



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**Evaluación de la genotoxicidad de
Astragalus membranaceus mediante
el ensayo de micronúcleos in vivo
en ratones CD1 en un estudio
agudo y subcrónico**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTAN

BRUGADA HERNÁNDEZ ALEJANDRA
ORTIZ MEDINA ANA ARELY

ASESORA:

M. EN C. MARITERE DOMINGUEZ ROJAS

CUAUTITLAN 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.



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 CUAUTITLÁN
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 de la genotoxicidad de Astragalus membranaceus mediante el ensayo de micronúcleos in vivo en ratones CD1 en un estudio agudo y subcrónico.

Que presenta la pasante: Alejandra Brugada Hernández
Con número de cuenta: 309102227 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 31 de Agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|--|-------|
| PRESIDENTE | Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo | |
| VOCAL | Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez | |
| SECRETARIO | M. en C. Maritere Domínguez Rojas | |
| 1er. SUPLENTE | Dra. Dolores Molina Jasso | |
| 2do. SUPLENTE | L.B.D. Rosa María de los Angeles López Cabrera | |

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

LMCF/cga*



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 CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR 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 de la genotoxicidad de *Astragalus membranaceus* mediante el ensayo de micronúcleos in vivo en ratones CD1 en un estudio agudo y subcrónico.

Que presenta la pasante: Ana Arely Ortiz Medina

Con número de cuenta: 309258496 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 31 de Agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|--|-------|
| PRESIDENTE | Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo | |
| VOCAL | Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez | |
| SECRETARIO | M. en C. Maritere Domínguez Rojas | |
| 1er. SUPLENTE | Dra. Dolores Molina Jasso | |
| 2do. SUPLENTE | L.B.D. Rosa María de los Angeles López Cabrera | |

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

LMCF/cga*

AGRADECIMIENTOS

Alejandra Brugada Hernández

A Dios por haberme permitido llegar a este momento.

A mí querida UNAM por recibirme desde el bachillerato y brindarme momentos inolvidables, una carrera, título, trabajo, prestigio y a mis mejores amigos.

A mis padres y hermanos por apoyarme en todo momento, por darme los mejores consejos y por conducirme hasta este camino.

A la M. en C. Maritere Domínguez Rojas por la confianza, sabiduría y la paciencia que me brindo en este trabajo.

A mi compañera y amiga de este proyecto, Ana Arely gracias por estos buenos años, por tu amistad, por compartir tantas desveladas y aventuras.

A mí jurado por la paciencia, asesoría, e interés que mostraron en este trabajo.

A las personas que estuvieron conmigo en la realización de este proyecto en el L-521, en especial al Sr. Pablo, gracias por el apoyo y las buenas pláticas.

A mis amigos de la Universidad Joaquín, Mariela, Claudia y Naranjo por su amistad incondicional, por ser la mejor compañía y el mejor equipo durante estos años.

A mí querido amigo Jozabad Soto, por tu amistad y por la enorme contribución en este trabajo.

A Horacio Nieves porque desde que te conocí no has hecho otra cosa más que apoyarme e impulsarme a conseguir lo que deseo, eres el mejor.

Ana Arely Ortiz Medina

A la UNAM por abrirme las puertas para emprender el camino que me haría llegar hasta el día de hoy.

A mis padres por ayudarme y brindarme su amor y apoyo incondicional sean cual sean mis decisiones, al igual que mis hermanas y cuñados.

A la M en C. Maritere Domínguez Rojas que me brindó la oportunidad de realizar el presente trabajo y apoyarme en el camino.

A Alejandra Brugada una gran amiga, nos hemos apoyado para salir adelante y terminar esto de la mejor manera.

A Alexander Casillas gracias, mil gracias, porque a pesar de las circunstancias y de lo que hemos pasado siempre has tratado de apoyarme de una u otra manera, me has animado a seguir y conseguir lo que quiero, por eso y otras cosas, siempre serás una persona importante para mí pase lo que pase.

A mis profesores y compañeros del L-521 por bríndame su conocimiento y al señor Pablo por hacerme el trabajo más ligero.

A mis amigos Josiff, Laura, Joaquín, Daniela, Lupita y Cyn gracias por su amistad, tiempo, apoyo, risas, chistes, canciones y demás que han hecho de este trayecto de vida algo divertido y ameno.

DEDICATORIAS

Alejandra Brugada Hernández

A mis padres Jaime Brugada Velázquez y Francisca Hernández Gasga, jamás encontraré las palabras adecuadas para agradecer todo lo que han hecho por mí, gracias por ser el principal ejemplo a seguir, por darme apoyo incondicional, consejos, sabiduría, por ser mi guía y el pilar más impórtate de la persona que soy ahora.

A mis hermanas Gabriela y Karina por ser mis amigas, confidentes, compañeras de aventuras, por apoyar mi decisiones y por ser las mejores madres.

A mis hermanos Daniel y Jaime por enseñarme y apoyarme siempre, por estar cuando los necesito y por acompañarme hasta este momento.

A mis niños, Leonardo, Scarlett, Dylan y Daniella por llenar mi vida de alegría, amor, emoción, por ser lo más hermoso que puedo tener.

Ana Arely Ortiz Medina

Para mi padre Aristeo Ortiz que me enseñó que las mujeres valemos demasiado y podemos conseguir nuestros sueños y no solo estar en casa, también que las cosas que más valoramos es por lo que más trabajamos y que siempre tenemos que hacer nuestro mejor esfuerzo no importa a que nos dediquemos.

A mi madre Antonia Medina ya que me brinda todo su apoyo y amor incondicional, que a pesar de que mi padre ya no está, ha luchado mucho para que yo siguiera en este gran camino, además de que siempre tiene las palabras exactas para seguir luchando por lo que quiero.

A mis hermanas: Adaena, me has enseñado a nunca rendirme y a dar lo mejor de mí; Ariadna, que a pesar de las circunstancias siempre podemos salir adelante y Adriana, contigo he aprendido a ser fuerte.

Ixchel este logro es principalmente para ti, eres lo mejor que me ha pasado, por lo que me esfuerzo para ser la mejor, me haces muy feliz, eres tan linda que con tu sonrisa y tus gestos borras cualquier enojo y tristeza que tengamos en el corazón. Hija tienes la sonrisa de un ángel y los gestos de la muñeca más hermosa, ojala que cuando crezcas esos gestos y esa sonrisa nunca las pierdas, ni aun cuando tengas alguna tristeza, sonríe hija mía, porque las sonrisas mueven al mundo.

A mis sobrinos Natalia y Mateo que me llenan de amor y alegría.

La fase experimental del presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética L-521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, bajo la dirección de la M. en C. Maritere Domínguez Rojas.

Las ampollitas de *Astragalus membranaceus*, que son objeto de este trabajo, y el material utilizado fueron proporcionados por el Dr. Guillermo Pérez Ishiwara de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Abreviaturas..... | 1 |
| Índice de figuras..... | 2 |
| Índice de tablas..... | 3 |
| Índice de gráficas..... | 4 |
| Resumen..... | 6 |
| I. Introducción | |
| 1. Medicina Tradicional y Complementaria (MTC)..... | 8 |
| 2. Medicina Tradicional China..... | 8 |
| 2.1 Fitoterapia..... | 13 |
| 2.2 Fitoterapia china..... | 13 |
| 3. <i>Astragalus membranaceus</i> | 14 |
| 3.1 Componentes principales de <i>Astragalus membranaceus</i> | 15 |
| 3.2 Usos medicinales de <i>Astragalus membranaceus</i> | 16 |
| 3.3 Evaluación toxicológica de <i>Astragalus membranaceus</i> | 17 |
| 4. Metil metano sulfonato..... | 18 |
| 4.1 Propiedades farmacológicas..... | 18 |
| 4.2 Mecanismo de acción..... | 18 |
| 5. Genotoxicidad..... | 19 |
| 5.1 Pruebas de genotoxicidad..... | 19 |
| 5.2 Importancia de la evaluación genotóxica..... | 20 |
| 6. Micronúcleos..... | 20 |
| 6.1 Ensayo de micronúcleos..... | 21 |
| 6.2 Criterios para la identificación de micronúcleos..... | 21 |
| 6.3 Técnica de micronúcleos en sangre periférica..... | 22 |
| 7. Citotoxicidad..... | 22 |
| 8. Estudio agudo..... | 23 |
| 9. Estudio subcrónico..... | 24 |
| II. Justificación..... | 25 |
| III. Hipótesis..... | 25 |
| IV. Objetivos..... | 25 |
| V. Diagrama de flujo..... | 26 |
| VI. Material y métodos..... | 27 |
| VII. Resultados..... | 30 |
| VIII. Discusión..... | 57 |
| IX. Conclusiones..... | 61 |
| X. Glosario..... | 62 |
| XI. Referencias..... | 64 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| AC | Alteraciones Cromosómicas |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| BrdU | 5-bromodeoxi-uridina |
| C-myc | Gen |
| DL50 | Dosis letal 50 |
| DSB | Rupturas de doble cadena |
| ENC | Eritrocitos normocrómicos |
| EPC | Eritrocitos policromáticos |
| EPCMN | Eritrocitos policromáticos micronucleados |
| HR | Recombinación Homóloga |
| ICH | Intercambio de Cromátides Hermanas |
| I.D | Intestino delgado |
| I.G | Intestino grueso |
| MMS | Metilmetanosulfonato |
| MN | Micronúcleos |
| MTC | Medicina Tradicional y Complementaria |
| MTCh | Medicina Tradicional China |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| p-27 | Proteína inhibidora de cinasa |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Clasificación del cuerpo humano y la naturaleza con respecto a los cinco elementos..... | 9 |
| Figura 2. Relaciones de intergeneración, interdominancia y contradominancia entre los 5 elementos: Madera, Fuego, Tierra, Metal y Agua..... | 10 |
| Figura 3. Canales principales Jing Mai..... | 11 |
| Figura 4. Astragalus membranaceus..... | 14 |
| Figura 5. Raíz de Astragalus membranaceus..... | 14 |
| Figura 6: Estructura de metil metanosulfonato..... | 18 |
| Figura. 7. Mecanismo de formación de micronúcleos..... | 21 |
| Figura 8. Formación de micronúcleos..... | 24 |
| Figura 9. Microfotografía de micronúcleo presente en EPC..... | 56 |
| Figura 10. Microfotografía de micronúcleo en frotis sanguíneo de sangre periférica de ratón CD1..... | 56 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Distribución de lotes para <i>Astragalus membranaceus</i>..... | 27 |
| Tabla 2. Distribución de lotes para controles..... | 28 |
| Tabla 3. Frecuencia de EPC/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1, de los tratamientos a distintos tiempos. Lote A de <i>A. membranaceus</i>, estudio agudo | 30 |
| Tabla 4. Frecuencia de EPCMN/1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1, de los tratamientos a distintos tiempos. Lote A de <i>A. membranaceus</i>, estudio agudo | 32 |
| Tabla 5. Frecuencia de EPC/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1, de los diferentes tratamientos a distintos tiempos. Lote B de <i>A. membranaceus</i>, ensayo agudo | 34 |
| Tabla 6. Frecuencia de EPCMN/1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1, de los tratamientos a distintos tiempos. Lote B de <i>A. membranaceus</i>, estudio agudo..... | 36 |
| Tabla 7. Frecuencia de EPC/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1 en diferentes tiempos y tratamientos. Lote A de <i>A. membranaceus</i>, estudio subcrónico | 43 |
| Tabla 8. Frecuencia de EPCMN/1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1 en diferentes tiempos y tratamientos. Lote A de <i>A. membranaceus</i>, estudio subcrónico. | 45 |
| Tabla 9. Frecuencia de EPC/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Lote B de <i>A. membranaceus</i>, estudio subcrónico | 47 |
| Tabla 10. Frecuencia de EPCMN/1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1, en diferentes tiempos y tratamientos. Lote B de <i>A. membranaceus</i>, estudio subcrónico..... | 49 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| Gráfica 1. Frecuencia de EPC/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Lote A de <i>A. membranaceus</i> , ensayo agudo | 31 |
| Gráfica 2. Frecuencia de EPCMN/ 1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Lote A de <i>A. membranaceus</i> estudio agudo..... | 33 |
| Gráfica 3. Frecuencia de EPC/ 1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Lote B de <i>A. membranaceus</i> , estudio agudo | 35 |
| Gráfica 4. Frecuencia EPC/ 1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Lote B de <i>A. membranaceus</i> , estudio agudo..... | 37 |
| Gráfica 5. Comparación de la frecuencia EPC/ 1000 ENC de los lotes A y B de <i>A. membranaceus</i> a las diferentes tiempos y tratamientos. Ensayo agudo | 37 |
| Gráfica 6. Comparación de frecuencias EPCMN/EPC de los lotes A y B de <i>A. membranaceus</i> a los diferentes tiempos y tratamientos. Estudio agudo | 38 |
| Gráfica 7. Frecuencia de EPC/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Lote A de <i>A. membranaceus</i> , ensayo subcrónico..... | 38 |
| Gráfica 8. Frecuencia de EPCMN/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Lote A de <i>A. membranaceus</i> , ensayo subcrónico..... | 39 |
| Gráfica 9. Frecuencia de EPC/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Lote B de <i>A. membranaceus</i> , ensayo subcrónico..... | 39 |
| Gráfica 10. Frecuencia de EPCMN/1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Lote B de <i>A. membranaceus</i> , ensayo subcrónico..... | 40 |
| Gráfica 11. Comparación de lotes Frecuencias EPC/ 1000 ENC, a diferentes tiempos y tratamientos de los lotes A y B de <i>A. membranaceus</i> . Estudio subcrónico | 40 |
| Gráfica 12. Comparación de la relación EPCMN/ 1000 EPC, a diferentes tiempos y tratamientos de los lotes A y B de <i>A. membranaceus</i> . Estudio subcrónico..... | 41 |
| Gráfica 13. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de los grupos con tratamiento de 0.02 mL en ambas ampollas. Estudio Agudo | 41 |
| Gráfica 14. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de los grupos tratados a 0.04 mL con ambas ampollas. Estudio Agudo | 42 |
| Gráfica 15. Frecuencia de EPC/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta A A de <i>A. membranaceus</i> , ensayo subcrónico..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| Gráfica 16. Frecuencia de EPCMN/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta A A de <i>A. membranaceus</i>, ensayo subcrónico..... | 46 |
| Gráfica 17. Frecuencia de EPC/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta B de <i>A. membranaceus</i>, ensayo subcrónico..... | 48 |
| Gráfica 18. Frecuencia de EPCMN/1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta B de <i>A. membranaceus</i>, ensayo subcrónico. | 50 |
| Gráfica 19. Comparación de la frecuencia EPC/ 1000 ENC de MMS. Estudio subcrónico. | 51 |
| Gráfica 20. Comparación de la frecuencia EPC / 1000 ENC del grupo control. Estudio subcrónico. | 51 |
| Gráfica 21. Comparación de la frecuencia EPC/ 1000 ENC de los grupos con tratamiento a 0.01mL, de ambas ampollitas. Estudio subcrónico. | 52 |
| Gráfica 22. Comparación de la frecuencia EPC/ 1000 ENC de los grupos tratados a 0.02mL, para ambas ampollitas. Estudio subcrónico. | 52 |
| Gráfica 23. Comparación de la frecuencia de EPC/ 1000 ENC de los grupos tratados con 0.04mL, de ambas ampollitas. Estudio subcrónico. | 53 |
| Gráfica 24. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC del tratamiento con MMS. Estudio subcrónico. | 53 |
| Gráfica 25. Comparación de la frecuencia de EPCMN/ 1000 EPC del grupo control. Estudio Subcrónico. | 54 |
| Gráfica 26. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de los grupos tratados con 0.01ml de ambas ampollitas. | 54 |
| Gráfica 27. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de los grupos tratados a 0.02ml de ambas ampollitas. Estudio subcrónico. | 55 |
| Gráfica 28. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de los grupos con tratamiento de 0.04mL para ambas ampollitas. | 55 |

RESUMEN

Las plantas con propiedades curativas han sido por muchos años parte elemental en la salud de las personas. Se estima que entre el 70 y 80 % de la población que habita en países en desarrollo depende de este recurso terapéutico como alternativa para la cura de sus enfermedades. Esta tendencia ha ido en aumento a nivel global (Domínguez y Cruz, 2014).

La OMS define a 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. Este conocimiento popular está basado en la eficacia, es decir, se acepta y adopta lo que se ve que sirve, lo demás cae en desuso; sin embargo, un problema de la fitoterapia popular es la dificultad de llevar un control sobre la dosis y la calidad del producto, lo cual puede propiciar riesgos y daños a la salud (Schlaepfer, 2010).

El desarrollo de plantas con uso terapéutico ha generado la necesidad de evaluar su potencial tóxico y genotóxico en modelos experimentales. El tipo y diseño de estos estudios estará en dependencia de las características y destino final del producto, pero en la generalidad de los casos, el objetivo debe ser la demostración de las potencialidades tóxicas por administración única (toxicología aguda), administraciones repetidas (subcrónica) y estudios especiales de genotoxicidad, toxicología de la reproducción y la fertilidad, llegando incluso en muchos casos a ser necesario la evaluación de su potencial carcinogénico (Gámez, 2007).

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos, este daño puede ser evaluado por diferentes técnicas citogenéticas y moleculares, entre ellas la prueba de micronúcleos ya que ha sido considerada como una metodología útil para evaluar dicho daño. Éste se basa en la detección y cuantificación de cuerpos citoplasmáticos semejantes al núcleo celular, cuyo origen se deriva de cromosomas, o fragmentos de éstos, que no se integran al núcleo durante la metafase, lo cual puede suceder de manera espontánea o por la acción de agentes genotóxicos.

En México se han establecido clínicas donde se integran la medicina tradicional con la alópata. El 90% de la población mexicana recurre a las plantas medicinales para el tratamiento empírico de varias enfermedades. *Astragalus membranaceus* es una planta medicinal importante utilizada comúnmente en muchas formulaciones a base de hierbas, en la práctica de la medicina tradicional china (MTC) sus raíces así como sus hojas son utilizadas en más de 20 diferentes enfermedades, para tratar una amplia variedad de enfermedades y trastornos corporales. Entre sus aplicaciones clínicas diversificadas, destaca el uso potencial de esta planta y de sus componentes químicos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y el cáncer.

En el presente trabajo de investigación se realizaron estudios citotóxicos y genotóxicos en el que se utilizaron dos ampollas de distintos lotes de producción del extracto de *Astragalus membranaceus*, esto con la finalidad de evaluar y comparar si existe daño genotóxico en un estudio agudo y subcrónico, y comprobar si sus características físicas (color, olor, aspecto) influyen en sus propiedades, mediante la prueba de micronúcleos (MN) empleando como sistema biológico, sangre periférica de ratones de la cepa CD1. En el cual para cuantificar el efecto genotóxico se determinó el número de eritrocitos policromáticos micronucleados

(EPCMN) en 1000 eritrocitos policromáticos por ratón (EPC), para evaluar el efecto citotóxico, se estableció la relación de EPC en 1000 eritrocitos por ratón.

Se administró para el lote A, cuatro concentraciones diferentes 0.01ml, 0.02ml, 0.04ml y 0.06 ml, realizando para cada una, frotis sanguíneos por triplicado a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas para el estudio agudo y concentraciones de 0.01ml, 0.02ml, 0.04ml con lecturas a 0, 48, 120, 192, 264 y 366 horas para el estudio subcrónico durante un periodo de quince días.

Para el lote B, dosis de 0.01ml, 0.02ml 0.04 ml para ambos estudios y con las lecturas correspondientes de cada uno, utilizado un lote control positivo al cual se le administró metil metano sulfonato (MMS) con una concentración de 50mg/kg para el estudio agudo y 30mg/kg para un estudio subcrónico.

El análisis descriptivo se realizó de manera independiente para cada lote y estudio, consistió en identificar las dosis en las que se presenta mayor efecto citotóxico y genotóxico.

Los resultados que muestra el estudio agudo, a las dosis manejadas en administración única vía intraperitoneal, *Astragalus membranaceus* no presenta genotoxicidad y citotoxicidad en ratones CD1.

En cuanto al estudio subcrónico, en las dosis manejadas en administración diaria por 15 días vía intraperitoneal, *Astragalus membranaceus* no presenta genotoxicidad y citotoxicidad en ratones de la misma cepa.

Los parámetros evaluados para el Metil Metano Sulfonato (MMS) se observó en ambos, diferencias estadísticas altamente significativas en relación al control negativo en ambas concentraciones 50 mg/kg para el estudio agudo y 30 mg/kg para un estudio subcrónico, lo que indica que esta sustancia posee un alto índice de citotoxicidad y genotoxicidad.

La importancia de realizar este trabajo radica en el reconocimiento cultural y fitoquímico de la medicina tradicional, que aportará elementos para el aprovechamiento de este recurso. Dadas las condiciones de la cobertura de salud, la medicina tradicional es una alternativa viable que representa al mismo tiempo una herramienta para el equipo de salud y para los usuarios.

I. INTRODUCCIÓN

1.- MEDICINA TRADICIONAL Y COMPLEMENTARIA (MTC)

La medicina tradicional es el 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 la prevención, el diagnóstico, la mejora y el tratamiento de enfermedades físicas y mentales (Organización Mundial de la Salud, 2017).

La Medicina complementaria y/o alternativa es un término que se usa para productos y prácticas médicas que se considera no pertenecen a la atención médica convencional, la medicina alternativa se usa en vez de los tratamientos médicos convencionales, la medicina integrativa combina la medicina convencional con prácticas de la medicina complementaria y alternativa que han sido más prometedoras (Instituto Nacional del Cáncer, 2015)

Este tipo de medicina es utilizada ampliamente en todo el mundo, en febrero de 2013 la directora general de la OMS Dra. Margaret Chan declaró que “las medicinas tradicionales de calidad, seguridad y eficacia comprobada, contribuyen a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud” ya que para muchas personas representa la principal fuente de atención sanitaria y muchas veces la única (Organización Mundial de la Salud, 2013).

La estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023, ayudará a las autoridades sanitarias a encontrar soluciones que propicien una visión más amplia respecto del mejoramiento de la salud y la autonomía de los pacientes; además de impulsar la integración global de dicha práctica en los sistemas de salud. Dicha estrategia tiene dos objetivos principales:

- Prestar apoyo a los Estados Miembros para que aprovechen la posible contribución de la MTC a la salud, el bienestar y la atención de salud centrada en las personas.
- Promover la utilización segura y eficaz de la MTC mediante la reglamentación de productos prácticas y profesionales (OMS, 2013).

2. MEDICINA TRADICIONAL CHINA

La medicina tradicional china es un reflejo de la cultura que la ha originado, se basa en dos grandes corrientes:

- Confucianismo: Originado por Kong Fu Zi y tiene como base que tanto la familia como el cuerpo humano son intocables y sagrados por lo cual el respeto al cuerpo no permite estudios en cadáveres, ni cirugías y utiliza otras vías de estudio.
- Taoísmo: Originado por Lao Tse, esta filosofía entiende al cuerpo, la salud y la enfermedad en torno a la naturaleza, y describe al Tao como dos fuerzas complementarias y opuestas conocidas como el Yin y el Yang (al yin pertenecen los órganos que son corazón, hígado, bazo, pulmón y riñón y al yang las vísceras que son intestino delgado, vesícula biliar, estómago, intestino grueso, vejiga y sanjiao) (Giralt, 2002).

Además de estas corrientes se utilizan otras teorías como:

- La teoría de los cinco elementos: Sostiene que la naturaleza está constituida por cinco sustancias que tienen distintas propiedades: agua (frío y húmeda), fuego (calentar), tierra (producir y cambiar), madera (crecer y desarrollarse) y metal (purificar y ser sólido); el desarrollo y los cambios de toda cosa o fenómeno son los resultados del movimiento continuo, la intergeneración y la interdominancia de los cinco elementos. Partiendo de esta consideración los antiguos médicos chinos relacionan lógicamente la fisiología y patología de las vísceras, órganos y tejidos del cuerpo humano con los factores del medio ambiente que tienen que ver con la vida de la humanidad; estos son clasificados en cinco categorías, tomando a los cinco elementos como base y de acuerdo con sus diferentes propiedades funciones y formas, esta clasificación se presentan en el siguiente cuadro:

Figura 1: Clasificación del cuerpo humano y la naturaleza con respecto a los cinco elementos.

| <i>Naturaleza</i> | | | | | | <i>Cinco elementos</i> | <i>Cuerpo humano</i> | | | | |
|-------------------|---------|----------|----------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|-------------------|---------------------------|-----------------|---------------------|
| Orientación | Sabores | Colores | Factores ambientales | Crecimiento y desarrollo | Estación | | Órganos | Visceras | Órganos de cinco sentidos | Tejidos | Emociones |
| Este | Agrio | Verde | Viento | Germi-nación | Prima-vera | Madera | Higado | Vesicu-la biliar | Ojos | Tendón | Ira |
| Sur | Amargo | Rojo | Calor de verano | Creci-miento | Verano | Fuego | Corazón | Intestino delgado | Lengua | Vasos | Alegría |
| Centro | Dulce | Amarillo | Humedad | Transfor-mación | Verano tardío (Estio) | Tierra | Bazo | Estó-mago | Boca | Músculo (carne) | Ansiedad (obsesión) |
| Oeste | Picante | Blanco | Sequedad | Cosecha | Otoño | Metal | Pulmón | Intestino grueso | Nariz | Piel y vello | Tristeza |
| Norte | Salado | Negro | Frio | Almace-namiento | Invierno | Agua | Riñon | Vejiga | Oido (oreja) | Huesos | Pánico y miedo |

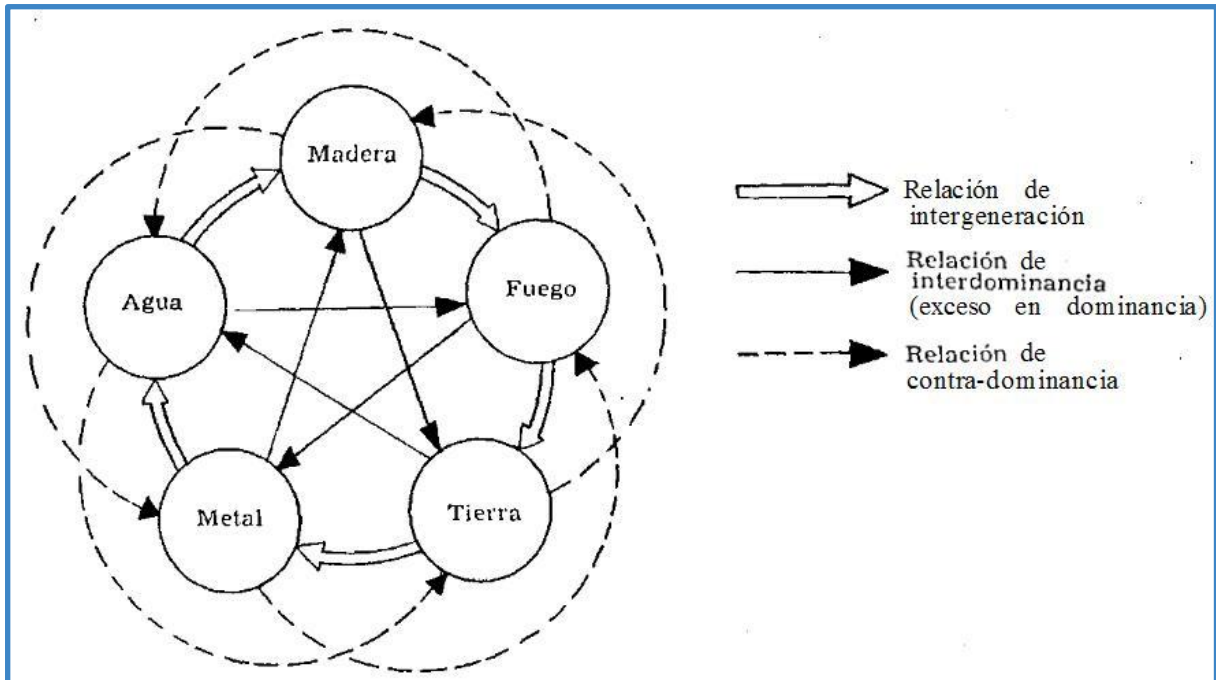


Figura 2. Relaciones de intergeneración, interdominancia y contradominancia entre los 5 elementos: Madera, Fuego, Tierra, Metal y Agua (MINGDE.Y.).

- La teoría de los canales y colaterales: Los canales y colaterales constituyen una intrincada red de vías sin sustrato anatómico reconocido, que sirven para la circulación del Qi (fluido sutil que promueve la vida y las funciones orgánicas), sangre y líquidos corporales; los canales son las vías principales y los colaterales son las vías complementarias. Se describen 12 canales principales divididos en 4 grupos de tres: 3 Canales Yang que circulan por el brazo, nacen en la mano terminan en la cabeza, 3 Canales Yin que circulan por el brazo, nacen en el tórax y terminan en la mano, 3 Canales Yang que circulan por la pierna, nacen en la cabeza y terminan en el pie y 3 Canales Yin que circulan por la pierna, nacen en el pie y terminan en el tórax; los seis canales Yang conectan con vísceras (I.D, estómago I.G, vejiga, vesícula biliar y sanjjiao) y seis canales Yin que conectan con órganos (pulmón, bazo, corazón riñón, hígado y pericardio) (Díaz, 2011).

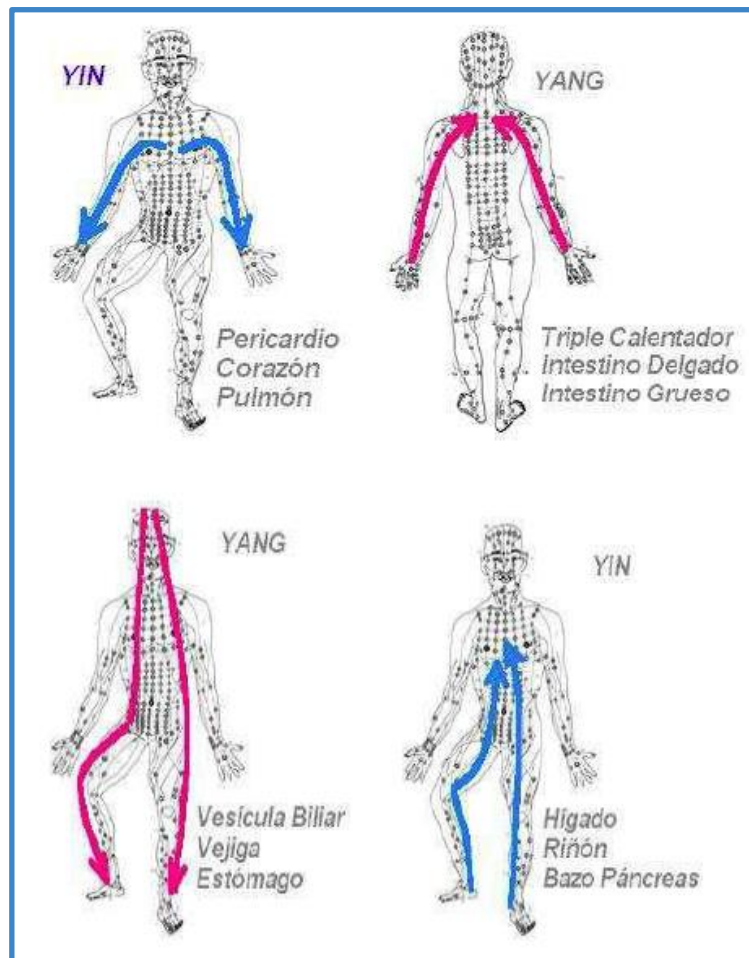


Figura 3. Canales principales JingMai (Torres D. M. 2013).

Al tomar en cuenta estos aspectos se realiza un diagnóstico al paciente, ya sea por anamnesis o historia clínica la cual se realiza como en la medicina convencional, exploración del paciente, exploración de la lengua ya que esta indica la situación energética del paciente, se observa el color, movimientos, forma, entre otros y el pulso por medio de la palpación de la arteria radial en ambas muñecas y en diferentes posiciones (Giralt S.I., 2002).

Una vez que se tiene el diagnóstico, se da un tratamiento basado en las distintas ramas que maneja este tipo de medicina, los cuales pueden ser:

- **Acupuntura:** Esta técnica se basa en la red de canales en el cuerpo con puntos de acupuntura (más de 1000), situados sobre la piel y los tejidos más profundos, la punción sobre estos puntos modula la fisiología del cuerpo. Las estructuras anatómicas y las funciones fisiológicas de los puntos de acupuntura, no han demostrado equivalentes en la ciencia biomédica moderna, pero la neurociencia moderna y los ensayos clínicos muestran un alto potencial terapéutico en el tratamiento del dolor crónico. Emplea agujas metálicas muy finas y pulidas de diferentes longitudes y calibres, dependiendo la zona que se vaya a puntuar. En una sesión normal se emplean de 10 a 12 agujas, realizando movimientos de vaivén y de rotación hasta que los tejidos impiden seguir rotando (Cobos R.R, 2013).

- Moxibustión: Es una terapia que se basa en la estimulación de puntos de acupuntura por medio del calor, este es generado por una moxa que es un papel de madera que contiene en el interior *Artemisia vulgaris* la cual está seca y prensada y se genera el calor sin producir una llama. Las pequeñas moxas pueden ser importadas desde China, pero también pueden sustituirse por cualquier otra forma de calor; algunos datos afirman que la moxibustión con *Artemisia* genera exactamente el mismo efecto que el calentamiento de los puntos con láser y que en las prácticas algunas veces es utilizado el fuego de un encendedor, una vela, un cigarrillo, entre otros (Baccetti, 2015).
- Ventosas: Método empleado para tratar enfermedades que producen una estasis sanguínea local, en este se usa un pequeño recipiente, en el cual se genera un vacío por medio del fuego; en la actualidad se utilizan recipientes de vidrio o bambú. Existen 5 tipos de ventosas: 1) sencilla: en esta se coloca la ventosa en el sitio elegido hasta que aparezca la equimosis, 2) con sangría: se realiza una punción con aguja gruesa o varias filiformes y al retirarlas se realiza la ventosa con la que se produce un pequeño sangrado, en este caso puede dejarse que se forme la equimosis o no, 3) con acupuntura: se coloca la aguja en un punto haciendo las maniobras de tonificación, se coloca la ventosa sobre la aguja sin que se toquen, 4) rápida: se coloca la ventosa y tan pronto se produce la succión se retira y 5) móvil: se coloca algo de grasa en la piel o en la boquilla de la ventosa, una vez colocada la ventosa el terapeuta la mueve arriba, abajo o a los costados hasta que toda la zona se vuelve rojiza o equimótica (Ramon N.H, 2014).
- Tui Na: Tiene una historia de más de 2000 años, la principal teoría del masaje chino es el sistema meridiano en el cual se utilizan técnicas que involucran la mano y brazo para estimular los puntos de acupuntura, la fuerza utilizada durante el masaje es el principal factor estimulante, esto permite que la energía fluya más armoniosamente permitiendo que el cuerpo se cure naturalmente; en adultos se da para tratar enfermedades óseas y musculares y en niños para influir directamente en los puntos de acupuntura (Qingguang Z, 2016).
- Fitoterapia: Véase capítulo 2.1.
- Dietoterapia: Adaptación de la alimentación a las distintas alteraciones metabólicas y/o digestivas producidas por la enfermedad y se realiza a través del uso equilibrado y metódico de los alimentos. La nutrición del enfermo puede alterarse por distintas causas es por eso que cada enfermo requiere un régimen prescrito individualmente que considere las alteraciones causadas por la enfermedad, a la vez que tenga en cuenta las características fisiológicas; por ello la dietoterapia tiene como finalidad la curación del organismo enfermo y no solo de una enfermedad determinada (Gattas V.).
- Tai Chi y/o Qi Gong: Fue creado principalmente como un estilo de combate del arte marcial que implica equilibrio, fuerza, flexibilidad, velocidad, coordinación y agilidad, con el tiempo ha evolucionado en una forma de ejercicio que contiene gracia, atención plena y suavidad que puede ser practicado por personas de todas las edades. Un gran número de estudios ha demostrado efectos benéficos de esta técnica sobre el bienestar físico y psicológico tanto en las personas de la tercera edad, así como en los pacientes con enfermedad de Parkinson, pero recientemente se ha prestado más atención cómo beneficia a los pacientes con esclerosis múltiple (Zou L. 2017).

2.1 FITOTERAPIA

Las plantas medicinales proveen una gran cantidad de nuevas oportunidades terapéuticas, ya sea para prevenir o aliviar enfermedades, el término fitoterápico se refiere a los medicamentos obtenidos por la extracción u otros procedimientos químicos o físicos de plantas medicinales, estos medicamentos se encuentran en las farmacopeas oficiales de distintos países. La mayoría de los fitoterápicos son administrados dentro de la medicina alternativa o tradicional y algunas veces la convencional. Sin embargo a finales de los años noventa un gran número de productos herbales que no son farmacéuticos, pero que tienen un beneficio para la salud por su gran auge y requerimiento, son llamados suplementos alimenticios, las normas que los regulan hacen difícil distinguir entre hierbas medicinales y suplementos alimenticios botánicos, además de que muchos de estos no cuentan con las pruebas necesarias para poder decir que no causen algún daño al ADN (Biagi, 2016).

Una encuesta realizada por la Fundación Salud y Naturaleza creada por los Laboratorios Soria Natural muestra que el 14% de los consumidores de la medicina alternativa conocen la fitoterapia y es la segunda más aplicada solo después de la nutrición y dietoterapia; así como también menciona que la comercialización de productos de plantas medicinales en España se lleva de entre un 50 a 60% de venta libre; la mayoría de los consumidores acude a la medicina tradicional por consejo familiar, pero también se expresa que dependiendo el tipo de molestia es que acuden a la medicina tradicional o la medicina convencional. Cabe mencionar que el mercado correspondiente a la fitoterapia se encuentra muy concentrado en un tipo de productos y/o empresas, aunque hay más de 200 géneros botánicos, la mayoría de las ventas solo se concentra en unos 20 productos de alrededor de 95; de estos productos solo 605 cuentan con un registro especial de planta medicinal, de los cuales casi la mitad corresponden para tratar afecciones del sistema digestivo (Fundación Salud y Naturaleza, 2007).

2.2 FITOTERAPIA CHINA

El desarrollo de medicamentos bajo la estrategia oriental no se ha limitado a la utilización de principios activos obtenidos de la planta, cuyo uso en la medicina tradicional se encontraba documentado, sino que también incluye la valoración de plantas en uso por la población actual. Esto ha dado como resultado el reconocimiento de plantas medicinales nuevas para tratar distintas sintomatologías; además, también se estudió el valor terapéutico de combinaciones de plantas medicinales de tradición popular, mediante estudios clínicos y posteriores investigaciones químicas y farmacológicas. Gracias a este constante trabajo en la farmacopea de la república popular china ha incluido las monografías que describen la fuente o las sustancias usadas. Prescripciones, métodos de preparación, identificación, examen, extracción, los efectos y las indicaciones, así como métodos principales de uso, dosificación y precauciones de las plantas (Llopis C. 2016).

3. *Astragalus membranaceus*

Astragalus membranaceus es una planta perenne de 16 a 36 pulgadas de alto, es nativa del norte y este de China, Mongolia y Corea, tiene tallos peludos con hojas compuestas de 12 a 18 pares de foliolos, la raíz es la parte medicinal de la planta y estas se cultivan a los 4-7 años de edad, disponible en tintura, cápsulas y tabletas, pueden estar estandarizadas o no, en forma inyectable solo disponibles en Asia para uso hospitalario y tópica. Entre los componentes principales del *Astragalus membranaceus* se encuentran flavonoides, saponinas y polisacáridos, existen otros componentes con actividad biológica como esteroides, lignanos, cumarinas y ácidos fenólicos, así como también tres grupos de compuestos tóxicos de fitoconstituyentes alcaloides de indolizidine, compuestos nitrados alifáticos derivados de hierro y selenio (Bratkov, V.M, 2016).

Hasta el año 2016 se han investigado más de 100 especies de *Astragalus*. Su uso contemporáneo de *Astragalus membranaceus* se centra principalmente en su utilización como inmunomodulador, anti-oxidante, y anti-inflamatoria, así como los efectos contra el cáncer (Ehrlich S. D, 2015).



Figura 4. *Astragalus membranaceus* (Magic garden, 2016).



Figura 5. Raíz de *Astragalus membranaceus* (Health blogs, 2011).

3.1 COMPONENTES PRINCIPALES DE *Astragalus membranaceus*

| Category | Main compounds |
|---|--|
| Saponin | <p>Caspicuside I, Astragalus saponin I–IV, Acetyl Astragalus saponin I, Isoastragaloside IV, Sphondin, Astragaloside I–IV, Astragalus saponins I, Astragalus saponins IV, Astragalus saponins VII, Astragalus aglycone, Baibutside, Cyclogaleginin, Saponin-Huangqiyesaponin C, Mongholicoside A, Mongholicoside B, Tetracyclic triterpenoids, Cotton wool Astragalus saponins, 3-O-β-D-Xylopyranosyl-24S-cycloart-3β,6α,16β,24,25-pentaol-25-O-β-D-glucopyranoside, Isoastragaloside IV, Cyclocanthoside C, Cyclounifolioside C, Asernestioside C, 6,3'-Dihydroxy-2',4'-dimethoxyisoflavan-6-O-β-D-glucopyranoside, Calycosin-7-O-β-D-glucoside, 7,3'-Dihydroxy-6,4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glucopyranoside, β-Sitossterol, β-Daucosterol</p> |
| Polysaccharide (including glucan and heteropolysaccharide) | <p>α-(1\rightarrow4) (1\rightarrow6) glucan, α-(1\rightarrow4) glucan</p> |
| Flavonoid | <p>That is, glucose, galactose, arabinose, rhamnose, mannose, xylose, fucose, fructose, ribose, galacturonic acid, galacturonic acid</p> <p>Kaempferol, Quercetin, Isorhamnetin, Narcissin, Nicotiflorin, Microcephalin I, Microcephalin II, Rhamnocitin, (3R)-2',3'-Dihydroxy-7,4-dimethyl oxygen radicals isoflavone, Rutin, (6aR,11aR)-10-Hydroxy-3,9-Dimethyl oxygen radicals red sandalwood alkyl, 1'-Hydroxy-7,3',4'-trimethoxy isoflavone, Odoratin-7-O-β-D-glucoside, Salvigenin, Apigenin, Luteolin, 7,3'-Dihydroxy-6,4'-dimethoxyisoflavone, 7-Hydroxyflavone, Formononetin-7-O-β-D-glycoside-6''-O-acetate, (6aR,11aR)-3-Hydroxy-9,10-dimethoxy-pterocarpan, Calycosin-7-O-β-D-glucoside-6''-O-malonate, Formononetin-7-O-β-D-glucoside-6''-D-malonate, (6aR,11aR)-3-Hydroxy-9,10-dimethoxypterocarpan, (3R)-7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan, Astrapterocarpan-glucoside-6'-O-malonate, Astraisoflavanglucoside-6'-O-malonate, Calycosin-7-O-β-D-glucoside-6''-O-acetate</p> |
| Amino acid trace element | <p>Asparagine, canavanine, proline, arginine, aspartic acid, alanine</p> <p>scandium, chromium, cobalt, copper, selenium, molybdenum, cesium, iron, manganese, zinc, rubidium</p> |
| Other compounds | <p>Coumarin, folic acid, bitter elements, choline, betaine, linoleic acid, linolenic acid, vanillic acid, ferulic acid, isoferulic acid, paimitic acid, hydroxy phenyl acrylic acid, caffeic acid, green acid, palm acid, 13-sitossterol, daucosterol, lupeol</p> |

(Hui-Lin Wang, 2017).

3.2 USOS MEDICINALES DE *Astragalus membranaceus*

Es una planta muy utilizada en la MTCh debido a sus propiedades, en combinación con otras sustancias contribuye a fortalecer el cuerpo contra diversas enfermedades físicas, emocionales y mentales como:

- Resfriados e influenza: *Astragalus* siempre se ha caracterizado por ser una planta utilizada para resfriados y gripe ya sea solo o en combinación, es rica en polisacáridos, flavonoides, minerales y aminoácidos; estudios en animales demostraron que la administración del extracto de la raíz de *A. membranaceus* a ratones con encefalitis japonesa, aumentaron sus tasas de supervivencia de un 30 a 40% en comparación con el grupo control, esto se le atribuye a un aumento de la actividad fagocítica; En otro ensayo, doble ciego controlado con placebo los participantes tomaron oralmente extractos de *Echinacea purpurea*, *Astragalus membranaceus* y *Glycyrrhiza glabra* por separado y una combinación de ambos, dos veces al día durante 7 días, de estas hierbas *Astragalus* demostró la mayor activación y proliferación de células inmunitarias, en particular de CD8, CD4 y células T, en comparación con el placebo y la combinación solo mostró un efecto aditivo en la activación pero no en la proliferación (Roxas M, 2007).
- Diabetes: Se ha estudiado en casos de Nefropatía diabética, se realizó un estudio por Li M y colaboradores, en este se revela que *Astragalus* muestra un efecto protector renal significativo y una mejora en el estado sistémico (nivel de albúmina sérica) comparados con el grupo control, para esto se utilizaron 25 ensayos controlados aleatorios y semi-aleatorios, los cuales abarcan 1804 pacientes tratados y 849 controles (Li M, 2011).
- Fatiga y falta de apetito por quimioterapias: Al revisarse 17 estudios en los que se utiliza quimioterapia basada en platino de forma aleatoria los cuales representan 1552 pacientes, se observa que cuando a esta se le adiciona un tratamiento con *Astragalus* hay un aumento significativo de supervivencia del paciente, así mismo un aumento del estado de rendimiento, por otra parte los efectos secundarios como son anemia, neutropenia, trombocitopenia, fatiga, falta de apetito, náuseas y vómitos fueron significativamente más frecuentes cuando se utilizó solo la quimioterapia a comparación de cuando se utiliza de forma conjunto con *Astragalus* (Wang S.F, 2016).
- Enfermedades cardiovasculares: Un estudio realizado durante tres meses por Cheng Y y colaboradores señala que los polisacáridos de *Astragalus membranaceus* reduce en un 45.8% el colesterol total plasmático en ratones con hipercolesterolemia, además de los triglicéridos en un 30%, el colesterol de la fracción de lipoproteína de baja densidad en un 47.4% comparable con la simvastatina, fármaco que se utiliza para reducir los niveles de colesterol y triglicéridos, además de que también se redujeron colesterol y triglicéridos en el hígado, incrementó la excreción de ácido biliar fecal y la excreción de esteroides neutros, inhibió la absorción de colesterol y en contraste incrementó la síntesis de colesterol hepático y la actividad de HMG-CoA reductasa (Cheng Y, 2011).

- Alergias estacionales: Un ensayo realizado por Matkovic en 2010, investigó la eficacia y seguridad de *A. membranaceus* en el tratamiento de pacientes con rinitis alérgica estacional; para este estudio se utilizó Lectranal que es un complejo obtenido de *A. membranaceus*, la fórmula se encuentra registrada en Croacia. El estudio fue diseñado en 6 semanas con 48 pacientes adultos con rinitis alérgica estacional de moderada a severa, en los que, a un grupo de pacientes se les administró la fórmula, en cambio a otros, se les administró un placebo. La eficacia del tratamiento fue evaluada por la medición del cambio de los síntomas, la calidad de vida del paciente, la medición de IgE e IgG en suero específica, eosinófilos nasales y evaluación física global de los pacientes; en comparación con el placebo, Lectranal disminuyó la intensidad de la rinorrea mientras que otros síntomas no difirieron, los investigadores y los pacientes juzgaron el tratamiento con *Astragalus* como más eficaz, debido a que los cambios dentro de los síntomas y la calidad de vida de los pacientes mejoró significativamente con el Lectranal; sin embargo se sugiere hacer un estudio más grande y multicéntrico (Matkovic Z. 2010).
- Cáncer: Se ha exhibido acciones antitumorales en pacientes con melanoma por el uso de *Astragalus*; en un estudio se evaluó *in vivo* e *in vitro* las acciones de *Astragalus* y la combinación de *Astragalus* con Pterostilbeno, en el cual la viabilidad celular se evaluó con el ensayo MTT, los nucleosomas liberados y la actividad de caspasa fueron medidos por el ensayo inmunoabsorbente enzima- ligando, así mismo se midió la inhibición del crecimiento *in vivo* e *in vitro*; de acuerdo al análisis estadístico se reflejó una inhibición de la proliferación celular con *Astragalus* y la combinación de *Astragalus*-Pterostilbeno dependiendo del tiempo y la concentración así mismo la actividad de la apoptosis y de la caspasa 3/7 aumento por ambos tratamientos; la inhibición del crecimiento del melanoma se dio de un 36.5 a 62.3% mediante la inducción de la apoptosis, lo cual estos datos sugieren que la combinación de *Astragalus*-Pterostilbeno aumenta la eficacia antitumoral (Yan X, 2014). También se ha realizado un estudio con las células de leucemia U937 en el cual la capacidad de proliferación celular se midió con el ensayo MTT, para la apoptosis se utilizó la citometría de flujo y los cambios morfológicos se observaron con microscopio de fluorescencia por tinción Hoechst 33258 y la expresión de ARNm de C-myc y p27 en las células se detectó mediante RT-PCR; los resultados del experimento indican que se dio una inhibición de la proliferación celular en el grupo tratado contra el grupo control, también se indujo a la apoptosis de las células U937 y la tasa de apoptosis alcanzó un aumento de 63±4 con un tratamiento de 1000ug/ml, además de que disminuye el nivel de expresión de C-myc y aumentó la expresión de p27, lo cual concluyó que a la concentración de 1000ug/ml de *Astragalus* se produce la apoptosis de la línea celular de leucemia U937 *in vitro* (Jia X, 2013).

3.2 EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE *Astragalus membranaceus*

Generalmente se le considera un medicamento seguro, no se ha reportado, *in vivo* o *in vitro*, ninguna incidencia de intoxicación asociada, al uso de la raíz o de sus componentes principales. Existen estudios que sustentan la DL50 del extracto es de 40 g/kg vía intraperitoneal en ratas, sin embargo se han administrado dosis de 100 g/kg vía oral sin efectos adversos, también se reporta administración vía intraperitoneal 0.5 g/kg/día durante un mes, cabe mencionar que no se observan cambios en la ingesta de alimento, comportamiento, o la producción de orina o heces.

Recientemente se realizó un estudio subcrónico sobre la toxicidad del extracto de *A. membranaceus*, el cual contenía mayoritariamente polisacáridos y saponinas para evaluar el rango de dosis de seguridad en la aplicación clínica, dando como resultado una dosis de 5.7-39.9 g/kg de peso en ratas y 2.85- 19.95 g/kg en perros, lo cual equivale de 70 a 35 veces la dosis en humanos respectivamente (Ayeung K.K, 2016).

4. METIL METANOSULFONATO (MMS)

El metil metano sulfonato o éster metílico metanosulfónico como también se le conoce, es un reactivo con fórmula molecular $C_2H_6O_3S$ y peso de 110.13g/mol, comercialmente se encuentra en estado líquido de color amarillo claro y no presenta olor, no se tiene datos de punto de fusión, congelación y reactividad, presenta un punto de ebullición de 202-203°C, tiene una densidad relativa de 1.3g/cm³, es estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas por el laboratorio que lo fabrica, es incompatible con agentes oxidantes fuertes, bases y ácidos fuertes; presenta una DL₅₀ vía oral en ratas de 225 mg/kg; en humanos tiene una toxicidad aguda oral categoría 3, es decir que es tóxico en caso de ingestión, provoca irritación cutánea e irritación ocular grave, irrita las vías respiratorias, y es posible agente carcinogénico en humanos (Sigma Aldrich, 2016).

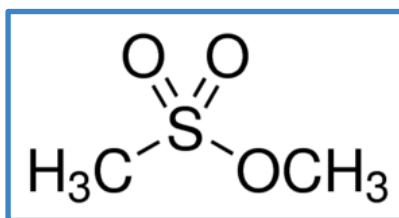


Figura 6: Estructura de metilmetanosulfonato (Sigma- Aldrich, 2016).

4.1 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

En pacientes con cáncer la dosis terapéutica oscilaban entre 2.8 y 800 mg/kg de peso corporal por un periodo de hasta 350 días, sin embargo condujo a efectos tóxicos gastrointestinales y hepáticos (Kumar V. 2011).

4.2 MECANISMO DE ACCIÓN

El MMS se ha utilizado durante muchos años para inducir mutagénesis y en experimentaciones de recombinación; el MMS modifica tanto a la guanina 7-metil guanina y adenina 3-metil adenina, provocando bloques de emparejamiento y replicación, respectivamente. La sensibilidad de las células al MMS también aumenta significativamente, cuando otras vías de reparación de ADN están comprometidas. En *Saccharomyces cerevisiae*, las células deficientes de recombinación homóloga (HR) son sensibles al MMS. La HR suele estar involucrada en la reparación de rupturas de doble cadena del ADN (DSB) en esta especie, lo que implica que el MMS de alguna manera induce DSB in vivo. Sin embargo, el mecanismo a través del cual MMS induce DSB no ha sido demostrado. Pero existe evidencia que las DSB, no se da por el tratamiento con MMS, sino como consecuencia de la preparación de la muestra (Lundin C. 2005).

5. GENOTOXICIDAD

La genotoxicidad es una característica de los tóxicos químicos, físicos o biológicos, dando como resultado el daño al ADN, ya sea por mutaciones, deleciones, intercambios del material cromosómico y rotura de cadenas, esto conduce a apoptosis, carcinogénesis o alteración del fenotipo (Akthar M.F. 2016).

5.1 PRUEBAS DE GENOTOXICIDAD

Las pruebas de genotoxicidad evidencian las alteraciones cromosómicas, directa o indirectamente, causadas por agentes físicos, químicos o biológicos, dichas pruebas son un requisito fundamental para la evaluación mutagénica de algún producto por lo general químico. A continuación se presentan las más utilizadas:

- Ensayo de micronúcleos (MN): Descrito en el punto 6.1.
- Prueba de Alteraciones Cromosómicas (AC): Se trata de un test *in vitro* para detectar alteraciones cromosómicas, fundamentalmente, alteraciones del tipo estructural, ya que el diseño experimental está concebido para analizar metafases de la primera división mitótica tras el tratamiento y se puede realizar con líneas celulares de crecimiento indefinido ya establecidas o con cultivo primario de linfocitos obtenidos a partir de sangre periférica. También esta técnica puede utilizarse como un signo de advertencia temprana para el desarrollo de cáncer, debido a la evidencia de correlación de daño genotóxico con las etapas tempranas de cáncer en humanos ha sido consolidada en estudios de cohorte y se ha confirmado que la detección de un aumento de la frecuencia de AC, relacionado con la exposición a agentes genotóxicos puede ser utilizado para estimar el riesgo carcinogénico (Bello G.J. 2001; Ascarrunz M. E. 2006).
- Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH): Consiste en la obtención de cromosomas con cromátides químicamente diferentes, mediante la incorporación *in vitro* de una base análoga a la timidina 5-bromodeoxi-uridina (BrdU), y representa el intercambio de los productos de la replicación del ADN en *loci* cromosómicos homólogos. Esta prueba muestra alta resolución en la evaluación del daño crónico, además de que es rápida y tiene potencial para evaluar cualquier población celular eucariota (Navarrete C. Ascarrunz M. E. 2006).
- Ensayo Cometa: Se utiliza para detectar daños al ADN producidos por un rompimiento simple o doble en la cadena y por daño oxidativo inducido. Este ensayo se basa en la fragilidad que tienen los sitios dañados, al ser sometidos a un pH superior a 13 y su comportamiento en una electroforesis; los fragmentos de ADN producto de la acción de la sustancia a probar, afectados por el pH alcalino, migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear, por lo cual se forma una cola del “cometa” y mientras más grande sea la cola, mayor es el daño ocasionado al material genético. Esta prueba permite el análisis de datos individuales y el uso de muestras celulares extremadamente pequeñas (Hernandez G. C ; Ascarrunz M. E. 2006).

5.2 IMPORTANCIA DE LA EVALUACIÓN GENOTÓXICA

La evaluación genotóxica es de carácter obligatorio a nivel internacional para compuestos de nueva síntesis y fitofármacos, la diversidad de efectos nocivos a los que está expuesto ADN son imposibles de detectar a través de un único sistema de ensayo, la gran cantidad de mutaciones que pueden originarse no serán abarcadas por un ensayo aislado, y si así lo fuera ofrecería un ensayo poco preciso; por este motivo, es imprescindible utilizar un grupo de ensayos *in vivo* e *in vitro*, que permitan una correcta exploración del efecto genotóxico de la sustancia de interés, para poder predecir con certeza los efectos que pueda tener esta (Arencibia A. D. 2003).

6. MICRONÚCLEOS

El micronúcleo fue reconocido en el final del siglo 19, cuando Howell-Jolly y encontraron pequeñas inclusiones en la sangre tomada de gatos y ratas. Las pequeñas inclusiones, llamados Cuerpos de Howell-Jolly, también se observan en los eritrocitos de la sangre periférica de pacientes con anemia grave. Estos son la primera descripción de la propia micronúcleos (Hayashi, 2016).

Los MN son cuerpos pequeños, extranucleares que se originan a partir de fragmentos acéntricos o cromosomas enteros que normalmente se pierden desde el núcleo de la célula durante la mitosis. Estos fragmentos de cromosomas rodeados de membrana nuclear son conocidos como MN, que son morfológicamente similar a núcleo normal, pero de menor tamaño, de ahí su nombre de "Micronucleos" (Kang, 2013).

La Frecuencia de micronúcleos no siempre es fácil de interpretar debido a que los micronúcleos pueden originarse por muchos mecanismos. Entre ellos, pérdida mitótica de fragmentos acéntricos que es considerado el mecanismo clásico, donde cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo, pues carece del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómero, darán origen a los núcleos de las células hijas regulares. Los elementos rezagados quedarán incluidos en el citoplasma de las células hijas y una considerable proporción es transformada en uno o varios núcleos secundarios, que como regla, son mucho más pequeños que el núcleo principal y de ahí su nombre de micronúcleo (Kang, 2013, Martínez, 2010).

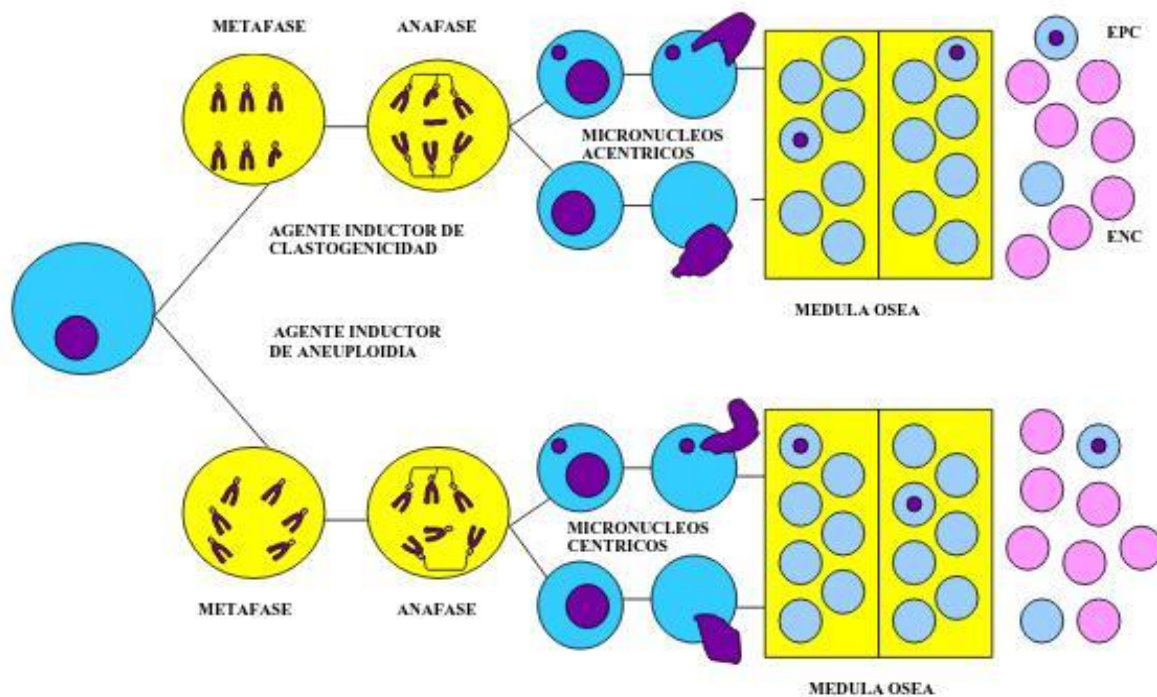


Figura. 7. Mecanismo de formación de micronúcleos (DOMÍNGUEZ, 2005).

6.1 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

La aparición de MN se considera que es un buen indicador de los efectos clastogénico y / o aneuploidizantes. El ensayo de MN en médula 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, solo pueden ser expresados en células que completaron división nuclear y no es aplicable para otro tipo de células ni para ser usadas en ensayos *in vitro* (Fenech, 2000).

Los MN solo se utilizaron por primera vez para cuantificar el daño cromosómico y ahora son reconocidos como uno de los ensayos más exitosos y confiables, ya que brinda un enfoque alternativo y más simple para evaluar el daño cromosómico (Martínez, 2010).

En comparación con otros ensayos de genotoxicidad, el ensayo de MN brinda rapidez y facilidad en la etapa de análisis de datos. Así mismo, no tiene necesidad de células en metafase, y muestra células identificables con un microscopio óptico, debido a que cada célula tiene sólo una división nuclear (Kang, 2013).

6.2 CRITERIOS PARA IDENTIFICAR MICRONÚCLEOS

Mediante estudios se han formulado criterios para la identificación de estructuras donde incluyen los MN, que tratan sobre las características necesarias para ser reconocidos como tal y permitan un recuento fiable y objetivo a partir de criterios de selección de las 40 células binucleadas (BN) y de los MN, definidos con base en los criterios para la identificación de micronúcleos (Fenech, 2000; Fenech et al., 2003; Zalacain 2005).

- El diámetro de MN debe tener una medida entre 1/16-1/3 del diámetro del núcleo principal) menos de una mitad del núcleo principal)
- No refractarios
- Intensidad de tinción similar a el núcleo principal
- No unidos a el núcleo de la célula de origen pero no superponerse con él y su membrana debe verse con claridad (Fenech, 2000; Fenech et al., 2003).

6.3 TÉCNICA DE MICRÓNÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA

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

De acuerdo con MacGregor (1990), el tiempo de vida de un eritrocito en ratón es de 30 días y considera que el ciclo celular es de 10 a 20 horas, el lapso que transcurre de la división a la enucleación es de 6 horas y el tiempo de los eritrocitos policromáticos (EPC) en medula ósea es de 24 horas (Domínguez, 2005).

En sangre periférica, se utilizan al menos dos muestras (48 y 72 h) después de una administración única. Para el estudio de un tratamiento más largo, una muestra de 48 h de la administración es aceptable (Hayashi, 2000).

La sangre periférica de ratón es obtenida de la vena, de la cola o de otro vaso sanguíneo apropiado. Las células hemáticas se someten inmediatamente a una tinción supravital o se extienden en frotis y posteriormente se tiñen con colorantes específicos de ADN o con colorantes convencionales como Giemsa (FDA, 2013).

Para cada animal se determina la relación de los eritrocitos inmaduros y el total de los eritrocitos (Inmaduros + maduros), en un recuento de al menos 2000 eritrocitos si se trata de médula ósea y de 1000 si se trata de sangre periférica (Gutiérrez, 2015).

7. CITOTOXICIDAD

La evaluación de la citotoxicidad es una prueba preliminar que puede ser útil para definir mejor las concentraciones usadas en el experimento, para poder decir si hay citotoxicidad o citostasis se requiere del índice de replicación, sin embargo existen otros marcadores para la citotoxicidad o la citostasis como son: integridad celular, apoptosis, necrosis, conteo en metafase, puentes nucleoplasmicos (OCDE, 2014). En la prueba de micronúcleos en sangre, la proporción de eritrocitos policromáticos/normocrómicos entre los individuos tratados y los testigos provee de un índice de citotoxicidad, este no debe ser menor o mayor al 20% con respecto al valor del control (Rocha E.Y, 2008).

8. ESTUDIO AGUDO

El análisis de eritrocitos inmaduros tanto en médula ósea como en sangre periférica es aceptable en aquellas especies en las que el bazo no elimina eritrocitos micronucleados. En ratones, los eritrocitos maduros son poblaciones celulares aceptadas para un análisis de MN cuando la exposición al agente ha durado cuatro semanas o más. La visualización del micronúcleo se ve facilitada en este tipo de células porque carecen de núcleo (Krishna, 2000).

El estudio de toxicidad aguda, evalúa el grado de toxicidad inducida por la droga sujeta a estudio como resultado de la administración de altas dosis, ya sea por la administración única o repetida en un intervalo no mayor de 24 horas, brindando información sobre la toxicidad intrínseca del producto y el posible riesgo que conlleva su exposición aguda. Además, aporta valiosa información para la selección de los niveles de dosis a emplear en los estudios subcrónicos. Durante muchos años, la toxicología aguda era sinónimo de búsqueda de la dosis letal media (DL50), la cual causa la muerte del 50 % de los animales. Este método dejó de ser requisito para el registro de medicamentos a finales del 2002 (Gamez R , 2007).

En este estudio se monitorea la presencia de MN en eritrocitos inmaduros o policromáticos (EPC), esto se debe a que son células jóvenes (reticulocitos) recientemente liberados a la circulación y presentan una coloración mezclada de basofilia y eosinofilia, presentando una coloración azul-violeta, misma que se debe a la presencia de ácido ribonucleico en el momento de su diapédesis hacia la circulación por la falta de aproximadamente 20% del contenido final de hemoglobina, por lo que aún conservan parte de aparato ribosómico para terminar la síntesis y construir una célula madura; generalmente poseen un tamaño un poco mayor que los eritrocitos maduros o normocrómicos (ENC), que presentan una coloración rosada, y proceden de normoblastos que pierden su núcleo antes de que la hemoglobinización del protoplasma sea completa. Generalmente, un aumento en el número de EPCs con respecto a los valores normales, indica una eritropoyesis aumentada. Debido a que son células producidas y liberadas durante el tiempo de estudio, constituyen la manera más eficaz de evaluar con ellas la afección de la actividad medular, así como la capacidad clastogénica de los compuestos de corto tiempo (Domínguez, 2005).

La presencia de MN en EPC se basa en lo siguiente: en la anafase del ciclo celular, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que poseen centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas; sin embargo, los elementos rezagados que pueden ser fragmentados (por un agente clastogénico) o cromosomas completos (por un agente anéugeno) quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios conocidos como micronúcleos (Rocha, 2008).

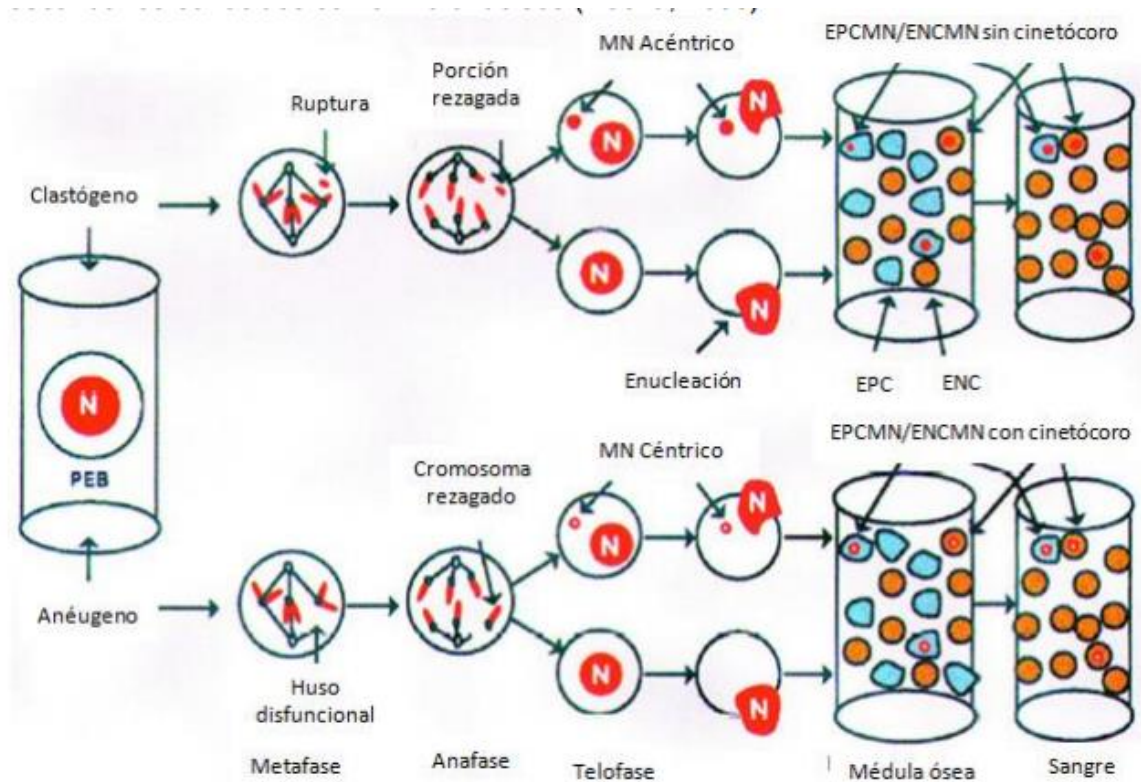


Figura 8. Formación de micronúcleos (Rocha, 2008).

9. ESTUDIO SUBCRÓNICO

La toxicidad subcrónica, refiere a los efectos adversos por toxicidad acumulativa de la sustancia administrada o sus metabolitos, los cuales ocurren por la administración del agente durante un período de tiempo que oscilan de 15 días hasta 4 semanas.

La administración de la dosis, se realiza diariamente con el objetivo de determinar potencial toxicológico de la sustancia luego de una prolongada y repetida administración.

El estudio subcrónico no es capaz de detectar aquellos efectos que se manifiestan tras un mayor período de latencia; sin embargo, brinda una valiosa información sobre los órganos dianas, y constituye la base para la selección de los niveles de dosis a evaluar en los estudios crónicos (Gámez R, 2007).

II. JUSTIFICACIÓN

En la última década ha renacido en todo el mundo el interés por el uso de la medicina tradicional. Los efectos de los extractos de plantas como uso terapéutico sobre organismos, se han estudiado y proyectado en muchas investigaciones a lo largo del tiempo, y son considerados de suma importancia en los estudios de descubrimiento de fármacos, lo que permite apoyar el tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano y evitar así posibles reacciones adversas

El estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica en los seres vivos. *Astragalus membranaceus* es una planta con flores Fabáceas registrada en la farmacopea como un inmunomodulador de varias vías de señalización de cáncer, se relacionan con las moléculas de transcripción específicos durante la protección contra la inflamación gastrointestinal y cáncer. Es un componente clave de la mayoría de las fórmulas tradicionales chinas y ha generado una perspectiva importante en tratamientos. Una publicación reciente de Wei et al. (2011) ha identificado a *Astragalus m.* como la medicina herbal prescrita con mayor frecuencia para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 y 2 en China.

Sin embargo, en muchos casos se desconoce el alcance de su toxicidad pudiendo ser perjudicial para nuestra salud. La evaluación del riesgo de estos productos generados a partir de plantas, conlleva la realización de pruebas que comprenden ensayos genotóxicos y citotóxicos por lo que la técnica de MN en sangre periférica aporta información valiosa para los estudios que aún falta por realizar para corroborar la inocuidad del efecto de la planta.

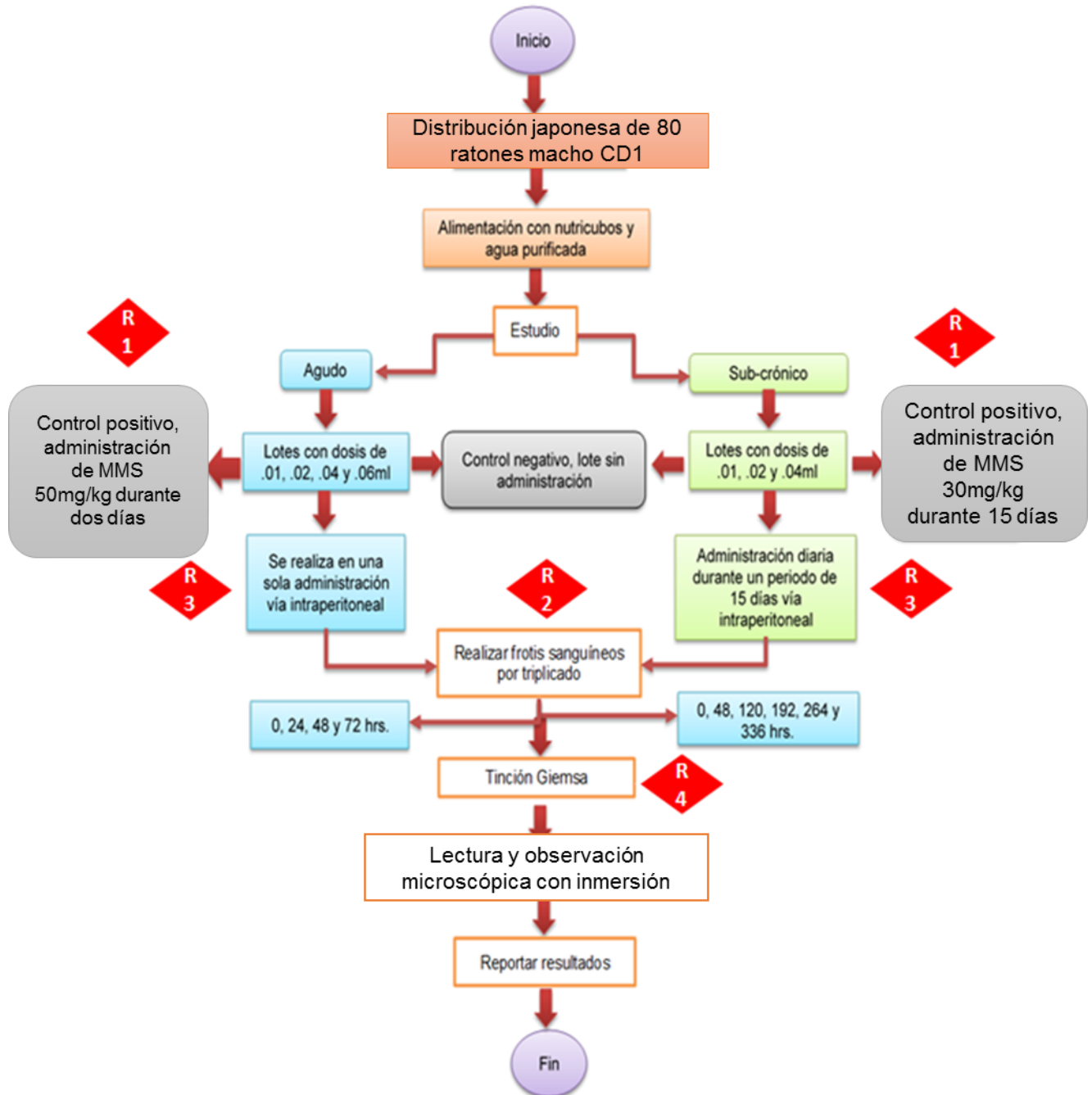
III. HIPÓTESIS

Si *Astragalus membranaceus* genera un efecto genotóxico y/o citotóxico, éste se reflejará en un aumento de micronúcleos en EPC y/o ENC, como también se observará alterado el índice de EPC/ENC.

IV. OBJETIVOS

- Determinar la genotoxicidad de *Astragalus membranaceus* en un estudio agudo y subcrónico mediante el ensayo de micronúcleos en ratones CD1.
- Determinar la citotoxicidad de *Astragalus membranaceus* mediante la relación de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocrómicos (EPC/1000 eritrocitos) en sangre periférica en ratones CD1.
- Determinar la genotoxicidad y citotoxicidad del Metilmetanosulfonato mediante el ensayo de micronúcleos en ratones CD1 en un estudio agudo y subcrónico.

V. DIAGRAMA DE FLUJO



Disposición de residuos

R1: Inactivación, neutralizar a pH básico, almacenar en recipiente rígido

R2: Inactivación y basurero municipal

R3: Las agujas se colocaron en el contenedor rojo RPBI de acuerdo a la Norma oficial 087.NOM-087-ECOL-SSA1-2001-RPBI

R4: Neutralizar hasta pH básico, desechar a la tarja

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se trabajaron 80 ratones macho de 30 ± 5 g de peso de la cepa CD1 los cuales proporcionó el bioterio de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, estos se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales (luz, temperatura y hábitat) con libre acceso de agua y alimento durante todo el desarrollo experimental.

Procedimiento para los estudios de micronúcleos en eritrocitos policromáticos y normocrómicos de sangre periférica

Se utilizaron 80 ratones machos CD1, que fueron pesados, marcados.

Ampolletas de *Astragalus membranaceus*

Se utilizaron dos ampolletas del extracto de *Astragalus m.* provenientes de diferentes lotes de producción, ambas fueron brindadas por la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional; elaboradas por los laboratorios DaliPharmaceutical Co. LTD:

- Ampolleta A: Color café oscuro y apariencia turbia
- Ampolleta B: Color amarillo, apariencia translúcida

Preparación de las dosis de *Astragalus membranaceus*

Las dosis se eligieron con base a la administración diaria en humanos (2 ampolletas de 10 mL en personas con un peso promedio de 70kg) se realizó la posología correspondiente en ratones CD1 de peso 30 ± 5 g con el fin de obtener las dosis a emplear. El resultado se muestra a continuación:

Tabla no.1 Distribución de lotes para *Astragalus membranaceus*

| Ensayo | Dosis en ml de Ampolleta A | Dosis en ml de Ampolleta B |
|------------|----------------------------|----------------------------|
| Agudo | 0.01 | 0.01 |
| | 0.02 | 0.02 |
| | 0.04 | 0.04 |
| | 0.06 | |
| Subcrónico | 0.01 | 0.01 |
| | 0.02 | 0.02 |
| | 0.04 | 0.04 |

Ambas ampolletas se disolvieron en agua inyectable que se utilizó como vehículo para su administración.

Preparación de MetilMetanosulfonato

La preparación de la dosis de MMS, se realizó basándose en la literatura.

Tabla no. 2 Distribución de lotes para controles

| Ensayo | Control negativo | Control positivo |
|------------|--------------------|-------------------|
| Agudo | Sin administración | Dosis de 50mg/ kg |
| Subcrónico | Sin administración | Dosis de 30mg/kg |

Posterior al pesaje de los ratones, se realizó la distribución japonesa, la cual consiste en acomodar de manera descendente los pesos de los animales, de acuerdo con el número de lotes se ordenan de izquierda a derecha, logrando una homogeneidad de los pesos en cada uno de los lotes. Tanto *A. membranaceus* como el MMS se administraron por vía intraperitoneal.

Una vez distribuidos los lotes, se tomó a todos los animales una muestra de sangre, con el fin de obtener frotis de tiempo cero (T_0), que corresponde a la muestra basal.

Se aplicó tópicamente lidocaína en la porción terminal de la cola de los 80 ratones; se cortó una pequeña porción de la cola, se depositó una gota de sangre en un portaobjetos previamente desengrasado y limpio e inmediatamente se procedió a la realización de frotis, el extendido del mismo debe ser uniforme y por triplicado. Se aplicó violeta de genciana después de realizar el corte para prevenir infecciones. La extensión de la gota se realizó con ayuda de otro portaobjetos colocando en un ángulo de 45° del primero. Con un solo movimiento se corre la gota, para que el extendido sea uniforme. La preparación se seca al aire libre.

Las laminillas obtenidas y rotuladas se fijaron con metanol absoluto en la campana de extracción, sumergiendo cada laminilla durante 3 minutos, posteriormente se dejó secar. Una vez secas, se realizó la tinción utilizando colorante de Giemsa en buffer de fosfatos de pH 6.8 (1:10) en un vaso copplin por un periodo aproximado de 12 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar al aire libre.

La administración intraperitoneal de *Astragalus m.* consiste en sujetar el ratón, enredando la cola en el dedo meñique de la mano derecha y sujetando con índice y pulgar de la misma mano la cabeza del ratón para inmovilizarlo.

Se colocó el ratón inmovilizado en un ángulo de 45° boca arriba para poder introducir la aguja con la cual se administró la dosis de la tabla no. 1.

En los días de administración de Astragalus m. se tomó muestra en estudio agudo 0, 24, 48 y 72 horas después de la administración, y 0, 48, 120, 192, 264 y 336 horas para el estudio subcrónico.

La administración de MMS en el estudio agudo fue de 50mg/kg durante dos días, para el estudio subcrónico se realizó una administración diaria de 30mg/kg durante un periodo de 15 días.

En primera instancia las laminillas obtenidas se analizaron a 40X en regiones donde las células se observaron separadas, intactas y bien teñidas. En estas regiones se utilizó el objetivo de 100X con aceite de inmersión y se contabilizaron 1000 ENC y 1000 EPC, así también, los micronúcleos para obtener el índice de genotoxicidad y citotoxicidad.

El color de las células debe ser de rojo a rosa en eritrocitos maduros o normocrómicos (ENC) y azulado para las formas inmaduras o policromáticos (EPC). Los micronúcleos en los EPCs se presentan como cuerpos de inclusión de color azul-violeta; son redondos, con un diámetro aproximado de 1/20 a 1/15 del eritrocito y no son refringentes.

Análisis estadístico

Se evalúan dos parámetros:

-Efecto genotóxico: Cuantificación de 1000 eritrocitos policromáticos por ratón, observando cuántos de ellos contiene micronúcleos (EPCMN)

$$\text{Frecuencia EPCMN} = \frac{\# \text{ EPCMN}}{\text{EPC contados}}$$

-Efecto citotóxico: Cuantificar la relación de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) en 1000 eritrocitos por ratón

$$\% \text{ EPC'S} = \frac{\# \text{ EPC}}{\text{EPC} + \text{ENC}} \cdot 100$$

El análisis descriptivo de los resultados se realizó con las pruebas de ANOVA y las comparaciones múltiples de Tukey en el Programa GraphPad InStat.

VII. RESULTADOS

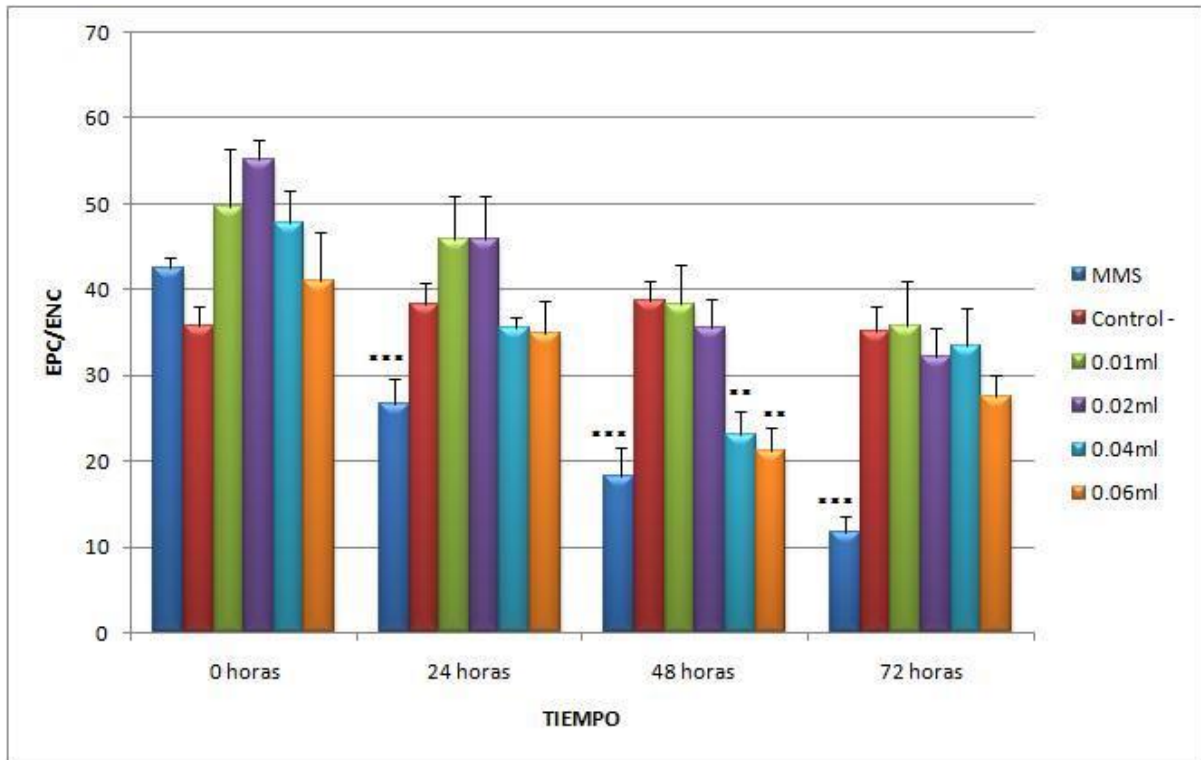
ESTUDIO AGUDO

- Ampolleta A:

En la tabla 3 se muestran los resultados del análisis descriptivo perteneciente a la frecuencia de EPC/1000 ENC en las muestras de sangre periférica de ratón con los distintos tratamientos realizados, a los diferentes tiempos de muestreo; asimismo, se muestra la gráfica 1 correspondiente a dicha tabla.

Tabla 3. Frecuencia de EPC/1000 eritrocitos en sangre periférica de ratón CD1, de los tratamientos a distintos tiempos. Ampolleta A de *A. membranaceus*, estudio agudo.

| Tiempo | Tratamiento | Media | Error estándar |
|----------|-------------|-------|----------------|
| 0 Horas | MMS | 42.6 | 1.12 |
| | Control - | 35.8 | 2.39 |
| | 0.01 ml | 49.6 | 6.93 |
| | 0.02 ml | 55.2 | 2.22 |
| | 0.04 ml | 47.8 | 3.82 |
| | 0.06 ml | 41 | 5.89 |
| 24 Horas | MMS | 26.6 | 3.01 |
| | Control - | 38.2 | 2.67 |
| | 0.01 ml | 46 | 4.90 |
| | 0.02 ml | 45.8 | 5.25 |
| | 0.04 ml | 35.6 | 1.28 |
| | 0.06 ml | 35 | 3.80 |
| 48 Horas | MMS | 18.2 | 3.45 |
| | Control - | 38.8 | 2.20 |
| | 0.01 ml | 38.2 | 4.71 |
| | 0.02 ml | 35.6 | 3.35 |
| | 0.04 ml | 23 | 2.82 |
| | 0.06 ml | 21.2 | 2.74 |
| 72 Horas | MMS | 11.8 | 1.80 |
| | Control - | 35.2 | 2.92 |
| | 0.01 ml | 35.8 | 5.24 |
| | 0.02 ml | 32.2 | 3.41 |
| | 0.04 ml | 33.4 | 4.52 |
| | 0.06 ml | 27.6 | 2.44 |



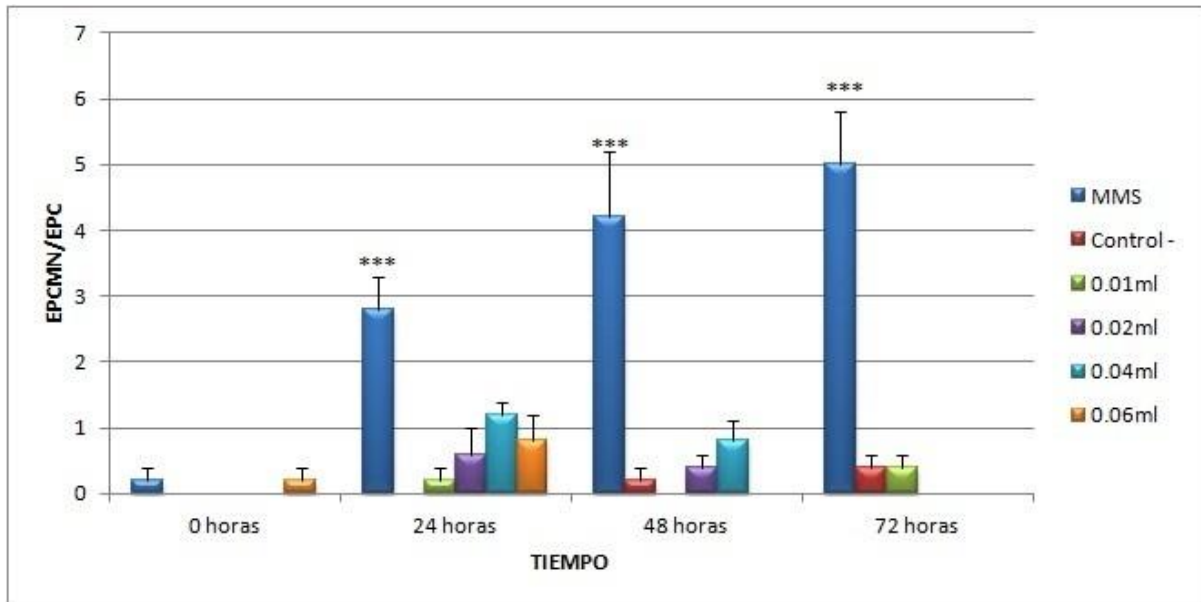
Gráfica 1. Frecuencia de EPC/1000 eritrocitos en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta A de *A. membranaceus*, ensayo agudo.

En los tiempos 24, 48 y 72 horas se puede apreciar una diferencia significativa *** con un $P < 0.001$ entre el MMS con los demás tratamientos aplicados; así mismo se puede observar una disminución de EPC a las 48 horas entre las dosis de 0.02 mL y 0.04 mL ** con un $P < 0.01$ con respecto al control negativo. Tratamiento descriptivo. Comparación múltiple de Tukey

En la Tabla 4 se presentan los resultados del análisis descriptivo de la frecuencia de EPCMN/1000 eritrocitos de las muestras obtenidas de sangre periférica de ratón con los tratamientos, en los diferentes tiempos de muestreo; a continuación se presenta la gráfica 2.

Tabla 4. Frecuencia de EPCMN/1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1, de los tratamientos a distintos tiempos. Ampolleta A de *A. membranaceus*, estudio agudo.

| Tiempo | Tratamiento | Media | Error estándar |
|----------|-------------|-------|----------------|
| 0 Horas | MMS | 0.2 | 0.20 |
| | Control - | 0.0 | 0.00 |
| | 0.01 ml | 0.0 | 0.00 |
| | 0.02 ml | 0.0 | 0.00 |
| | 0.04 ml | 0.0 | 0.00 |
| | 0.06 ml | 0.2 | 0.20 |
| 24 Horas | MMS | 2.8 | 0.58 |
| | Control - | 0.0 | 0.00 |
| | 0.01 ml | 0.2 | 0.20 |
| | 0.02 ml | 0.6 | 0.40 |
| | 0.04 ml | 1.2 | 0.20 |
| | 0.06 ml | 0.8 | 0.48 |
| 48 Horas | MMS | 4.2 | 1.02 |
| | Control - | 0.2 | 0.20 |
| | 0.01 ml | 0.0 | 0.00 |
| | 0.02 ml | 0.4 | 0.24 |
| | 0.04 ml | 0.8 | 0.37 |
| | 0.06 ml | 0.0 | 0.00 |
| 72 Horas | MMS | 5.0 | 0.83 |
| | Control - | 0.4 | 0.24 |
| | 0.01 ml | 0.4 | 0.24 |
| | 0.02 ml | 0.0 | 0.00 |
| | 0.04 ml | 0.0 | 0.00 |
| | 0.06 ml | 0.0 | 0.00 |



Gráfica 2. Frecuencia de EPCM/ 1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta A de *A. membranaceus* estudio agudo.

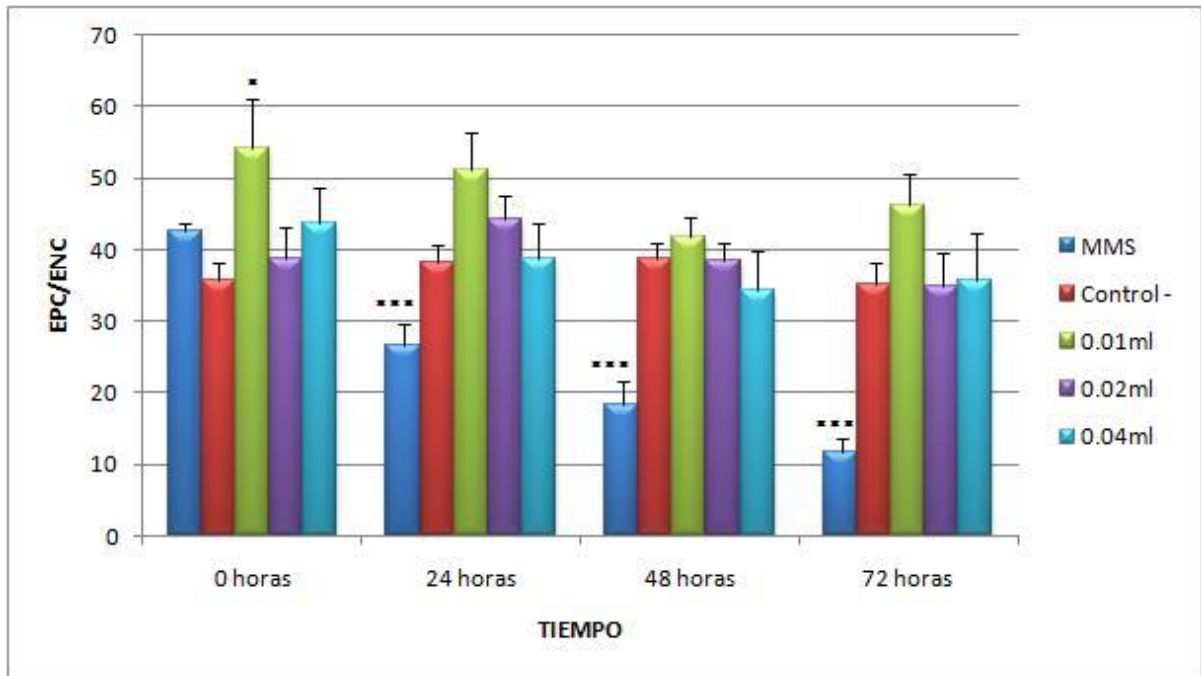
Se observa a las 24, 48 y 78 horas ***existe una diferencia entre el MMS y todos los tratamientos, con un $P < 0.001$. Tratamiento descriptivo. Comparación múltiple de Tukey.

- **Ampolleta B:**

En la tabla 5 se muestran los resultados del análisis descriptivo perteneciente a la frecuencia de EPC/1000 ENC en las muestras de sangre periférica de ratón con los tratamientos, en los diferentes tiempos de muestreo; se presenta a continuación la gráfica 3 correspondiente a dicha tabla.

Tabla 5. Frecuencia de EPC/1000 eritrocitos en sangre periférica de ratón CD1, de los diferentes tratamientos a distintos tiempos. Ampolleta B de *A. membranaceus*, ensayo agudo.

| Tiempo | Tratamiento | Media | Error estándar |
|----------|-------------|-------|----------------|
| 0 Horas | MMS | 42.6 | 1.12 |
| | Control - | 35.8 | 2.39 |
| | 0.01 ml | 54.2 | 6.83 |
| | 0.02 ml | 38.8 | 4.39 |
| | 0.04 ml | 43.8 | 4.99 |
| 24 Horas | MMS | 26.6 | 3.01 |
| | Control - | 38.2 | 2.67 |
| | 0.01 ml | 51.2 | 5.18 |
| | 0.02 ml | 44.2 | 3.38 |
| | 0.04 ml | 36.8 | 6.13 |
| 48 Horas | MMS | 18.2 | 3.45 |
| | Control - | 38.8 | 2.20 |
| | 0.01 ml | 41.8 | 2.72 |
| | 0.02 ml | 38.6 | 2.54 |
| | 0.04 ml | 32.4 | 6.52 |
| 72 Horas | MMS | 11.8 | 1.80 |
| | Control - | 35.2 | 2.92 |
| | 0.01 ml | 46.2 | 4.49 |
| | 0.02 ml | 35.0 | 4.57 |
| | 0.04 ml | 35.8 | 6.65 |



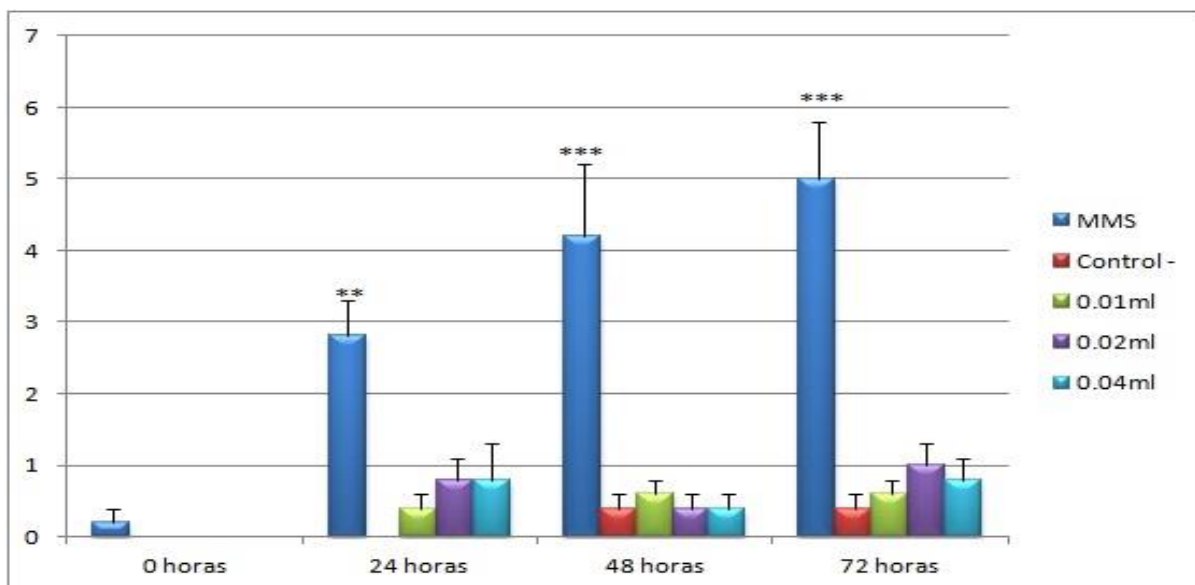
Gráfica 3. Frecuencia de EPC/ 1000 eritrocitos en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta B de *A. membranaceus*, estudio agudo.

En 0 horas hay una diferencia entre los datos del tratamiento de 0.01ml. En 24 y 48 y 72 horas se puede apreciar que *** existe una disminución de EPC pertenecientes al tratamiento con MMS con un $P < 0.05$; y los demás grupos. Tratamiento descriptivo Comparación múltiple de Tukey

En la Tabla 6 se muestran los resultados del análisis descriptivo de la frecuencia de EPCMN/1000 EPC de las muestras de sangre periférica de ratón con los tratamientos en los diferentes tiempos de muestreo; asimismo se presenta la gráfica 4 correspondiente.

Tabla 6. Frecuencia de EPCMN/1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1, de los tratamientos a distintos tiempos. Ampolleta B de *A. membranaceus*, estudio agudo.

| Tiempo | Tratamiento | Media | Error estándar |
|----------|-------------|-------|----------------|
| 0 Horas | MMS | 0.2 | 0.20 |
| | Control - | 0.0 | 0.00 |
| | 0.01 ml | 0.0 | 0.00 |
| | 0.02 ml | 0.0 | 0.00 |
| | 0.04 ml | 0.0 | 0.00 |
| 24 Horas | MMS | 2.8 | 0.58 |
| | Control - | 0.0 | 0.00 |
| | 0.01 ml | 0.4 | 0.24 |
| | 0.02 ml | 0.8 | 0.37 |
| | 0.04 ml | 0.8 | 0.58 |
| 48 Horas | MMS | 4.2 | 1.02 |
| | Control - | 0.4 | 0.24 |
| | 0.01 ml | 0.6 | 0.24 |
| | 0.02 ml | 0.4 | 0.24 |
| | 0.04 ml | 0.4 | 0.24 |
| 72 Horas | MMS | 5 | 0.83 |
| | Control - | 0.4 | 0.24 |
| | 0.01 ml | 0.6 | 0.24 |
| | 0.02 ml | 1.0 | 0.31 |
| | 0.04 ml | 0.8 | 0.37 |

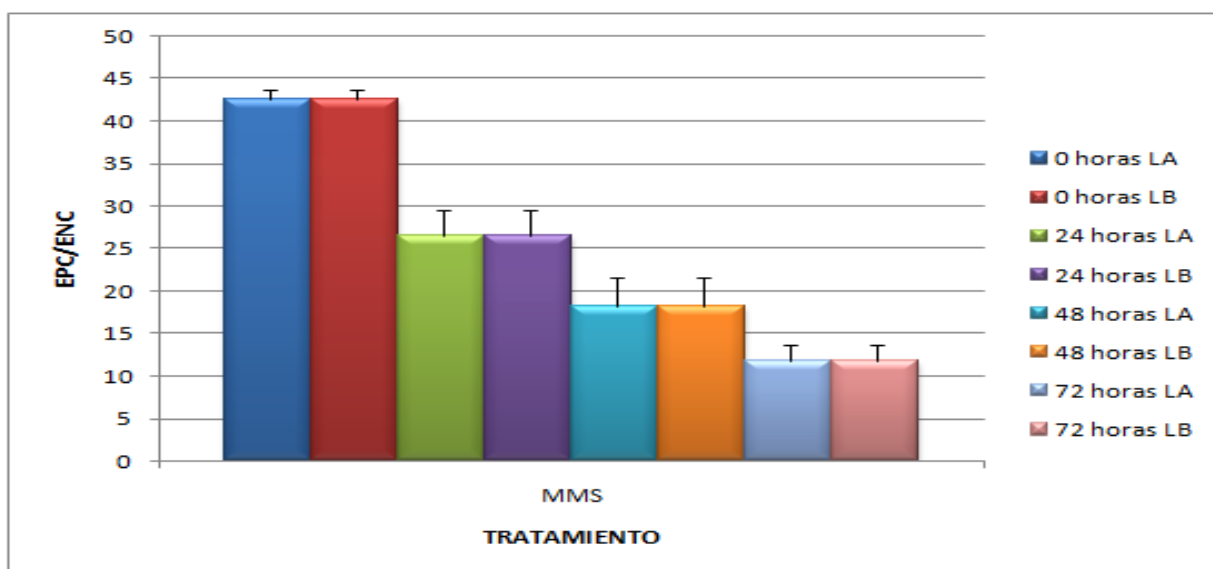


Gráfica 4: Frecuencia EPCMN/ 1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta B de *A. membranaceus*, estudio agudo.

A las 24 horas ** existe diferencia entre el MMS y los demás tratamientos, con un $P < 0.01$. A las 48 y 72 horas *** existe un aumento de EPCMN con el MMS, con un $P < 0.001$. Tratamiento descriptivo. Comparación múltiple de Tukey.

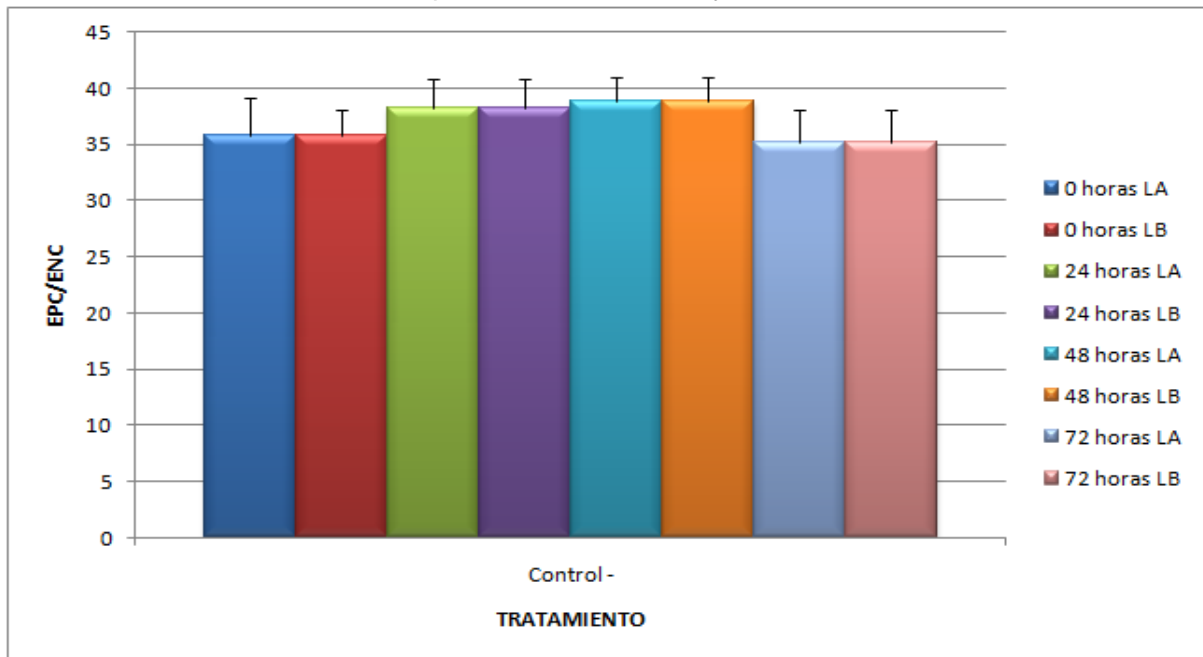
Comparación entre lotes A y B.

Se comparó tanto la frecuencia EPC/ENC, así como la frecuencia EPCMN/EPC de las dos ampolletas (A y B), para analizar si hay alguna diferencia entre ellos, ya que a pesar de que ambos ampolletas son producidas por el mismo laboratorio, no cuentan con las mismas características físicas (color, olor, aspecto). Se realizó un análisis descriptivo ANOVA y la prueba de Tukey de comparación múltiple. A continuación se muestran las gráficas 5 y 6 que se obtuvieron.



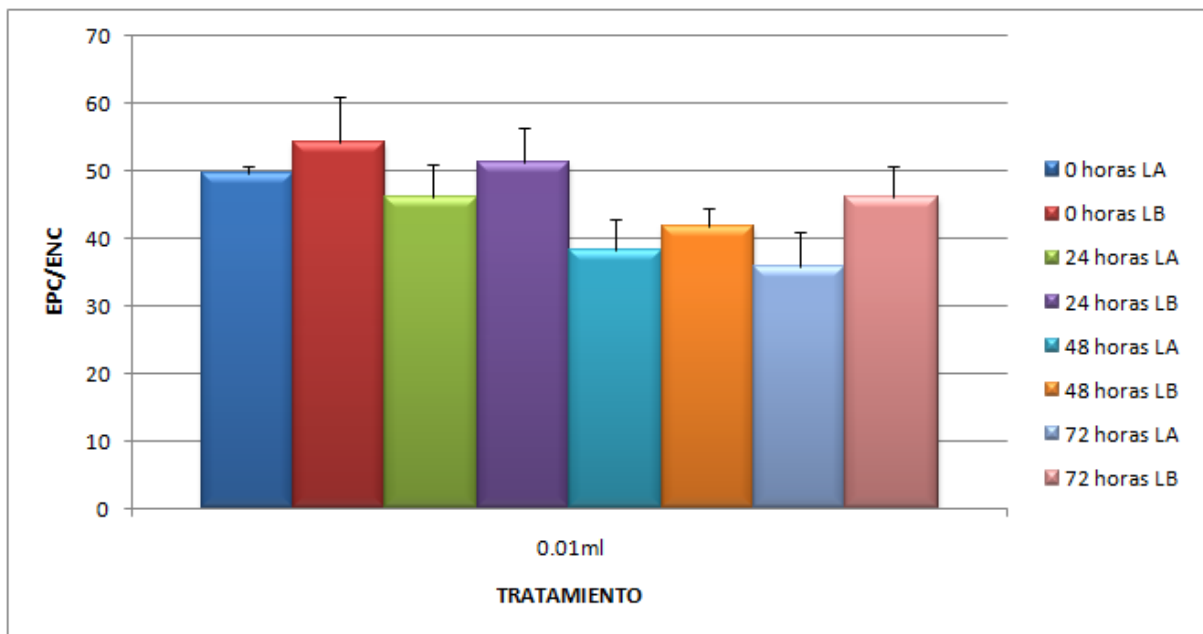
Gráfica 5. Comparación de la frecuencia EPC/ 1000 eritrocitos de los lotes manejados para MMS. Estudio agudo.

Se observa una diferencia en la disminución de los EPC como transcurre el tiempo del tratamiento comenzando con un promedio de 43 EPC y terminando en 12 EPC.



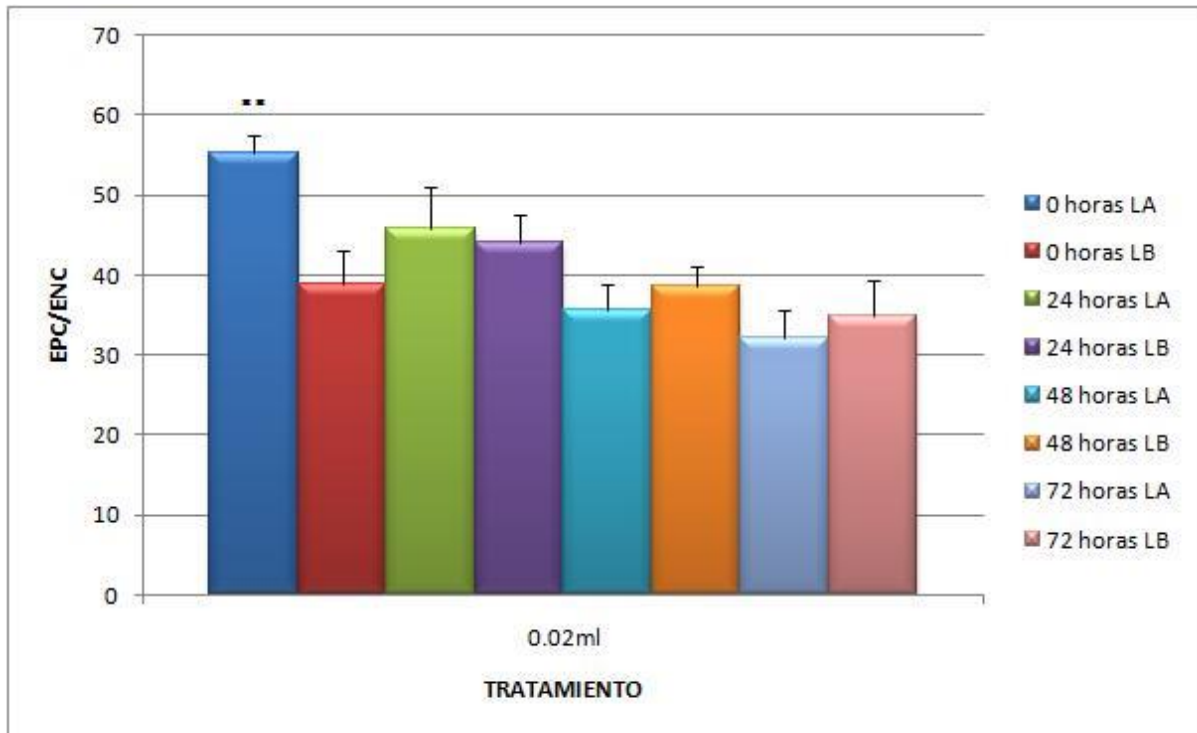
Gráfica 6. Comparación de la frecuencia de EPC/ 1000 eritrocitos del grupo control. Estudio Agudo.

En el grupo control no se observan diferencias considerables, se encuentran entre 35 a 40 EPC en promedio durante todo el tiempo de experimentación.



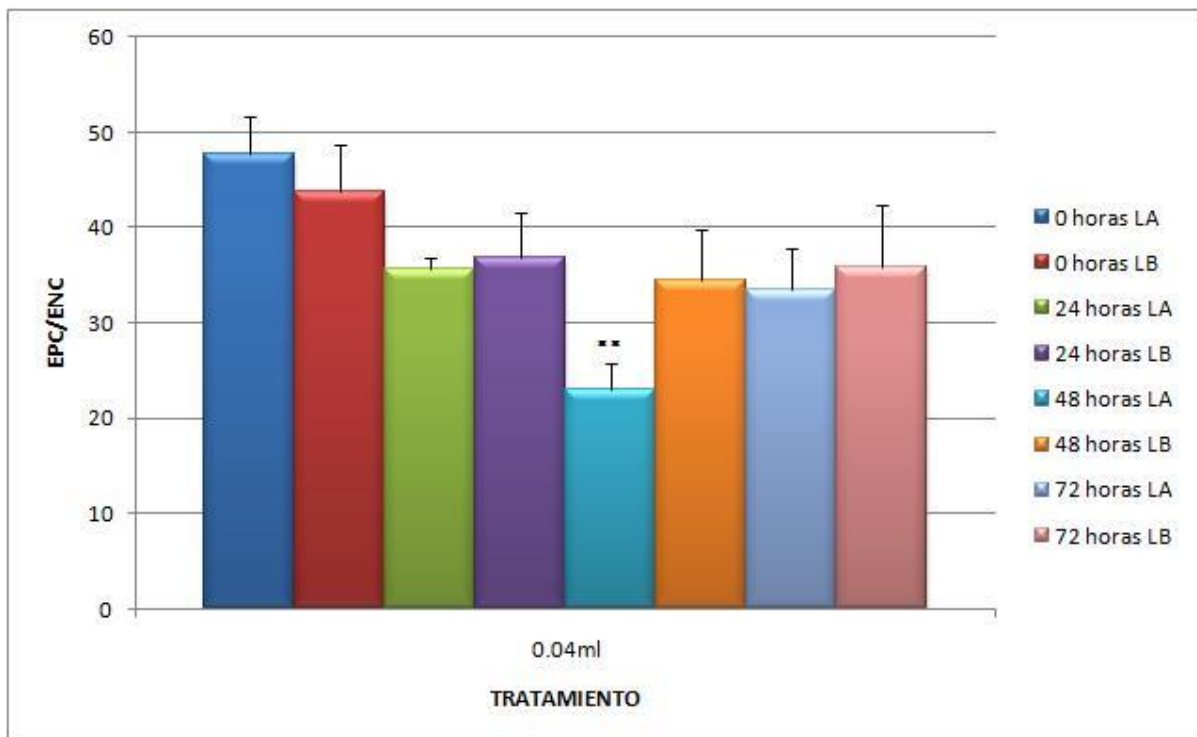
Gráfica 7. Comparación de la frecuencia de EPC/ 1000 eritrocitos de los grupos tratados a 0.01mL de ambas ampollas. Estudio Agudo.

No se observan diferencias entre ambas ampollas a una concentración de 0.01mL, ya que se observa una cantidad de EPC similar a la distinta toma de muestra.



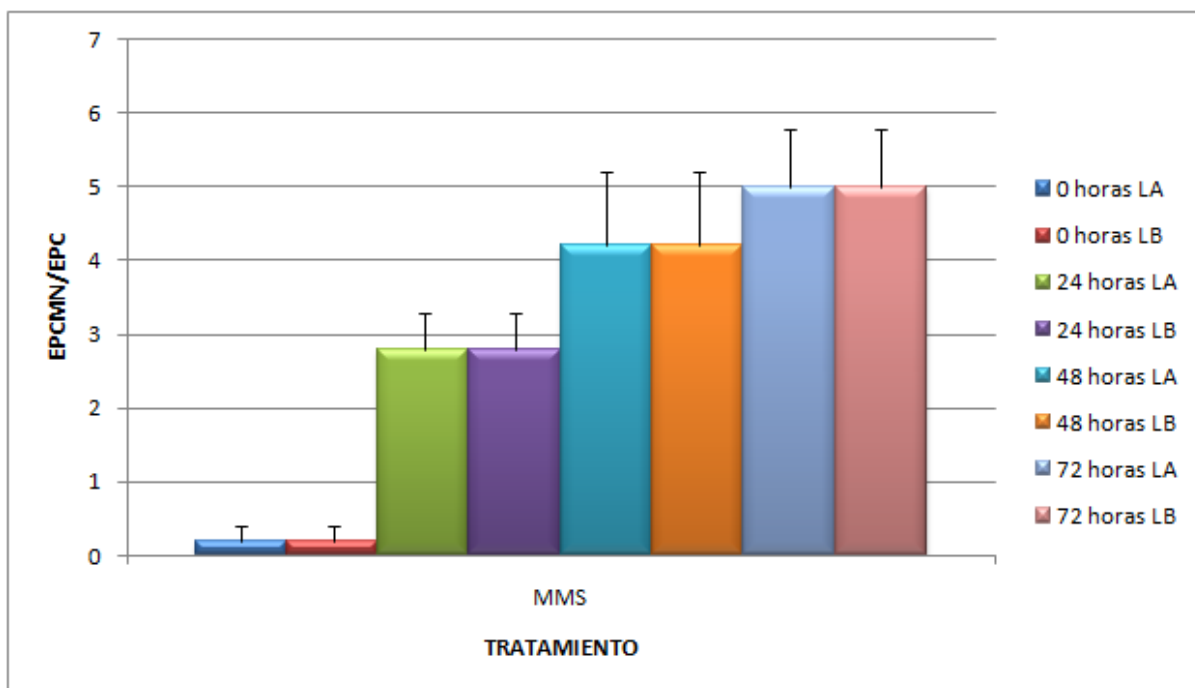
Gráfica 8. Comparación de la frecuencia de EPC/1000 eritrocitos de los grupos tratados a 0.02 mL de ambas ampolletas. Estudio Agudo.

En 0 horas el grupo de la ampolleta A, tiene una mayor cantidad de EPC, por lo cual se considera que hay una diferencia significativa respecto a este grupo con un $P < 0.01$, sin embargo en el resto del experimento ambas ampolletas tienen comportamiento similar.



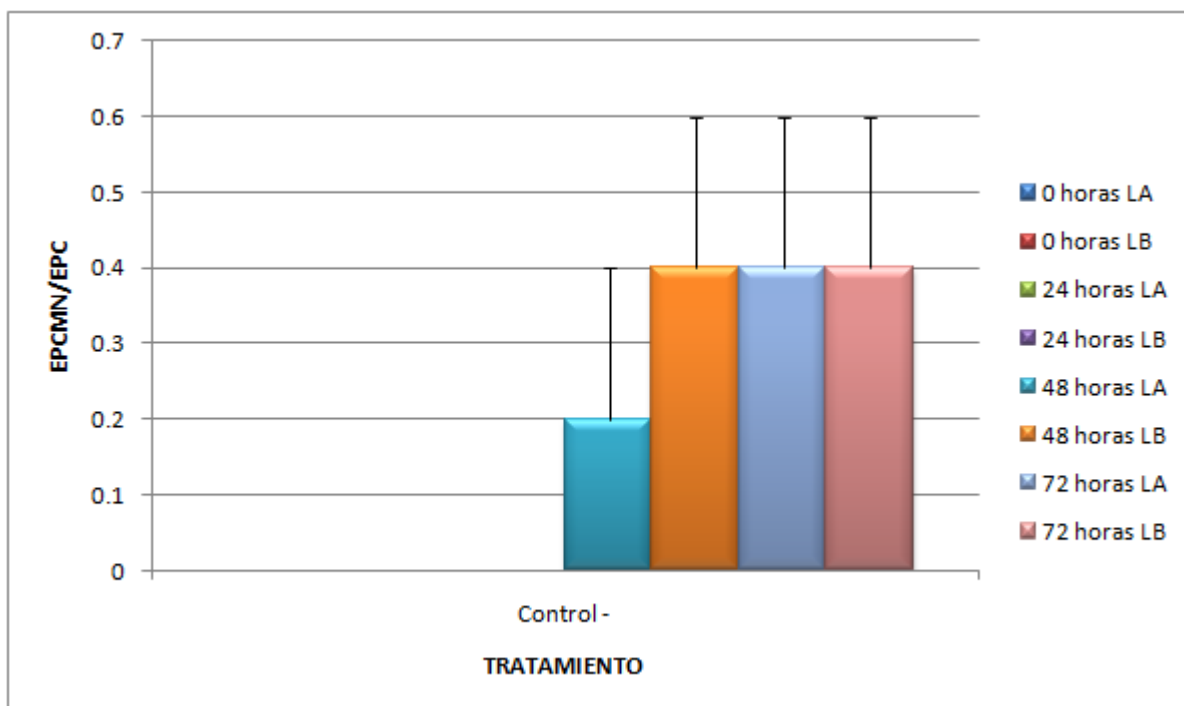
Gráfica 9. Comparación de la frecuencia de EPC/ 1000 eritrocitos de grupos tratados a 0.04 ml de ambas ampolletas. Estudio Agudo.

A las 48 horas de la ampolleta A presenta una disminución de los EPC con un $P < 0.01$, mientras que en los otros tiempos de muestra se comportan de forma similar.



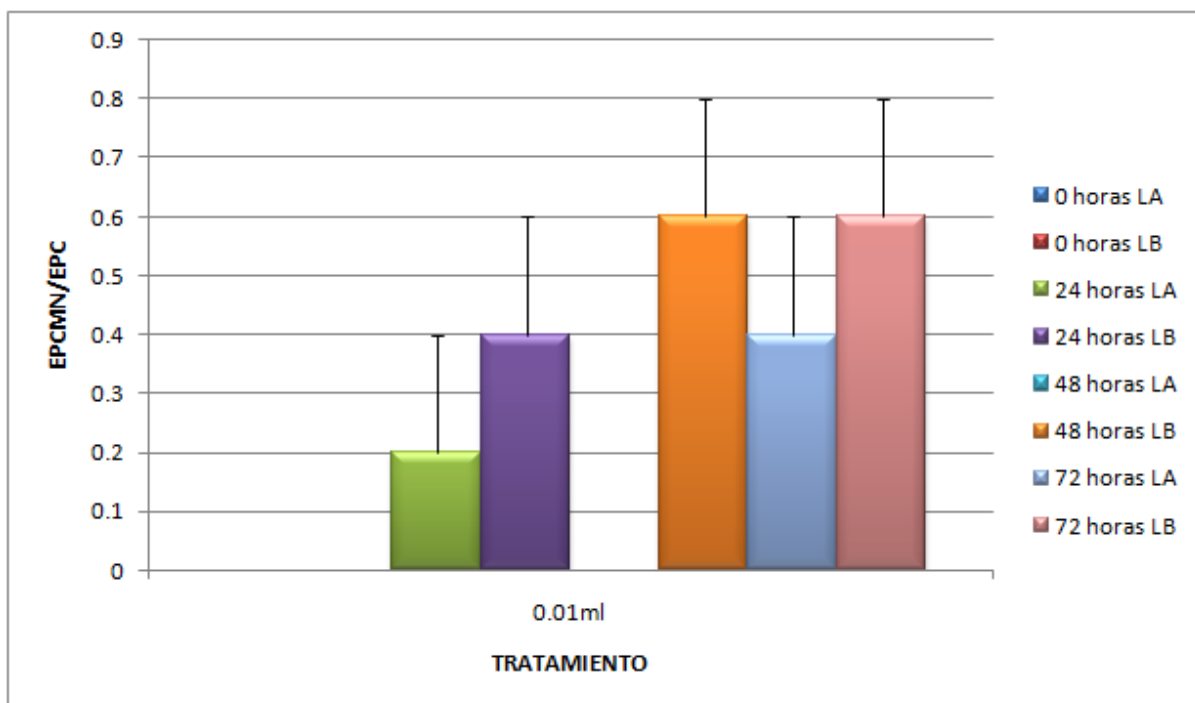
Gráfica 10. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de grupos tratados con MMS. Ensayo Agudo.

Se observa que conforme transcurre el tiempo, se presenta un aumento de micronúcleos, creando una diferencia altamente significativa.



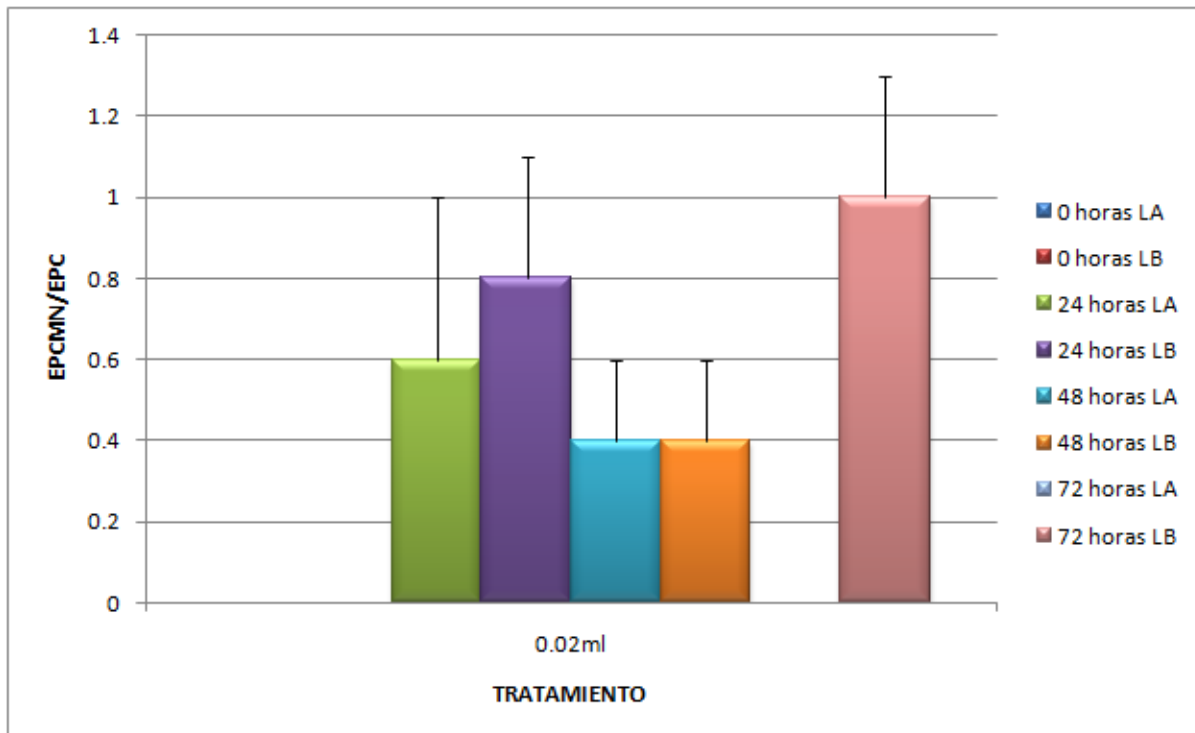
Gráfica 11. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de los grupos control. Estudio Agudo

No se muestra diferencias a las diversas horas de tomas de muestra, ya que no se alcanza a un micronúcleo en promedio.



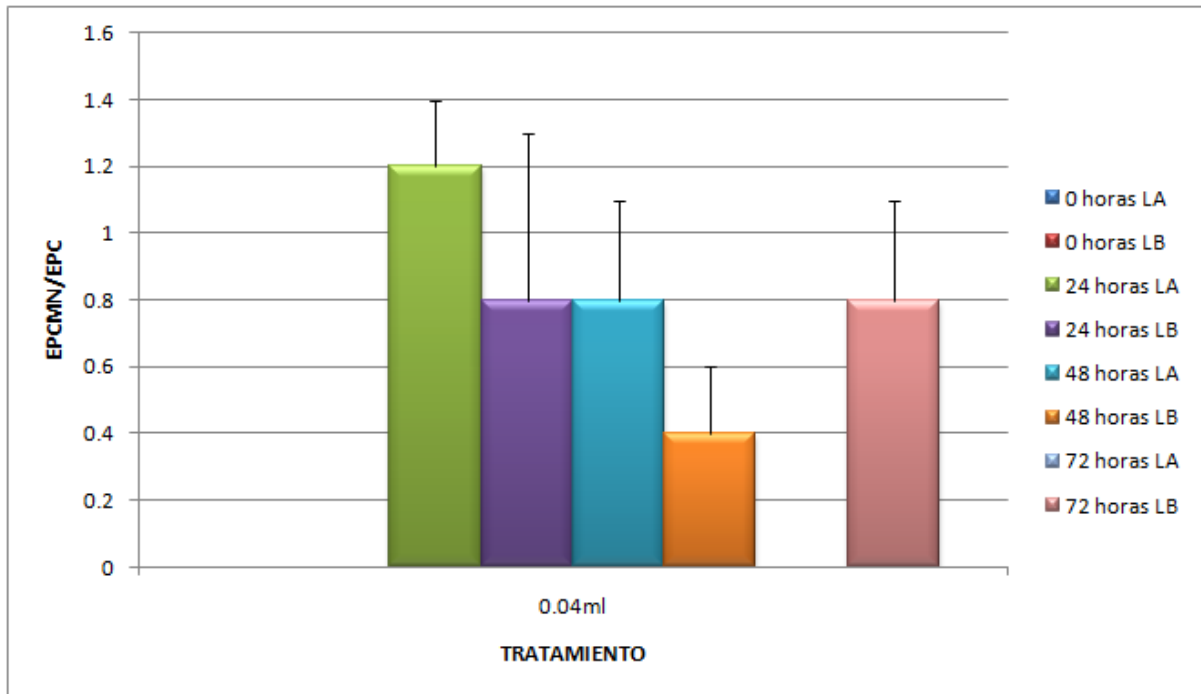
Gráfica 12. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de los grupos con un tratamiento de 0.01 mL con ambas ampolletas. Estudio Agudo.

No se muestran diferencias significativas, si hay presencia de micronúcleos pero no rebasa el índice normal.



Gráfica 13. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de los grupos con tratamiento de 0.02 mL en ambas ampolletas. Estudio Agudo.

No hay diferencias significativas. Ambas ampolletas tienen el mismo comportamiento.



Gráfica 14. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de los grupos tratados a 0.04 mL con ambas ampolletas. Estudio Agudo.

No se presentan diferencias durante las tomas de muestra

ESTUDIO SUBCRÓNICO

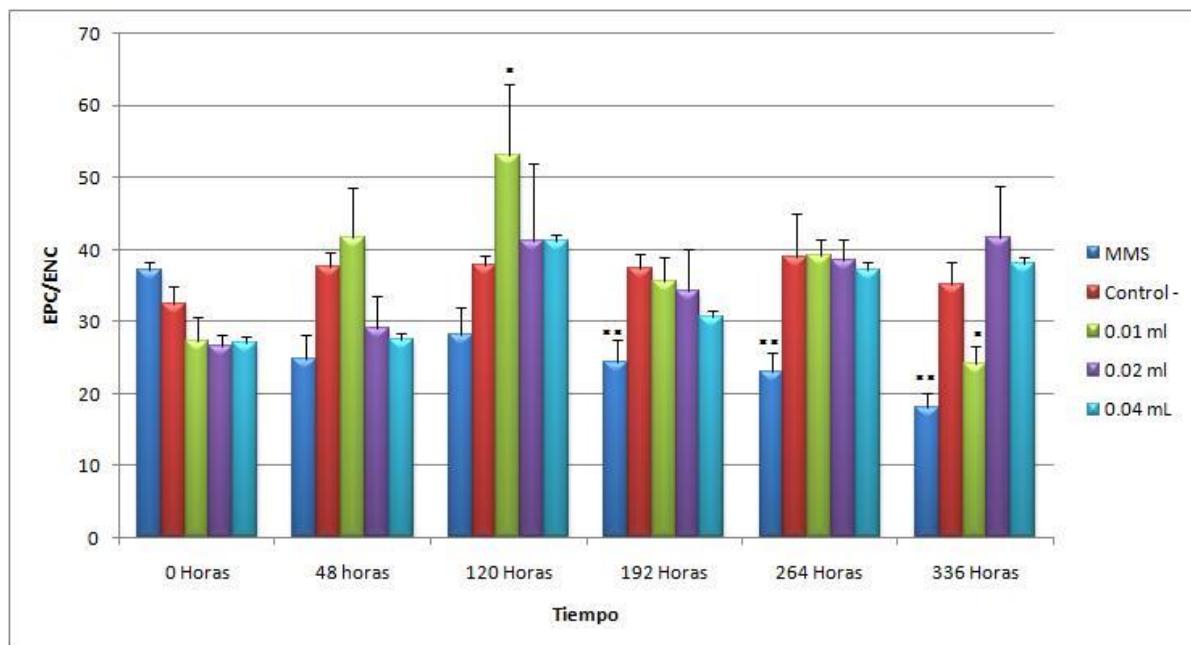
- **Lote A:**

En la tabla 7 se observa los resultados del análisis descriptivo de la frecuencia de EPC/1000 ENC de sangre periférica de ratón con los distintos tratamientos realizados, a los diferentes tiempos de muestreo; a continuación, se muestra la gráfica correspondiente a dicha tabla.

Tabla 7. Frecuencia de EPC/1000 eritrocitos en sangre periférica de ratón CD1 en diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta A de *A. membranaceus*, estudio subcrónico.

| Tiempo | Tratamiento | Media | Error estándar |
|-----------|-------------|-------|----------------|
| 0 horas | MMS | 37.2 | 1.11 |
| | Control - | 32.4 | 2.52 |
| | 0.01 mL | 27.2 | 3.44 |
| | 0.02 mL | 26.6 | 1.63 |
| | 0.04 mL | 27.0 | 3.11 |
| 48 horas | MMS | 24.8 | 3.42 |
| | Control - | 37.6 | 2.01 |
| | 0.01 mL | 41.6 | 7.01 |
| | 0.02 mL | 29.0 | 4.62 |
| | 0.04 mL | 27.4 | 4.63 |
| 120 horas | MMS | 28.2 | 3.87 |
| | Control - | 37.8 | 1.49 |
| | 0.01 mL | 53.0 | 10.08 |
| | 0.02 mL | 41.2 | 10.76 |
| | 0.04 mL | 41.2 | 9.45 |
| 192 horas | MMS | 24.4 | 2.99 |
| | Control - | 37.4 | 2.06 |
| | 0.01 mL | 35.2 | 3.45 |
| | 0.02 mL | 34.2 | 5.82 |
| | 0.04 mL | 30.6 | 4.22 |
| 264 horas | MMS | 23.0 | 2.77 |
| | Control - | 39.0 | 6.09 |
| | 0.01 mL | 39.2 | 2.33 |
| | 0.02 mL | 38.4 | 2.96 |
| | 0.04 mL | 37.2 | 7.92 |

| | | | |
|-----------|-----------|------|------|
| 366 horas | MMS | 18.0 | 2.00 |
| | Control - | 35.2 | 3.61 |
| | 0.01 mL | 42.2 | 2.47 |
| | 0.02 mL | 41.6 | 7.16 |
| | 0.04 mL | 38.0 | 5.07 |



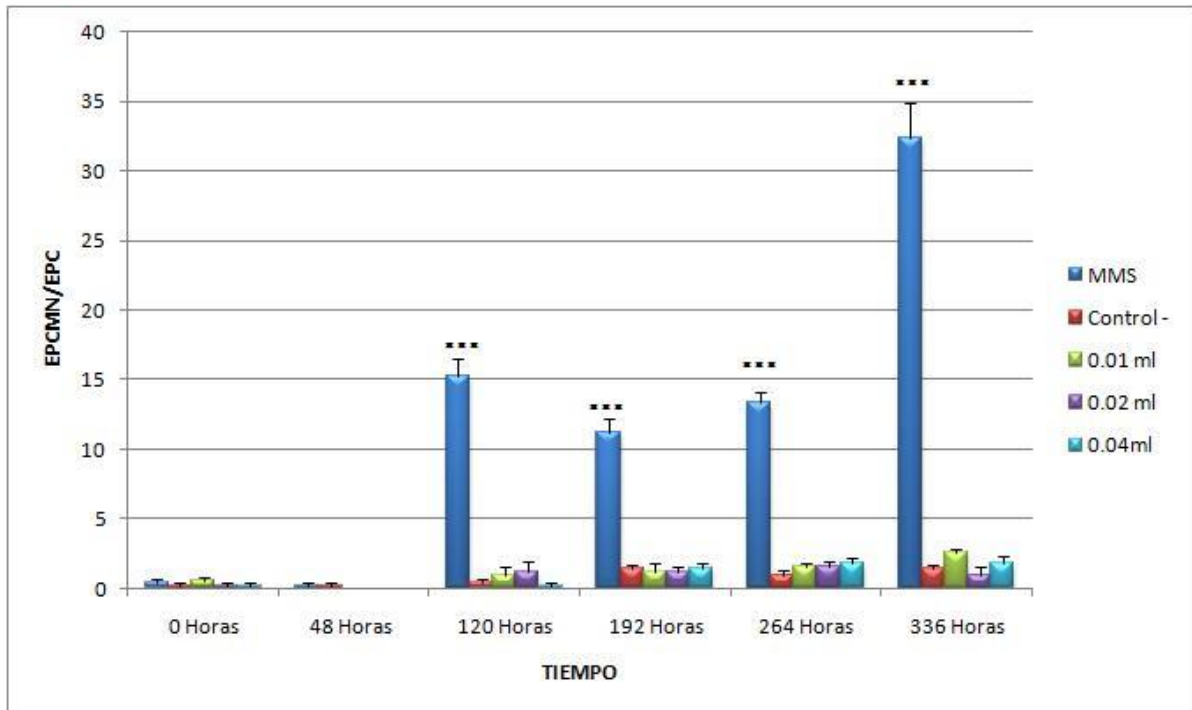
Gráfica 15. Frecuencia de EPC/1000 eritrocitos en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta A de *A. membranaceus*, ensayo subcrónico.

A las 120 y 336 horas se puede apreciar una diferencia significativa * en el tratamiento de 0.01 mL con respecto al control negativo con un $P < 0.05$; de igual forma a las 192, 264 y 336 horas hay diferencia significativa entre el MMS y el control negativo, con $P < 0.01$. Tratamiento descriptivo Comparación múltiple de Tukey.

En la tabla 8 se muestran los resultados del análisis descriptivo de la relación EPCMN/ 1000 EPC, con los distintos tratamientos empleados a los diferentes tiempos de toma de muestra, se presentan en la gráfica no. 16.

Tabla 8. Frecuencia de EPCMN/1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1 en diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta A de *A. membranaceus*, estudio subcrónico.

| Tiempo | Tratamiento | Media | Error estándar |
|-----------|-------------|-------|----------------|
| 0 horas | MMS | 0.4 | 0.24 |
| | Control - | 0.2 | 0.20 |
| | 0.01 mL | 0.6 | 0.24 |
| | 0.02 mL | 0.2 | 0.20 |
| | 0.04 mL | 0.2 | 0.20 |
| 48 horas | MMS | 0.2 | 0.20 |
| | Control - | 0.2 | 0.20 |
| | 0.01 mL | 0.0 | 0.00 |
| | 0.02 mL | 0.0 | 0.00 |
| | 0.04 mL | 0.0 | 0.00 |
| 120 horas | MMS | 8.8 | 1.35 |
| | Control - | 0.4 | 0.24 |
| | 0.01 mL | 1.0 | 0.54 |
| | 0.02 mL | 1.2 | 0.73 |
| | 0.04 mL | 1.2 | 0.48 |
| 192 horas | MMS | 7.8 | 1.02 |
| | Control - | 1.4 | 0.24 |
| | 0.01 mL | 1.2 | 0.58 |
| | 0.02 mL | 1.2 | 0.37 |
| | 0.04 mL | 1.4 | 0.40 |
| 264 horas | MMS | 11.8 | 1.90 |
| | Control - | 1.0 | 0.31 |
| | 0.01 mL | 1.6 | 0.24 |
| | 0.02 mL | 1.6 | 0.40 |
| | 0.04 mL | 1.8 | 0.37 |
| 366 horas | MMS | 31.2 | 2.22 |
| | Control - | 1.4 | 0.22 |
| | 0.01 mL | 2.2 | 0.37 |
| | 0.02 mL | 1.4 | 0.40 |
| | 0.04 mL | 2.6 | 0.40 |



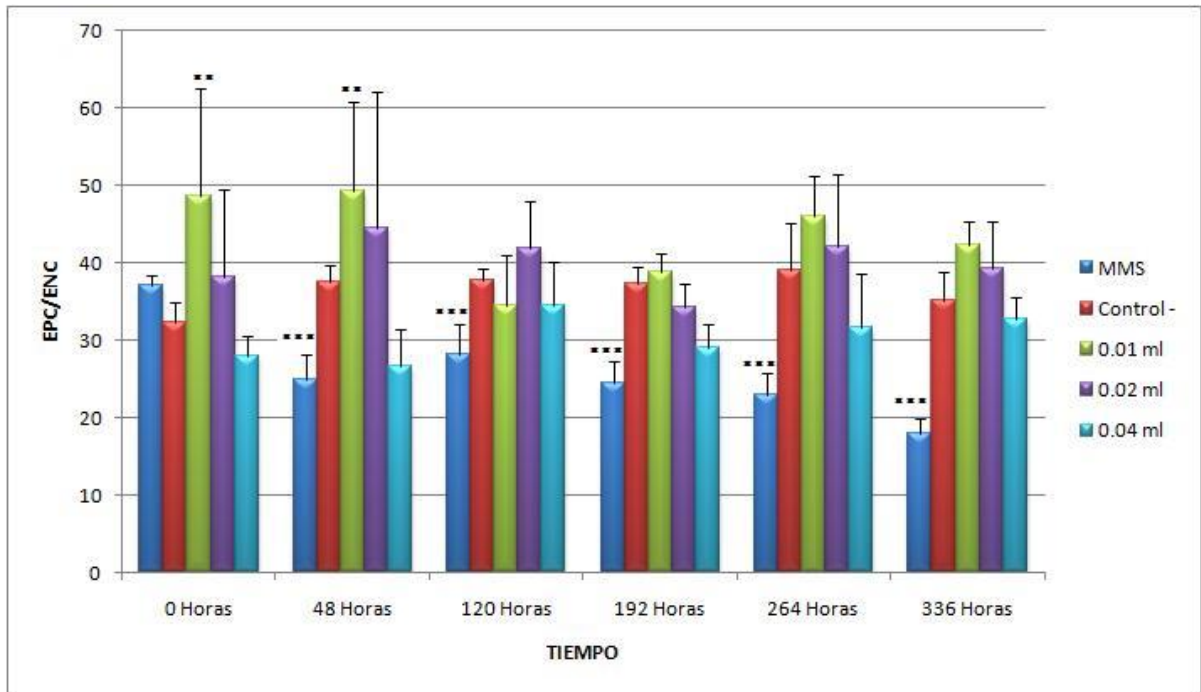
Gráfica 16. Frecuencia de EPCMN/1000 ENC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta A A de *A. membranaceus*, ensayo subcrónico.

Se observa que a partir de las 120 horas existe una diferencia significativa, entre el MMS y los tratamientos con un $P < 0.001$. Comparación múltiple de Tukey.

En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos del análisis descriptivo de los frotis de la sangre periférica de ratón con los tratamientos y tiempos de toma de muestra, del lote B, así como la gráfica 17 correspondiente a dicha tabla.

Tabla 9. Frecuencia de EPC/1000 eritrocitos en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta B de *A. membranaceus*, estudio subcrónico.

| Tiempo | Tratamiento | Media | Error estándar |
|-----------|-------------|-------|----------------|
| 0 horas | MMS | 37.2 | 1.11 |
| | Control - | 32.4 | 2.52 |
| | 0.01 mL | 48.6 | 13.93 |
| | 0.02 mL | 38.2 | 11.27 |
| | 0.04 mL | 28.0 | 2.51 |
| 48 horas | MMS | 24.8 | 3.42 |
| | Control - | 37.6 | 2.01 |
| | 0.01 mL | 49.2 | 11.65 |
| | 0.02 mL | 44.8 | 17.68 |
| | 0.04 mL | 26.6 | 4.73 |
| 120 horas | MMS | 28.2 | 3.87 |
| | Control - | 37.8 | 1.49 |
| | 0.01 mL | 34.4 | 6.62 |
| | 0.02 mL | 41.8 | 6.15 |
| | 0.04 mL | 34.4 | 5.81 |
| 192 horas | MMS | 24.4 | 2.99 |
| | Control - | 37.4 | 2.06 |
| | 0.01 mL | 38.8 | 2.41 |
| | 0.02 mL | 34.2 | 6.63.188 |
| | 0.04 mL | 29.0 | 3.13 |
| 264 horas | MMS | 23.0 | 2.77 |
| | Control - | 39.0 | 6.09 |
| | 0.01 mL | 46.2 | 5.25 |
| | 0.02 mL | 42.2 | 9.33 |
| | 0.04 mL | 31.6 | 7 |
| 366 horas | MMS | 18.0 | 2.00 |
| | Control - | 35.2 | 3.61 |
| | 0.01 mL | 42.4 | 2.94 |
| | 0.02 mL | 47.0 | 5.68 |
| | 0.04 mL | 35.6 | 4.64 |



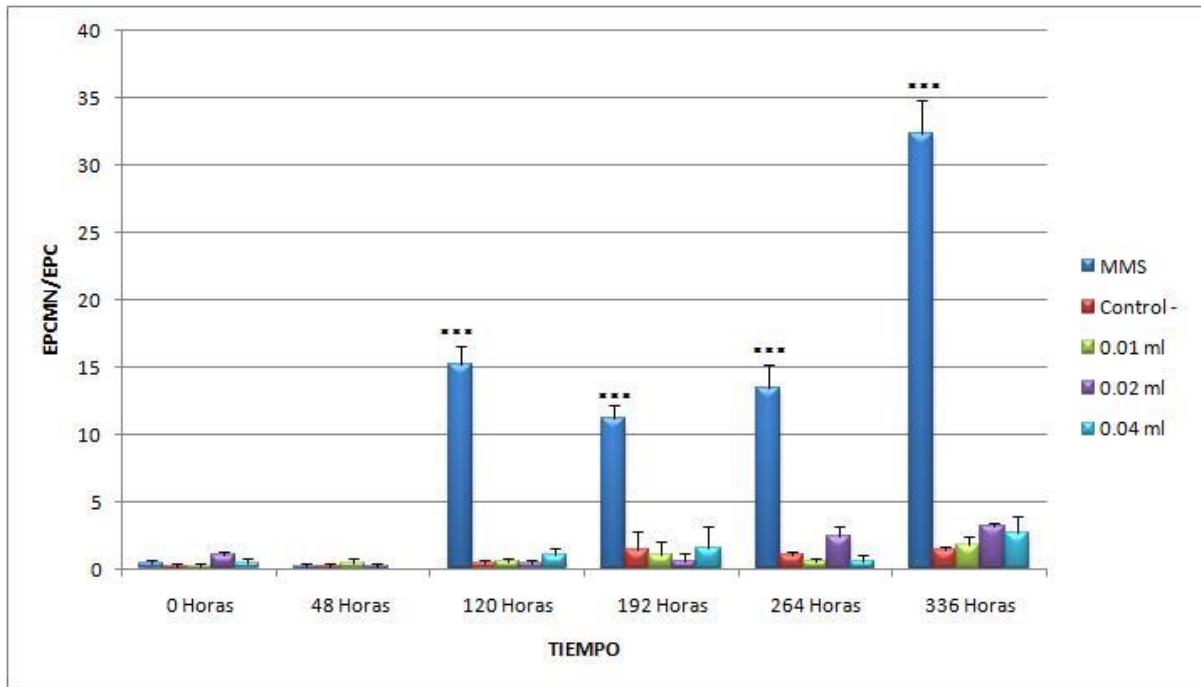
Gráfica 17. Frecuencia de EPC/1000 eritrocitos en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta B de *A. membranaceus*, ensayo subcrónico.

En la gráfica se muestra una diferencia significativa entre el lote con tratamiento de 0.01 mL y el control negativo en las horas 0 y 48. Con valor de $P < 0.01$. ** Por otra parte se observa también la diferencia por el MMS con respecto al control negativo a las 48, 120, 192, 264 y 336. *** con un $P < 0.001$. Comparación múltiple de Tukey.

A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis descriptivo de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC a diferentes tiempos y tratamientos del lote B así como su gráfica 18 correspondiente.

Tabla 10. Frecuencia de EPCMN/1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1, en diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta B de *A. membranaceus*, estudio subcrónico.

| Tiempo | Tratamiento | Media | Error estándar |
|-----------|-------------|-------|----------------|
| 0 horas | MMS | 0.4 | 0.24 |
| | Control - | 0.0 | 0.00 |
| | 0.01 mL | 0.4 | 0.24 |
| | 0.02 mL | 1.0 | 0.31 |
| | 0.04 mL | 0.8 | 0.37 |
| 48 horas | MMS | 0.2 | 0.20 |
| | Control - | 0.4 | 0.24 |
| | 0.01 mL | 0.6 | 0.40 |
| | 0.02 mL | 0.2 | 0.20 |
| | 0.04 mL | 0.4 | 0.24 |
| 120 horas | MMS | 8.8 | 1.35 |
| | Control - | 0.8 | 0.20 |
| | 0.01 mL | 0.8 | 0.20 |
| | 0.02 mL | 0.4 | 0.24 |
| | 0.04 mL | 1.0 | 0.54 |
| 192 horas | MMS | 7.8 | 1.02 |
| | Control - | 1.0 | 0.31 |
| | 0.01 mL | 1.0 | 0.31 |
| | 0.02 mL | 0.6 | 0.40 |
| | 0.04 mL | 1.8 | 0.37 |
| 264 ho | MMS | 11.8 | 1.9 |
| | Control - | 1.4 | 0.50 |
| | 0.01 mL | 0.6 | 0.24 |
| | 0.02 mL | 2.0 | 0.94 |
| | 0.04 mL | 0.6 | 0.24 |
| 366 horas | MMS | 31.2 | 2.22 |
| | Control - | 2.4 | 0.24 |
| | 0.01 mL | 1.2 | 0.37 |
| | 0.02 mL | 3.0 | 0.31 |
| | 0.04 mL | 2.6 | 0.92 |

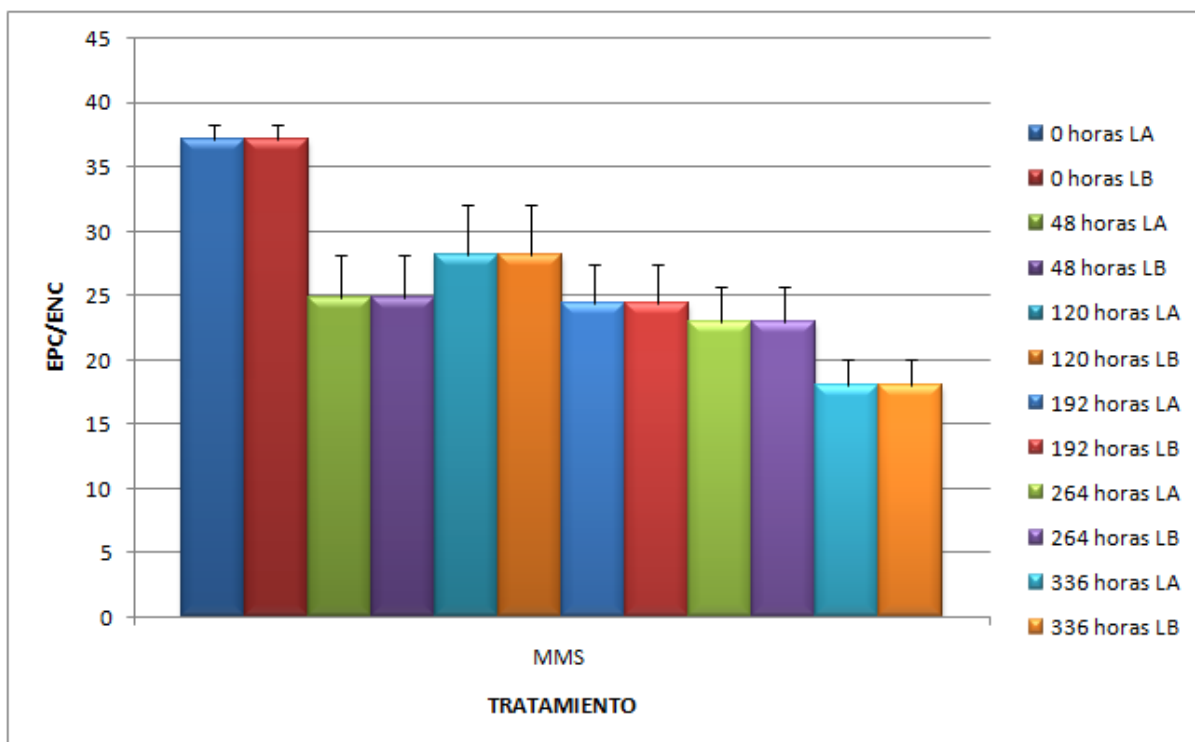


Gráfica 18. Frecuencia de EPCMN/1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1 a diferentes tiempos y tratamientos. Ampolleta B de *A. membranaceus*, ensayo subcrónico.

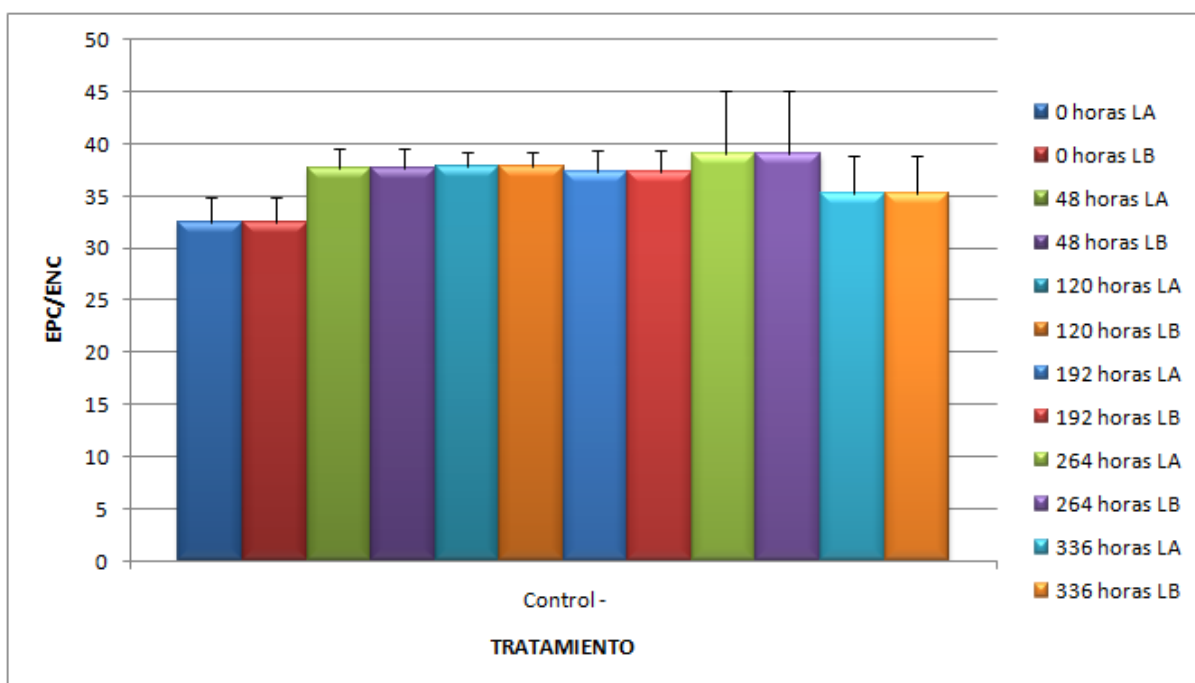
Como se puede observar existe una diferencias significativa entre el MMS y los tratamientos*** desde las 120 horas con un $P < 0.001$. Comparación múltiple de Tukey.

Comparación de los lotes A y B en el estudio subcrónico

De la misma forma que se realizó en el estudio agudo, también se comparó entre ampollas del estudio subcrónico, tanto de la frecuencia EPC/ 1000 eritrocitos y EPCMN/ EPC; realizando un ANOVA y una prueba de Tukey de comparación múltiple.

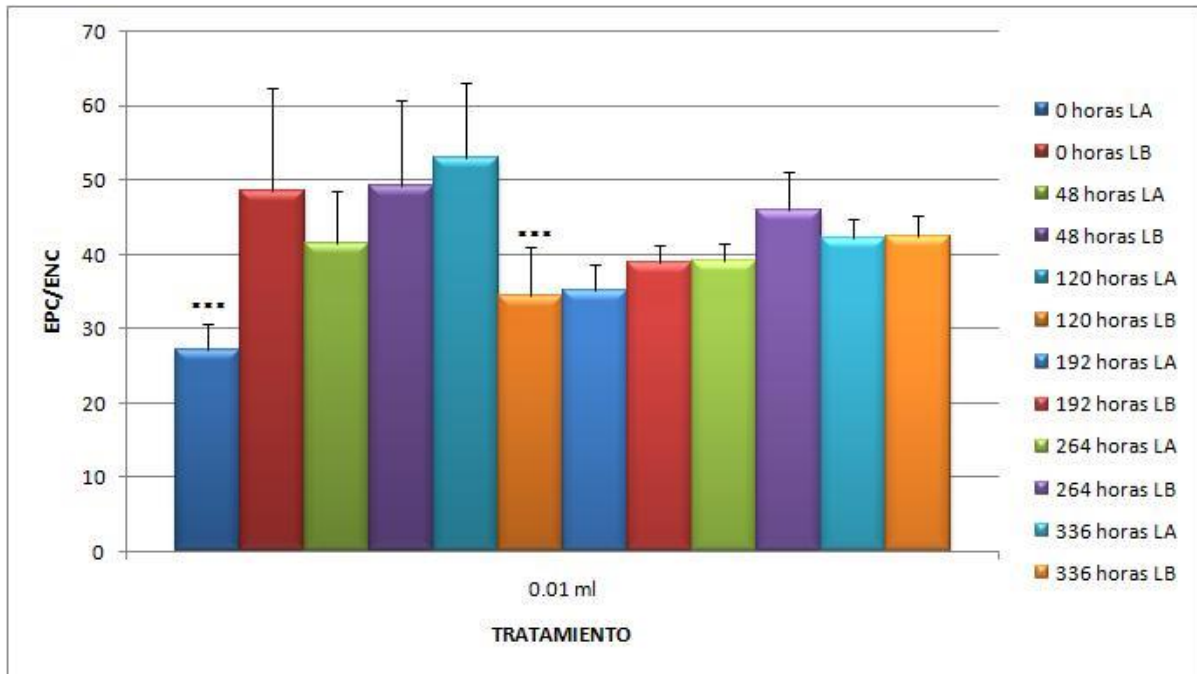


Gráfica 19. Comparación de la frecuencia EPC/ 1000 eritrocitos de MMS. Estudio subcrónico. Se observa una disminución de los EPC con respecto pasa el tiempo



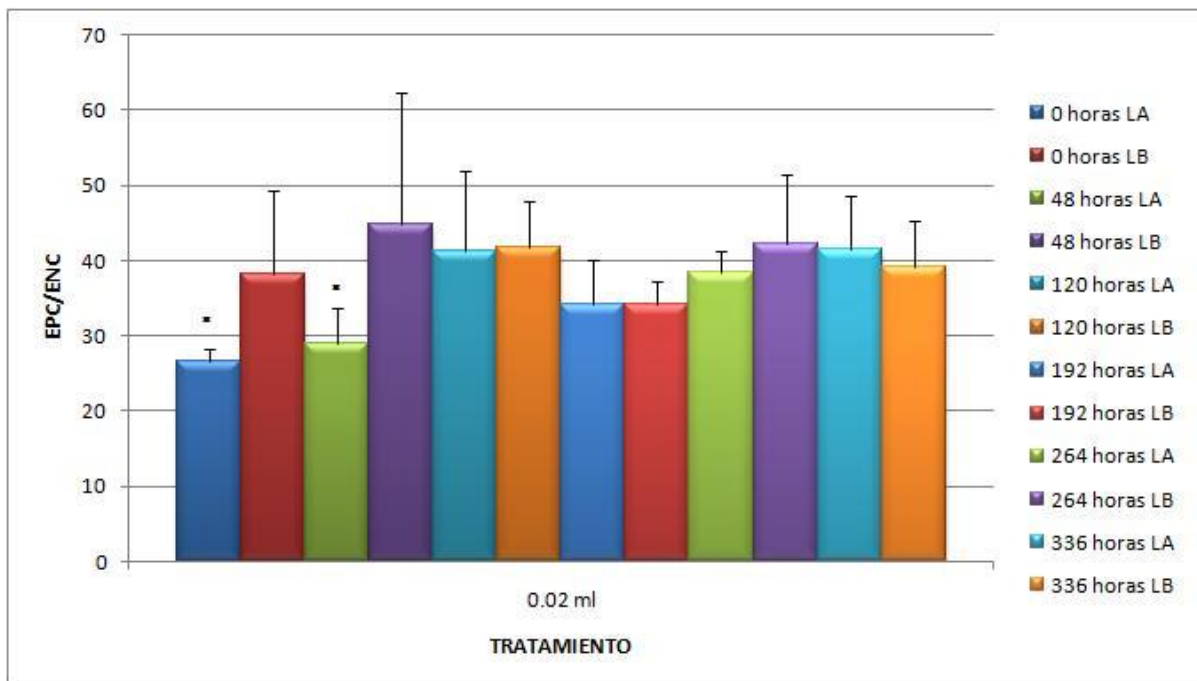
Gráfica 20. Comparación de la frecuencia EPC / 1000 eritrocitos del grupo control. Estudio subcrónico.

No se muestran diferencias significativas.



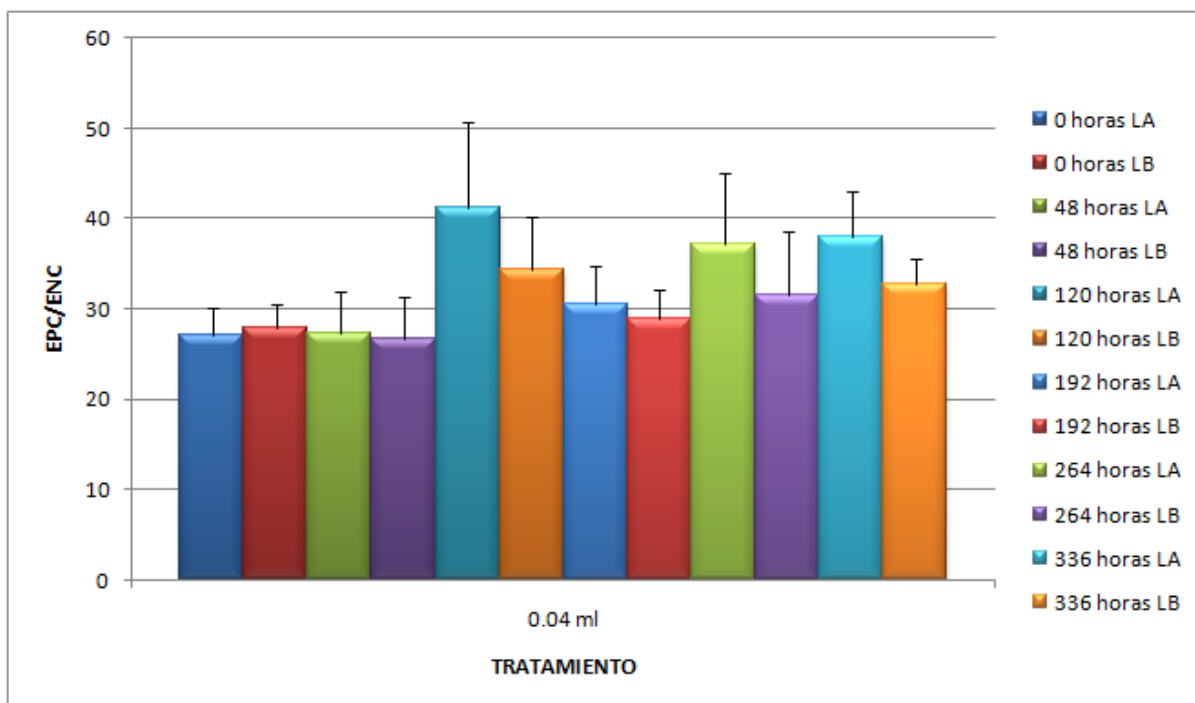
Gráfica 21. Comparación de la frecuencia EPC/ 1000 eritrocitos de los grupos con tratamiento a 0.01mL, de ambas ampolletas. Estudio subcrónico

En 0 horas existe una diferencia con un $P < 0.001$, a las 120 horas hay una diferencia perteneciente a la ampolleta B



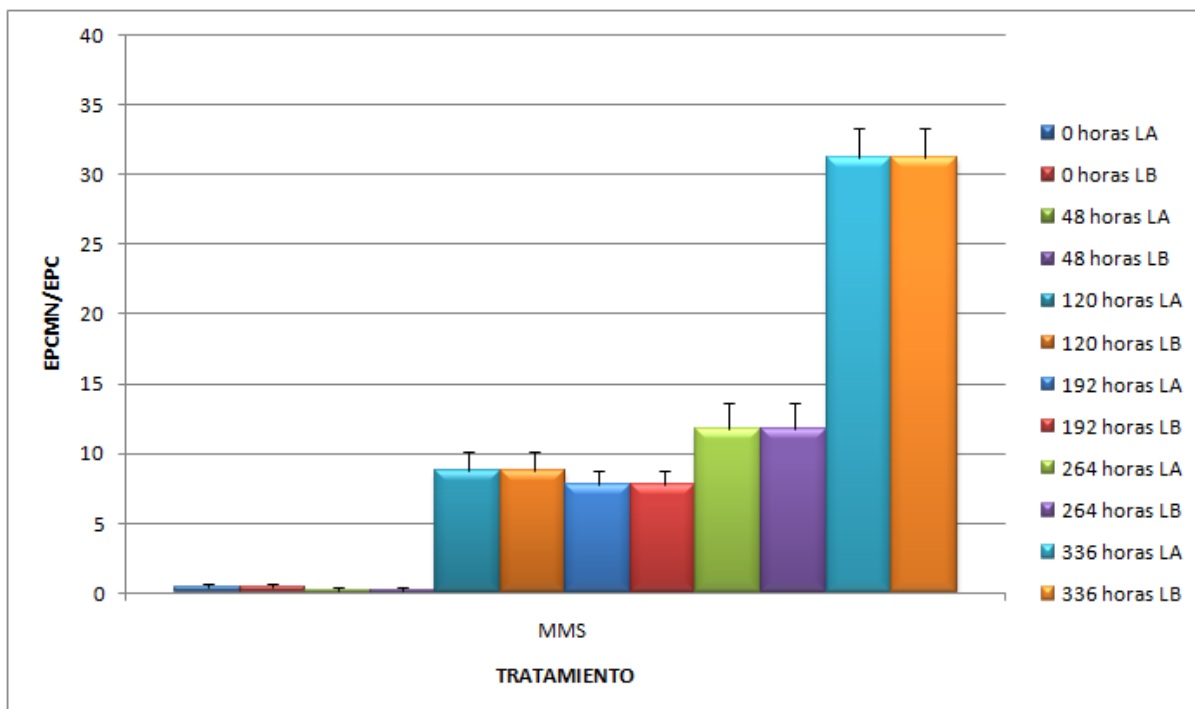
Grafica 22. Comparación de la frecuencia EPC/ 1000 eritrocitos de los grupos tratados a 0.02mL, para ambas ampolletas. Estudio subcrónico.

La ampolleta A presenta una diferencia tanto a las 0 y las 48 horas con un $P < 0.05$.



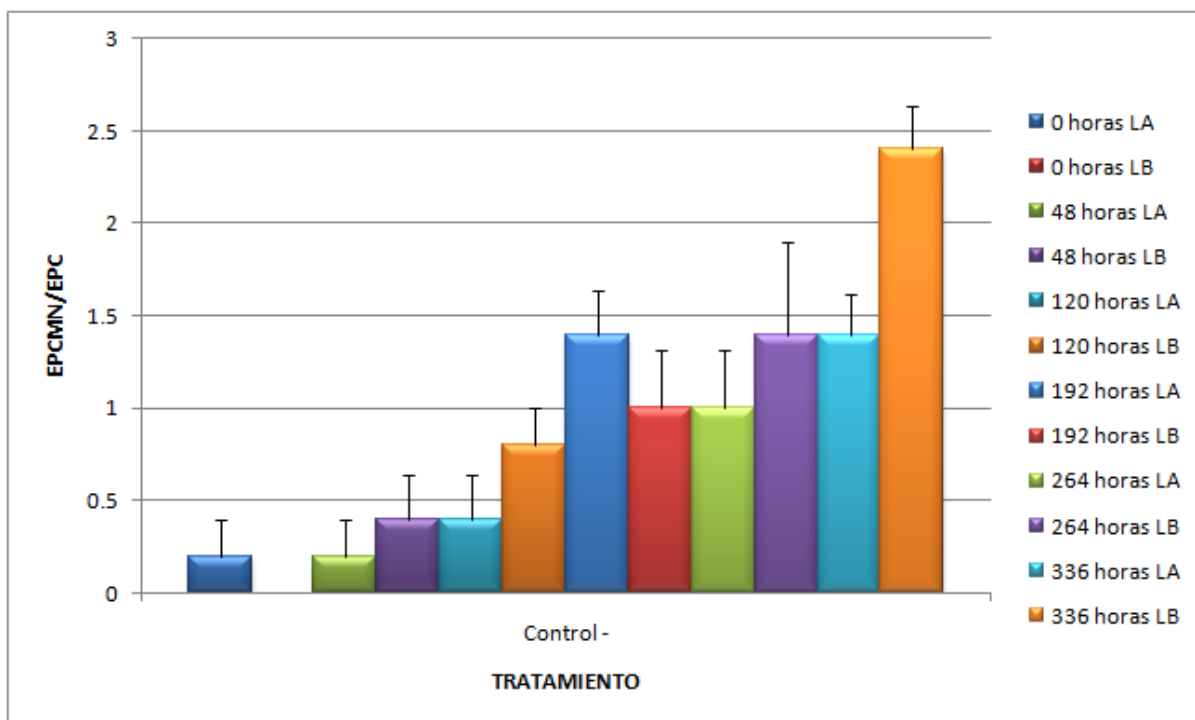
Gráfica 23. Comparación de la frecuencia de EPC/ 1000 eritrocitos de los grupos tratados con 0.04mL, de ambas ampolletas. Estudio subcrónico.

Se observa un aumento a las 120 horas de parte de la ampolleta A, sin embargo este aumento no proporciona una diferencia que se pueda tomar como significativa.



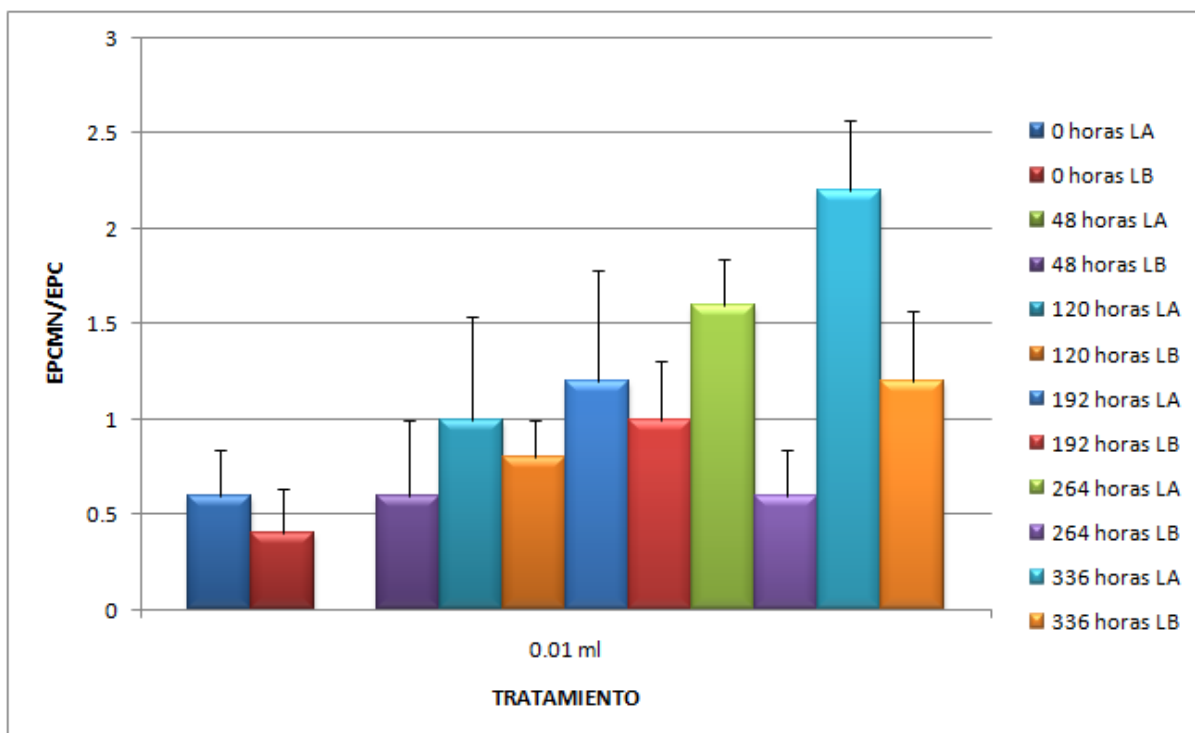
Gráfica 24. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC del tratamiento con MMS. Estudio subcrónico.

Se presenta un aumento de EPCMN con respecto al tiempo, este aumento es tan grande que genera una diferencia altamente significativa con respecto a los demás grupos.



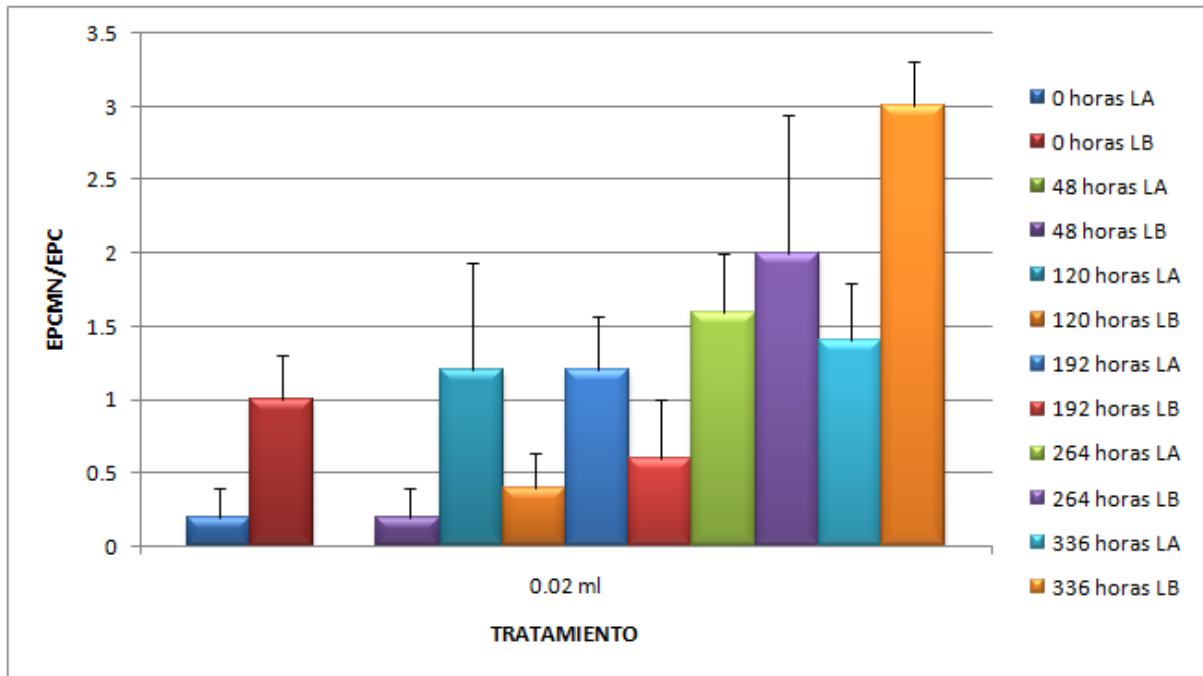
Gráfica 25. Comparación de la frecuencia de EPCMn/ 1000 EPC del grupo control. Estudio Subcrónico.

No se observan diferencias significativas



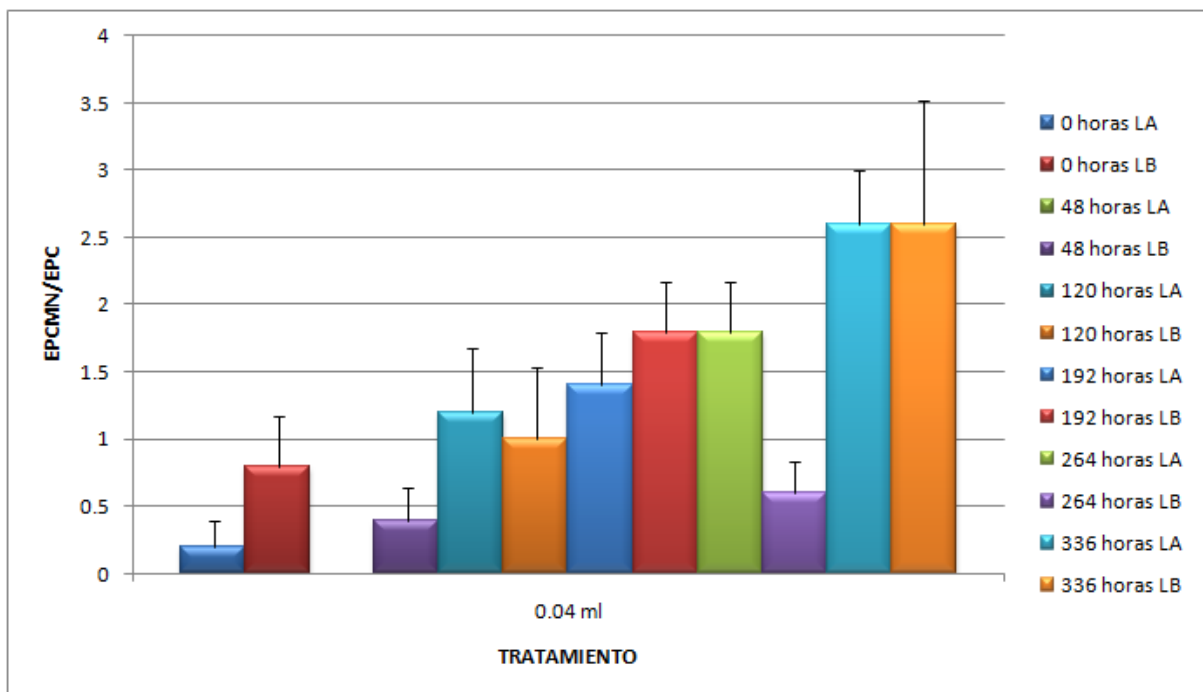
Gráfica 26. Comparación de la frecuencia EPCMn/ 1000 EPC de los grupos tratados con 0.01ml de ambas ampolletas.

Se observan diferencias, sin embargo estas diferencias se encuentran dentro del rango establecido.



Gráfica 27. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de los grupos tratados a 0.02ml de ambas ampolletas. Estudio subcrónico.

Existen diferencias, sin embargo estas no se toman como significativas.



Gráfica 28. Comparación de la frecuencia EPCMN/ 1000 EPC de los grupos con tratamiento de 0.04mL para ambas ampolletas.

No se muestra diferencias de forma significativa.

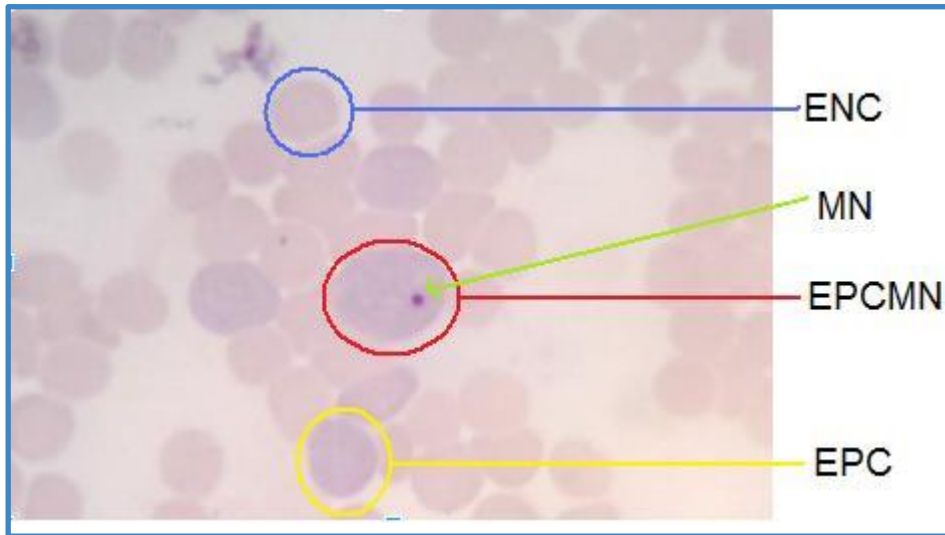


Figura 9. Microfotografía de MN presente en EPC, observación de diferentes tipos de eritrocitos que se presentan en frotis sanguíneo de sangre periférica de ratón CD1, objetivo 100X en inmersión, tomada en el Laboratorio L-521 de la FESC - Campo 1.

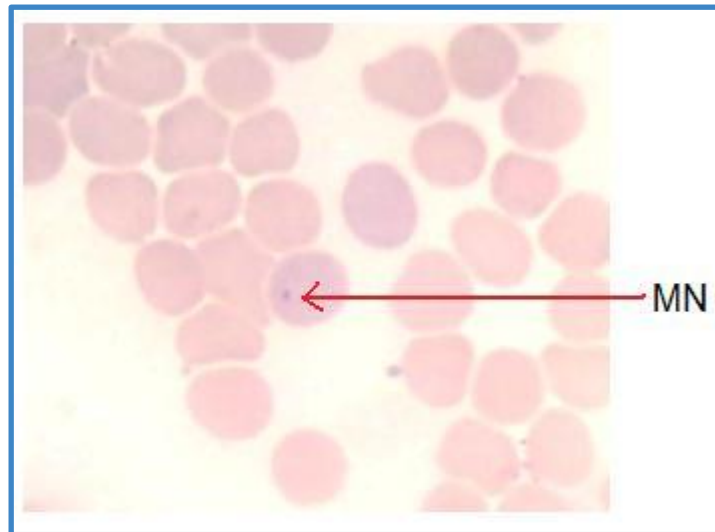


Figura 10. Microfotografía de micronúcleo en frotis sanguíneo de sangre periférica de ratón CD1. Objetivo 100X en inmersión, tomada en el laboratorio L- 521 de la FESC- Campo 1.

VIII. DISCUSIÓN

La medicina tradicional china es un importante recurso que ha estado vigente durante miles de años y ha permitido mejorar la salud y calidad de vida de muchas personas. En 1998 la Secretaría de Salud en México reconoció a los “medicamentos herbolarios” como oficiales, siempre y cuando cumplan con los criterios establecidos para acreditarse como tal.

En la fitoterapia, *Astragalus membranaceus* es una de las plantas que tiene un gran auge por la cantidad de metabolitos que contiene, el extracto obtenido de esta planta es utilizado para diversas afecciones que aquejan al ser humano; basado en la literatura no se conocen las reacciones adversas que esta presenta (Sinclair S. N.D), sin embargo, de acuerdo a los pacientes que lo consumen en la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN en casos se llega a presentar diarrea y dolor de estómago.

La evaluación genotóxica y/o citotóxica de los productos pertenecientes a la medicina alternativa o tradicional son de gran importancia ya que son algunos de los criterios que se debe cumplir para ser acreditado; muchos de estos productos son prescritos o se utilizan como suplementos alimenticios sin tener una adecuada dosificación, no obstante, la mayoría de éstos no cuentan con dicha evaluación, por lo cual no se tiene conocimiento de si pueden causar un daño al material genético.

La prueba de micronúcleos es la más utilizada para evaluar este tipo de daño, ya que permite detectar daños clastogénicos (que rompen los cromosomas), como aneuploidogénicos (que pueden afectar el huso mitótico), pudiéndose diferenciar ambos por el tamaño de los MN y presencia de centrómero; esta prueba se puede realizar en gran número de especies, se utilizó al ratón como modelo biológico, debido a que su manipulación es sencilla, se tiene las condiciones ambientales para esta especie, la muestra es sencilla de obtener, además un estudio realizado con 35 especies de mamíferos refiere que el ratón es el animal que presenta una mayor frecuencia de eritrocitos micronucleados con respecto a las demás (Bañales M.L, 2009; Cedano D. A, 2012).

La prueba *in vivo* de micronúcleos en sangre periférica de ratón tiene la ventaja de ser más sencilla y menos invasiva, tiene un menor costo, se puede utilizar tanto para estudios agudos y sub crónicos; además de que los efectos que se producen *in vitro* no necesariamente se producen también *in vivo* o se producen en niveles diferentes (Díaz C. A, 2013).

El objetivo de la evaluación de los estudios debe ser la demostración de las potencialidades tóxicas por administración única (toxicidad aguda), administraciones repetidas (subcrónica), así como estudios especiales de genotoxicidad. La evaluación de la toxicidad aguda se realiza para señalar los efectos de una o de varias dosis administradas en 24 horas, pudiendo aparecer sus efectos en pocas horas o días.

La evaluación de la técnica de micronúcleos en sangre periférica de ratones CD1 se efectuó para determinar la capacidad genotóxica y citotóxica de *Astragalus m.*, los resultados demostraron que la frecuencia de EPC MN no mostró diferencias descriptivamente significativas con respecto al control negativo, lo que sugiere que el compuesto no es genotóxico

La prueba de toxicidad subcrónica evalúa la capacidad genotóxica y citotóxica que pudiera provocar ambas ampollitas de *Astragalus m.* a través de la prueba de micronúcleos en sangre periférica de ratones de cepa CD1 como parte de la batería de pruebas preclínicas que deben realizarse para poder perfilarlos como tratamiento.

El MMS es considerado uno de los carcinógenos reactivos al ADN, en ratas se reporta daño al tejido del sistema nervioso. Con respecto a las concentraciones que se utilizaron en la experimentación, se basó en un estudio que realizaron Muto y colaboradores en 2015, en el cual probaron distintas dosis de MMS comparando la cantidad de micronúcleos que inducían y las reacciones adversas que estas producían, de acuerdo a esto se utilizó en el estudio agudo una dosis de 50mg/kg/día durante dos días seguidos, mientras que para el estudio subcrónico se optó una dosis de 30mg/kg/día en un periodo de 15 días, estas se aplicaron por vía intraperitoneal.

Como se menciona en la metodología, se utilizaron dos tipos de ampollitas del extracto de *Astragalus membranaceus*, ambas las produce el mismo laboratorio, sin embargo, las dos tienen características físicas distintas (color, olor, aspecto), además los pacientes de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía presentaron efectos adversos como diarrea, náuseas y dolor de estómago al consumir la ampollita de apariencia oscura.

Las dosis que se administraron en el ensayo para ambas ampollitas se basaron en las dosis que prescribe la institución mencionada anteriormente que es de 2 ampollitas de 10 ml/día para una persona con un peso de 70kg, la concentración que se administra en ratones de 30 a 25 g de peso es de 0.01ml, sin embargo para realizar la experimentación se incluyeron 2 concentraciones más para ambas ampollitas de 0.02ml y 0.04ml; adicionalmente se incluyó una dosis en la ampollita en la que se presentaban las reacciones adversas que fue de 0.06ml, esto con el fin de ver si a una mayor concentración se presenta algún efecto adverso.

En el estudio agudo se obtuvieron muestras a las 0, 24, 48 y 72 horas, por otra parte en el estudio subcrónico las tomas de muestra fueron a las 0, 48, 120, 192, 264 y 336 horas; se realizó de esta manera debido a que los eritrocitos policromáticos aparecen en la circulación en un periodo de 24 a 48 horas, esto indica con certeza que los eritrocitos policromáticos micronucleados son originados por la exposición al agente que se prueba; se debe tener en cuenta que estudios indican que los roedores tienen un número espontáneo de eritrocitos micronucleados a causa de que el sistema retículo endotelial es inmaduro y disminuyen al aumentar la edad (Cedano D. A, 2012).

De acuerdo con los resultados en la gráfica 1 se puede percibir que la ampollita A en el ensayo agudo existe una diferencia significativa entre el control y el MMS lo cual indica que produce citotoxicidad, con respecto a los grupos de las diferentes dosis, se observa diferencia a la hora 0, sin embargo, esta diferencia no se toma en cuenta para indicar una citotoxicidad, ya que desde el inicio de la experimentación y conforme fueron tomadas las muestras a las 24, 48 y 72 horas, no mostraron diferencia significativa con respecto al control, para determinar la citotoxicidad se examina el índice EPC/ENC, y este no debe ser menor o mayor al 20% con respecto al valor del control. (Rocha E.Y, 2008)

En la gráfica 2 solo existe una diferencia significativa de todos los grupos de estudio y el MMS, debido a que este fue el que más micronúcleos indujo, cabe mencionar que la producción de estos no es suficiente para decir que la ampolla A en el estudio agudo produce un cierto grado de genotoxicidad, en un frotis normal hay de 0 a 3 micronúcleos en 1000 células, y en el grupo de con tratamiento de MMS hay solo un promedio de 5 micronúcleos lo cual no señala un grado de daño al material genético.

De acuerdo a la gráfica 3 donde se examinan las frecuencias EPC/ 1000 eritrocitos de la ampolla B en el estudio agudo se observa que a las 0 horas hay una diferencia entre el grupo de la dosis de 0.01ml con respecto del control, sin embargo, esta diferencia se mantiene hasta el finalizar las tomas de muestra, mientras que, también se muestra una diferencia entre el MMS y el control una vez iniciado el tratamiento por lo cual se puede decir que este presenta un grado de citotoxicidad, de acuerdo a lo mencionado anteriormente por Rocha y colaboradores.

En la gráfica 4 al igual que en la gráfica 2 solo se muestra una diferencia entre el MMS y el control, pero esta diferencia no es suficiente para indicar que el MMS genera un daño genotóxico a la dosis que se manejó en el estudio agudo, tampoco se puede decir que las dosis de *Astragalus* generan dicho daño, ya que sus valores entran dentro de lo establecido como normal.

Además de los análisis de las frecuencias EPC/1000 eritrocitos y EPCMN/1000 EPC, se realizó una comparación de ambos, correspondientes a las ampollas A y B, ya que se ha mencionado anteriormente, se quiere comprobar que si por presentar diferentes características físicas (olor, color, textura) también cambian sus propiedades y generan cierto daño como los efectos adversos antes descritos, daños genotóxicos o citotóxicos; dicha comparación de éstas se realizó por la prueba descriptiva de comparación múltiple.

De acuerdo a las gráficas 5 y 6 no se observan diferencias ya que para las ampollas se manejaron los mismos grupos de MMS y control. En las gráfica 7, se compara la dosis de 0.01ml y se observan diferencias entre ambas ampollas, sin embargo ninguna es significativa. En la gráfica 8 no se muestran diferencias significativas por lo cual no hay diferencia entre las ampollas a la dosis de 0.02ml, por último en la gráfica 9 donde se analiza la dosis de 0.04 mL, a las 48 horas se presenta una disminución en los EPC en la ampolla A con respecto con la B, en 72 horas no se observa tal diferencia, por lo cual se puede atribuir este resultado no es dado por el tratamiento, sino por un error experimental.

Al comparar la genotoxicidad en la gráfica 10 y 11 se analiza el MMS y el Control presentan igual comportamiento en ambas ampollas, como se mencionó anteriormente se utilizaron los mismos grupos para A y B; en la dosis de 0.01, 0.02 y 0.04 mL que se representan en las gráficas 12, 13 y 14, no se muestran diferencias significativas entre ambas ampollas, dado que, el valor de micronúcleos obtenido durante la experimentación para las dosis de *Astragalus* entra dentro del rango normal que es de 0 a 3 micronúcleos.

En el caso del estudio subcrónico en la gráfica 15 se representan los resultados de la ampolla A; a las 120 horas hay una diferencia significativa entre la dosis de 0.01 y el control la cual se estabiliza a las 192 y 264 horas, no obstante, a las 336 vuelve a surgir la diferencia, por lo cual en este caso puede decirse que presenta una citotoxicidad a esta dosis, con respecto a dosis

mayores no hay tal diferencia, por esta razón se atribuye a errores experimentales y no a la acción que genera el extracto; por otra parte el MMS genera diferencia a las 192, 264 y 336 horas misma que va en aumento, por ello se puede deber a la acción de la dosis administrada del mutágeno y que este si genera daño citotóxico.

En la gráfica 16, se representa la relación EPCMN/ 1000 EPC correspondiente a los resultados obtenidos con la ampolleta A, se observa una diferencia muy marcada entre el MMS y los otros grupos de tratamiento incluido el control, en este caso la diferencia es muy grande, se puede decir que el MMS a la concentración de 30 mg/ kg de peso, administrado diariamente si genera genotoxicidad puesto que el promedio más alto obtenido es de 32 micronúcleos, este valor es más del doble de lo permitido o considerado como normal.

De acuerdo con la ampolleta B, como se puede visualizar en la gráfica 17 se presenta una citotoxicidad dada por el MMS, ya que la disminución de EPC va en aumento conforme pasa el tiempo de muestreo; por otra parte hay diferencia por parte del grupo con dosis de 0.01 mL a las 0 y 48 horas, sin embargo esta diferencia no se puede atribuir a la acción que lleva el extracto de *Astragalus*, dado que no se observa una disminución o un aumento de los EPC a las siguientes horas de muestreo, además, como menciona Cedano y colaboradores en 2012, los EPC aparecen el circulación de entre 24 y 48 horas, a lo cual si se debiera a la acción de la dosis se vería un aumento a las 48 horas después, lo cual no se lleva a cabo.

Referente al tema de genotoxicidad de la ampolleta B, solo se muestra este tipo de daño por acción del MMS, se presenta un aumento significativo en el número de micronúcleos en EPC, mientras que en las dosis de *Astragalus* el nivel de micronúcleos que presentaron los grupos está dentro de los límites establecidos y no hay diferencia con respecto del control.

Al igual que en estudio agudo se realizó una comparación entre ambas ampolletas con el fin de conocer si existe diferencias significativas entre ellas, se utilizó Tukey de comparación múltiple con un $P < 0.05$.

En las gráficas pertenecientes al control y al MMS para la frecuencia EPC/ 1000 eritrocitos se utilizaron los mismos datos para ambas ampolletas, por esta razón que las gráficas se observan sin ninguna diferencia; en la dosis de 0.01mL a las 0 horas la ampolleta A presenta una diferencia, esta no se debe al tratamiento, ya que al principio de la experimentación, a las 120 horas se presenta diferencia entre la ampolleta A con respecto de la B, esto también se atribuye a errores experimentales, tal diferencia no se presenta a tomas de muestra posteriores. En la dosis de 0.02mL hay diferencia a las 0 horas de la ampolleta A con respecto a la B, a las 48 horas se presenta una diferencia entre ambas ampolletas, tal resultado puede deberse a el comportamiento del grupo desde las 0 horas, y no por la acción del tratamiento. Por último a la dosis de 0.04 ml existe una variación de los EPC a las 120 horas, sin embargo esta no es significativa para la experimentación.

En la gráfica 24 se observa el MMS genera su efecto de genotoxicidad con respecto al tiempo de exposición al agente, dado que la cantidad de micronúcleos va aumentando conforme va pasando el tiempo; mientras que en las gráficas 25, 26, 27 y 28, se puede decir que no hay diferencias debido a que estos valores son menores a 3 micronúcleos.

El MMS genera tanto como genotoxicidad como citotoxicidad a la dosis de 30mg/ k/ día, por otra parte las dosis manejadas de *Astragalus membranaceus* no generan genotoxicidad ni citotoxicidad en ambos ensayos, no obstante, existe evidencia como la que presenta Bratkov y colaboradores en 2016, en la cual mencionan que la formononetina, de una isoflavona que está presente en *Astragalus* inhibe el crecimiento de células con cáncer de colon HCT116, además de que se observó la activación de la apoptosis, además de que los flavonoides extraídos de la raíz de esta planta y calicosina inhiben la proliferación de eritroleucemia humana, adicionalmente concluyeron que también estos flavonoides podrían reducir de forma significativa el número de micronúcleos inducidos por ciclofosfamida y mutagénesis génica *in vitro*.

Otro estudio realizado por Chul Park y su equipo, probaron un extracto de la raíz y de las hojas de esta planta y demostraron que *Astragalus* carece de potencial mutagénico y/o clastogénico, por medio de tres tipos de ensayo, como son la prueba de Ames, el ensayo de micronúcleos y la prueba de aberraciones cromosómicas, así aseguran que las partes aéreas de *Astragalus membranaceus* y no solo la raíz serán lo suficientemente seguras para utilizarlas como material alimenticio y suplemento dietético.

Bajo los estudios mencionados y los resultados obtenidos en ambos ensayos de toxicidad, *Astragalus membranaceus* no presenta ningún tipo de daño genotóxico o citotóxico, por lo cual se apoya a la utilización de la ampolleta con fines terapéuticos

IX. CONCLUSIONES

- El estudio agudo, a las concentraciones manejadas en administración única vía intraperitoneal, *Astragalus membranaceus* tanto en la ampolleta A como en la ampolleta B no presenta genotoxicidad y citotoxicidad en ratones CD1.
- El estudio subcrónico, en las concentraciones manejadas en administración diaria por 15 días vía intraperitoneal, *Astragalus membranaceus* en la ampolleta A como en la ampolleta B, no presenta genotoxicidad y citotoxicidad en ratones CD1.
- En el estudio agudo el Metil Metanosulfonato solo presenta citotoxicidad a una concentración de 50 mg/kg/ en un periodo de 2 días seguidos en ratones CD1.
- En el estudio subcrónico, MetilMetanosulfonato presenta genotoxicidad y citotoxicidad a una concentración de 30 mg/kg/ en un periodo de 15 días seguidos en ratones CD1.

X. GLOSARIO

ADN: Ácido desoxirribonucleico, es una macromolécula que normalmente está formada por una doble hélice de nucleótidos unidas por puentes de hidrógeno.

Anafase: Fase de la mitosis y la meiosis en la que los cromosomas duplicados son separados hacia cada polo de la célula.

Anamnesis: Conjunto de datos que se recogen en la historia clínica del paciente.

Aneuploidógeno: Agente capaz de producir en la célula que uno o más cromosomas completos de un conjunto normal falten o se presenten más de una vez.

Apoptosis: Vía de muerte celular programada por el mismo organismo.

Carcinogénesis: Proceso por el cual se produce el cáncer, consta de tres etapas: iniciación, promoción y progresión.

Cinetocoro: Estructura proteica situada sobre los cromosomas, en la cual se anclan los microtúbulos del huso mitótico durante los procesos de división celular.

Clastogénico: Agentes físicos o químicos que son capaces de inducir roturas cromosómicas.

Cromátides: Cualquiera de los dos filamentos idénticos de ADN que se observan en los cromosomas durante la división celular.

Cromosoma: estructuras que se encuentran en el núcleo de las células que transportan fragmentos largos de ADN.

Deleción: Anomalía estructural cromosómica que consiste en la pérdida de un fragmento de ADN.

Dosis: Cantidad del principio activo de un medicamento.

Fitoterapia: Tratamiento médico basado en el uso de plantas y sustancias vegetales.

Huso mitótico: Aparato microtubular en forma de huso, formado durante la división celular cuya función es posibilitar la migración y la correcta separación de los cromosomas en la meiosis o de las cromátides en la mitosis.

in vitro: Estudio realizado en el exterior de un organismo vivo, que se realiza dentro de un laboratorio.

in vivo: Experimentación hecha dentro de un organismo vivo.

Medicina: Ciencia dedicada al enfermedades que afectan al ser humano, tratamiento y prevención de estas.

Metafase: Fase de la mitosis en la cual la membrana celular desaparece y los cromosomas se sitúan en el plano ecuatorial de la célula.

Microtúbulos: Componente del citoesqueleto que tienen las funciones de disposición espacial de determinados orgánulos, formar un sistema de raíles para la comunicación mediante vesículas o macromoléculas entre compartimentos celulares, son imprescindibles para la división celular puesto que forman el huso mitótico, ayudan en el desplazamiento celular, permiten la polarización de ciertos tipos celulares y son esenciales para la estructura y función de los cilios y de los flagelos.

Mitosis: Serie de eventos que se suceden en una célula en división.

Mutación: Cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN.

Nocivo: Que hace daño.

Perenne: Planta que vive durante más de dos años, florece y produce semillas más de una vez en su vida.

Quimioterapia: Tratamiento del cáncer que usa fármacos para destruir células cancerosas.

Replicación: Mecanismo que permite al ADN duplicarse.

Recombinación homóloga: Proceso fundamental en la célula, que permite la reorganización de genes dentro y entre cromosomas, participa en la reparación del DNA, asegura la segregación de los cromosomas en la división.

Toxicidad: Medida usada para medir el grado tóxico o venenoso de algunos elementos.

XI. REFERENCIAS

1. AKHTAR M.F. (2016). Genotoxic and cytotoxic action potential of *Terminalia citrina*, a medicinal plant of ethnopharmacological significance. EXCLI Journal Experimental and Clinical Sciences. Vol. 15. [En línea]. Consultado el día 1 de Noviembre de 2016, desde: http://www.excli.de/vol15/Akthar_24102016_proof.pdf.
2. ARENCIBIA A. D. et. al (2003). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. Retel: Revista de toxicología en línea. [En línea]. Consultado el día 2 de Noviembre de 2016, desde: http://www.sertox.com.ar/img/item_full/20003.pdf.
3. ARENCIBIA A. D. et. al (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Retel. Revista de toxicología en línea. [En línea]. Consultado el día 2 de noviembre de 2016, desde: http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf.
4. ASCARRUNZ M.E. et. al. (2006). Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca, expuestos a plaguicidas. [En línea]. Consultado el día 2 de Noviembre de 2016, desde: <http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/chc/v51n1/v51n1a01.pdf>.
5. AUYEUNG K.K. (2016). *Astragalus membranaceus*: A Review of its Protection Against Inflammation and Gastrointestinal Cancers. The American Journal of Chinese Medicine. Vol. 44. No. 1. 1-22pp.
6. BACCETTI S. et.al. (2015). La moxibustión para la inversión del feto en posición podálica. [En línea]. Consultado el día 20 de Febrero de 2017, desde: http://www.ideassonline.org/public/pdf/br_15_41.pdf.
7. BAÑALES M.L, (2009). Modelo experimental para evaluar la genotoxicidad transferida por leche materna durante la lactancia. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad de Colima.
8. BELLO G.J. et. al. (2001). Fundamentos de ciencia toxicológica. Madrid: Díaz de Santos. 146p.
9. BRATKOV. V.M, et. al. (2016). Flavonoids from the genus *Astragalus*: Phytochemistry and biological activity. <http://www.phcogrev.com/article.asp?issn=0973-7847;year=2016;volume=10;issue=19;spage=11;epage=32;aualast=Bratkov>
10. BIAGI M. et.al. (2016). Herbal products in Italy: The thin line between phytotherapy, nutrition and parapharmaceuticals ; a normative overview of the fastest growing market in Europe. Pharmaceuticals. Vol 9.[En línea] Consultado el día 31 de Octubre de 2016, desde: www.mdpi.com/1424-8247/9/4/65/htm.
11. CARRILLO R. (2008) Cuerpos de Howell-Jolly. Revista de Investigación Médica Sur, México (online) Recuperado el día 23 de enero de 2017 en el sitio web <http://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2008/ms084f.pdf>
12. CEDANO D. A. et. al. (2012). La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos. Abanico Veterinario. Vol. 2. No. 2. 44,45 pp.
13. CHENG Y. et. al (2011). *Astragalus Polysaccharides* Lowers Plasma Cholesterol through Mechanisms Distinct from Statins. PLoS ONE .Vol 6. No. 11.
14. CHUL P. Y. et. al. (2014). Genotoxicity study of polysaccharide fraction from *Astragalus membranaceus*'s aerial parts. Toxicology research. Vol. 30. No. 2.
15. COBOS R.R. (2013). Acupuntura, electroacupuntura, moxibustión y técnica relacionadas en el tratamiento del dolor. Revista de la Sociedad Española del Dolor. Vol. 20. No 5. 263-277 pp.

16. DÍAZ M.M. (N.D). (2011) JING LUO: Canales y colaterales. [En línea]. Consultado el día 19 de Febrero de 2017, desde: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/jing_luo_1.pdf.
17. DÍAZ C. A. et. al. (2013). Presencia de micronúcleos en células epiteliales de encías, como marcador de inestabilidad cromosomal. Revisión sistemática. Avances de odontoestomatología. Vol. 29. No. 2.
18. DOMINGUEZ R. M. (2005). Actividad genotóxica del ácido 6-nonadecilsalicílico aislado de la corteza del cuachalate y su éster metílico evaluada en la sangre periférica de ratones CD1 con la prueba de micronúcleos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
19. EHRLICH S.D. (2015). Astragalus <http://umm.edu/health/medical/altmed/herb/astragalus>
20. FENECH, M. (2000). the in vitro micronucleustechnique. Mutationresearch, Vol. 455, 81-95 pp.
21. FUNDACIÓN SALUD Y NATURALEZA (2007). Libro blanco de los herbolarios y las plantas medicinales. Madrid: Papaverrhoeas L. 29-47 pp.
22. GÁMEZ R. (2007) Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 38, No. 3
23. GATTAS V. (N.D). Dietoterapia. [En línea]. Consultado el día 21 de Febrero de 2017, desde: <http://www.biblioteca.org.ar/libros/88599.pdf>.
24. GIRALT S. I. (2002). La medicina tradicional china, un reflejo de la cultura china. Barcelona: FundacióMútua General de Catalunya. [En línea]. Consultado de día 31 de Octubre de 2016, desde: www.mgc.es>setmana_es_200211_02.
25. HEALTHBLOGS (2011). Chineseherbs in western view-huang (Bei) qi (Radixastragali) healthbenefits and sideeffects. [En línea]. Consultado el día 2 de Noviembre de 2016, desde: <http://kylenorton.healthblogs.org/2011/11/20/chinese-herbs-in-western-view-huang-bei-qi-radix-astragali-health-benefits-and-side-effects/>.
26. HAYASHI M. (2016). Themicronucleus test—mostwidelyusedin vivogenotoxicity test. BioMed Central. V 38. PMC
27. HERNÁNDEZ G. C. et. al. (N.D). Electroforesis unicelular (Ensayo cometa) como bioindicador de antigenotoxicidad inducida por Amphipterygiumadstringens. [En línea]. Consultado el día 2 de noviembre de 2016, desde: www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07.../44_hernandez-guevara_y_col..pdf.
28. HUI-LIN WANG et. Al (2017). Astragaloside IV for Experimental Focal Cerebral Ischemia: Preclinical Evidence and Possible Mechanisms. [En línea]. Consultado el día 21 de febrero de 2017 desde: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/8424326/>
29. JIA X. et. al (2013). Effect of astragalusinjectionon U937 leukemiacellsproliferation and apoptosis and relevant molecular mechanisms. ChineseJournal of ContemporaryPediatrics. Vol. 15. No. 12. 1128-1133 pp.
30. KANG H., (2013) RecentAdvances in In Vivo GenotoxicityTesting: Prediction of CarcinogenicPotentialUsingComet and MicronucleusAssay in Animal Models. Vol. 18(4). Journal of CancerPrevention. PMC
31. KUMAR V. et. al. (2011). Effect of methylmethanesulfonateon hsp70 expression and tissuedamage in thethird instar larvae of transgenic*Drosophila melanogaster (hsp70-lacZ) Bg⁹* InterdisciplinaryToxicology. Vol. 4. 159-165 pp.
32. LI M. et. al. (2011). Meta-analysis of theclinicalvalue of Astragalusmembranaceus in diabeticnephropathy. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 133. No. 2. 412-9.

33. LLOPIS C. (2016). La fitoterapia china, un recurso terapeutico en expansión. *Qualitas Vitae*. No. 20.
34. LUNDIN C. et. al. (2005). Methylmethanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damagebut no detectable in vivo DNA double-strandbreaks. *NucleicAcidResearch*. Vol.33. No. 12.
35. MAGGIC. (2016) *Historias de Medicina*. . [En línea]. Consultado el día 14 de Febrero de 2017 desde: <https://gailfaithedwards.com/our-lady-of-the-green-%E2%80%93-reweaving-plant-wisdom-medicine-stories-and-the-divine-feminine/>
36. MARTINEZ, S. (2010) El cerdo joven como bioindicador de concentraciones bajas de genotoxicos, mediante la prueba de micronucleos en eritrocito de sangreperiferica. Universidad de Colima, Facultad de medicina. Colima
37. MATHEUS L. (2014) Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Scielo*. Vol.18 no.2. Valencia
38. MATKOVIC Z, et al.(2010) Efficacy and safety of Astragalusmembranaceus in thetreatment of patientswithseasonalallergicrhinitis. *Phytother Res*. Vol. 24. No 2.
39. MINGDE Y. et. al. (N.D). *Tratado de Acupuntura*. [En línea]. Consultado el día 19 de Febrero de 2017, desde: <http://educacion-holistica.org/notepad/documentos/Medicina%20alternativa/Acupuntura/tratado%.pdf>.
40. MUTO S. et. al. (2015). Assessment of methylmethanesulfonateusingtherepeated-doselivermicronucleusassay in youngadultrats. *MutationResearch/ Genetictoxicology and environmentalmutagenesis*. Vols.780-781. 107-110 pp.
41. NAVARRETE C. et. al (N.D). Estudio del Intercambio de Cromátides Hermanas en gemelos. México: Unidad de investigación clínica en Genética Humana. IMSS. [En línea]. Consultado el día 1 de Novienbre de 2016, desde: www.revistas.unam.mx/index.php/eab/article/download/34653/31595.
42. OCDE (2014). OCDE Guidelineforthetesting of chemicals: in vitro mammaliancellmicronucleus test. [En línea]. Consultado el día 15 de Marzo de 2017, desde: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-tg487-2014-508.pdf>
43. Organización Mundial de la Salud (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. China: Hong Kong SAR. 8p.
44. QINGGUANG Z.(2016). Effect of Chinesemassage (Tui Na) onisokineticmusclestrength in patientswithkneeosteoarthritis. *Journal of TraditionalChinese Medicine*. Vol. 16. No.36. 314-320 pp.
45. RAMON N. H. et.al (2014). Métodos de manipulación en la medicina tradicional asiática. *MEDISAN*. Vol.18. No.5.
46. ROCHA E.Y. (2008). Estudio genotóxico mediante la prueba micronúcleos del compuesto tiomorfolínico LQM 319. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
47. ROXAS M, et. al. (2007). Colds and Influenza: A review of diagnosis and conventional, botanical and nutritionalconsiderations. *Alternative medicine review*. Vol. 12. No 1. 42p.
48. SCHLAEPFER L. (2010) Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Academia de Biología Humana, Colegio de Ciencia y Tecnología, Universidad Autónoma de la Ciudad de México. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas* vol. 41, núm. 4, pp. 18-27

49. SIGMA-ALDRICH. (2016). Ficha de datos de seguridad: Methylmethanesulfonate. [En línea] Consultado el día 31 de Octubre de 2016, desde: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=MX&language=es&productNumber=M4016&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fm4016%3Flang%3Des>
50. SINCLAIR S. (N. D). Chinese Herbs: A Clinical Review of Astragalus, Ligusticum, and Schizandrae. [En línea]. Consultado el día 20 de Marzo de 2017, desde: <http://altmedrev.com/publications/3/5/338.pdf>
51. TORRES D. M. (2013). Acupuntura: Teoría de canales y puntos. [En línea]. Consultado el día 12 de Marzo de 2017, desde: <http://buenosdiasacupuntura.blogspot.mx/2013/11/canales-y-puntos.html>
52. WANG S.F. et. al. (2016). *Astragalus*-containing Traditional Chinese Medicine, with and without prescription based on syndrome differentiation, combined with chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Current Oncology*. Vol. 23. No. 3. 188-195.
53. YAN X. et. al. (2014). Enhanced Antitumor Efficacy with Combined Administration of Astragalus and Pterostilbene for Melanoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Vol. 15, No. 3, 1163-1169 pp.
54. ZOU L. et. al (2017) Taichí for health benefits in patients with multiple sclerosis: A systematic review. *PLoS ONE*. Vol. 12. No. 2.