



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio genotóxico de la tintura de *Tecoma stans* en
linfocitos humanos *in vitro*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ADRIANA ALEJANDRA MENDOZA AMADOR

**DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C MARÍA GUADALUPE ORDAZ TÉLLEZ
(2010)**



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.

JURADO ASIGNADO

| | |
|-------------|---|
| Propietario | Dra. Rosario Rodríguez Arnaíz |
| Propietario | Dra. Angélica Graciela Martínez Hernández |
| Propietario | M en C María Guadalupe Ordaz Téllez |
| Suplente | Dra. María Elena Calderón Segura |
| Suplente | Quim. en Alim. Verónica Muñoz Ocotero |

ASESOR DEL TEMA

M en C María Guadalupe Ordaz Téllez

SUSTENTE

Adriana Alejandra Mendoza Amador

DOY GRACIAS A MI FAMILIA A CADA UNO DE ELLOS, POR HABER ESTADO A MI LADO SIEMPRE, PERO MUY ESPECIALMENTE A MI MADRE: TODO LO QUE SOY TE LO DEBO A TI.

A MIS PROFESORES, ESOS QUE ME IMPULSARON A APRENDER, A LUPITA, POR TODO ESTE TIEMPO APOYÁNDOME.

A MIS AMIGOS, CADA UNO ME ENSEÑO ALGO Y ESTUVO A MI LADO A SU TIEMPO, ESPECIALMENTE A MI PERRO, POR SER SIEMPRE MUCHO MAS QUE UNA AMIGA, Y ESTAR CONMIGO HASTA EL FINAL, A MI NIÑO POR ESTAR AHÍ Y AMARME TANTO.

LOS AMO A TODOS.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| 1.1. Diabetes..... | 4 |
| 1.2. Etnobotánica..... | 5 |
| 1.3. <i>Tecoma stans</i> | 7 |
| 1.3.1. Descripción..... | 7 |
| 1.3.2. Sinonimias..... | 8 |
| 1.3.3. Distribución..... | 10 |
| 1.3.4. Hábitat..... | 11 |
| 1.3.5. Usos terapéuticos..... | 11 |
| 1.3.6. Forma de preparación..... | 11 |
| 1.3.7. Compuestos químicos y principios activos..... | 12 |
| 1.4. Estudios realizados en animales..... | 13 |
| 1.5. Biomarcadores..... | 13 |
| 1.5.1. Prueba de micronúcleos..... | 14 |
| 1.5.1.1. Ventajas del ensayo de micronúcleos..... | 16 |
| 1.5.1.2. Mecanismos de formación de micronúcleos..... | 16 |
| 1.5.1.3. Factores de variabilidad..... | 17 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 19 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 19 |
| 4. OBJETIVOS..... | 19 |
| 4.1. Objetivo general..... | 19 |
| 4.1.1. Objetivos particulares..... | 19 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 21 |
| 5.1. Estudio fitoquímico..... | 21 |
| 5.1.1. Obtención de <i>Tecoma stans</i> | 21 |
| 5.1.2. Preparación de los extractos..... | 22 |
| 5.1.3. Cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos..... | 22 |
| 5.1.3.1. Revelado..... | 23 |
| 5.1.4. Extracción con Hexano..... | 24 |
| 5.1.5. Extracción con Acetato de Etilo (AcOEt)..... | 25 |
| 5.1.6. Extracción con Metanol..... | 25 |
| 5.1.7. Extracción de flavonoides..... | 26 |
| 5.1.8. Extracción de alcaloides..... | 30 |
| 5.2. Estudio genotóxico..... | 31 |

| | |
|--|----|
| 5.2.1. Población de estudio..... | 31 |
| 5.2.1.1. Criterios de inclusión..... | 31 |
| 5.2.1.2. Criterios de eliminación..... | 31 |
| 5.2.2. Concentración del extracto hidroalcohólico (tintura comercial) y controles..... | 32 |
| 5.2.3. Técnica de micronúcleos..... | 32 |
| 5.2.3.1. Obtención de la muestra..... | 32 |
| 5.2.3.2. Siembra de linfocitos..... | 33 |
| 5.2.3.3. Tratamiento..... | 33 |
| 5.2.3.3.1. Bloqueo de la citocinesis..... | 34 |
| 5.2.3.4. Cosecha..... | 34 |
| 5.2.3.5. Elaboración de las preparaciones..... | 34 |
| 5.2.4. Criterios de lectura..... | 36 |
| 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 37 |
| 7. RESULTADOS..... | 38 |
| 7.1. Estudio fitoquímico..... | 38 |
| 7.2. Estudio genotóxico..... | 42 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 47 |
| 8.1. Estudio fitoquímico..... | 47 |
| 8.2. Estudio genotóxico de la tintura de <i>Tecoma stans</i> | 48 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 50 |
| 10. REFERENCIAS..... | 51 |
| 10.1. Referencias electrónicas..... | 57 |
| 11. ANEXO I (Reveladores para cromatografía)..... | 58 |
| 11.1. Disolución de FeCl ₃ | 58 |
| 11.2. Disolución de AlCl ₃ | 58 |
| 11.3. Reactivo de Draggendorf..... | 58 |
| 11.4. Ácido Sílicotúngstico..... | 58 |
| 12. ANEXO II (Carta de consentimiento y obtención de información por paciente)..... | 60 |

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un problema grave de salud, no solo en nuestro país, sino en el mundo entero, la gente recurre a medidas alternativas para su control y mejoramiento de la calidad de vida, una de ellas es la medicina tradicional. En México, existen alrededor de 300 especies de plantas que se utilizan para el control de este padecimiento, entre las cuales se encuentra *Tecoma stans* ("tronadora, trompeta, flor amarilla, entre otros nombres comunes que le dan en su lugar de origen."). Existe un amplio consumo y comercialización de la especie y sus preparados; por esto es importante evaluar la genotoxicidad de los extractos y/o diferentes modalidades en que se administra esta planta medicinal a la población. En el presente se evaluó el efecto genotóxico inducido por la tintura comercial de *Tecoma stans* obtenida del jardín de plantas Medicinales de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México. Se empleó el ensayo de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos, que permite valorar la inducción de daño genético ya que estos se producen cuando se desprende un fragmento de ADN durante la mitosis y no se incorpora correctamente al núcleo debido a diferentes factores como radiación y/o sustancias genotóxicas. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por medio de venopunción, con tubos vacutainer con heparina; se separaron por el método de obtención de fracciones sanguíneas nucleadas y se sembraron en medio de cultivo cultivo RPMI 1640 suplementado. La población de estudio consistió de cuatro pacientes (dos hombres y dos mujeres sanos). Los cultivos se expusieron a diferentes concentraciones de *Tecoma stans* (0.06 ml/ml, 0.045 ml/ml, 0.03 ml/ml, 0.0225 ml/ml, 0.015 ml/ml). Como testigo negativo se empleó el solvente (agua) y como control positivo mitomicina C [0.04 ml/ml]. 44 horas después de la siembra se adicionó Citocalasina-B [4.5 µg/ml] y a las 72 horas se realizó la cosecha de las muestras con fijador Carnoy, se hicieron las preparaciones que se tiñeron con Giemsa y se observaron al microscopio óptico a 40X. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos en las células binucleadas ni en el índice de proliferación celular (CBPI) con respecto a los controles negativos. Es importante resaltar que las concentraciones de 0.06 y 0.045 ml/ml fueron tóxicas para los linfocitos, mientras que en la de 0.03 ml/ml hubo una recuperación celular completa; por lo que se concluye que la tintura de *Tecoma stans*, bajo las condiciones de este estudio, no muestra un efecto genotóxico ni citostático, por lo que su uso como medicina alternativa para el tratamiento de la diabetes, no representa un factor de riesgo al consumidor.

Palabras clave: *Tecoma stans*, micronúcleos, cromatografía de capa fina, diabetes mellitus, genotoxicidad.

I INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes

Al ingerir alimentos, el organismo los transforma en glucosa (azúcar) y la sangre se encarga de transportarla a las células para convertirla en la energía necesaria para poder llevar a cabo todas las actividades del cuerpo; la insulina es una hormona producida por el páncreas, que ayuda a que la glucosa penetre en las células, y controla el nivel de azúcar en la sangre; cuando la insulina es poca o deficiente, las células no absorben la glucosa adecuadamente y por lo tanto aumenta su concentración en la sangre (Fig. 1) (Hernández y Callejas, 2006).

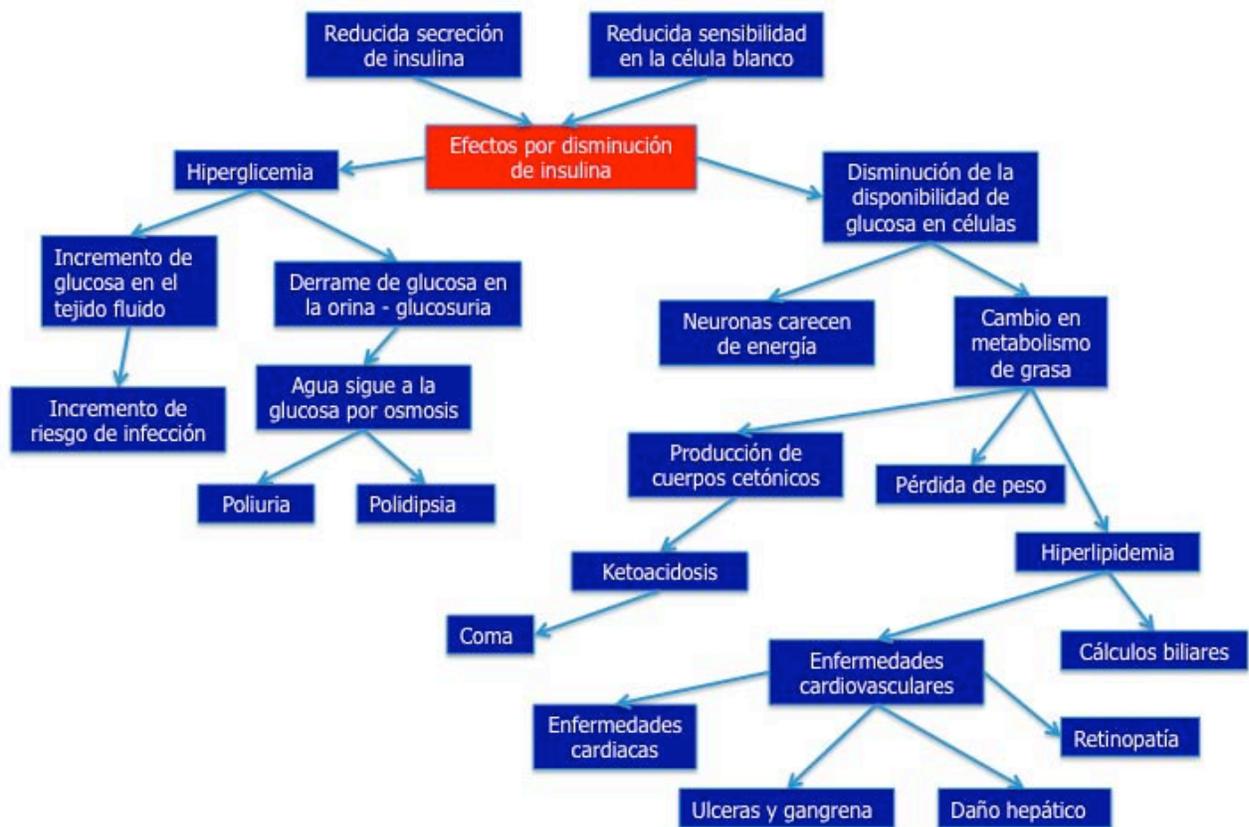


Fig. 1 Efectos causados por la deficiencia de Insulina (Modificado de Web F)

La diabetes mellitus (DM) en la práctica se define como cualquier trastorno que eleve la glucosa plasmática después del ayuno (Islas y Revilla, 2004). Ésta es una enfermedad determinada genéticamente en la que el paciente sufre alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, junto con una deficiencia relativa o absoluta en la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a ésta; se caracteriza por hiperglucemia en ayunas, complicaciones microangiopáticas, en especial renales y oculares,

así como macroangiopatía con afección en las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica y neuropatía (Islas y Revilla, 2004).

La DM se subdivide en 4 grupos diferentes, aunque hay dos formas clínicas principales de la enfermedad: tipo I o DM dependiente de insulina (IDDM) que aparece temprano y se agrava rápidamente y tipo II o DM no dependiente de insulina (NIDDM), es de desarrollo lento y menos grave y, a menudo desapercibida (Nelson y Cox, 2001) (Tabla I).

Tabla I: Variaciones de diabetes mellitus (Tomado de Islas y Revilla, 2004, Strachan y Read, 2006 y Hernández *et al.*, 1998).

| IDDM (tipo I) | NIDDM (tipo II) | DJIM (tipo III) | DM gestacional (tipo IV) |
|--------------------------------|--|--|--|
| Inicio juvenil | Inicio en la madurez (> 40 años) | Inicio juvenil | Edad superior a los 30 años |
| 0.4% de la población Británica | 6% de la población Estadounidense | Rara | Entre el 0.5 y 16%; en los países occidentales se presenta en el 5% de los embarazos |
| Requiere insulina | Por lo general controlable con hipoglicemiantes orales | Por lo general controlable con hipoglicemiantes orales | Dieta, si resulta insuficiente se usa insulino terapia ¹ |
| Ausencia de obesidad | Asociación potente con obesidad | Ausencia de obesidad | Ausencia de obesidad |

¹ Aunque la utilización de hipoglicemiantes orales esta contraindicada en la gestación.

1.2 Etnobotánica

La etnobotánica es el estudio científico de las interrelaciones que se establecen entre grupos culturales o etnias y el entorno vegetal a través del tiempo y en diferentes medios climáticos (Fig. 2). De estas interrelaciones surge el aprendizaje de los beneficios que las plantas proporcionan como alimento, o por sus propiedades curativas (Miranda *et al.*, 2005). Actualmente sabemos que el uso de las plantas se ha diversificado extensamente por su actividad antitumoral, antimicrobiana, inmunológica, anticonceptiva, contra padecimientos hepáticos, gastrointestinales e hipoglicemiantes entre otras (Miranda *et al.*, 2005).

LINEA DE TIEMPO DE LA ETNOBOTANICA

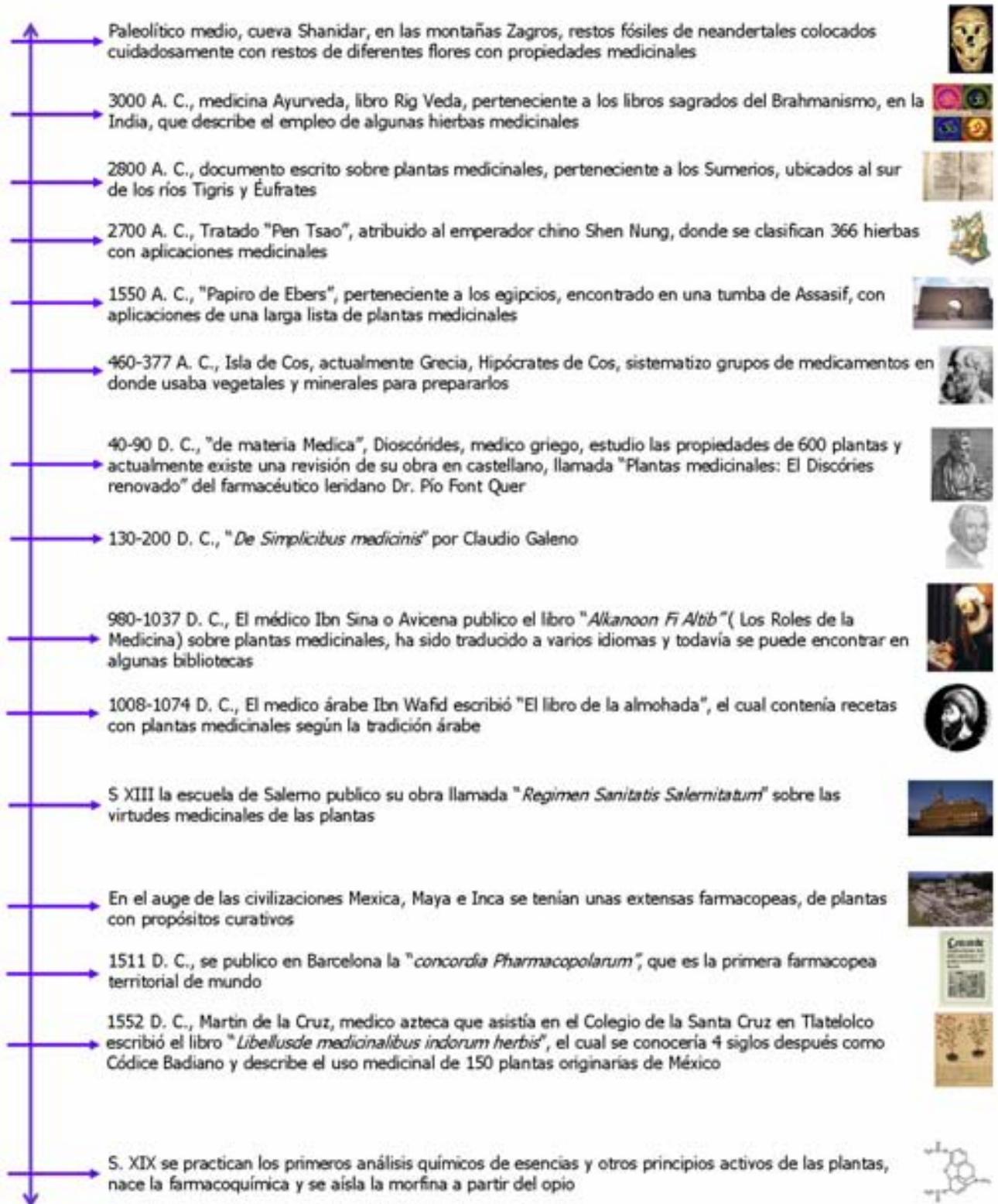


Fig. 2 Línea de tiempo de la Etnobotánica (Modificado de Marinoff, 2006 y Barquero, 2007)

En México, según algunos estudios realizados, existen alrededor de 300 especies de plantas que se utilizan para el control de la DM, entre las cuales se encuentra *Tecoma stans*, como auxiliar en el tratamiento de este padecimiento (Alarcón-Aguilara *et al.*, 1998; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Cervantes y Valdés, 1990; Corral *et al.*, 2002; Costantino *et al.*, 2003; Hernández-Galicia *et al.*, 2002; Hernández y Calleja, 2006; Jezewski y Poss 2002; Miranda *et al.*, 2005; Pérez y Vargas, 2006; Poss *et al.*, 2003; Satyavati *et al.*, 1989; Shapiro y Gong, 2002).

1.3 *Tecoma stans*

1.3.1 Descripción



Fig. 3 *Tecoma stans*

Es un árbol pequeño, siempre verde, que puede alcanzar alturas de 6 a 20 metros y diámetro de 0.25 mts, tiene una ramificación desde el medio del tallo y copa irregular. La corteza es de color blancuzco a gris claro, es fibrosa, tiene lenticelas, hojas opuestas imparinnadas con ápice de punta larga y base de punta corta; las flores están ordenadas por racimos terminales cortos y tienen varias flores amarillas atractivas, que tienen forma de trompeta; los frutos son cápsulas cilíndricas (Diagnóstico y Programa de manejo, El Orito, 2001) (Fig.3).

Reino.: Plantae

Phylum: Spermatophyta

Subphylum Magnoliophytina

Subclase: Asteridas

Orden.: Escrofulariales

Familia: Bignoniaceae

Nombre científico: *Tecoma stans* (L.) Juss-exHBK

Las especies de la familia Bignoniaceae, son neotropicales, y son usadas en la práctica médica por las culturas indígenas de Sudamérica (Alguacil *et al.*, 1999). El conocimiento de la farmacobotánica de especies de *Tecoma* es poco conocido. Pero aun así se sabe de la actividad narcótica y anestésica de flores y hojas

de *Tecoma stans* (L.) Juss., así como la actividad diurética e hipoglicemiante tomado como infusión (Alguacil *et al.*, 1999).

Según un estudio Farmacognóstico realizado a *Tecoma stans* de acuerdo con Norma Ramal de salud pública No. 309 (Cuba), el estudio macromorfológico caracterizó las hojas en compuestas, imparinnadas, pecioladas de 5-13 foliolos, principalmente de 7-9, foliolos lanceolados, agudos o acuminados en el ápice y estrechados o cuneados en la base, con bordes aserrados y nervios algo pilosos, mientras que en las características micromorfológicas, se observó en el corte transversal de la hoja, cutícula gruesa: una capa de células en la epidermis del haz, una capa de parénquima en empalizada, parénquima lagunar laxo y una capa de células epidérmicas en el envés, estomas hundidos y tricomas dendríticos unicelulares; en el caso de epidermis adaxial no se encontraron estomas ni pelos, mientras en la cara abaxial se presentaron estomas rodeados de 6 células y abundantes bases de pelos de forma característica (Corral *et al.*, 2002).

1.3.2 Sinonimias (tomado de Web A y Web E)

Bignonia frutecens Millere ex DC.,
Bignonia incisa Hort ex DC.,
Bignonia stans L.,
Gelsemium stans (L.) Kuntze,
Stenolobium incisum Rose & Standl.,
Stenolobium quinquejugum Loes.,
Stenolobium stans (L.)Seemann,
Stenolobium stans var. *apiifolium* (Hort. ex DC.) Seem.,
Stenolobium stans var. *multijugum* Fr.,
Stenolobium stans var. *pinnatum* Seem.,
Tecoma incisa Sweet,
Tecoma stans var. *apiifolia* Hort. ex DC.,
Tecoma tronadora (Loes.) Johnst.

| NOMBRES COMUNES DE <i>Tecoma stans</i> (Martínez, 2000; Ospina y Pinzon, 1995; Cervantes y Valdés, 1990; Satyavati <i>et al.</i> , 1989; Corral <i>et al.</i> , 2002; Web A; Web B) | | |
|---|---|---|
| Argentina | Guaranguay | |
| Bolivia | Toco-toc | |
| Colombia | Roble Amarillo, Chirlobirlo | |
| Costa Rica | Candelillo, Carboncillo | |
| Ecuador | Cholan | |
| El Salvador | Tagualashte, Tatche, Tasto, Flor de San Sebastián, Marchucha, Flor Amarilla, San Andres | |
| Estados Unidos | Yellow Trumpet-Flower | |
| Guatemala | Chacté, Timboco, Timboque, San Andres | |
| Honduras | Sardinillo | |
| México | Chiapas | Batilimi, Matilimi, Candox |
| | Distrito Federal | Nextamalxochitl (<i>l. náhuatl</i>) |
| | Durango | Corneta amarilla, Trompeta |
| | Guerrero | Hierba de San Nicolás, Hoja de Baño, Nixtamalxochitl, Yucuc II (<i>l. mixteco</i>) |
| | Michoacán, Guanajuato, Jalisco | Retama, K'aptzarukua (<i>l. purhépecha</i>) Capzarucua, Istamasuchil, Kameri |
| | Morelos | Huiztonxochitl, Izontontli (<i>l. náhuatl</i>), Estoncle, Izontontli, Huizontli |
| | Nuevo León | Miñona |
| | Oaxaca | Tulasúchil, Lipa-gundoflei, (<i>l. chontal</i>), Guiabiche, Guie-bacaná, Guie-bichi, Trompeta, (<i>l. zapoteca</i>), Trovador |
| | Puebla | Ichcuetl, Mixtontze, Ixontli, Xochimitl |
| | Quintana Roo | X-k'anlol (<i>l. maya</i>) |
| | San Luis Potosí | Borla de San Pedro, Hierba de San Pedro, Flor de San Pedro, San Pedro, San Diego huitis (<i>l. tenek</i>) |
| | Sinaloa | Gloria |
| | Sonora | Caballito |
| | Tamaulipas | San Pedro |
| | Veracruz | Mazorca |
| | Yucatán | Xk´anlol, Xkantol, X-cantul (<i>l. maya</i>), Kanlool, K'aanool Che', Xk'aan Lool Ché |
| | Otros | Tronador, Retama, Lluvia de oro, Campanas amarillas, Palo de Arco, Canlol, Tronadora, Alacrancillo, Ángel, Bignonia, Canario, Escandor, |

| | |
|--------------------|--|
| | Hierba de Baño, Hoja de San Pedro, Iscandor, Moco de Cócono, Ojo de Santa Lucía, Pichiche, Sanguinaria, Saúco, Trompeta tronador, Trueno y Truena Fuerte |
| Nicaragua | Chilca, Flor Amarilla, Sardinillo |
| Panamá | Copete |
| Puerto Rico | Ruibarba |
| Venezuela | Fresnillo |
| India | Pila kaner |
| Cuba | Sauco amarillo, Corneta Amarilla, Flor Amarilla, Flor de San Pedro |

1.3.3 Distribución

Se distribuye principalmente en zonas a nivel del mar y hasta los 1.500 mts. Desde el Suroeste de Estados Unidos hasta Bolivia, Argentina, Brasil y las Antillas (Martínez, 2000) (Fig. 4).



Fig. 4 Distribución en América de *Tecoma stans*.

1.3.4 Habitat

Se encuentra en áreas alteradas, a orillas de las carreteras, sobre faldas de las serranías, barrancas y sitios pedregosos, en climas preferencialmente templado húmedo y subhúmedo, trópico húmedo y subhúmedo; en bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, matorral xerófilo, pastizal y bosques espinoso, mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de pino-encino; florece de julio a noviembre (Web A; Web E).

1.3.5 Usos terapéuticos

Se utiliza como diaforético, diurético contra la diabetes, contra dolores reumáticos, es estimulante e hipoglicémiante (Martínez, 2000). También se utiliza contra malestares estomacales, como dolor de estómago, disentería, bilis y empacho, atonía intestinal y problemas del hígado, enfermedades gastrointestinales, como gastritis, mala digestión y pirosis, enfermedades hepáticas, respiratorias y ginecológicas, como regla retrasada, es auxiliar en el parto y para dar baños después de éste, también ayuda a la estimulación de apetito en enfermedades como anorexia, anemia y desnutrición de los niños; es antihelmíntico, antisifilitico, contra dolor de muelas, se utiliza para curar llagas y enfermedades cutáneas, como viruela o urticaria; igualmente como antídoto de la irritación por hiedra y contra el piquete de alacrán; además, se le usa para purificar la sangre, bajar temperatura corporal "calentura", así como en la fiebre amarilla; es vigorizante, calma las alteraciones nerviosas, para los ataques e infecciones; como desinflamatorio en golpes; se emplea como analgésico y como tónico en la "borrachera", es útil para el asma y la tos y el exceso de ácido úrico (Corral *et al.*, 2002; Web E).

1.3.6 Forma de preparación

En infusión.

Indicada en caso de:

- a) *Diabetes*: Se prepara con las hojas o la flor, se toma sin azúcar y en ayunas (Diagnóstico y Programa de manejo, El Orito, 2001; Jezewski y Poss, 2002; Web A).
- b) *"Borrachera" y en el postparto*: Se prepara una infusión con yemas de trueno (*Tecoma stans*) y canela, se endulza con piloncillo, se deja hervir hasta que quede la cantidad de una taza, y se toma en ayunas durante tres mañanas (Web E).

En decocción.

Se recomienda para:

- a) *Dolores del cuerpo o reumáticos*: Se cuece un puñado de hojas en agua y se entibia y se hace un baño, por nueve días (Martínez, 2000). Se recomienda hacer una decocción a la cual se le agregue rosa de castilla y viuxita.
- b) Empacho y para disentería sólo se le añade tapacola (*Waltheria americana*) (Web E).
- c) *Trastornos ginecobstétricos como regla retrasada, es auxiliar en el parto y después de éste*: Se mezcla con "hoja del cáncer" u "hoja negra" (Web E).

En gotas.

Se recomienda para:

- a) *Gastritis*: Se toman 15 gotas directo, 3 veces al día por 10 días.
- b) *Diabetes*: Se toman 15 gotas 3 veces al día hasta normalizar.

No consumir picante, puerco, refresco, café ni licor. De preferencia tomar antes de cada alimento para un mejor resultado (Tintura comercial, obtenida en el jardín de plantas medicinales de San Cristóbal de las Casas, Chiapas).

1.3.7 Compuestos químicos y principios activos

Algunos autores han reportado alrededor de 60 compuestos químicos en *Tecoma stans*, aunque no se conoce la actividad específica de algunos de ellos: Ácido antranílico (inhibidor de la insulina, insulínico), Beta-sitosterol (hipoglicemiante), Cumarina (antidiurético), Tecomina (hipoglicemiante), Tecostanina (hipoglicemiante), Triptofano (hipoglicemiante, inhibidor de la insulina, insulínico) inhibidor α -glucosidasa o inhibidor de la amilasa, (Bianco *et al.*, 1981; Corral *et al.*, 2002; Costantino *et al.*, 2003; González, 2004; Hernández-Galicia *et al.*, 2002; Lins y Felicio, 1993; Ospina y Pinzon, 1995; Pérez y Vargas, 2006; Taha, 1954; Web D; Aguilar-Santamaría *et al.*, 2009).

Se ha visto que la presencia de ciertos metabolitos secundarios, alcaloides y flavonoides, en el extracto de *Tecoma stans* son los responsables de la acción farmacológica hipoglicemiante (Corral *et al.*, 2002; De la Paz *et al.*, 2003). En el estudio realizado de acuerdo con Norma Ramal de salud pública No. 309 (Cuba), los cambios cualitativos de coloración fueron positivos por la presencia de un precipitado naranja para alcaloides y rojo intenso para flavonoides en la fase amilica; por cromatografía en capa delgada se conoció la presencia de apigenina (Corral *et al.*, 2002).

1.4 Estudios realizados en animales

En un estudio realizado por el IMEPLAM en 1980, se ensayaron diferentes extractos de *Tecoma stans* en ratas y conejos normales, así como en animales sometidos a la extirpación parcial del páncreas y en ratas con diabetes inducida con estreptozotina; los resultados indicaron que el efecto hipoglicémico fue suave en los animales normales, mientras que en aquellos a los que se les indujo la diabetes la acción de *Tecoma* fue más evidente (González, 2004).

En un ensayo realizado a perros normales administrando intravenosamente *Tecoma stans* se observó una respuesta temprana de hiperglicemia, seguida de una disminución lenta de los valores de glucosa en sangre acompañada de hipertrigliceridemia (Costantino *et al.*, 2003).

La CONABIO (Web A) considera a *Tecoma stans* como planta venenosa para el ganado bovino y caprino, además de que se utiliza como insecticida contra el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*).

Pocos estudios se han realizado con respecto a la genotoxicidad de *Tecoma stans*; entre los biomarcadores que se pueden realizar para observar si un compuesto provoca efectos genotóxicos es el de micronúcleos (MN).

1.5 Biomarcadores

Los biomarcadores son cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o marcador de la exposición a un agente tóxico (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo 2007). Los biomarcadores se pueden clasificar en:

- a) Exposición: los cuales miden la concentración del xenobiótico o de sus metabolitos en los fluidos biológicos.
- b) Efecto: que determinan los cambios fisiológicos, bioquímicos, genéticos o moleculares que ocurren en las células o en los tejidos.
- c) Susceptibilidad: donde se implica una interacción especial del xenobiótico con las características genéticas del individuo (Ostrosky y Gonsebatt, 2006).

Las pruebas para la inducción de daño genético se han llevado a cabo para diferentes modelos, aunque los estudios de biomonitorio humano de ensayos citogenéticos son los más comúnmente utilizados, entre los cuales se encuentran Aberraciones Cromosómicas (AC), Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) y micronúcleos (MN) entre otros (Pastor *et al.*, 2001).

1.5.1 Prueba de micronúcleos (MN)

El uso del ensayo de MN para evaluar el daño cromosómico inducido por clastógenos o aneugenos sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesto por Countryman y Heddle en 1976, cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica por ejemplo linfocitos y eritrocitos de sangre periférica, aunque también se pueden utilizar células uroteliales y exfoliativas de las mucosas nasales y bucales y técnicamente también es posible utilizar médula ósea y algunos otros tejidos internos, pero su adquisición requiere procedimientos invasivos por lo cual no se usa comúnmente (Zalacain *et al.*, 2005, Tucker y Preston, 1996). Aunque en 1975 Schimid utilizaba ya el ensayo de MN para analizar diferentes compuestos aplicados a mamíferos pequeños produciendo un efecto de rompimiento cromosómico en las células (Fig. 5).

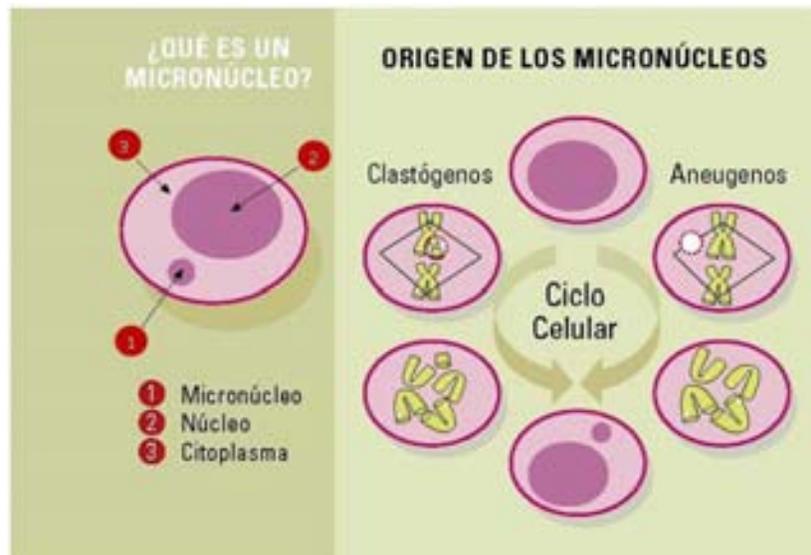


Fig. 5 Origen de Micronúcleos (Modificado de Marcos, 2006).

En 1984, el análisis fue mejorado por Fenech y Morley, al frenar la citocinesis en células que ya pasaron por un ciclo celular (CBMN: cytokinesis-block micronucleus) (Fig. 6).

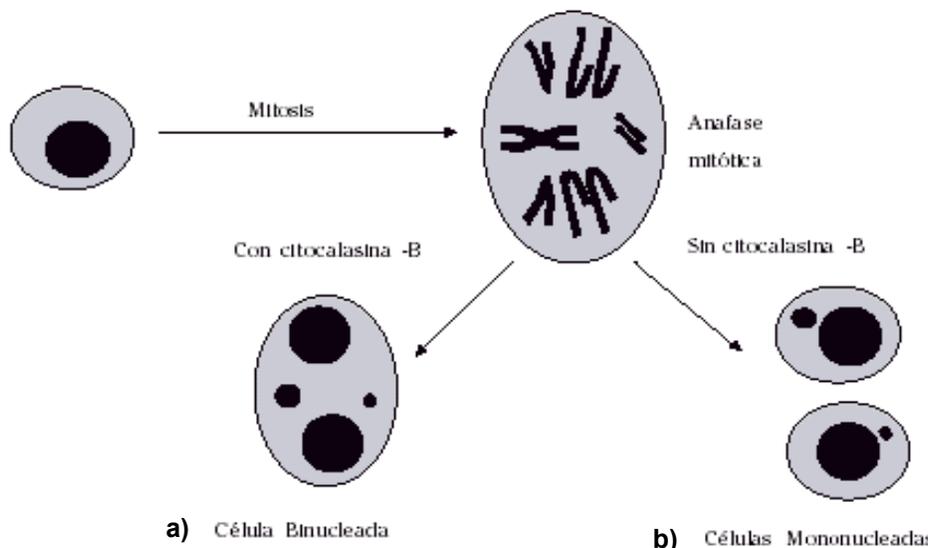


Fig. 6 Formación de Micronúcleos: a) En una célula binucleada con Citocalasina-B y b) Células mononucleadas (Tomado de Zalacain *et al.*, 2005).

Las células son tratadas con Citocalasina-B (aislada del hongo *Helmithosporum dematoideum*) agente inhibidor de ensamblaje de los microfilamentos, que inhibe la citocinesis durante la mitosis de manera que las células que han llevado a cabo un solo ciclo de división pueden ser identificadas por su aspecto binucleado (Di Giorgio, 2001 y Zalacain *et al.*, 2005) (Fig. 7).

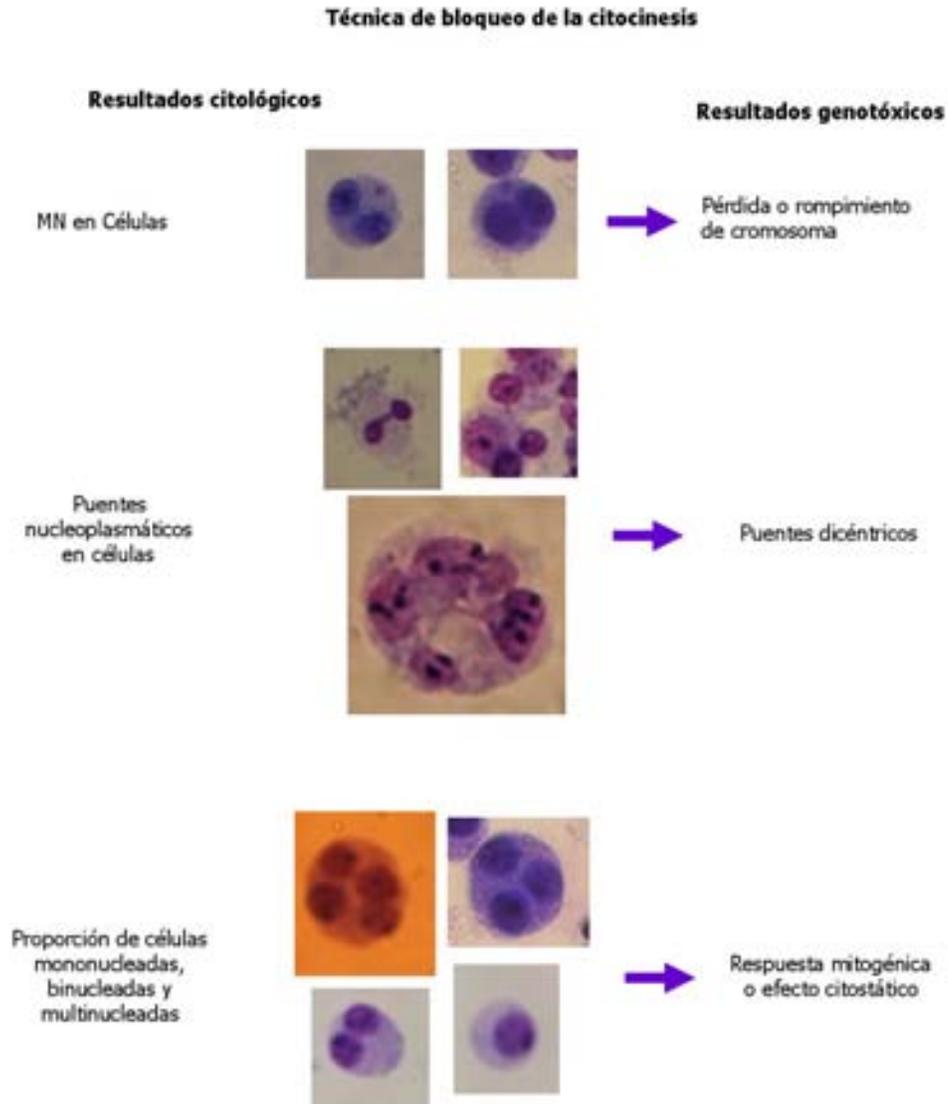


Fig. 7 Se muestran algunos resultados que se pueden esperar en la técnica de bloqueo de la citocinesis (Modificado de Fenech, 1997).

En 1999 el ensayo de MN fue validado a nivel mundial y considerado como un biomarcador efectivo para detectar daño en el ADN (agentes clastógenos y aneuploidógenos) para la validación se creó un programa internacional de MN humanos (HUMN: Human MicroNucleus Project), diseñado por Michael Fenech y colaboradores en 1999 con el fin de recopilar las frecuencias basales de MN obtenidas en diferentes laboratorios y poblaciones del mundo (Norppa, 1993; Zalacain *et al.*, 2005).

1.5.1.1 Ventajas del ensayo de micronúcleos

Una de las razones por las que se prefiere este ensayo sobre algunos otros es por su facilidad y rapidez comparado con otros ensayos como por ejemplo el de aberraciones cromosómicas. Algunas de las ventajas que tiene es que el conteo celular es muy fácil; los efectos producidos por algún agente solo son considerados en células con división mitótica; tiene un gran poder estadístico porque se pueden analizar muchas células; y sin mucho esfuerzo. Se puede obtener información utilizando anticinetocoros y pruebas de hibridación *in situ* con varias pruebas de DNA, además es muy poco probable obtener un resultado falso-positivo porque los MN solo ocurren en la división celular y son considerados en la estimación del porcentaje de células con aberraciones cromosómicas, también permite explotar otros parámetros: en la cinética de la división celular, puentes, etc. y puede ser usado en ensayos *in vivo* o *in vitro* en una gran variedad de células (Fenech, 1997; Lucero *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1997).

1.5.1.2 Mecanismos de formación de micronúcleos

Durante la división celular el ADN contenido en el núcleo se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea, debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y/o de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo (Zalacain *et al.*, 2005). Cuando esto ocurre el material genético que se desprende y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño denominado micronúcleo (MN), visible al microscopio óptico. (Zalacain *et al.*, 2005). El micronúcleo, puede derivar de cromosomas enteros o fragmentos cromosómicos acéntricos (Fenech, 1997) (Fig.8).

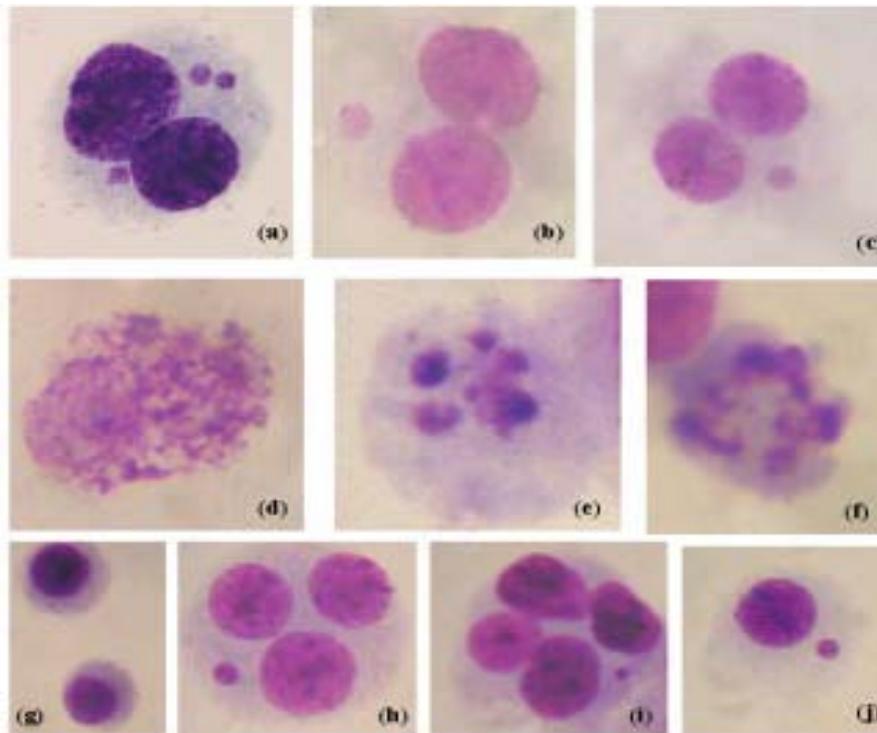


Fig. 8 (a) (b) y (c) células binucleadas portadoras de micronúcleos; tanto las células como los micronúcleos cumplen los criterios de selección definidos por el comité internacional de micronúcleos humanos; (d) (e) y (f) distintos estadios de células en vías de apoptosis; (g) (h) e (i) células con distintos índices de división nuclear; (g) células mononucleadas; (h) célula trinucleada portadora de micronúcleos; (i) célula tetranucleada portadora de micronúcleos, (j) célula mononucleada con micronúcleos. (Tomado de Zalacain *et al.*, 2005).

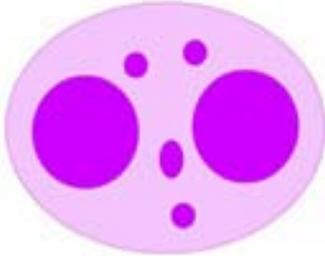
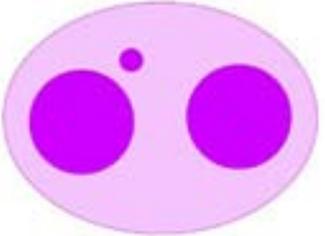
1.5.1.3 Factores de variabilidad

Existen algunos factores que pueden afectar la variabilidad en el número de micronúcleos (MN) en la frecuencia basal, entre estos se encuentran:

- a) Edad, a mayor edad mayor número de MN, el promedio de edad en donde se ve reflejado es a los 35 años en promedio.
- b) Genero, las mujeres presentan una mayor frecuencia en el número basal de MN, un déficit de folato y vitamina B12 también aumentan la frecuencia de MN. La menopausia y el desarrollo de osteoporosis también pueden aumentar la frecuencia de MN (Zalacain *et al.*, 2005).

Por otro lado también existen factores que pueden ayudar a reducir el número de MN, como el consumo regular en la dieta de agentes antioxidantes, como la vitamina E, vitamina C, β -caroteno, ginseng y algunas infusiones (Zalacain *et al.*, 2005) (Tabla II).

Tabla II: Factores modificadores del número de micronúcleos en cultivos de células humanas (modificado de Zalacain *et al.*, 2005).

| Incremento | Factores |
|---|---|
|  | Edad (>edad >MN) |
| | Genero (hombres > mujeres) |
| | Presencia de homocisteína plasmática |
| | Déficit de folato y vitamina B12 |
| | Procesos fisiológicos (menopausia y osteoporosis) |
| | Drogas citostáticas (tratamientos antitumorales) |
| | Alcohol |
| | Exposición a agentes tóxicos a diario |
|  | Agentes antioxidantes |
| | Vitamina E y C |
| | β -caroteno |
| | Infusiones de Ginseng e infusión |

II JUSTIFICACIÓN

Según la OMS la diabetes mellitus (DM) ocupa el 7° lugar de muertes en el mundo para ambos sexos, mientras que para hombres ocupa el 11° lugar y en mujeres el 7° (Becker *et al.*, 2006). Y en México es una de las principales causas de muerte. Hace veinticinco años se registraron 10 mil muertes por diabetes mellitus, lo cual representaba 2.4% del total, ubicándose en el 10° lugar (Lozano *et al.*, 2002). En el 2005 ocupó el 1° lugar con un total de 67,070 muertes esto es el 13.6% de la mortalidad general registrada en el país (pagina Web B).

La DM es un problema grave de salud para la población, la gente recurre a medidas alternativas para su control y mejoramiento de la calidad de vida, una de ellas es la medicina tradicional. El uso de plantas medicinales, es milenario, entre otras plantas con efecto hipoglicemiante se utiliza a *Tecoma stans* (De la Paz *et al.*, 2003). Por lo que es importante probar que la tintura comercial de *Tecoma stans*, proveniente del jardín de plantas medicinales de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, no produce alteraciones secundarias, como: mutaciones, alteraciones en el DNA y/o cambios en la segregación cromosómica.

III HIPÓTESIS

Si la tintura de *Tecoma stans* incrementa la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas y/o modifica el índice de proliferación con respecto al control negativo en la prueba de micronúcleos entonces *Tecoma stans* es genotóxico y/o citotóxico.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto citotóxico y genotóxico de la tintura de *Tecoma stans* en linfocitos humanos por medio de la prueba de micronúcleos (MN).

4.1.1 Objetivos particulares

1. Mediante cromatografía de placa fina (CCF) comparar el extracto de las hojas y tallos de *Tecoma stans*, con sus presentaciones comerciales de la especie (tintura y sobre con planta seca y molida para infusión), obtenidos en el jardín de plantas medicinales de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México, para corroborar que los preparados provienen de dicha especie.
2. Determinar la presencia de flavonoides y alcaloides en hojas y tallos de *Tecoma stans*.
3. Evaluar el efecto genotóxico inducido por la tintura de *Tecoma stans* en el ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos.
4. Determinar si la tintura de *Tecoma stans* modifica la cinética de proliferación en linfocitos humanos *in vitro*.

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estudio fitoquímico

El estudio de las sustancias de origen natural que poseen una virtud medicinal se conoce como farmacognosia, y el efecto que ocasionan esas sustancias en el organismo se estudia en farmacología. La fitoquímica permite detectar y posteriormente identificar los principios activos responsables de las propiedades atribuidas a las plantas (Alonso, 2008) (Fig. 9).

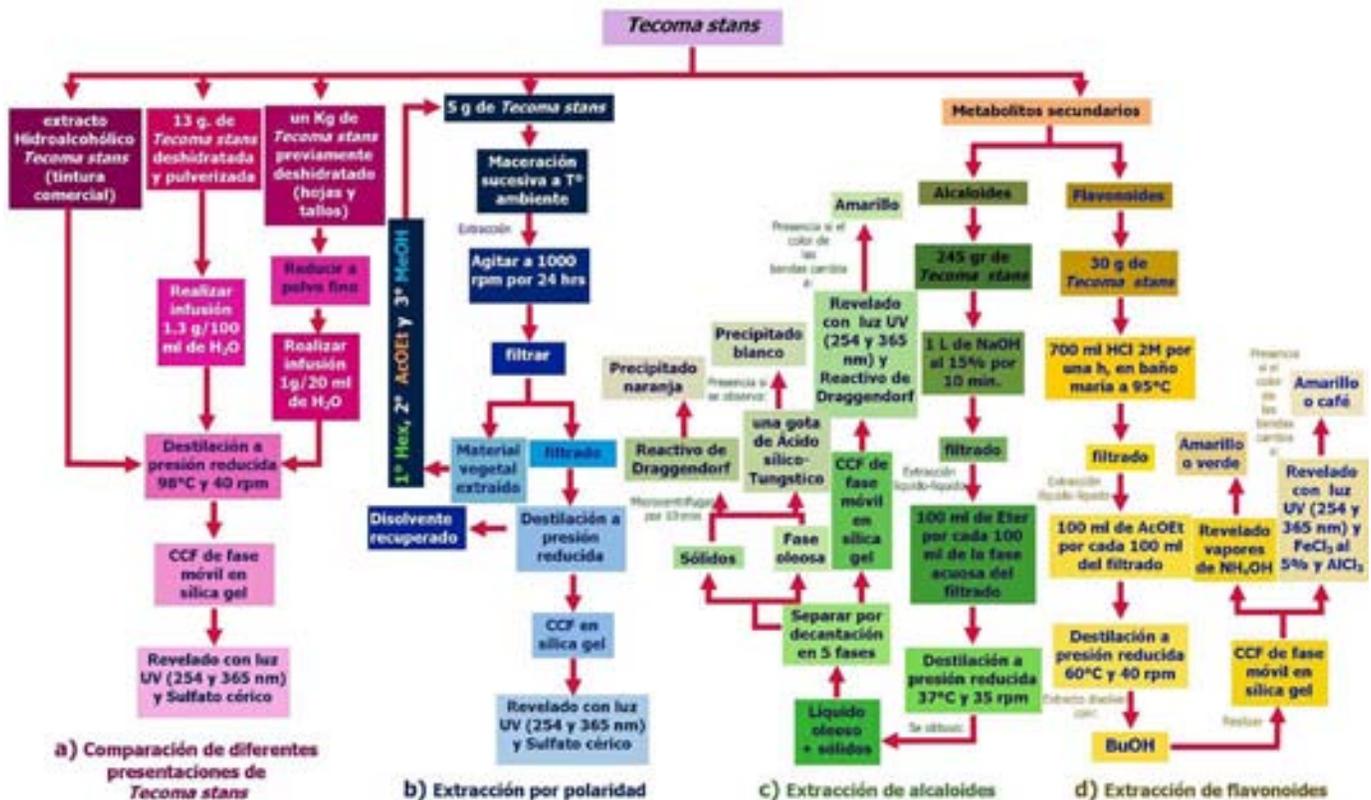


Fig. 9 Estudio fitoquímico de *Tecoma stans*.

5.1.1 Obtención de *Tecoma stans* (Fig. 9a)

Se utilizó *Tecoma stans* obtenida del jardín de plantas Medicinales de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México, esta se obtuvo en tres presentaciones: un Kg de esta previamente deshidratada (hojas y tallos), 13g de la planta deshidratada ya pulverizada y en extracto hidroalcohólico (tintura comercial).

5.1.2 Preparación de los extractos

La planta (presentación de un Kg) se trituró lo más posible hasta obtener un polvo fino. Se obtuvieron 903g de planta molida.

Se realizó una infusión, con 1g de la planta en polvo en 20ml de agua hirviendo. Posteriormente se concentró la infusión en un rotaevaporador (BÜCHI) y baño (BOEKEL) (Fig. 10) a una temperatura de $\pm 96^{\circ}\text{C}$ con presión reducida y 40 rpm, y se espero hasta reducir su volumen a 5ml aproximadamente.

5.1.3 Cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos

En dos placas de sílica gel (60F₂₅₄) de 2 x 6cm (I y II) se colocaron 3 muestras:

- Infusión de *Tecoma stans* planta ya pulverizada (1.3g/100 ml de agua).
- Infusión de *Tecoma stans* tallo y hojas (1g/20ml de agua).
- Extracto de *Tecoma stans* (tintura comercial).

Se hicieron otras dos placas para la infusión (III y IV), solo que esta vez solo se utilizaron dos muestras:

- Infusión de *Tecoma stans* planta ya pulverizada (1.3g/100ml de agua).
- Infusión de *Tecoma stans* tallo y hojas (1g/20ml de agua).



Fig. 10 Rotaevaporador

Para la aplicación de los extractos en la placa se utilizó un capilar previamente punteado se tomó un poco de la muestra y se puso en el número correspondiente en la línea de origen, esto hasta saturar el punto, dejando secar entre gota y gota (Fig. 11).

Para el corrimiento, la placa con las 3 muestras se introdujo en una cámara cromatográfica, en donde se colocó el eluyente (5ml), en este caso se utilizó etanol para correr una de las placas (I) y Butanol: Ácido Acético: Agua (6:1:3) para la otra (II), y una vez que la cámara se saturó de vapores del eluyente se introdujo la placa intentando no salpicarla con el eluyente, se tapó la cámara y cuando el eluyente llegó hasta el frente de la placa se retiró y se dejó secar (Fig. 12).

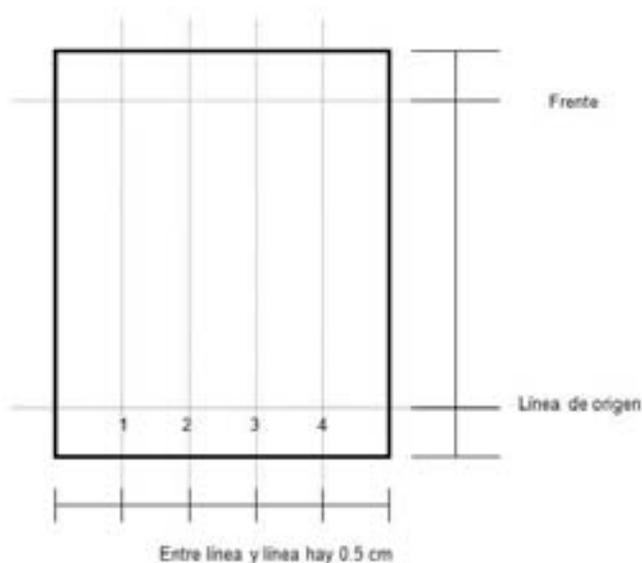


Fig. 11 Placa de sílica gel.



Fig. 12 Cámara cromatográfica.

De las placas con dos muestras una se corrió en Butanol: Ácido Acético: Agua (5:1:4) (III), y la otra se corrió en metanol (IV).

5.1.3.1 Revelado

Cuando la placa se secó se observó en una lámpara de luz UV a 254nm (onda corta) y a 365nm (onda larga), estas hacen que fluorescan las muestras o compuestos que se ven solo si absorben ese tipo de luz, se fueron marcando las manchas con un lápiz (Figs. 13 y 14).

Después con ayuda de un aspersor de cristal y una bomba de aire se rocía la placa con una disolución de Sulfato Cérico dentro de la campana de extracción, esto hasta que la placa este completamente amarilla; posteriormente la placa se colocó sobre una plancha caliente a 95°C hasta que revele las manchas de los compuestos orgánicos presentes, pudiéndose ver incluso aquellos que no se hayan detectado en UV, y se retira de la plancha hasta que las manchas queden en un fondo blanco (Fig. 15).

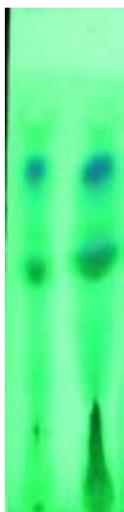


Fig. 13 Revelado con luz UV 254nm



Fig. 14 Revelado con luz UV 365nm



Fig. 15 revelado Sulfato cérico

5.1.4 Extracción con Hexano (Fig. 9b)

Para la extracción con Hexano se pesaron 5g de la planta y se le agregaron 40ml de Hexano en un frasco de cristal, se puso a agitar a ± 1000 rpm durante 24 horas. Se filtró la *Tecoma* recuperando el filtrado en un matraz, para su posterior destilación a presión reducida.

La planta molida extraída con Hexano se puso dentro de la campana de extracción para secarlo y esto usarlo en la siguiente extracción con un disolvente más polar.

El líquido obtenido se pone en el rotaevaporador a 55°C y 40 rpm y se hace la destilación hasta disminuir el volumen del extracto. Se realizaron cuatro placas de Hexano con dos muestras:

1. Extracción con Hexano planta ya pulverizada (1.3g/100 ml de agua).
2. Extracción con Hexano tallo y hojas (1g/20ml de agua).

Se corre una placa con Hexano, otra placa con Hexano: AcOEt (9:1), otra placa Hexano: AcOEt (8:2) y la última placa Hexano: AcOEt (7:3) y se revelan en luz UV y con Sulfato cérico.

Se pesó el vial del extracto de Hexano una vez que se puso en una cámara de vacío hasta evaporar, y por diferencia de peso se sacó el peso del extracto.

5.1.5 Extracción con Acetato de Etilo (AcOEt) (Fig. 9b)

Para la extracción con AcOEt se usó el macerado que se había puesto a secar de la extracción anterior, y se siguió el mismo procedimiento, el líquido obtenido se puso en el rotaevaporador a 65°C y 40 rpm hasta disminuir el volumen del extracto y se realizó una placa con dos muestras:

1. Extracción con AcOEt planta ya pulverizada (1.3g/100ml de agua).
2. Extracción con AcOEt tallo y hojas (1g/20ml de agua).

Se corrió la placa en una cámara de cromatografía con Hexano: AcOEt (7:3) y se revela en luz UV y con Sulfato cérico.

Se pesó el extracto de AcOEt.

5.1.6 Extracción con Metanol (Fig. 9b)

Para la extracción con Metanol se usó el macerado que se había puesto a secar de la extracción de AcOEt, y se siguió el mismo procedimiento, el líquido obtenido se puso en el rotaevaporador a 60°C y 40 rpm hasta disminuir a aceites y se realizaron cinco placas con dos muestras:

1. Extracción con Metanol planta ya pulverizada (1.3g/100ml de agua).
2. Extracción con Metanol tallo y hojas (1g/20ml de agua).

Se corrieron las placas en una cámara de cromatografía, la primera con Butanol: Ácido Acético: Agua (5:1:4), la placa dos se corrió con AcOEt: Metanol (5:5).

La tercera placa se corrió en AcOEt y sobre este corrimiento se corrió en AcOEt: Metanol (8:2) y sobre este se corrió en AcOEt: Metanol (7:3).

La cuarta placa se corrió en AcOEt: Metanol (9:1), la quinta placa se corrió en Butanol: Ácido Acético: Agua (6:0.5:2.5) y todas se revelaron en luz UV y con Sulfato cérico

Se realizó una placa en donde se hizo una cromatografía comparativa de los extractos de metanol con las infusiones y se aplicó:

1. Infusión de *Tecoma stans* planta ya pulverizada (1.3g/100ml de agua).

2. Infusión de *Tecoma stans* tallo y hojas (1g/20ml de agua).
3. Extracción con Metanol planta ya pulverizada (1.3g/100ml de agua).
4. Extracción con Metanol tallo y hojas (1g/20ml de agua).

Esta placa se corrió en Butanol: Ácido Acético: Agua (6:1:3), se reveló en luz UV y Sulfato cérico.

Se pesó el extracto de Metanol.

5.1.7 Extracción de flavonoides (Fig. 9d)

Para la extracción de los flavonoides se utilizó HCl 2M ya que este rompe (hidroliza) la unión de aquellos flavonoides que estén unidos a otra molécula (azúcares).

Se pesaron 30g de *Tecoma stans* y se depositaron en un vaso de precipitados de 1L y se le agregó aproximadamente 700ml de HCl 2M (hasta que la planta quedara cubierta). Se preparó un baño maría y se metió el vaso con la planta tapado con una caja petri de cristal, de tal forma que los vapores del vaso se condensaran se dejó por una hora manteniendo el agua a 95°C.

Se realizó una filtración con vacío en un matraz kitasato y un embudo büchner, el matraz se conectó al vacío y sobre el filtro se puso un círculo de papel filtro, se fue filtrando la planta que se puso en contacto con el HCl.

Cuando todo el filtrado se recuperó se hizo una extracción líquido-líquido con AcOEt (Fig. 16). Se extrae de la fase acuosa agregando 100ml de AcOEt por cada 150ml del filtrado, esto se realizó 3 veces. La fase de AcOEt se seca con Sulfato de Sodio Anhidro que después se retira por filtración.

El AcOEt se elimina con el rotaevaporador a 60°C y 40 rpm, el extracto seco de la hidrólisis soluble en AcOEt obtenido se disuelve en Butanol (BuOH). La fase acuosa de la extracción líquido-líquido se desecha; y la planta se dejó secar.

Esto se realiza así, ya que los flavonoides al ser solubles en AcOEt se recuperan con este solvente.



Fig. 16 Separación de fases.

Se pesó el extracto de flavonoides.

Una muestra del extracto de AcOEt se aplicó en una placa y se corrió con Hexano: AcOEt (5:5).

Los flavonoides se revelan en una cámara de vapores de amoníaco, en donde se observan en amarillo o verde.

Se corrió la misma placa en AcOEt y se metió a la cámara de vapores de amoníaco, después se reveló con FeCl_3 al 5% (revela fenoles, Anexo I).

La planta que se dejó secar se puso en un frasco de 4 L, ámbar de cristal, con AcOEt recuperado de extracciones, esto por 24 horas. A esta extracción se le hizo un lavado con Hexano y se fue recuperando, se retiró la planta y el extracto que quedó en el frasco se disolvió con Etanol al 96%.

Se hizo una placa con el extracto del lavado con Hexano y se corrió en Hexano: AcOEt (8:2), esto para corroborar que ya no hubiera flavonoides en la fracción menos polar, se observó con luz UV 365nm y con vapores de amoníaco, posteriormente se dividió la placa a la mitad a lo largo y a una parte se le aplicó Sulfato Cérico y a la otra mitad FeCl_3 .

Se realizaron dos placas una en sílica gel y la otra en celulosa, con las siguientes muestras:

1. Quercetina (flavonoide)
2. Extracción con AcOEt (flavonoides) tallo y hojas.
3. Rutina (flavonoide)

Se corrieron en Butanol: Ácido Acético: Agua (4:1:5), y se revelaron con vapores de amoníaco y con FeCl_3 .

Se hicieron ocho placas en sílica gel con la extracción de AcOEt (flavonoides) tallo y hojas:

- La primera se corrió en AcOEt: Ácido Fórmico: Ácido Acético: Agua (10:1:1:2).
- La segunda placa se corrió en Metanol: AcOEt (5:5).
- La tercera se corrió en Butanol: Agua (7:3).
- La cuarta placa se corrió en AcOEt: Metanol (9:1).
- La quinta placa se corrió en AcOEt: Metanol: Hexano (9:1:1).
- La sexta placa se corrió en AcOEt: Metanol: Hexano (9:1:1.5).
- La séptima placa se corrió en AcOEt: Hexano (8:2) y sobre esta se corrió en AcOEt.
- La octava placa se corrió en Butanol: Ácido Acético: Agua (6:0.5:2.5).

Todas se revelaron con luz UV a 365nm, vapores de amoniac y FeCl₃.

Se hicieron dos placas en celulosa con la fase AcOEt (flavonoides):

- La primera se corrió en AcOEt: Metanol: Hexano (9:1:1).
- La segunda placa se corrió en AcOEt: Metanol: Hexano (9:1:1.5).

Se revelaron con luz UV a 365nm, vapores de amoniac y FeCl₃.

Se hizo una placa de dos dimensiones (10 x 13 cm); se aplica el extracto de AcOEt (flavonoides) en dos puntos y se corre en AcOEt: Metanol: Hexano (9:1:1.5) hasta que corra 9.5cm aproximadamente (Fig. 17):

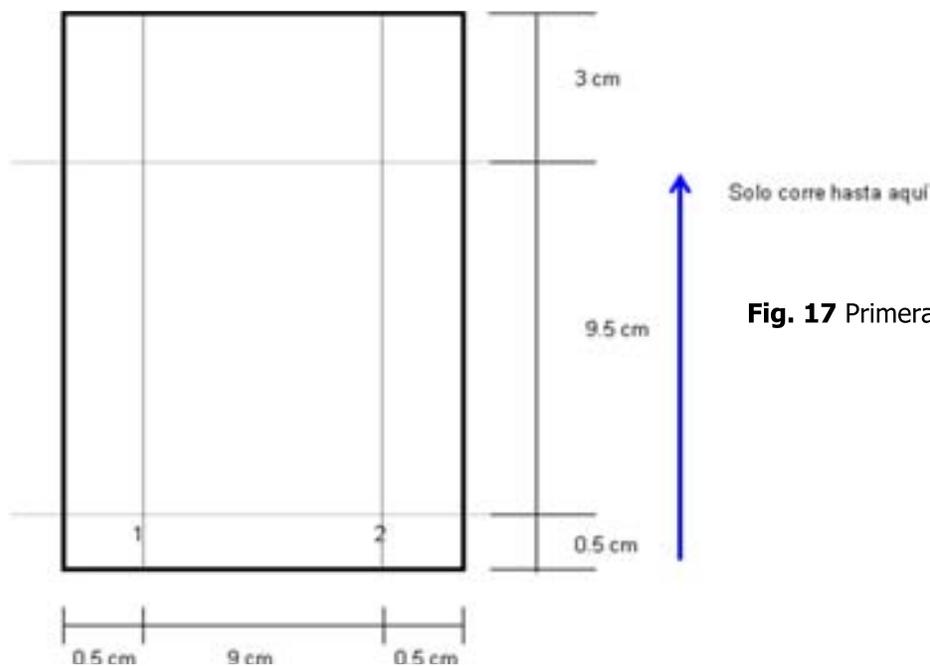


Fig. 17 Primera dimensión 1D

Una vez que corrió se rota 90° la placa y se aplican los estándares de flavonoides, en este caso:

1. Quercitina
2. Luteolina
3. Rutina
4. Ácido Clorogénico
5. Miricetina

Y se corren en el mismo eluyente (AcOEt: Metanol: Hexano (9:1:1.5)) solo 9 cm aproximadamente (Fig. 18).

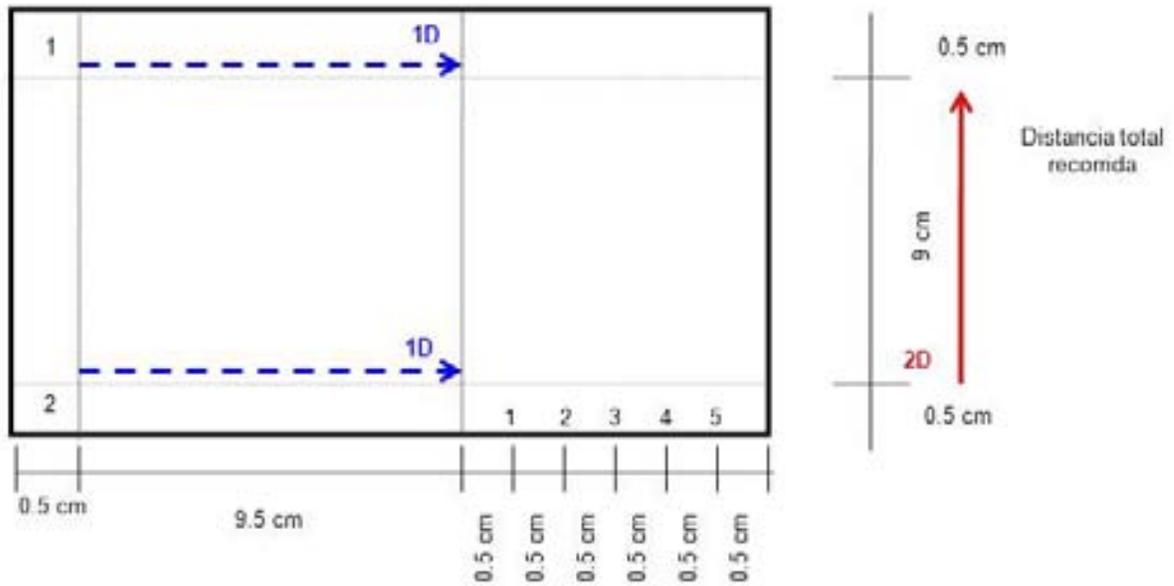


Fig. 18 Segunda dimensión 2D

Una vez que corrió se observa en luz UV a 365nm y se revela con vapores de amoníaco y FeCl_3 (Fig. 19).

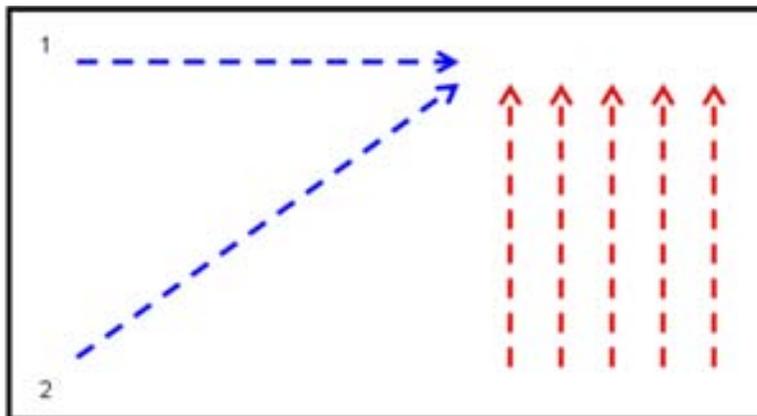


Fig. 19 Resultado

Se realizó otra placa de dos dimensiones de la extracción de AcOEt la cual se corrió en AcOEt: Metanol: Hexano (9:1:2), a esta se aplican mas estándares:

1. Quercitina
2. Luteolina
3. Rutina
4. Ácido Clorogénico
5. Miricetina
6. Ácido Cumarico
7. Cumarina

Se reveló con luz UV a 365nm, vapores de amoniaco y el corrimiento 1D, se revela con FeCl_3 y todo lo demás con AlCl_3 al 1% (Anexo I).

5.1.8 Extracción de alcaloides (Fig. 9c)

En un vaso de precipitados se colocaron 245g de planta en 1L de Hidróxido de Sodio al 5%, se dejó por 10 minutos y se enjuagó con 500ml de Hidróxido de Sodio, y después se hizo la extracción líquido-líquido con Éter, y la fase Éter se secó con Sulfato de Sodio. Se eliminó el éter a 37°C y a 35 rpm, se dejó hasta sequedad.

Se dejó reposar unos días la extracción y se pudo observar que el extracto obtenido se conforma de un líquido oleoso que se separó por decantación del sólido formado, el cual fue disuelto en dos pasos: el primero con AcOEt y el segundo con AcOEt: Metanol (9:1); obteniendo (Fig. 20).



Fig. 20 Formación de fases de alcaloides.

Se hizo una placa de sílica gel donde se corrieron las 3 fracciones en un eluyente Metanol: AcOEt (9:1) y después sobre esta se corrió en Metanol: AcOEt (7:3), se observó en luz UV 254nm y 365nm y se reveló con reactivo de Draggendorf (Anexo I). Los alcaloides revelan en anaranjado y se observan reacciones de precipitación originadas por los ácidos de metales pesados.

Se hizo otra placa en donde se aplicaron las 3 fracciones y se corrió en Metanol: AcOEt (5:5), se reveló en luz UV corta y larga y con reactivo de Draggendorf.

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió hacer una prueba de la fracción 3: colocando en una caja petri una gota de Ácido Silicotungstico (Anexo I) y sobre este una gota de la fracción 3, y en otro lado de la caja se colocó una gota de reactivo de Draggendorf y sobre este una gota de la misma fracción.

Se obtuvo el peso de la fracción 3.

5.2 Estudio genotóxico

5.2.1 Población de estudio

Cuatro individuos sanos de origen mexicano (2 hombres y 2 mujeres) entre 20 y 35 años de edad.

5.2.1.1 Criterios de inclusión

- Individuos sanos.
- No estén bajo tratamiento médico.
- No fumen, que no ingieran alguna droga ni alcohol, etc.
- Ayuno de 12 horas.
- Sin ingerir alimentos con mucha grasa por lo menos 24 horas.

5.2.1.2 Criterios de eliminación

- Que requieran estar bajo un tratamiento médico prolongado.
- Problemas en el momento de la toma de muestra durante el estudio.
- Que la muestra de sangre contenga grasa.

A todos los individuos se les proporcionó información de la investigación que se va a realizar con la muestra de sangre y posteriormente firmaron la carta de consentimiento (Anexo II).

5.2.2 Concentración de la extracto hidroalcohólico (tintura comercial) y controles

Se analizaran 5 concentraciones de la tintura de *Tecoma stans* (0.06ml/ml, 0.045ml/ml, 0.03ml/ml, 0.0225ml/ml, 0.015ml/ml) obtenida del jardín de plantas Medicinales de San Cristóbal de las Casas, Chiapas. México (Medicamento para la diabetes).

Se corrieron simultáneamente los controles negativo (agua) y positivo (Mitomicina C). Para cada experimento se realizarán por lo menos dos repeticiones.

5.2.3 Técnica de micronúcleos

5.2.3.1 Obtención de la muestra

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron usando el sistema BD vacutainer de toma múltiple (Morán, 2001) (Fig. 21).

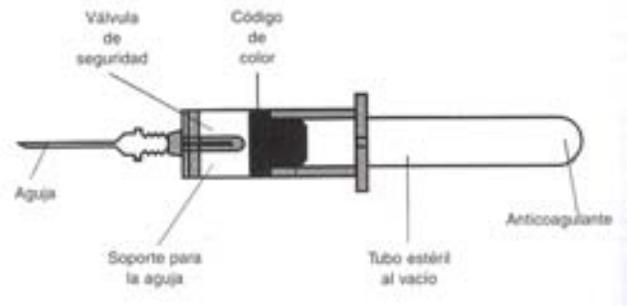


Fig. 21 Sistema BD vacutainer (tomado de Morán, 2001).

- 1.- Limpiar con una torunda con alcohol el área de donde se obtendrá la sangre (venas superficiales del brazo, parte posterior del codo).
- 2.-Se obtuvieron 18ml de sangre periférica por venopunción, con un tubo vacutainer estéril con anticoagulante heparina sódica, 86 us points) de 6ml de capacidad cada tubo (3 tubos vacutainer) (Fig. 22).
- 3.- Las muestras fueron rotuladas y posteriormente procesadas para la técnica de micronúcleos.

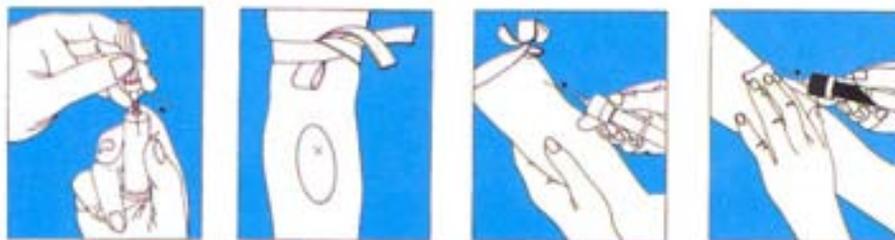


Fig. 22 toma de muestra (tomado de Morán, 2001).

5.2.3.2 Siembra de los linfocitos

La muestra se separó por el método de obtención de las fracciones sanguíneas con el fin de obtener la capa leucocítica (fracción de células nucleadas) para lo cual:

- 1.-La muestra de sangre se centrifugó a 1500 rpm por 30 minutos.
2. Por medio de una pipeta Pasteur estéril se recuperó la capa de células nucleadas (Fig. 23).
- 3.-La muestra de células nucleadas se distribuyó en siete tubos de centrifuga estériles de 10 ml de capacidad, con fondo cónico en los cuales se agregó 4ml de medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 0.2ml de fitohemaglutinina (forma M) (Gibco), 0,25ml de Penicilina-streptomina (Gibco).
- 4.-Los cultivos se incubaron a 37 °C por 24 horas.

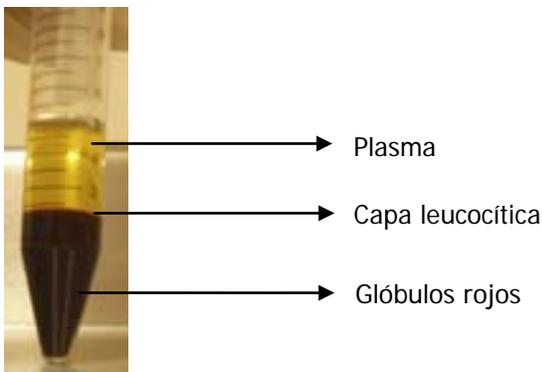


Fig. 23 Obtención de fracciones sanguíneas por centrifugación.

5.2.3.3 Tratamiento

Pasadas las primeras 24 horas después de la siembra se realizó el tratamiento de los cultivos:

Para la tintura de *Tecoma stans* se utilizaron cinco de los tubos de cultivo para las diferentes concentraciones de la tintura (0.06ml/ml, 0.045ml/ml, 0.03ml/ml, 0.0225ml/ml, 0.015ml/ml).

A un tubo de cultivo se le agregó 0.04ml/ml de Mitomicina C. [80ng/ml] (Sigma), como control positivo y otro cultivo se le agregó agua como control negativo.

Los cultivos se incubaron a 37 °C por 24 horas.

5.2.3.3.1 Bloqueo de la citocinesis

A las 44 horas después de la siembra a todos los cultivos celulares se les agregó 0.04ml/ml de Citocalasina-B [4.5µg/ml] y se dejaron incubar hasta que los cultivos completaron las 72 horas de incubación a 37° C.

5.12.3.4 Cosecha

- 1.- Se sacaron los cultivos de la incubadora y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular.
- 2.- Posteriormente se prefijaron los cultivos con un ml de fijador Carnoy (3 partes de metanol (Merck) y una parte de Ácido Acético glacial (Sigma)).
- 3.- Se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos.
- 4.-Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular.
- 5.- Se agregaron 5 ml de fijador y se centrifugo los cultivos a 1500 rpm durante 10 minutos.
- 6.- Se retiró nuevamente el sobrenadante y se resuspendió el botón celular.
- 7.- Se agregaron 5ml de fijador y centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, se guardaron en el refrigerador hasta realizar las preparaciones.

5.2.3.5 Elaboración de las preparaciones

- 1.- Con ayuda de una pipeta Pasteur se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular.
- 2.- Se gotearon de 3 a 4 gotas en un portaobjetos limpio y seco, y se dejo secar al aire.

Tinción: Las preparaciones se tiñeron en una solución de 5ml Giemsa (Merck) y 45ml de buffer Gurr durante 5 minutos; al concluir el tiempo se enjuagaron en agua, se dejaron secar y se observaron al microscopio óptico a 40X.

Análisis al microscopio: Las preparaciones se analizaron en un microscopio óptico a 40X (Axiostar, Zeiss), en campo claro y los parámetros que se observaron son:

A) Genotoxicidad

Se analizaron 2000 células binucleadas y se obtuvo la frecuencia de micronúcleos. Además se registraron el número de micronúcleos en células Mono, BN, Tri y Tretanucleadas y la presencia de puentes.

B) Citotoxicidad (*CBPI*)

Se cuantificó el número de células mononucleadas (M_1), binucleadas (M_2), trinucleadas (M_3) y tretanucleadas (M_4) para obtener el índice de proliferación de citocinesis bloqueada (CBPI):

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

N = Número total de células

5.2.4 Criterios de lectura

Criterios de lectura de las células binucleadas y micronúcleos (tomado de Zalacain *et al.*, 2005).

| CÉLULAS BINUCLEADAS (Fig. 24) | MICRONÚCLEOS (Fig. 25) |
|--|---|
| El citoplasma debe distinguirse claramente (a) | El diámetro oscila entre 1/16-1/3 de la media del diámetro del núcleo principal (a) |
| Membrana citoplasmática y nuclear intactas (b) | No refractarios (b) |
| Núcleos con similar grado de condensación de cromatina (c) | Intensidad de tinción similar a los núcleos principales o superior (c) |
| Igual tamaño, forma (ovalados) y patrón de tinción (d) | Forma similar a los núcleos de la célula binucleada (d) |
| Pueden tocarse pero no solaparse (e) | Pueden estar unidos por puentes nucleoplasmáticos (e) |
| Ninguno de los núcleos debe encontrarse en etapas de apoptosis | Pueden tocar los núcleos de la células binucleadas pero no solaparse con ellos (f) |

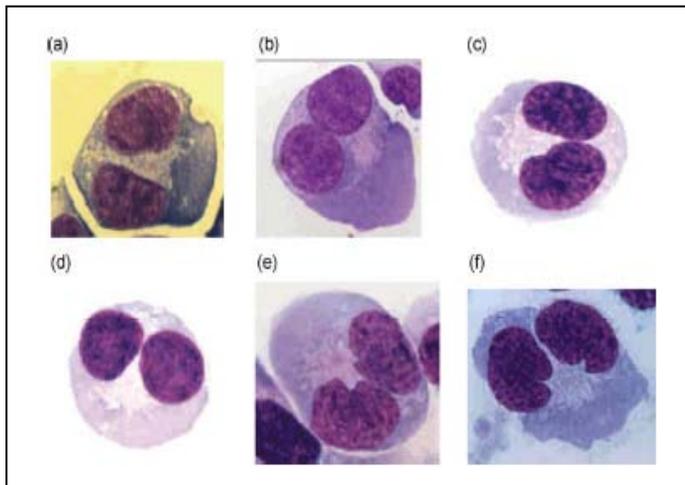


Fig. 24 Células binucleadas (a-f) (Tomado de Fenech *et al.*, 1999).

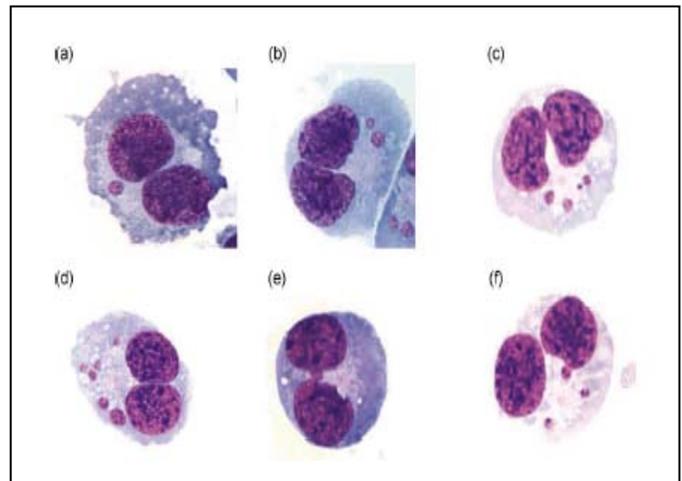


Fig. 25 Células binucleadas típicas con 1, 2, 3 y 6 micronúcleos (a-d); (e) micronúcleo que forma un puente entre ambos núcleos y (f) micronúcleo cerca de uno de los núcleos de las célula (Tomado de Fenech *et al.*, 1999).

VI ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la frecuencia de micronúcleos (MN) en las células binucleadas (BN) se empleó el estadístico de prueba Z de proporciones con un α de 0.05.

Para el Índice de Proliferación de Citocinesis Bloqueada (CBPI), se analizaron las diferencias a través de la prueba de t para muestras pequeñas con un α de 0.05.

Para saber si la distribución de MN es dependiente de la concentración y del sexo de la persona, se realizó una prueba de independencia χ^2 con un α de 0.05.

VII RESULTADOS

7.1 Estudio fitoquímico

En la extracción de extractos se encontró glucósidos, fenoles, flavonoides y terpenos, como componentes de *Tecoma stans*, en una concentración de 11.7gr de tallo y hoja en 100ml de agua, hervida por 6 minutos realizado en el laboratorio de Química, Facultad de Ciencias, UNAM, por la QA Verónica Muñoz Ocoero.

La extracción realizada con Hexano tuvo un rendimiento total 0.0847g, y en la cromatografía de placa fina que se realizó para este extracto se encontró que el mejor eluyente fue Hexano: AcOEt (8:2), posteriormente se revelaron en 254nm y 365nm y con sulfato cérico (Figs. 26, 27 y 28).



Fig. 26 Hexano UV 254nm.



Fig.27 Hexano UV 365nm.



Fig. 28 Hexano revelado sulfato cérico.

Para la extracción con AcOEt, tuvo un rendimiento de 0.133g y se realizó una placa que se corrió con Hexano: AcOEt (7:3), ya que desde el principio quedaron bien definidas las bandas, posteriormente se reveló en luz de 254nm y 365nm, así como Sulfato Cérico (Figs. 29, 30 y 31).



Fig. 29 AcOEt UV 254nm



Fig. 30 AcOEt UV 365nm.



Fig. 31 AcOEt Revelado Sulfato Cérico.

En la extracción con metanol el rendimiento fue de 0.8835g y se encontró que el mejor eluyente fue Butanol: Ácido Acético: Agua (6:1:3), tanto para infusiones, como para el extracto metanólico, y posteriormente se reveló con luz de 254nm y 365nm así como en Sulfato Cérico (Figs. 32, 33 y 34).

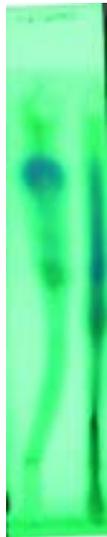


Fig. 32 Metanol UV a 254nm.



Fig. 33 Metanol UV 365nm.



Fig. 34 Metanol revelado Sulfato Cérico

Flavonoides

El rendimiento de flavonoides fue de 1.8176g, el mejor eluyente para estos fue AcOEt: Metanol: Hexano (9:1:1.5), la cual se reveló con vapores de amoniac y luz de 254nm y 365nm, así

como FeCl_3 , también se corrió una placa del lavado con Hexano, se reveló con luz UV 365nm y con vapores de amoníaco y no hubo cambio, posteriormente se dividió la placa a la mitad a lo largo y a una parte se le aplico Sulfato Cérico y a la otra mitad FeCl_3 , no hubo cambio, así que se descartan flavonoides en esta fracción.

También se realizó la placa de dos dimensiones para la cual se observó un mejor corrimiento en AcOEt: Metanol: Hexano (9:1:2), también se reveló en luz de 254nm y la dimensión 1D se revela con FeCl_3 y todo lo demás con AlCl_3 (Figs. 35, 36, 37 y 38).

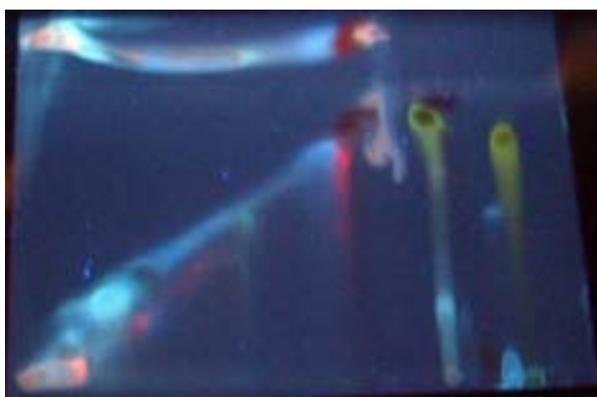


Fig. 35 Flavonoides onda UV 365nm.

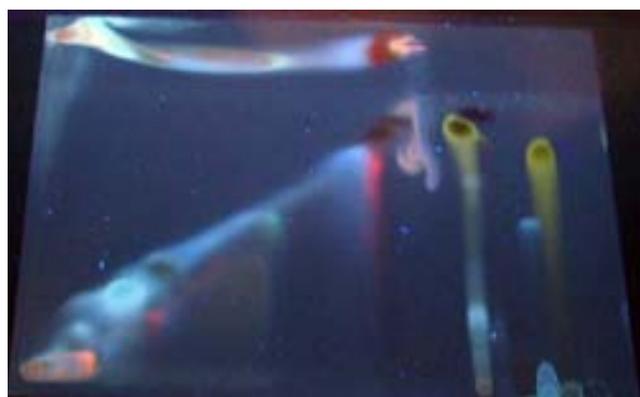


Fig. 36 Flavonoides revelado con vapores de amoníaco, onda UV 365nm.



Fig. 37 Revelado con FeCl_3 y AlCl_3 .



Fig. 38 Revelado con AlCl_3 onda UV 365nm.

Alcaloides

Se hicieron placas de capa fina para la cromatografía y en estas se puede observar una banda mucho más consistente en la fracción 3, así que, se hizo una prueba confirmativa de esta colocando en una caja petri una gota de Ácido Silicotúngstico y sobre este una gota de la fracción 3, y en otro lado de la caja se colocó una gota de reactivo de Draggendorf y sobre este una gota de la misma fracción, en ambos caso se observó presencia de alcaloides (Figs. 39, 40, 41 y 42). El rendimiento de esta fracción fue de 12.79g.

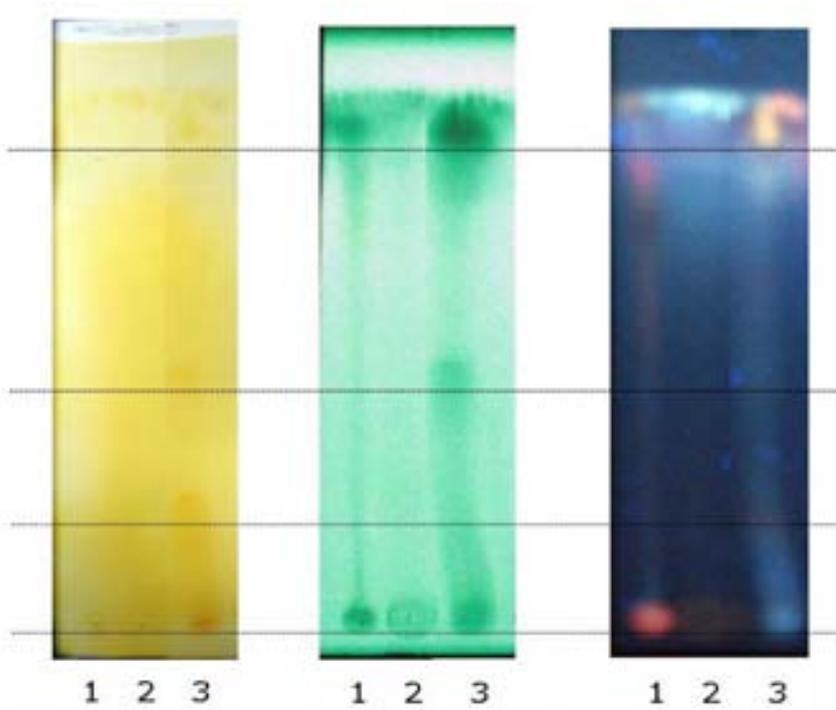


Fig. 39 Alcaloides luz UV 254nm.

Fig. 40 Alcaloides luz UV 365nm.

Fig. 41 Alcaloides revelados con reactivo de Dragendorff.

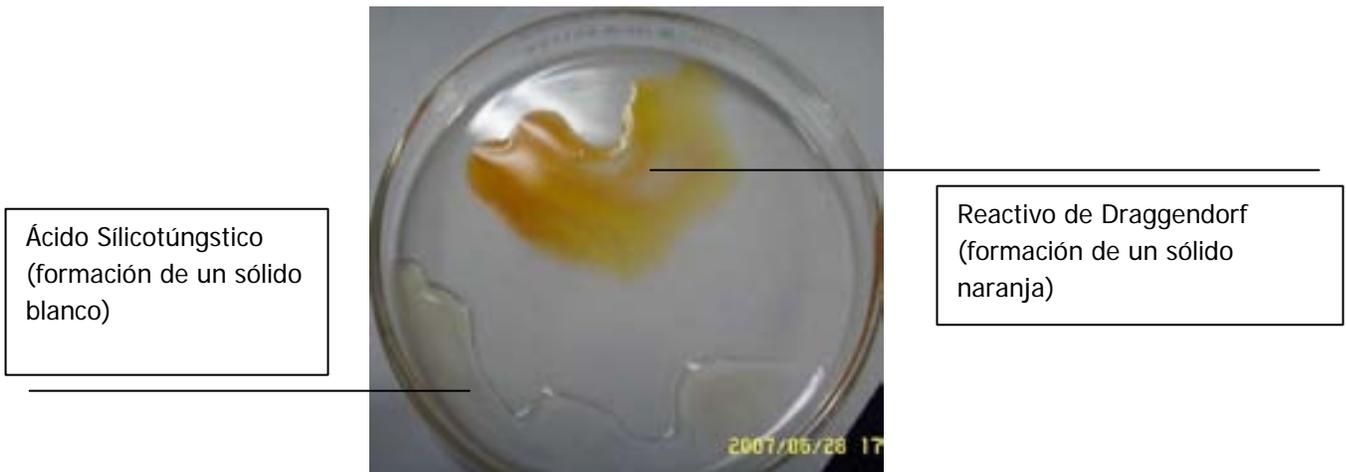


Fig. 42 Prueba de alcaloides fracción 3

7.2 Estudio genotóxico

Tabla III: Distribución de la frecuencia de micronúcleos (MN) y puentes en linfocitos humanos en células binucleadas (BN).

| MUESTRAS [ml/ml] | Micronúcleos (MN) | | Total | % MN | Puentes | % Puentes | |
|------------------------------|-------------------|------|-------|------|---------|-----------|------|
| | 0 | 1 | | | | | |
| 1 Masculino (31 años) | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 2337 | 112 | 2449 | 4.57 | 9 | 0.37 |
| Control | (agua) | 2300 | 19 | 2319 | 0.82 | 0 | 0.00 |
| Tecoma | 0.015 | 2008 | 34 | 2042 | 1.67 | 14 | 0.69 |
| | 0.0225 | 2032 | 10 | 2042 | 0.49 | 1 | 0.05 |
| | 0.03 | 2021 | 35 | 2056 | 1.70 | 6 | 0.29 |
| 2 Masculino (28 años) | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 2044 | 166 | 2210 | 7.51 | 10 | 0.45 |
| Control | (agua) | 2080 | 22 | 2102 | 1.05 | 3 | 0.14 |
| Tecoma | 0.015 | 2036 | 7 | 2043 | 0.34 | 3 | 0.15 |
| | 0.0225 | 2044 | 10 | 2054 | 0.49 | 3 | 0.15 |
| | 0.03 | 2155 | 12 | 2167 | 0.55 | 1 | 0.05 |
| 3 Femenino (34 años) | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 2006 | 79 | 2085 | 3.79 | 8 | 0.38 |
| Control | (agua) | 2141 | 16 | 2157 | 0.74 | 2 | 0.09 |
| Tecoma | 0.015 | 2063 | 13 | 2076 | 0.63 | 3 | 0.14 |
| | 0.0225 | 2224 | 4 | 2228 | 0.18 | 1 | 0.04 |
| | 0.03 | 2007 | 16 | 2023 | 0.79 | 3 | 0.15 |
| 4 Femenino (22 años) | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 2031 | 73 | 2104 | 3.47 | 7 | 0.33 |
| Control | (agua) | 2008 | 7 | 2015 | 0.35 | 3 | 0.15 |
| Tecoma | 0.015 | 2006 | 8 | 2014 | 0.40 | 2 | 0.10 |
| | 0.0225 | 2017 | 10 | 2027 | 0.49 | 1 | 0.05 |
| | 0.03 | 2016 | 4 | 2020 | 0.20 | 4 | 0.20 |

Tabla IV Distribución de células de acuerdo al número de núcleos e Índice de Proliferación de Citocinesis Bloqueada (CBPI).

| MUESTRAS [ml/ml] | | Distribución de células (%) de acuerdo al número de núcleos | | | | | | | | | | Total de células | % de BN | CBPI |
|------------------------------|--------|---|-------|------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|------------|------|
| | | Mono | (%) | BN | (%) | Tri | (%) | Tetra | (%) | Penta | (%) | | | |
| 1 Masculino (31 años) | | | | | | | | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 93 | 3.503 | 2449 | 92.2 | 9 | 0.34 | 100 | 3.77 | 4 | 0.151 | 2655 | 92.24 | 2.05 |
| Control | (agua) | 162 | 6.311 | 2319 | 90.3 | 11 | 0.43 | 61 | 2.38 | 14 | 0.545 | 2567 | 90.34 | 2.01 |
| Tecoma | 0.015 | 553 | 21.16 | 2042 | 78.1 | 6 | 0.23 | 12 | 0.46 | 0 | 0 | 2613 | 78.15 | 1.80 |
| | 0.0225 | 67 | 3.165 | 2042 | 96.5 | 4 | 0.189 | 4 | 0.19 | 0 | 0 | 2117 | 96.46 | 1.97 |
| | 0.03 | 1053 | 33.86 | 2056 | 66.1 | 1 | 0.03 | 0 | 0.00 | 0 | 0 | 3110 | 66.11 | 1.66 |
| 2 Masculino (28 años) | | | | | | | | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 212 | 8.607 | 2210 | 89.73 | 3 | 0.122 | 38 | 1.543 | 0 | 0 | 2463 | 89.73 | 1.95 |
| Control | (agua) | 152 | 6.465 | 2102 | 89.41 | 20 | 0.851 | 76 | 3.233 | 1 | 0.043 | 2351 | 89.41 | 2.01 |
| Tecoma | 0.015 | 669 | 24.64 | 2043 | 75.25 | 0 | 0 | 3 | 0.11 | 0 | 0 | 2715 | 75.25 | 1.76 |
| | 0.0225 | 85 | 3.968 | 2054 | 95.89 | 1 | 0.047 | 2 | 0.093 | 0 | 0 | 2142 | 95.89 | 1.96 |
| | 0.03 | 332 | 13.25 | 2167 | 86.51 | 5 | 0.2 | 1 | 0.04 | 0 | 0 | 2505 | 86.51 | 1.87 |
| 3 Femenino (34 años) | | | | | | | | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 77 | 3.409 | 2085 | 92.3 | 3 | 0,13 | 94 | 4.161 | 0 | 0 | 2259 | 92.30 | 2.05 |
| Control | (agua) | 56 | 2.365 | 2157 | 91.09 | 3 | 0,13 | 152 | 6.419 | 0 | 0 | 2368 | 91.09 | 2.11 |
| Tecoma | 0.015 | 37 | 1.719 | 2076 | 96.42 | 0 | 0 | 40 | 1.858 | 0 | 0 | 2153 | 96.42 | 2.02 |
| | 0.0225 | 130 | 5.511 | 2228 | 94.45 | 1 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2359 | 94.45 | 1.95 |
| | 0.03 | 200 | 8.997 | 2023 | 91 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2223 | 91.00 | 1.91 |
| 4 Femenino (22 años) | | | | | | | | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 20 | 0.894 | 2104 | 94.05 | 4 | 0.179 | 107 | 4.783 | 2 | 0.089 | 2237 | 94.05 | 2.09 |
| Control | (agua) | 21 | 0.939 | 2015 | 90.08 | 10 | 0.447 | 191 | 8.538 | 0 | 0 | 2237 | 90.08 | 2.17 |
| Tecoma | 0.015 | 16 | 0.757 | 2014 | 95.27 | 2 | 0.095 | 82 | 3.879 | 0 | 0 | 2114 | 95.27 | 2.07 |
| | 0.0225 | 32 | 1.547 | 2027 | 98.02 | 2 | 0.097 | 7 | 0.338 | 0 | 0 | 2068 | 98.02 | 1.99 |
| | 0.03 | 27 | 1.319 | 2020 | 98.68 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2047 | 98,68 | 1.99 |

Mono: Mononucleada, BN: Binucleada, Tri: Trinucleada, Tetra: Tetranucleada, Penta: Pentanucleada.

Tabla V Distribución de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos de acuerdo al número de núcleos en células.

| MUESTRAS [ml/ml] | | Distribución de MN de acuerdo al número de núcleos en las células | | | | Total de MN | Total de células | MN/ células |
|------------------------------|--------|--|-----|-----|-------|----------------|---------------------|----------------|
| | | Mono | BN | Tri | Tetra | | | |
| 1 Masculino (31 años) | | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 3 | 112 | 1 | 10 | 126 | 2655 | 0.047 |
| Control | (agua) | 4 | 19 | 0 | 0 | 23 | 2567 | 0.009 |
| Tecoma | 0.015 | 15 | 34 | 0 | 0 | 49 | 2613 | 0.019 |
| | 0.0225 | 6 | 10 | 0 | 0 | 16 | 2117 | 0.008 |
| | 0.03 | 21 | 35 | 0 | 0 | 56 | 3110 | 0.018 |
| 2 Masculino (28 años) | | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 27 | 166 | 1 | 2 | 196 | 2463 | 0.080 |
| Control | (agua) | 3 | 22 | 3 | 0 | 28 | 2351 | 0.012 |
| Tecoma | 0.015 | 8 | 7 | 0 | 0 | 15 | 2715 | 0.006 |
| | 0.0225 | 3 | 10 | 0 | 0 | 13 | 2142 | 0.006 |
| | 0.03 | 7 | 12 | 0 | 0 | 19 | 2505 | 0.008 |
| 3 Femenino (34 años) | | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 3 | 79 | 0 | 1 | 83 | 2259 | 0.037 |
| Control | (agua) | 1 | 16 | 1 | 2 | 20 | 2368 | 0.008 |
| Tecoma | 0.015 | 1 | 13 | 0 | 0 | 14 | 2153 | 0,007 |
| | 0.0225 | 3 | 4 | 0 | 0 | 7 | 2359 | 0.00297 |
| | 0.03 | 6 | 16 | 0 | 0 | 22 | 2223 | 0.010 |
| 4 Femenino (22 años) | | | | | | | | |
| MMC | 0.04 | 1 | 73 | 0 | 2 | 76 | 2237 | 0.034 |
| Control | (agua) | 2 | 7 | 1 | 5 | 15 | 2237 | 0.007 |
| Tecoma | 0.015 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 | 2114 | 0.004 |
| | 0.0225 | 1 | 10 | 0 | 0 | 11 | 2068 | 0.005 |
| | 0.03 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 | 2047 | 0.002 |

MN: Micronúcleos, Mono: Mononucleada, BN: Binucleada, Tri: Trinucleada, Tetra: Tetranucleada, Penta: Pentanucleada.

Tabla VI Distribución de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos de acuerdo al número de núcleos en células en la concentración [0.045 ml/ml].

| Individuos | Mono | BN | Total de MN | Total de células | No. total de MN/BN | Total de BN | MN/células | Puentes | CBPI |
|------------------------------|------|----|-------------|------------------|--------------------|-------------|------------|---------|------|
| 1 Masculino (31 años) | 30 | 10 | 40 | 393 | 10 | 101 | 0.102 | 5 | 1.25 |
| 2 Masculino (28 años) | 7 | 7 | 14 | 317 | 7 | 172 | 0.044 | 6 | 1.53 |
| 3 Femenino (34 años) | 6 | 1 | 7 | 161 | 1 | 27 | 0.04435 | 9 | 1.16 |
| 4 Femenino (22 años) | 0 | 1 | 1 | 46 | 1 | 2 | 0.022 | 0 | 1.02 |

MN: micronúcleos, Mono: Mononucleada, BN: Binucleadas, CBPI: índice de proliferación de citocinesis bloqueada.

Tabla VII Distribución de células de acuerdo al número de núcleos en células en la concentración [0.045 ml/ml].

| Individuos | Distribución de células (%) de acuerdo al número de núcleos | | | | | | | | Total de células |
|------------------------------|---|-------|-----|-------|-----|-----|-------|------|------------------|
| | Mono | (%) | BN | (%) | Tri | (%) | Tetra | (%) | |
| 1 Masculino (31 años) | 291 | 74.05 | 101 | 25.7 | 0 | 0 | 1 | 0.25 | 393 |
| 2 Masculino (28 años) | 145 | 45.74 | 172 | 54.26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 317 |
| 3 Femenino (34 años) | 134 | 83.23 | 27 | 16.77 | 0 | 0 | 0 | 0 | 161 |
| 4 Femenino (22 años) | 44 | 95.65 | 2 | 4.348 | 0 | 0 | 0 | 0 | 46 |

MN: Micronúcleos, Mono: Mononucleada, BN: Binucleada, Tri: Trinucleada, Tetra: Tetranucleada, Penta: Pentanucleada.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estadístico de prueba Z de proporciones, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de las diferentes concentraciones; lo que indica que todas las concentraciones [0.03, 0.0225, 0.015 ml/ml] son iguales en relación al efecto que se produce, en el control negativo (agua), por lo tanto a las concentraciones bajo la metodología planteada no se encontró un efecto genotóxico.

Para el Índice de Proliferación de Citocinesis Bloqueada (CBPI), se utilizó la prueba de t para muestras pequeñas, en donde tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa, en la comparación de las diferentes concentraciones [0.03, 0.0225, 0.015 ml/ml] y el control positivo (MMC) contra el control negativo (agua), por lo cual bajo las condiciones de este estudio tampoco se encuentra un efecto citostático.

Para observar si existen diferencias entre la concentración de *Tecoma* y el sexo de los individuos se utilizó prueba de independencia χ^2 , la cual no mostró diferencias estadísticamente significativas, esto es que la presencia de MN, no depende del sexo, ni de la concentración de la tintura, bajo la metodología realizada en este estudio. Es importante resaltar que el intervalo de edad de los individuos (20 a 35 años) no fue un factor que influye en la presencia de MN.

VIII DISCUSIÓN

Tecoma stans es ampliamente usada por los mexicanos como alternativa o complemento para el tratamiento de la diabetes, varios estudios han reportado actividades antidiabéticas en extractos de esta planta, por ejemplo: decrecimiento en la rápida glicemia, así como en el área baja la curva en un test de tolerancia a la glucosa, también se observó una reducción en el colesterol en plasma y una prevención en la pérdida de peso en ratas tratadas con estreptozotocina (Aguilar-Santamaría *et al.*, 2009).

8.1 Estudio fitoquímico

En el estudio fitoquímico realizado en el laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias, UNAM, por la QA Verónica Muñoz, se determinó la presencia de glucósidos, fenoles, flavonoides y terpenos, y aunque en este estudio no se encontró la presencia de alcaloides, en un estudio realizado posteriormente se detectó la presencia de estos, debido, tal vez, a como menciona Costantino *et al.* (2003) que la composición de los alcaloides de *Tecoma stans* depende del lugar donde crece; así como, las condiciones ambientales y el tiempo que se tiene almacenada, ya que estos pueden eliminarse por completo o disminuir a una cantidad mínima difícil de detectar la presencia de estos. Según libros de plantas medicinales es conveniente coleccionar las plantas medicinales silvestres cuando están en pleno crecimiento y sean abundantes, pero si la abundancia llega al amontonamiento, pueden alterarse las sustancias curativas; es posible que el poder medicinal de una misma especie varíe según la región donde se crezca, la etapa de crecimiento en que se encuentre y la época del año en que se colecciona, por eso los farmacólogos no recomiendan recolectar las plantas para automedicarse (Reader's Digest, 1987).

Se puede decir que las muestras de las hojas y la tintura obtenidas del jardín de plantas medicinales de San Cristóbal de las Casas, Chiapas provienen de la misma especie: *Tecoma stans*, esto se observó por que el bandeo de los extractos de Hexano, Metanol y AcOEt, así como, el de las infusiones es muy parecido (Figs. 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34).

En cuanto a los fenoles, se puede decir que por lo menos hay 9 presentes, ya sea flavonoides o no, de los cuales gracias a los estándares utilizados se puede inferir que Quercitina, Luteolina, Ácido Clorogénico, Rutina o algún derivado de estos está presente (Figs. 35, 36, 37 y 38), aunque Corral y colaboradores, (2002), en su estudio fitoquímico encontraron apigenina, aunque este solo tiene un efecto ansiolítico sin provocar relajación muscular, también es antiespasmódico y antiinflamatorio. Para saber que flavonoide está presente se requiere un mayor número de estándares, para compararlos con el perfil cromatográfico de la fase AcOEt.

Con respecto a los alcaloides observamos presencia de estos, únicamente en la fracción 3 (Figs. 39, 40, 41 y 42) que es la que se presenta con mayor intensidad. Se podría inferir que los alcaloides presentes en *Tecoma stans* son responsables del efecto hipoglicemiante como lo reporta L. Costantino y colaboradores (2003) en donde se identifica a Tecomina y Tecostanina y se atribuye dicha actividad a estos dos alcaloides. Aunque en un estudio publicado por Aguilar-Santamaría y colaboradores (2009) observaron que el extracto de *Tecoma stans* posee por lo menos cuatro actividades relacionadas con antidiabetes, incluyendo la inhibición de α -glucosidasa y anti-hiperglicemia postprandial, y efectos hipotriglicéridémicos, y se dice que el inhibidor α -glucosidasa o inhibidor de la amilasa ha sido reportado en varias plantas con actividades antidiabéticas, clínicamente este es empleado como adyuvante en pacientes con diabetes.

Para un análisis más detallado de los compuestos que se encuentran presentes en *Tecoma stans* como flavonoides y alcaloides se necesitan más estudios, ya que no fue posible debido a que no era el objetivo del trabajo.

8.2 Estudio genotóxico de la tintura de Tecoma stans

El estudio científico de *Tecoma stans* fue iniciado en el Instituto Médico Nacional a finales del siglo pasado en donde se realizaron investigaciones en ranas, palomas y perros a los que se les administró el cocimiento de la planta pero no se observaron resultados evidentes a su acción antidiabética (Web E). Aunque autores como Satyavati *et al.* (1989), De la Paz *et al.* (2003), Costantino (2003), González (2004), reportan a *Tecoma stans* entre las plantas con actividades hipoglicemiantes probada en modelos animales. En cuanto a efectos producidos en el hombre se administró a pacientes de diabéticos en el Instituto Médico Nacional, en los cuales no se logró observar efectividad de el extracto, aunque si se observó mejoría en el estado de salud general de los pacientes (Web E). La Biblioteca Digital de Medicina Tradicional Mexicana (2009) refiere que hasta el momento no hay estudios sobre la toxicidad de la planta, y hace hincapié en que es un aspecto fundamental para definir la seguridad en el uso medicinal, ya que en el caso de la diabetes el uso debe ser continuo y por periodos muy largos de tiempo.

Con base a estos antecedentes se realizó un estudio genotóxico (ensayo de micronúcleos) en el laboratorio de genética de la Facultad de Ciencias en la UNAM.

La presencia de micronúcleos (MN) es un indicador de rompimiento de cromosomas o de rezago anafásico los cuales se forman espontáneamente después de la exposición a agentes genotóxicos; en este estudio se utilizó dicho ensayo en la cual se utilizaron 5 concentraciones de la tintura [0.06, 0.045, 0.03, 0.0225, 0.015 ml/ml]. Sin embargo en la más alta [0.06ml/ml] no se encontró crecimiento celular y en la

[0.045 ml/ml] fue imposible contar con un número adecuado de células binucleadas para el estudio de genotoxicidad ya que el número máximo de células binucleadas encontradas en esta concentración fue de 172 células (Tabla VII). También se encontró que en las células mononucleadas de esta misma concentración, existe incremento de MN preexistentes y el Índice de Proliferación (CBPI) fue menor que el control negativo lo que indica que existe un efecto citostático (Tabla VI).

Con respecto a lo anterior se puede inferir que entre la concentración [0.045ml/ml] y la concentración [0.03 ml/ml] se encuentra la LD₅₀ por lo cual los resultados de genotoxicidad son a partir de la concentración [0.03ml/ml] en donde se recupera el CBPI en todos los individuos (Tabla IV).

Los resultados de genotoxicidad de la tintura de *Tecoma stans* muestran que no hay diferencias significativas con un $\alpha= 0.5$ entre las diferentes concentraciones [0.03, 0.0225, 0.015ml/ml] con su respectivo control negativo en cada individuo.

Para el CBPI se observó que tanto las concentraciones [0.03, 0.0225, 0.015ml/ml] de la tintura de *Tecoma stans* y los controles (agua y Mitomicina-C) no se ve afectada la cinética de proliferación.

Además no se encontró diferencias significativas ($\alpha= 0.05$) entre los sexos; aunque el individuo masculino1 se encontró un incremento de MN con respecto al control (agua) en las concentraciones [0.03 y 0.015 ml/ml] pero no fue significativo.

Para Mitomicina-C (MMC) que es el control positivo en todos los individuos se observó un incremento significativo de MN por células binucleadas (BN) de 3.47-7.51% con respecto a su control (agua) que va de 0.35-1.05%, lo que permite demostrar que si existe una inducción de MN por el agente clastógeno.

Con respecto a la presencia de puentes se encontraron en las diferentes concentraciones [0.03, 0.0225, 0.015 ml/ml] de *Tecoma stans*, los cuales no son significativos con respecto a sus controles (agua) excepto con el control positivo MMC, la presencia de puentes son producto de intercambios entre cromosomas y de cromosomas dicéntricos.

IX CONCLUSIONES

Los perfiles cromatográficos obtenidos corroboran que *Tecoma stans* es la especie fuente para la obtención de la muestra comercial de la tintura proveniente de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, para el tratamiento de la diabetes mellitus. En el estudio fitoquímico se logró obtener una fracción de flavonoides (flavonoles y flavonas) y otra de alcaloides, cuyas características fisicoquímicas corresponden a las citadas en la literatura para esta especie.

En cuanto al estudio genotóxico realizado en linfocitos humanos no se encontró aumento en la presencia de MN con respecto al control negativo (agua). Tampoco se observó una modificación en la cinética de proliferación en los linfocitos humanos *in vitro* en las concentraciones [0.03, 0.0225, 0.015 ml/ml].

Se encontró que entre las concentraciones [0.045 ml/ml] y [0.03 ml/ml] se encuentra LD₅₀.

La presencia de alcaloides y flavonoides en *Tecoma stans* probablemente se relacionan con las propiedades medicinales de la especie; su consumo local como auxiliar en el tratamiento de diabetes mellitus, no representa un riesgo para el consumidor ya que, bajo las condiciones de este estudio, no mostró un efecto genotóxico ni citostático.

X REFERENCIAS

A

1. Aguilar-Santamaría L., Ramírez G., Nicasio P., Alegría-Reyes C., Herrera-Arellano A., (2009) ANTIDIABETIC ACTIVITIES OF *Tecoma stans* (L.) Juss. Ex Kunth, Journal of Ethnopharmacology 2009.04.033
2. Alarcón-Aguilara F. J., Roman-Ramos R., Pérez-Gutiérrez S., Aguilar-Contreras A., Contreras-Weber C. Flores-Sáenz J. L., (1998) STUDY OF THE ANTI-HYPERGLYCEMIC EFFECT OF PLANTS USED AS ANTIDIABETICS, Journal of Ethnopharmacology, 61:101-110
3. Alguacil L. F., Galán de Mera A., Gómez J, Linares F., Morales L., Muñoz-Mingarro M.D., Pozuelo J.M., Vicente Orellana J.A., (1999) *TECOMA SAMBUCIFOLIA*: ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIES, AND '*IN VITRO*' TOXICITY OF EXTRACTS OF THE 'HUARUMO' OF PERUVIAN INCAS, Journal of Ethnopharmacology, 70: 227–233.
4. Alonso Torres M. G., Ibarra Martínez C. M., Martínez y Díaz de Salas M., (2008) ESTUDIO FITOQUÍMICO DE PLANTAS MEDICINALES PROPIAS DEL ESTADO DE QUERÉTARO, Universidad Autónoma de Querétaro, Memorias del programa de Verano de la Ciencia, 10° Verano de la Ciencia de la Región centro.
5. Andrade-Cetto A., Heintich M., (2005) MEXICAN PLANTS WITH HYPOGLYCAEMIC EFFECT USED IN THE TREATMENT OF DIABETES, Journal of Ethnopharmacology, 99: 325-348.

B

6. Barquero A. A., (2007) PLANTAS SANADORAS: PASADO, PRESENTE Y FUTURO, Revista Química viva, Año 6 (2): 53-69.
7. Becker R., Silvi J., Ma Fat D., L'Hours A. y Laurenti R., (2006) A METHOD FOR DERIVING LEADING CAUSES OF DEATH, Bolletin of the World Health Organization 84 (4).
8. Bianco A., Massa M., Oguakwa J. U., Passacantilli P., (1981) 5-DEOSYSTANSIDE, AN IRIDOID GLUCOSIDE FROM *Tecoma stans*, Phytochemistry, Vol. 2 (8): 1871-1872.

C

9. Cervantes Servín L., Valdés Gutiérrez J., (1990) PLANTAS MEDICINALES DEL DISTRITO DE OCOTLÁN OAXACA, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot. 60 (1): 85-103.
10. Corral Salvado A., Jiménez Rivero G., De la Paz Naranjo J., (2002) DROGA CRUDA Y EXTRACTO FLUIDO DE *Tecoma stans* L., Rev. Cubana Plant. Med. 7(3): 138-141.
11. Costantino L., Raimondo L., Pirisino R., Brunetti T., Pessotto P., Giannessi F., Paulino Lins A., Barlocco D., Antolini L., El-Abady S. A., (2003) ISOLATION AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF THE *Tecoma stans*, ALKALOIDS, Il Farmaco, 58: 781-785.
12. Countryman P. I., Heddle J. A., (1976) THE PRODUCTION OF MICRONUCLEI FROM CHROMOSOME ABERRATIONS IN IRRADIATED CULTURES OF HUMAN LYMPHOCYTES, Mutation Research 41:321-332.

D

13. De la Paz Naranjo J., Corral Salvado A., Rivero Jiménez G., Fernández Menéndez M. y Pérez Santoya P., (2003) EFECTO HIPOGLICEMIANTE DEL EXTRACTO FLUIDO DE *TECOMA STANS* LINN EN ROEDORES, Revista Cubana Medica Militar, 32(1): 13-17.
14. Di Giorgio M., Nasazzi N. B., Taja M. R., Roth B., Sardi M., Menéndez P. R., (2001) ENSAYO DE MICRONUCLEOS EN LINFOCITOS CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS COMO POSIBLE INDICADOR DE LA RESPUESTA DEL PACIENTE A LA RADIOTERAPIA, Presentado en el 5th Regional Congress on Radiation Protection and Safety, Recife, Brasil, 29 de abril al 4 de mayo del 2001.
15. DIAGNÓSTICO Y PROGRAMA DE MANEJO, PARQUE ECOLÓGICO "EL ORITO" GUANAJUATO, GTO. 2001

F

16. Fenech M., (1997) THE ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF THE CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS METHOD, Mutation Research 392:11-18.

17. Fenech M., Holland N., Chang W.P., Zeiger E. and Bonassi S., (1999) THE HUMAN MICRONUCLEUS PROJECT- AN INTERNATIONAL COLLABORATIVE STUDY ON THE USE OF THE MICRONUCLEUS TECHNIQUE FOR MEASURING DNA DAMAGE IN HUMANS. *Mutation Research* 428: 271-283.
18. Fenech M., Morley A. A., (1984) MEASUREMENT OF MICRONUCLEI IN LYMPHOCYTES, *Mutation Research* 147: 29-36.

G

19. González Ferrara M., (2004) HERBOLARIA CLINICA, *Revista Salud Pública y Nutrición "las Memorias del VI Congreso Regional de Químicos Farmacéuticos Biólogos del 25-27 de Agosto de 2004"*, Edición especial 10:2004.

H

20. Hernández-Galicia E., Aguilar-Contreras A., Aguilar-Santamaría L., Román-Ramos R., Chávez-Miranda A. A., García-Vega L. M., Flores-Saenz J. L. y Alarcón-Aguilar F. J., (2002) STUDIES ON HYPOGLYCEMIC OF MEXICAN MEDICINAL PLANTS, *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 45: 118-124.
21. Hernández Mijares A., Morillas Ariño C., Riera Fortuny C., Graña Fandos J., Melia Suárez C., Valencia España, (1998) DIABETES GESTACIONAL, *Semergen* 24 (5): 386-390.
22. Hernández Rivera S. A., Callejas Barrera L., (2006) ¿POR QUÉ LES CAIGO MAL SI SOY DE SANGRE DULCE?, *Ciencia y el Hombre, Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana*, Vol. XIX, No. 2.

I

23. Islas Andrade S., Revilla Monsalve M.C., (2004) DIABETES MELLITUS, cap. 1 Concepto y nueva clasificación, tercera edición, Ed. Mc Graw-Hill, pág. 3-20.

J

24. Jezewski M. A., Poss J., (2002) MEXICAN AMERICANS' EXPLANATORY MODEL OF TYPE 2 DIABETES, *Western Journal of Nursing Research*, 24 (8): 840-858.

L

25. Lins A. P. , Felicio J. D., (1993) MONOTERPENE ALKALOIDS FROM *Tecoma stans*, *Phytochemistry*, 34 (3): 876-178.
26. Lozano R., Torres L. M., Lara J., Santillán A., Solíz P., (2002) SÍNTESIS EJECUTIVA 7, EFECTOS DE LA CIE-10 EN LAS ESTADÍSTICAS DE DIABETES MELLITUS EN MÉXICO, Sistema Nacional de Información en Salud, Secretaria de Salud.
27. Lucero L., Suárez S., Durbán R., Gómez C., Parrón T., Creus A., Marcos R., (1999) CYTOGENETIC BIOMONITORING OF SPANISH GREENHOUSE WORKERS EXPOSED TO PESTICIDES: MICRONUCLEI ANALYSIS IN PHERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND BUCCAL EPITHELIAL CELLS, *Mutation Research* 464: 255 – 262.

M

28. Marcos R., (2006) MECANISMO DE GENOTOXIDAD Y MUTAGÉNESIS DEL ARSÉNICO: BASES MOLECULARES DE SUS EFECTOS CANCERÍGENOS; SEMINARIO INTERNACIONAL, EL ARSENICO Y LA SEGUNDA REGION, *Revista de la Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Antofagasta-Chile*, Publicación 1 (2): 28-31.
29. Marinoff, M. A., (2006) LAS PLANTAS MEDICINALES DESDE LA BIBLIA HASTA LA ACTUALIDAD, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, *Comunicaciones científicas y Tecnológicas*.
30. Martínez A., (2000) GUÍA DENDROENERGETICA, SAN ANDRES (*TECOMA STANS (L.) Juss-ex HBX*), Soyapango, República de el Salvador en la América Central, Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección General de Recursos Naturales Renovables, Servicio Forestal y de Fauna.
31. Martínez-Valenzuela C., Gómez-Arroyo S., (2007) RIESGO GENOTÓXICO POR EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN TRABAJADORES AGRÍCOLAS, *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23 (4): 185-200.
32. Miller B., Pötter-Locher F., Seelbach A., Stopper H., Utesch D., Madle S., (1997) EVALUATION OF THE IN VITRO CHROMOSOMAL ABERRATION ASSAY: POSITION OF THE GUM WORKING GROUP ON THE IN VITRO MICRONUCLEUS TEST, *Mutation Research* 410: 81-116.

33. Miranda Beltrán M. de la L., Huacuja Ruiz L. López Velázquez A. L. Panduro Cerda A., (2005) FITOTERAPIA MOLECULAR COMO PARTE DE LA MEDICINA ALTERNATIVA COMPLEMENTARIA EN LAS ENFERMEDADES DEL HÍGADO, Investigación en salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara-México, IIV: 64-70.
34. Morán Villatoro L., (2001) México, OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DE CALIDAD ANALÍTICA MEJORÍA CONTINUA DE LA ETAPA PREANALÍTICA, Ed. Medica Panamericana, 1^{ra} edición, 157 pp, Cap 4:64:76 y Cap 5:103.

N

35. Nelson, D. L., Cox M. M., (2001) Barcelona, LEHNINGER PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA, Ed. omega, 3^a edición, pp 1152, Cap. 22: 833.
36. Norppa H., Luomahaara S., Heikanen H., Roth S., Sorsa M., Renzi L., Lindholm C., (1993) MICRONUCLEUS ASSAY IN LYMPHOCYTES AS A TOOL TO BIOMONITOR HUMAN EXPOSURE TO ANEUPLOIDOGENS AND CLASTOGENS, Environmental Health Perspectives Supplements, 101 (3):139-143.

O

37. Ospina G. L. F., Pinzon Serrano R., (1995) PLANTAS USADAS COMO ANTIDIABÉTICAS EN LA MEDICINA POPULAR COLOMBIANA, Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 23: 81-94.
38. Ostrosky P., Gonsebatt M.E., (2006) EL TEJIDO LINFOCITARIO EN LA EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES DE EFECTO, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

P

39. Pastor S., Gutiérrez S., Creus A., Cebulska-Wasilewska A., Marcos R., (2001) MICRONUCLEI IN PHERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND BUCCAL EPITHELIAL CELLS OF POLISH FARMERS EXPOSED TO PESTICIDES, Mutation Research 495: 147-156.

40. Pérez Gutierrez R. M., Vargas Solís R., (2006) EFFECT ON CAPILLARY PERMEABILITY IN RABBITS OF *ACALYPHA LANGINIA*, *BUDDLEIA SCORDIOIDES*, *HYLOCEREUS UNDATUS*, *TECOMA STANS* AND *ASTIANTHUS VIMINALIS*, Pharmacologyonline 1: 113-119.

41. Poss J., Jezewski M. A., Gonzalez Stuart A., (2003) HOME REMEDIES FOR TYPE 2 DIABETES USED BY MEXICAN AMERICANS IN EL PASO, TEXAS, Clinical Nursing Research, 12 (4): 304-323.

R

42. Reader´s Digest, (1987) PLANTAS MEDICINALES, VIRTUDES INSOSPECHADAS DE PLANTAS CONOCIDAS, primera edición , Reader´s Digest México S.A. de C.V. 430 pp, Cap. 2: 27; Cap. 4: 328.

S

43. Satyavati G. V., Tandon N. y Sharma M., (1989) INDIGENOUS PLANT FOR DIABETES MELLITUS, Diabetes Bulleta.

44. Shapiro K. Gong W. C., (2002) NATURAL PRODUCTS USED FOR DIABETES, Journal of the American Pharmaceutical Association, 42 (2): 217-226.

45. Schmid W., (1975) Switzerland, THE MICRONUCLEUS TEST, Mutation Research, 31: 9-15.

46. Strachan T., Read A. P., (2006) México, GENÉTICA HUMANA, ed. Mc Graw Hill, 3ª edición, 676 pp, Cap. 15:456.

T

47. Taha, M.M., (1954) THE CAROTENOIDS OF THE PETALS OF TWO SPECIES OF *TECOMA*, Biochem J., 58, (3): 413-415.

48. Tucker J., Preston J., (1996) CHROMOSOME ABERRATIONS, MICRONUCLEI, ANEUPLOIDY, SISTER CHROMATID EXCHANGES, AND CANCER RISK ASSESSMENT, Mutation Research 365: 147-159.

Z

49. Zalacain M., Sierrasesúmaga L., Patiño A., (2005) EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS COMO MEDIDA DE INESTABILIDAD GENÉTICA INDUCIDA POR AGENTES GENÓTOXICOS, *Anales Sis San Navarra*, 28, (2): 227-236.

10.1 Referencias electrónicas

1. **WEB A:** SISTEMA NACIONAL DE INFORMACION FORESTAL CONABIO, tomado de la página (consultado en agosto 2009): www.conabio.gob.mx/conocimiento/info.../12-bigno8m.PDF
2. **WEB B:** PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD GENERAL, tomado de la pagina (consultado noviembre-2006): http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/tabs/m_005.xls
3. **WEB C:** CÁTEDRA DE FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES., tomado de la página (consultado julio-2007): mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/FarmacognosiaPE80/RELEVAMIENTOFITOQUIMICO.pdf
4. **WEB D:** DR. DUKE'S PHYTOCHEMICAL AND ETHNOBOTANICAL DATABASE tomado de la página (consultado marzo 2009): <http://www.ars-grin.gov/duke/>
5. **WEB E:** BIBLIOTECA DIGITAL DE LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA, tomado de la página (consultado noviembre-2009): <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tronadora&id=7502>
6. **WEB F:** HEALTH RESOURCES, tomado de la página (consultado noviembre 2009): http://www.health-res.com/white-classification-of-diabetes-in-pregnancy_9949/

XI ANEXO I Reveladores para cromatografía

Se utiliza para flavonoides y otros fenoles

11.1 Disolución de $FeCl_3$ (pagina Web C)

Solución al 5% de Cloruro férrico en EtOH al 96%

11.2 Disolución de $AlCl_3$ (pagina Web C)

Solución al 1% de Cloruro de aluminio en EtOH al 96%

11.3 Reactivo de Draggendorf (pagina Web C)

Este se utiliza para alcaloides y otros compuestos nitrogenados.

Solución a: 1.7 g. de Nitrato básico de Bismuto disuelto en una mezcla de 10 ml. de Ácido Acético y 40 ml. de agua.

Solución b: 8 g. de Yoduro de Potasio en 20 ml. de agua.

Solución Stock: volúmenes iguales de a y b se mezclan (por separado a y b pueden ser almacenadas por largo tiempo en oscuridad).

Reactivo: 1 ml. de stock se mezcla con 2 ml. de Ácido Acético y 10 ml. de agua antes de usarlo.

11.4 Ácido-Sílicotúngstico

Se disuelven 5 g de Ácido Sílico Túngstico en el Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 6N para formar 100 ml de solución.

XII ANEXO II Carta de consentimiento y obtención de información por paciente



CONSENTIMIENTO PARA USAR SANGRE HUMANA, FLUIDOS CORPORALES Y TEJIDOS DONADOS PARA INVESTIGACIÓN



(Adaptado según la guía para obtener el consentimiento informado para el uso de tejidos, células y fluidos humanos para investigación, OMS)

Doy mi consentimiento para usar mi espécimen de _____ (ej. Sangre, orina, etc...) para el siguiente proyecto de investigación.

Nombre del proyecto: ***Estudio genotóxico de la tintura de *Tecoma stans* en linfocitos humanos in vitro***

Si cualquier parte de mi espécimen tiene alguna sobra después de que se haya completado este proyecto de investigación:

Deseo que estas sobras sean destruidas inmediatamente

 SI NO

O

Doy permiso para que estas sobras del espécimen sean utilizados para una investigación futura con la condición de que **no** sean usada para los siguientes tipos de investigación:

NOTA: La sobra de la muestra de sangre para el estudio de MN se eliminan después de 96 hrs. de tomar la muestra.

Nombre:

Firma: _____ Fecha: _____



Laboratorio de Genética Facultad de Ciencias UNAM



| | | | |
|--|-------------------|---------|----|
| Apellido paterno: | Apellido materno: | Nombre: | |
| Ocupación: | | | |
| Empresa o Facultad: | | | |
| Estado Civil: | | | |
| Dirección Particular: | | | |
| Teléfono trabajo: | | | |
| Teléfono casa: | | | |
| E- mail: | | | |
| Edad: | | | |
| Sexo: | | | |
| Estatura: | cm | Peso: | Kg |
| Medicamentos que actualmente esta tomando: | | | |
| Padecimiento actual: | | | |
| 1. ¿Toma café? | Si | No | |
| Si toma, ¿Cuántas tazas al día? | | | |
| 2. ¿Toma Té? | Si | No | |
| Si toma, ¿Cuántas tazas al día? | | | |
| 3. Ingiere bebidas alcohólicas? | Si | No | |
| Si Toma ¿Con que frecuencia? | | | |
| 4. ¿Fuma? | Si | No | |
| Si fuma, ¿Cuántos cigarrillos al día? | | | |
| Si no fuma, ¿Ha fumado en alguna época de su vida? | | Si | No |
| Cuando fumaba. ¿Cuántos cigarrillos al día? | | | |
| ¿Cuándo dejo de fumar? | | | |
| 5. ¿Qué come normalmente? | | | |
| Desayuno | | | |
| Almuerzo | | | |
| Comida | | | |
| Cena | | | |
| 6. ¿Toma alguna droga? | Si | No | |
| Si Toma ¿Con que frecuencia? | | | |
| 7. ¿Toma algún antidepresivo? | Si | No | |
| Si Toma ¿Con que frecuencia? | | | |