas, municipio de Ahome, Sinaloa". (Tesis de doctorado en ciencias). UNAM. México.
 40. Mavournin, K., David H., Michael C., Michael F. & John A. (1990). "The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program". *Mutation Research*. 239(1), 29-80.
 41. Molina, J. (2013). "Aplicación etnomédica de *Mecardonia procumbens* (mill.) *small*". en san miguel regla, huasca de ocampo, hidalgo. *Revista de Investigación del CICS-UST*, 5 (3), 1-9.
 42. Moreno, J., Bazaldúa, S., Villarreal, M., Bonilla, J., Mendoza, S., & Rodríguez, V. (2011). "Cytotoxic and antioxidant activities of selected lamiales species from Mexico". *Pharmaceutical Biology*, 49(12), 1243-1248.
 43. Munari, C., De Oliveira, P., Leandro, L., Pimenta, L., Ferreira, N., Da Costa, J. & Tavares, D. (2014). "*In vivo* assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of *Solanum lycocarpum* fruits glycoalkaloidic extract". *PLOS ONE*, 9(11), e111999.

44. OECD. (2014). "guideline for the testing of chemicals: mammalian erythrocyte micronucleus test (1997)". Consultado el 07-06-2016. disponible en www.oecd.org revisado.
45. OMS. (2004). "Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Ginebra. OMS. Consultado el 7 de Junio de 2016. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
46. Paniagua, L. (2013). "Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto polifenólico derivado del cape (éster fenetílico del ácido cafeíco) mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel *in vitro*". (tesis de licenciatura en Química Farmacéutico Biólogo). UNAM. México.
47. Pathak, S., Kulshreshtha, D. & Maurya, R. (2005). "Chemical constituents of bacopa procumbens". *Natural Product rResearch*, 19 (2), 131-136.
48. Pérez, R. (2010). "Definición de medicina tradicional: OMS". Ginebra. OMS. Consultado el: 07 de Junio de 2016. recuperado de: <http://nutriciencia.altervista.org/who-monograph.html>
49. Prieto, S., Garrido, G., González, J., & Molina, J. (2004). "Actualidad de la medicina tradicional herbolaria". *Revista CENIC: Ciencias Biológicas*, 35(1), 19-36.
50. PubChem. (2004). National Center for Biotechnology Information. Compound Database; CID=4156. Estados Unidos de América. PubChem. Consultado el 08-06-2016. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4156>.
51. Ramos, J. (2016). "Efecto de los flavonoides de *Camellia sinensis* (miricetina, quercetina y rutina) sobre la inducción de micronúcleos y apoptosis en ratones tratados con trióxido de cromo". (tesis de licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo). México, D.F.
52. Rehni, A., Pantlya, H., Shri, R., & Singh, M. (2007). "Effect of chlorophyll and aqueous extracts of *Bacopa monniera* and *Valeriana wallichii* on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury in mice". *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(9), 764.

-
53. Rocha, E. (2008). "Estudio genotóxico mediante la prueba de micronúcleos del compuesto tiomorfolínico LQM319". (tesis licenciatura en químico farmacéutico biólogo). UNAM. México.
54. Sánchez, A., Fonseca, G. Capiro, N. & Fernández, D. (2000). "Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en cuba". Revista cubana de farmacia, 34, 34-43. Consultado el 17-06-2016. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0034-75152000000100005&lng=es&tlng=pt.
55. Schlaepfer, L., & Mendoza, J. (2010). "Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México". Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 41(4), 18-27.
56. Serrano, G. (2011). "Evaluación de los efectos del ácido ascórbico, del α -tocoferol y de los β -carotenos sobre las frecuencias de micronúcleos inducidas por el trióxido de cromo en ratones hembra de la cepa CD1. (tesis de licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo). UNAM, México.
57. Shilki, V. & Agarwal, R. (2013). "Evaluation of genetic potential of *Bacopa monnieri* extract in Mouse bone marrow cells by chromosomal analysis test". Journal of Entomology and Zoology Studies. 1(3), 52-56.
58. Sireeratawong, S., Jaijoy, K., Khonsung, P., Lertprasertsuk, N., & Ingkaninan, K. (2016). "Acute and chronic toxicities of bacopa monnieri extract in Sprague-dawley rats". BMC Complementary and Alternative medicine, 16(1), 249.
59. Small, J. (2010). "*Mercadonia procumbens*". Estados Unidos de América. ATRP. Consultado el 07 de junio del 2016. recuperado de: http://keys.trin.org.au/key-server/data/0e0f0504-0103-430d-8004-060d07080d04/media/html/taxon/mecardonia_procumbens.htm
60. Sun, J., Armstrong, M., & Galloway, S. (1999). "Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure". Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 439(1), 121-126.

61. Torres, O., Zabala, M., Mava, A., Flores, A. & Ramos, M. (2014). "Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells". Estados Unidos de América. NCBI. Consultado el 07-06-2016. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778463>
62. Tropicos. (2016). "Flora de nicaragua, *Bacopa procumbens*". Nicaragua. Flor de Nicaragua. Consultado el 07 de Junio 2016. Recuperado de: <http://www.tropicos.org/name/29201877?projectid=7>
63. Tweats, D., Blakey, R., Heflich, A., Jacobs, S., Jacobsen, T., Morita, T. Nohmi, M., O'donovan, Y., Sasaki, T., Sofuni R. (2007). "Report of the working group on strategy interpretation for regulatory *in vivo* tests identification of *in vivo*-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test". Mutation Research. 627(1): pp 92–105.
64. Vijayan, V., & Helen, A. (2007). "Protective activity of bacopa monniera linn. on nicotine-induced toxicity in mice". Phytotherapy Research, 21(4), 378-381.
65. Vishnoi, S., & Agarwal, R. (2008). "Evaluation of genetic potential of bacopa monnieri extract in mouse bone marrow cells by chromosomal analysis test". Biomedical and Environmental Sciences, 21(1), 7-23.
66. Vrzoc, M., & Petras, M. L. (1997). "Comparison of alkaline single cell gel (comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting dna damage caused by direct and indirect acting mutagens". Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 381(1), 31-40.
67. Yakandawala, D. & Yakandawala, K. (2007). "*Mecardonia procumbens* (mill) small, an addition to the sri lankan scrophulariaceae juss.ceylon". Journal of Science (Biological Sciences), 36 (1), 61-64.
68. Zaizuhana, S., Puteri, J., Noor, M. Baharuddin, N., Hussin-muhammad, A. Bakar, Zakiah Ismail (2006). "The *in vivo* rodent micronucleus assay of *Kacip fatimah* (*Labisia pumila*) extract. Tropical". Biomedicine 23(2). 214–219.

69. Zalacain, M., Sierrasesúmaga, A. & Patiño (2005). "El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos". *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 28 (2). 227-236.
70. Zuñiga, G. & Gómez, Belinda. (2006). "La prueba de micronúcleos". *la ciencia y hombre. revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana*. México. La ciencia el Hombre. Micronúcleos. Consultado el: 08 de Junio de 2016. Recuperado de: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol19num1/articulos/micronucleos/index.htm>