

1991 - B

COD. No. 084622834

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTANDARIZACION DE LAS PRUEBAS DE MICRONUCLEOS E
INDICE MITOTICO PARA DETERMINAR GENOTOXICIDAD
DE PLANTAS CON ACTIVIDAD AGLUTINANTE - INMOVILIZANTE
DE LOS ESPERMATOZOIDES DE RATON

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

OLIVIA TORRES BUGARIN

GUADALAJARA, JAL., NOVIEMBRE 1993

ESTANDARIZACION DE LAS PRUEBAS DE
MICRONUCLEOS E INDICE MITOTICO
PARA DETERMINAR GENOTOXICIDAD
DE PLANTAS CON ACTIVIDAD
AGLUTINANTE - INMOVILIZANTE DE LOS
ESPERMATOZOIDES DE RATON

AUTOR

OLIVIA TORRES BUGARIN

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN
EL LABORATORIO DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION
EN LA DIVISION DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO
CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE

C. I. B. O.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

I. M. S. S.

BAJO LA DIRECCION DE:

M. EN C. LUIS HUACUJA RUIZ

LO MAS IMPORTANTE
EN ESTE MUNDO NO ES
DONDE ESTAMOS PARADOS,
SINO EN QUE DIRECCION
NOS MOVEMOS

OLIVER WENDELL HOLMES

A G R A D E C I M I E N T O S

DE MANERA MUY ESPECIAL A:

M. EN C. GUILLERMO ZUÑIGA G.

Por tus conocimientos, el tiempo que
me has brindado, pero sobretodo por tu
confianza y gran apoyo.

Biol. Ma. de La Paz Ramirez
Por tu ayuda desinteresada.

Biol. Antonio Camacho P.
Por tu tiempo y paciencia.

A todos los que han contribuido en mi formación.

GRACIAS

DEDICATORIAS

CON TODO EL CARINO DEL MUNDO A:

MIS PAPAS JULIAN Y OLIVIA,

Por que con su ejemplo y apoyo
incondicional he podido salir adelante.

A MIS HERMANOS

JAVIER, ROGELIO Y GABRIELA

Por que formamos la mejor Familia
y mis Logros son de Ustedes.

A MI ESTRELLA

Con todo mi AMOR, por estar conmigo
e Iluminar mi vida.

POR SER LA AMISTAD EL MAYOR TESORO

TERE GROVER

*Donde quiera que estes
Por Ti y por Mi*

Launa Leyva

Por tu apoyo incondicional

Martín Huerta

Por tu valiosa ayuda y apoyo desinteresado

Juan Carlos

Por formar parte de mi vida

Catalina Sarmiento

Por el tiempo que compartimos

Victoria Torres

*Por estos 12 años que me has brindado tu
amistad.*

A Ti que siempre estaras en mi corazón.

I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION. - - - - -	1
ANTECEDENTES. - - - - -	8
HIPOTESIS. - - - - -	20
OBJETIVO GENERAL. - - - - -	22
OBJETIVO PARTICULAR. - - - - -	24
MATERIAL. - - - - -	26
METODOLOGIA. - - - - -	29
RESULTADOS. - - - - -	39
DISCUSIONES. - - - - -	55
CONCLUSIONES. - - - - -	62
BIBLIOGRAFIA. - - - - -	64

I N T R O D U C C I O N

Debido al crecimiento de la población mundial tan -
acentuado y a que cada día resulta más difícil la obtención -
de satisfactores para una vida de calidad, la regulación del
número de miembros de una familia es una preocupación seria -
de gran actualidad que requiere atención oportuna y adecuada.
La tendencia de regular la fertilidad no es un problema que -
adquiere vigencia en tiempos modernos; ya que los egipcios de
hace 4000 años ya describen la práctica de controlar la ferti-
lidad.

En Grecia hace 2000 años, Aristóteles pensaba que se
podría servir mejor a la civilización manteniendo una pobla-
ción estacionaria. Se utilizaban preparaciones a base de raí-
ces que producían esterilidad en la mujer, hierbas y hojas de
árboles, píldoras de mercurio, incluso pócimas con arsénico -
que llegaban a causar la muerte de la madre (1). Entre los
hombres ilustrados de ésta época, se daba por sentado la rela-
ción semen y embarazo; esto se constató hasta el invento del
microscopio con el que fue posible ver los espermatozoides -
vivos.

Hay también antecedentes de los Indúes, Chinos y Ja-
poneses que se refieren a el uso de pastas, gomas y geles con
lo que aparentemente interferían con la motilidad y la viabi-
lidad de los espermatozoides dentro de la vagina.

Las tribus primitivas y que ignoran los escritos -- egipcios, orientales y los descubrimientos modernos, tienen - sus propios métodos; por lo que el deseo de limitar el número de nacimientos parece tan antiguo como la humanidad.

Durante muchos siglos se han utilizado métodos de - control natal basados en la supuesta relación semen-preñez. - Uno de los métodos es el "coitus interruptus" que es el anticonceptivo masculino más antiguo que se conoce. Ya se describe en el Génesis (capítulo 38; 9) y en el Talmud: fue muy popular entre los griegos y los romanos. Se practica muy ampliamente en países industrializados, en el este de Europa, - Francia, España y Estados Unidos (2,3). Conforme avanzó el conocimiento sobre la fisiología del aparato genital femenino, comenzaron a adoptarse otros métodos, como el método del ritmo (OGINO - KNAUS), la temperatura basal (TB), se utiliza como método complementario a los anteriores, al igual que el de la ovulación o de Billings (2,4).

Simultáneamente a estos métodos se desarrolló e incrementó el uso de hormonas y prostaglandinas por vía oral o inyectada (2,5,6,7).

Entre los métodos más exitosos de la actualidad tenemos a los Dispositivos Intrauterinos (DIUs), aunque Hipócrates observó efectos anticonceptivos colocando un cuerpo extraño en el interior del útero, los árabes y turcos nómadas colocaban un pedazo de cuero en el útero de los camellos para evi

tar preñez. La anticoncepción intrauterina moderna se inicia en 1909 con Richter, quien utiliza una asa de hilo de seda, - método que fue modificado en 1929 por Grafenberg añadiéndole' un hilo de plata y en 1934 Ota cambió los metales por plástico. Hoy en día existen gran diversidad de DIUs entre ellos - tenemos; Dispositivos inertes, (Asa de Lippes, Dalkon Shield Safe - T - coil). Dispositivos liberadores de hormonas, Dispositivos liberadores de iones (Cu - T, Multiload Nova - T y TC 380A de reciente introducción (2,7,8 y 9). O bien el empleo de métodos irreversibles o quirúrgicos como: la vasectomía y ligamiento de trompas (7).

Es de hacer notar que el desarrollo de la anticoncepción masculina es mínima, en la actualidad los dos métodos de control de la fertilidad de que dispone el varón son el quirúrgico y el preservativo. Por lo que no es de extrañar que' los esfuerzos más notorios se centren en la meta de encontrar un anticonceptivo para el varón, en teoría su elaboración podría ser encaminada a: interferir con la espermatogénesis, impedir la maduración espermatofica, obstaculizar de alguna manera el tránsito de los espermatozoides en cualquier segmento - del conducto del sistema reproductor desde el testículo hasta deferentes.

Hasta el momento se han descubierto distintas substancias químicas que cumplen con cada una de las funciones -- enumeradas, pero sus efectos son incompletos o tienen efectos secundarios indeseables. Así por ejemplo la combinación de -

estrógenos y progestágenos, utilizados en la píldora femenina en el macho; inhibe la producción del espermatozoides pero en la mayoría de los varones provoca una fuerte disminución en el interés sexual que suele degenerar en impotencia. En la actualidad se está trabajando en un tipo de píldora a base de testosterona y progestágenos; pues parece que no tiene los efectos secundarios sobre la eyaculación que presentan los estrógenos y por lo general no alteran la función sexual. No obstante, estas píldoras solo inhiben eficazmente la producción del espermatozoides durante un corto espacio de tiempo (7).

La terapia por medio de plantas medicinales tienen orígenes muy remotos. El primer estudio cuidadoso de plantas fue realizado por quienes practicaban la medicina herbolaria, con una lista de plantas medicinales y sus usos desde el año 1500 a.C. (10). Actualmente el empleo de la fitoterapia se sigue practicando en casi todo el mundo, en forma de medicina indígena, Tradicional y Científica (11).

Es muy interesante hacer notar que diferentes grupos de investigadores, utilizando productos no hormonales de plantas han demostrado posibilidades de éxito, todavía en fase experimental, por ejemplo Aristolocha indica sinensis, cuyo efecto es inhibir la espermatogénesis (12), Hibiscus rosa sinensis, en rata afecta la espermatogénesis (13), además de alterar el ciclo estral, reducción en el peso del útero, ovario e hipófisis (14), estos efectos son variables dependiendo de la estación del año en que se hace la colecta (15), las semi-

llas de Carica papaya, con efectos anti-implantación, producen cambios en el peso de los órganos genitales y modifica el patrón de la espermatogénesis (16), Phytolaca dodecandra es un potente espermatocida (17), Malvaviscus konzattii reduce significativamente el número y la motilidad de los espermatozoides y produce cambios en la histología testicular (18), Arum maculata y Arum orientale de las que es utilizada la raíz, se ha visto que el extracto reacciona específicamente con las sustancias de la cola de los espermatozoides (19). En la India se han reportado cerca de 350 extractos de plantas que afectan la fertilidad a diferentes niveles: Anti-ovulatorios 32 plantas (Aloe bardensis, Menta arvensis), Anti-implantación 94 plantas (Arbus precatorius, Pueraria tuberosa, Pruns mehaleb Linn), Anti-espermáticos 90 plantas (Bursera serrata) (20).

En una reciente comunicación China se mencionan diferentes efectos del Gossypol; impide la producción del espermatozoides, destruye las enzimas de la zona acrosomal, variando su efecto dependiendo de la dosis (21 y 22). En humano "in vitro" inhibe la reacción acrosomal (23), así como la penetración al ovocito por el espermatozoides debido a la hidrólisis de la zona pelucida (22-23). En hamsters algunos isómeros del gossypol producen degeneración de las mitocondrias de los espermatozoides (24). Aunque el gossypol es uno de los compuestos que se han utilizado mucho en diversos ensayos de la anticoncepción masculina, se continúan las investigaciones con derivados de este polialcohol --

con el propósito de encontrar el derivado que conserve actividad anticonceptiva con la posible reducción de efectos indeseables (2). Sin embargo estas actividades siguen en fase experimental y no ha sido posible establecer estos efectos en humanos, con la mayoría de las plantas en estudio exceptuando el Tripterygium wilfordii, planta que se utiliza principalmente en tratamiento de artritis y lesiones en la piel, observándose que con dosis menores a las administradas clínicamente para estos padecimientos, se produce destrucción de los espermatozoides a nivel epididimario, sin alterar el peso corporal y las concentraciones de Na, K y de la hormona folículo estimulante (FSH), en suero sanguíneo y con mínimos efectos a nivel testicular (25). Esta actividad resultó específica para el sexo masculino, por lo que actualmente se está trabajando en clínicas para regular la fertilidad masculina en forma reversible (26).

A N T E C E D E N T E S

Es bien sabido que existen compuestos de origen vegetal con conocido efecto citotóxico como son los alcaloides di méricos que se obtienen del perinwinkle Vinca rosea de forma tradicional se utilizan en el tratamiento de diabetetes melli tus, produce granulocitopenia y supresión de la médula ósea, -- estos alcaloides son vinleurosina, vinrosidina, sulfato de -- vinblastina, vincristina; de éstos los dos últimos son los -- más utilizados en el tratamiento de tumores malignos (27,28). Otros compuestos son los Aflatoxinas B1 (AFB), desechos del hongo Aspergillus flavus que son hepotóxicos y hepatocarcinogenos en diversas especies animales, en bacterias es mutagénico (29), el extracto de mandragora Podophyllum peltatum usado en la medicina indígena como vomitivo, purgante antihelmíntico, tiene alta actividad terapéutica en humanos con neoplasias, en células cancerosas pulmonares, tumores testiculares, enfermedad de Hodgking's, en la propagación de linfoma histocítico. Son referidos a etopósido (VP - 16 - 213) y tenipósido (VM - 26). Tiene efecto en la función estructural de -- los microtúbulos (27).

Otro grupo de especies vegetales de los que se extraen compuestos con actividad citotóxica e inhibición de tumores y cáncer es el formado por Solanum dulcamara, Thalictrum dasycarpum, Cyclea peltata, Croton macrostachys, Marchorganus, Taxodium distichum, Brandegea bingelovii, Acnistus -

arborescens, Withania somnifera, Elephantopus elatus, (de la que se extraen la elefantina y la elefantopina) Eupatorium rotundifolium, Vernonia hymenolepis (de la que se extrae la vernolepina y la vernolenina). Además de Helenimu microcephalum, Helenium amarum de las que se extraen la tenuína y la helenalina respectivamente que son agentes inhibidores de la síntesis del ADN por lo que son utilizados como anticancerígenos (30, 31).

El método clásico o "in vitro" para probar daño citogenético es el examen de las preparaciones de metafase de las células tratadas con el agente a probar "in vivo" o "in vitro". Este consiste en poner una muestra de sangre en un tubo que contenga un medio de cultivo específico, un mitogénico y antibiótico, 2 h antes de la cosecha se agrega colchicina. Después de 72 h se cosecha con hipotónica, se fija con Acido acético etanol y se prepara el frotis. La Tinción es con tripsina y se cuentan 16 metafases. Desafortunadamente este método es costoso y consume mucho tiempo, y algunas veces tiene un bajo poder estadístico por el número de metafases a examinar (32, 33). Otro método poco conocido con mucho potencial es la prueba de mitronúcleos (MNs) que "in vivo" sirve para detectar el efecto de agentes mutagénicos a nivel cromosómico, identificar cromosomas acéntricos y/o cromosomas rezagados, que al quedar fuera del núcleo forman los MNs (34, 35). Detecta agentes clastogénicos como statmocinéticos (afectan el huso mitótico) (33, 36) pudiéndose diferenciar unos de otros por el tamaño de MNs (32, 37) (Fig. 1).

FIGURA I

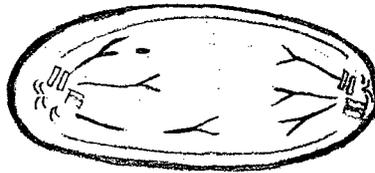


Diferentes tamaños de MNs en sangre periférica de ratón.

FUNDAMENTO DEL METODO

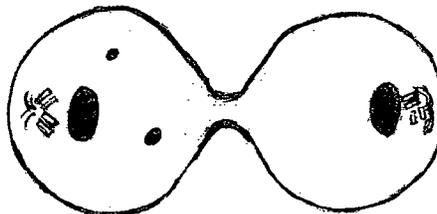
El método de los MNs está basado en el siguiente -- principio; en anafase cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo pues carece del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. (Fig. 2)

FIGURA 2



Después de la telofase los cromosomas normales así como los fragmentos que posean centrómero dan origen a los núcleos de las células hijas normales. Los elementos rezagados quedan incluidos en el citoplasma de las células y una considerable proporción es transformada en uno o varios núcleos secundarios los cuales son como regla mucho más pequeños que el núcleo principal de ahí su nombre de MNs (33). (Fig. 3)

FIGURA 3



Eventos similares ocurren si el funcionamiento del aparato mitótico es dañado por ejemplo con vinblastina, vincristina o colchicina (33), el núcleo principal es reemplazado por un grupo completo de pequeños núcleos, los cuales en general, son considerablemente más grandes que el típico MN (33, 37). Después de que el eritroblasto expulsa su núcleo para convertirse en eritrocito, por razones aún no conocidas' MNs permanecen en el citoplasma de los eritrocitos jóvenes y' es entonces cuando es posible visualizarlos (33).

La técnica de los MNs ha sido ampliamente aceptada para realizarla en diferentes especies de organismos, así tenemos los trabajos en eritrocitos micronucleados en sangre periférica de ratones expuesto a por lo menos 4 días a un agente' con probable efecto genotóxico (38), otros estudios proponen' poblaciones celulares de queratinocitos con lo que se ha demostrado que pueden ser utilizados para investigar tanto genotóxicos como carcinogénicos y que la inducción de MNs puede ser un signo de inicio de cáncer de piel (39), lo mismo que utilizando células de la mucosa de la boca, la presencia de MNs se ha podido asociar con alteraciones citológicas en individuos fumadores (40, 41) también se utilizan los hepatocitos de rata eliminando 2/3 de hígado o bien con promotores mitogénicos, se induce la división celular facilitando con esto la manifestación de los MNs nuevos en hepatocitos que son expuestos a agentes genotóxicos o carcinógenos (42, 43), lo mismo se puede realizar en células germinales en las que de existir un' daño genético, este podría ser transmitido a la descendencia --

(44, 45). Para probar algún posible genotóxico con esta técnica, se pueden utilizar animales de laboratorio como: la rata (46), ratón (36, 47), hamster (33) y algunos primates como el Macaca fascicularis en el que los estudios se han extendido a la médula ósea de los fetos de las madres tratadas (48) y - últimamente se proponen otros tipos de organismos como vertebrados no mamíferos, Xenopus laevis y Pleurodeles waltl, cuyos eritrocitos son muy grandes y la observación de las células micronucleadas se facilita (49) o en algunas aves con los que se puede tener de igual forma un sistema "in vivo" (50).

Por otra parte si se da colchicina a un animal o se añade a un cultivo celular en el cual estén las células multiplicándose, toda célula que entre en mitosis después de actuar la colchicina, no la completa, en consecuencia, se acumulan imágenes de mitosis. Sin embargo, si en un momento determinado (antes que desaparezca la colchicina) se cuenta el número de imágenes de mitosis, el número obtenido corresponde - prácticamente al número de células en el tejido oculto celular que entraron en proceso de mitosis durante el tiempo en que se efectúe el experimento. En las estructuras y órganos' del cuerpo donde la multiplicación celular está regulada, corresponde a la pérdida o a la muerte de células por lo tanto, es posible usar colchicina para estimar la intensidad de recambio de la población celular determinando la proporción de células que entren en mitosis durante un período determinado' de tiempo (51, 52).

En nuestro laboratorio recientemente que ha iniciado una línea de investigación sobre la utilización de substancias obtenidas de plantas Crassulaceas y Burseraceas como posibles reguladores de la fertilidad en mamíferos. Se ha podido demostrar que los extractos crudos acuosos o etanólicos de Sedum oxipetalum (53, 54), Sedum dendroideum (55), Bursera multijuga, Bursera fagaroides (55, 56), Echeveria gibbiflora (57), Kalanchoe gastonis bonieri, Kalanchoe flamea (58) tienen propiedades "in vitro" de aglutinar e inmovilizar los espermatozoides de humano, rata y ratón; por lo que es interesante continuar las investigaciones con el objeto de determinar si la actividad de los extractos crudos acuosos de Kalanchoe bolossfeldiana, Echeveria gibbiflora o los etanólicos de Sedum oxipetalum y Bursera multijuga administrados por vía oral producen infertilidad sin producir alteraciones en el índice mitótico en médula ósea, ni en la formación de MNs en sangre periférica y médula ósea, como prueba de daño genotóxico con las técnicas previamente estandarizadas.

DESCRIPCION Y TAXONOMIA DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO.

Sedum oxipetalum

DIVISION	Magnoliophyta
SUBDIVISION	Angiospermae
CLASE	Dicotiledónea
SUBCLASE	Rosidae
ORDEN	Rosales
FAMILIA	Crassulaceae
GENERO	Sedum
ESPECIE	oxipetalum

Es un arbusto erecto, que mide entre 0.5 y 1.5 metros

de altura, ramificado, con una cutícula que cubre a la corteza en forma de delgadas capas amarillentas fácilmente desprendibles, sus hojas son alternas, espatuladas, emarginadas, cimas terminables multifloras. Tiene flores pequeñas. Cáliz - de 5 sépalos verdes, que miden de 2 a 5 mm. Corola de 5 pétalos libres, lanceolados, de color blanco, rojizo o venoso que miden de 4 a 8 mm. de largo por 1 ó 2 de ancho. Androceo con 10 estambres, con filamentos rosados y anteras rojas o amarilla-rojizas. Gineceo con pistilos simples, con carpelo cada uno. Ovario súpero. Tiene 5 carpelos y muchos óvulos. Los frutos son folículos membranáceos o coriáceos. Florece de julio a octubre. Esta planta se encuentra generalmente en zonas montañosas y lechos de lava, principalmente en el Edo. de México (59, 60, 61).

Burcera Multijuga

DIVISION	Magnoliophyta
SUBDIVISION	Angiospermae
CLASE	Dicotyledoneae
SUBCLASE	Rosidae
ORDEN	Geraniales
FAMILIA	Burceraceae
GENERO	Bursera
ESPECIE	multijuga

La familia Burceraceae se caracteriza por agrupar árboles o arbustos generalmente resinosos, con hojas alternas, rara vez opuestas pinadas o trifoliadas, sin estípulas. Flores actinomorfas, hermafroditas o unisexuales, pequeñas y verdosas. Cáliz de 3 - 5 sépalos valvadas, corola 3 - 5 pétalos rara vez ausentes, libres o unidos en forma variable, imbricada

cados o valvados, disco presente. Estambres en número igual o doble que los pétalos, con los filamentos libres y anteras biloculares de dehiscencia longitudinal. Ovario súpero 3 - 5 carpelar, 3 - 5 locular, con 2 óvulos, rara vez con placentas axiales. Frutos drupáceos o indehiscientes, o seco y entonces dehiciente por valvas, con 1 - 5 huesos monospermos.

Esta familia consta de unos 20 géneros y más de 500 especies distribuidas principalmente en América, Africa y -- Asia tropical. Comprende especies de importancia económica, de las que se utilizan las resinas y gomas para la fabrica--- ción de cementos y barnices (61, 62).

Burcera multijuga, presenta hojas una vez pinadas, - una o varios pares, principalmente elípticas 2-3 (-5) cm de longitud, agudo o terminado en punta, algunas filada o acerra da, inflorescencia corta y pendículada. Corteza paperacea ro ja. Es un árbol de tamaño moderado (10 -12 m de alto), tron co rojo de 30 cm de diámetro, es una planta que crece en pen dientes, cañadas, barrancas, etc. El fruto es de 5 -7 pares' de hojas, con inflorescencia delgadamente pendincluda (62, - 63).

Echeveria gibbiflora

DIVISION	Magnoliophyta
SUBDIVISION	Angiospermae
CLASE	Dicotiledoneas
SUBCLASE	Rosidae
ORDEN	Rosales

FAMILIA	Crassulaceae
GENERO	Echeveria
ESPECIE	gibbiflora

Planta glabra con tallos simples o ramificados, gruesos hasta de 1 m de alto (A veces en sitios sombreados) que junto con la inflorescencia de aproximadamente el mismo largo pueden alcanzar un total de 2 m, con 14 - 20 hojas formando una roseta en el extremo, glaucas tendiendo a enrojecerse sobre todo la superficie, ovaladas u oblongas-espatuladas, con el envés aquillado, has concavo (de 12 - 30 cm de largo por 7 - 15 cm de ancho (, ápice triangular o escotado, pedúnculo floral con hojas semejantes a las de la roseta pero más reducida, el eje de la inflorescencia mide más de 60 cm de largo; inflorescencia paniculada de color rojo-amarillo y a veces -- pruinosos, sépalos desiguales laceoladas de 7 mm a 1.5 cm de largo, corola de 12-14 mm de largo con el tubo corto, lóbulos lanceolados, aquillado embonados en la base, semillas largamente oblongas, de 0.75 mm de largo. Conocida popularmente como "Oreja de burro". Registrada en México y Sudamérica. - (63)

Kalanchoe blossfeldiana (Thum-thum)

DIVISION	Magnoliophyta
SUBDIVISION	Angiospermae
CLASE	Dicotyledoneas
SUBCLASE	Rosidae
ORDEN	Rosales
FAMILIA	Crassulaceae
GENERO	Kalanchoe
ESPECIE	blossfeldiana - (Thum - thum)

Planta con brote vertical, poco ramificado, aprox. - de 30 cm de alto, desnudo, liso. Hojas con pecíolo de 2.5 cm de largo, que se ensancha en forma alargada u ovalada-alargada, con 7 cm de largo y 4 cm de ancho; de color verde oscuro brillante, con bordes rojos; a partir de la mitad hacia la -- punta algo calcadas y muescadas. Flores en un tallo, con cabezuelas de flores numerosas, cada una de 9 mm a 10 mm de diámetro, de color rojo escarlata, florecen de enero a abril. - Es una planta popular de uso ornamental (64, 65).

H I P O T E S I S

Los extractos etanólicos de Sedum oxipetalum de Bursera multijuga y los crudos acuosos de Echeveria gibbiflora y Kalanchoe blossfeldiana (Thum-thum) suministrados por vía oral a ratones de la Cepa BLAB/c no producen diferencias significativas en la formación de micronúcleos en sangre periférica y médula ósea con respecto a los controles.

OBJETIVO GENERAL

Probar la genotoxicidad "in vivo" de los extractos -
etanólicos de Sedum oxipetalum, de Bursera multijuga y de los
extractos crudos acuosos de Echeveria gibbiflora y Kalanchoe-
blossfeldiana (Thum-thum).

OBJETIVO PARTICULAR

Estandarizar las condiciones operativas de las pruebas de Micronúcleos (MNS) en sangre periférica y médula ósea e Índice mitótico en Médula ósea.

M A T E R I A L

EQUIPO

Balanza granataria	OHAUS
Balanza analítica	CHYO JUPITER C3-200
Rotavapor	BULCHER INSTRUMENTS
Baño maría	THELCO 188
Bomba de vacío	WELCH MOD. 1402
Espectrofotómetro	COLEMAN Ga 20 L.J.
	IIA
Estufa eléctrica	CHROMALOX
Incubadora	FIBROSYSTEM
Centrífuga	SORVALL GCC-1
Desmineralizador	CRISTALAB CL-5
Vórtex	BENIE H 550-G
Microscopio	ZEISS

INSTRUMENTAL MENOR

Termómetro con escala de 0 a 110°C	
Refrigerante	
Micropipeta de 50 mm	HAMILTON
Pipetas pasteur	
Micropipetas y puntas	EPPENDORF
Portaobjetos	
Cubreobjetos	
Tubos de ensayo	PYREX
Mortero de Agata	
Tijeras de disección	
Vaso de precipitado	
Fibra de vidrio	

REACTIVOS

Antrona	SIGMA
Colchicina	SIGMA (Cat. 3915)
H ₂ SO ₄	MERCK
Ham F-10	SIGMA (Cat. Nº 1387)
Wright	IMSS
Geimsa	IMSS
Aceite de inmersión -(Tipo A, baja viscosidad)	(AMSA Cat. 515)
Solución salina fisiológica 0.9	
KCl 0.075 M	
Ac. acético etanol (3:1)	
Fosfato monofosfórico (KH ₂ PO ₄)	
Fosfato disódico anhidro (Na ₂ HPO ₄)	

SOLVENTES

Hexano	MERCK
Etanol	MERCK
Butanol	MERCK

MATERIAL BIOLÓGICO

Ratones de la cepa BALB/c
 Extracto de Sedum oxipetalum
 Extracto de Bursera multijuga
 Extracto de Echeveria gibbiflora
 Extracto de Kalanchoe blossfeldiana
 (Thum-thum)

M E T O D O L O G I A

ESTANDARIZACION DE LAS PRUEBAS DE MICRONUCLEOS EN MEDULA OSEA Y SANGRE PERIFERICA E INDICE MITOTICO EN MEDULA OSEA.

INDUCCION DE MICRONUCLEOS CON COLCHICINA
- EN MEDULA OSEA Y SANGRE PERIFERICA -

Se utilizaron 24 ratones (Mus musculus) de la cepa - BALB/c, de dos a tres meses de edad, peso promedio de 32 g, - proporcionados por el bioterio del C.I.B.O., dichos ratones - se mantuvieron en condiciones estandares de laboratorio; (Luz, - obscuridad alternos 12 h, temperatura de 22°C, agua y alimento ad libitum), hasta el momento de iniciar el tratamiento - (16).

Con estos animales se formaron 6 grupos de 4 animales cada uno, a los cuales se les inyectó intraperitonealmente diferentes dosis de colchicina 24 horas antes del sacrificio.

Ratón N°	dosis de colchicina mg/k
1	0.0000
2	0.0646
3	0.2916
4	0.1258
5	0.5166
6	1.033

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, e inmediatamente después se les corto la punta de la cola, para obtener una gota de sangre periférica, esta se recibió en un portaobjetos limpio y seco preparándose inmediatamente el frotis. Pasadas 24 horas de la preparación del frotis la tinción (69) se realizó de la siguiente manera: La lamina se cubrió con Wright por 3 minutos una vez transcurrido este tiempo se lavó con agua bidestilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco el frotis, se sumergió en colorante Giemsa (Giemsa 3 ml en 50 ml de buffer fosfato pH' 6.8) de 10 a 12 minutos. El frotis se lavó con agua bidestilada y se dejó secar a temperatura ambiente. La observación de MNs se realizó en el microscopio fotónico normal, con el objetivo de inmersión (34, 36, 44, 47). Se hizo la observación de 8000 células para la cuenta de MNs y su posterior análisis estadístico (34, 66, 67).

Una vez obtenido la sangre se disectaron los huesos largos posteriores, se limpiaron perfectamente. Para obtener el paquete de células medulares, a los huesos se les cortó la parte proximal y distal insertándoles en el canal medular una jeringa para insulina que contenía 5 ml de solución salina fisiológica (0.9%), al hacerles pasar dicha solución se obtuvo el paquete celular que se recibió en un tubo y se llevó a centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se retiró con una pipeta Pasteur, con el precipitado se realizaron los frotis dejándolos secar por 24 horas a temperatura ambiente para realizar la tinción de la siguiente manera:

- Se cubrió la laminilla con 3 ml de colorante Wright por 3 minutos.
- Se lavó abundantemente con agua bidestilada y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Una vez seca la laminilla, se sumergió en el colorante Giemsa (3 ml en 50 ml de buffer fosfato pH 6.8), de 10 a 12 minutos.
- Se lavó abundantemente con agua bidestilada y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se observó al microscopio con el objetivo de inmersión.
- Se hizo la observación de 2000 células para la cuenta de MNS y su posterior análisis estadístico (34, 66, 67, 68, 70).

INDICE MITOTICO

Se utilizaron 25 animales, con los que se formaron 5 grupos de 5 animales cada uno, a los cuales se les administró intraperitonealmente diferentes dosis de colchicina 2 horas antes del sacrificio (67). Con el fin de estimar la intensidad de recambio de la población celular determinando la proporción de las células que entraron en mitosis en ese período de tiempo (51).

Ratón Nº	Dosis de colchicina mg/k
1	0.000 (control)
2	5.166
3	2.583
4	1.291
5	0.646

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, disectándose los huesos largos posteriores, y se descarnaron perfectamente, se les cortó las partes proximal y distal, para hacerles pasar 5 ml de solución salina fisiológica' (0.9%) con una jeringa de insulina. El paquete celular así' obtenido se recibió en un tubo para centrifugarlo a 1000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se eliminó, el paquete celular se resuspendió en 5 ml de KCl 0.075 M al que se le agregó 50 μ l de colchicina llevándose a incubar 27 minutos a 37°C, transcurrido el tiempo fue centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, y se fijó con ácido acético: etanol 1:3 v/v. Esta operación se realizó dos veces. El paquete celular se aplicó -- por goteo sobre un portaobjetos, haciéndose estas preparaciones en ambiente húmedo para permitir mejor la expansión del paquete celular, el frotis se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente para realizar la tinción de la siguiente manera:

- Las laminillas se sumergieron en el colorante Giemsa -- por 10 minutos.
- Se lavaron con agua bidestilada y se dejaron secar a -- temperatura ambiente.
- Se observaron al microscopio con el objetivo de inmersión.
- Para su análisis estadístico se contaron las mitosis en 300 células (69).

OBTENCION DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS

Sedum oxipetalum y Bursera multijuga

Las plantas se colectaron en época de sequía, las especies colectadas se identificaron taxonómicamente en el Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara, excepto Bursera multijuga que fue identificada por el Biol. Martín -- Huerta Martínez.

Las plantas fueron seccionadas finamente para hacer más eficientes las extracciones; primero con hexano (mediante reflujo controlado durante 2 h a 50°C - extracto hexánico -), después con etanol al 80% tres veces sucesivas durante 4 h cada vez a 60°C - extracto etanólico - ; en proporción de 1/3-p/v). Los extractos se juntaron y los solventes fueron retirados a presión reducida y temperatura (60° C) controlada. (53, 54). Los extractos así obtenidos se conservaron en refrigeración hasta su uso.

OBTENCION DE LOS EXTRACTOS CRUDOS ACUOSOS.

Echeveria gibbiflora y Kalanchoe blossfeldiana

Las plantas fueron seccionadas y por presión mecánica, en mortero de Agata se obtuvieron los extractos crudos acuosos, los cuales fueron centrifugados a 1200 rpm por 15 minutos para eliminar residuos. Los extractos se guardaron en congelación hasta su uso.

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS TOTALES DE LOS EXTRACTOS

Se hicieron las determinaciones de carbohidratos totales de los extractos con el método de Hewitt (71), el cual se basa en la reacción de carbohidratos con el reactivo de Antrona. La intensidad de color del cromóforo formado, es directamente proporcional a la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra, tiene una longitud de onda máxima de absorción de 620 nm. La determinación de carbohidratos totales se realizó como parámetro cuantitativo al realizar los ensayos de actividad biológica.

PRUEBAS DE LOS EXTRACTOS IN VITRO PARA DETERMINAR
LA ACTIVIDAD AGLUTINANTE-INMOVILIZANTE DE -
LOS ESPERMATOSOIDES DE RATON.

Los espermatozoides de ratón, se obtuvieron de la colla del epídido, después de sacrificar 8 animales. Las collas de los epídidimos se colocaron en un vaso de precipitado - con medio Ham F-10 (Nutrient mixture) con pH 7.4 a 37°C, fueron seccionados finamente con tijeras de disección, la suspensión obtenida se filtró inmediatamente en: una columna elaborada con una pipeta Pasteur que contenía fibra de vidrio, para facilitar la filtración se agregó 5 ml Ham F-10. Los espermatozoides así obtenidos, fueron separados del líquido epídidimario por centrifugación a 1500 rpm durante 15 minutos, - lavados dos veces con Ham F-10 pH 7.4, después del segundo lavado, los espermatozoides se resuspendieron en el mismo medio de lavado y la suspensión se ajustó a 100 millones de espermatozoides por ml se tomaron alicuotas equivalentes a 20 millones y se ajustó a un volumen de 0.5 ml con Ham F-10 incubándose a 37°C. Se adicionaron alicuotas crecientes de los extractos hasta lograr 100 de inmovilización-aglutinación. Este -- efecto se observó al microscopio con aditamento, para contrastate de fases (53, 54).

Una vez confirmado el 100% de actividad de cada uno' de los extractos se procedió a realizar las pruebas "in vivo".

PRUEBAS DE LOS EXTRACTOS IN VIVO PARA DETERMINAR
LA GENOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS -
ANTES MENCIONADAS.

Se utilizaron 50 ratones machos con las mismas características que se utilizaron en la estandarización de las pruebas.

TRATAMIENTOS

Los animales se distribuyeron en cinco grupos de 10 animales cada uno de ellos. A los cuales se les administraron los extractos por vía oral, en su agua diaria, por un período de 30 días, con las siguientes dosis:

GRUPO 1.- Control	0.0 mg/día
GRUPO 2.- <u>Kalanchoe bossfeldiana</u>	2.0 ml.de extracto/día
GRUPO 3.- <u>Echeveria gibbiflora</u>	2.5 ml.de extracto/día
GRUPO 4.- <u>Bursera multijuga</u>	53.0 mg.de extracto/día
GRUPO 5.- <u>Sedum oxipetalum</u>	25.5 mg.de extracto/día

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento se procedió a realizar las pruebas de genotoxicidad.

PARAMETROS PARA DETERMINAR GENOTOXICIDAD

FORMACION DE MICRONUCLEOS EN SANGRE PERIFERICA.

INDICE MITOTICO EN MEDULA OSEA.

FORMACION DE MICRONUCLEOS EN SANGRE PERIFERICA.

La sangre se obtuvo cortando la punta de la cola del animal. Y en portaobjetos previamente limpio y seco, se recibió una gota de sangre, e inmediatamente se preparó el frotis. Pasadas 24 h de la preparación del frotis se realizó la tinción (34) de igual forma que en la estandarización de la técnica.

INDICE MITOTICO

A los animales que se les aplicó el extracto así como a los controles se les inyectó 2 horas antes del sacrificio 0.1 ml de colchicina (concentración de 5 mg de colchicina por 10 ml de agua bidestilada). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, y se procedió como en la estandarización de la técnica.

R E S U L T A D O S

MICRONUCLEOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATONES TRATADOS CON DIFERENTES DOSIS DE COLCHICINA

La prueba de MNs en sangre periférica con diferentes dosis de colchicina no mostró diferencias significativas entre grupos al aplicar ANOVA de Fisher (*) con una $p < 0.05$ mientras que con ANOVA de Kruskal-Wallis (**) mostró diferencias significativas con $p < 0.05$ por lo que se aplicó un t-Student y se pudo ver que las diferencias fueron al comparar el grupo control contra grupos tratados con $p < 0.05$.

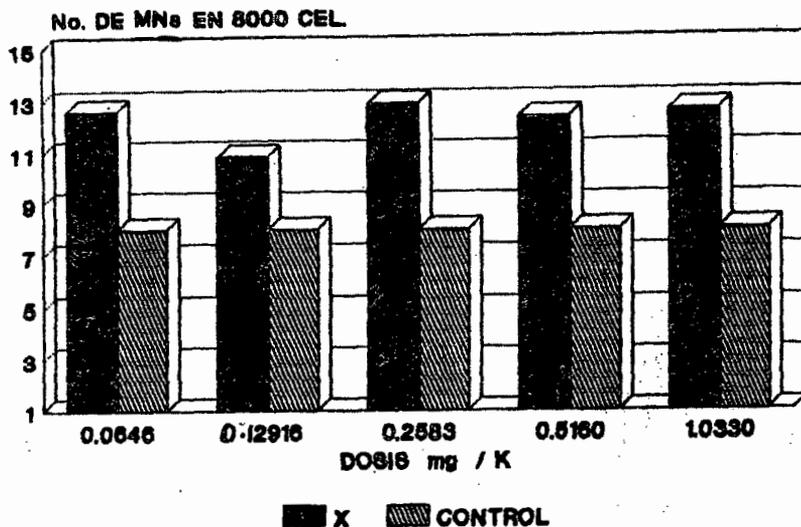
Al aplicar el coeficiente de correlación y la regresión múltiple con una $p < 0.05$ no mostró un efecto dosis dependiente, con $r = 0.144$ y $n = 24$.

(CUADRO 1, GRAFICA 1,).

* PRUEBA PARAMETRICA.

** PRUEBA NO PARAMETRICA.

MICRONUCLEOS EN SANGRE PERIFERICA DIFERENTES DOSIS DE COLCHICINA



GRAFICA No. 1

No.	DOSIS mg / k	MEDIA *	DES. ESTAN.	N
1	0	8.0167	3.1299	4
2	0.0646	12.6276	6.1985	4
3	0.1292	10.8467	1.5547	4
4	0.2583	12.9125	4.1691	4
5	0.516	12.3575	5.5362	4
6	1.033	12.6053	4.3998	4

* No. DE MNs EN
8000 CEL.

FIGURA 4



MNs en eritrocitos de sangre periférica de ratón

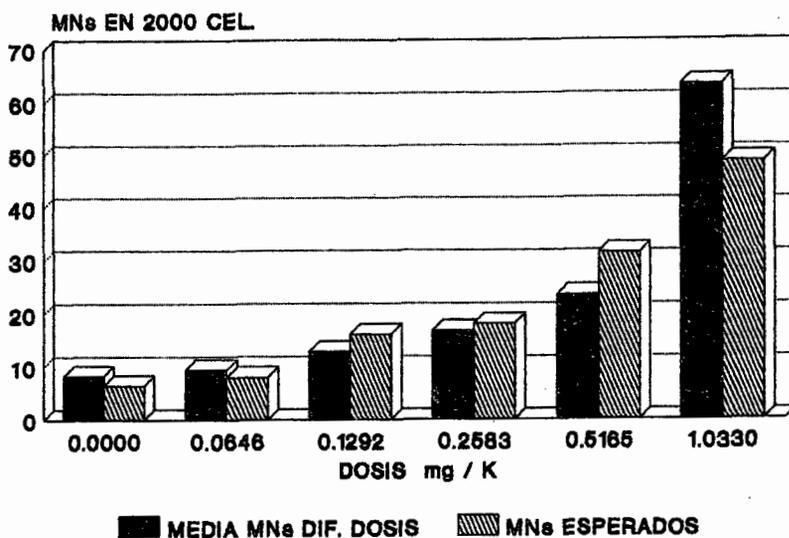
MICRONUCLEOS EN MEDULA OSEA DE RATONES TRATADOS CON
DIFERENTES DOSIS DE COLCHICINA

La prueba de MNs en Médula ósea con diferentes dosis de colchicina mostró diferencias significativas entre grupos' al aplicarles el ANOVA de Fisher (*) con $p < 0.05$ mientras que con ANOVA de Kruskal - Wallis (**) no mostró diferencias significativas con $p < 0.505$ por lo que se aplicó una t-Student la cual fue no significativa con $p < 0.05$.

Al aplicar el coeficiente de correlación, y la regresión múltiple con $p < 0.05$ mostró un efecto dosis-dependencia con una $\bar{r} = 0.7489$ y $n = 19$.

(CUADRO 2, GRAFICA 2)

MICRONUCLEOS EN MEDULA OSEA DIFERENTES DOSIS DE COLCHICINA



GRAFICA No. 3

No.	DOSIS mg / k	MEDIA *	DES. ESTAN.	N
1	0	8.333	4.041	3
2	0.0646	9.5	3.535	2
3	0.1292	12.9	5.129	4
4	0.2583	16.867	10.347	3
5	0.516	23.575	13.914	4
6	1.033	63.5	41.464	3

* No. DE MNS EN
2000 CEL.

CUADRO 2

FIGURA 5



MNs en médula osea de ratón.

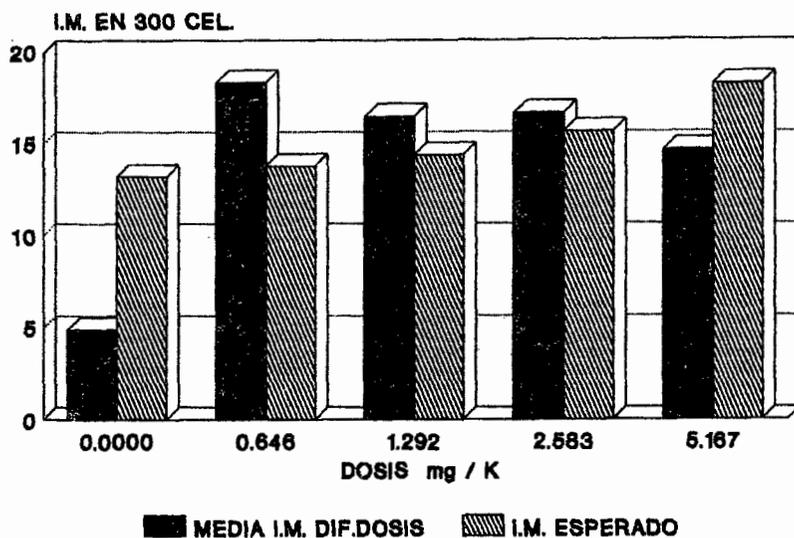
INDICE MITOTICO EN MEDULA OSEA DE RATONES TRATADOS
CON DIFERENTES DOSIS DE COLCHICINA.

La prueba de Índice mitótico en médula ósea con diferentes dosis de colchicina mostró diferencias significativas' entre grupos al aplicarles el ANOVA de Fisher (*) con $p < 0.05$ mientras que con ANOVA de Kuskal Wallis (**) no mostró diferencias significativas con $p < 0.05$ por lo que se aplicó' una t -Student y se pudo ver que las diferencias fueron al comparar el grupo control contra los grupos tratados con $p < - 0.05$.

Al aplicar el coeficiente de correlación y la regresión múltiple con $p < 0.05$ no mostró un efecto dosis - dependencia con una $a r = 0.2427$ y $n = 23$.

(CUADRO 3, GRAFICA 3)

INDICE MITOTICO EN MEDULA OSEA DIFERENTES DOSIS DE COLCHICINA



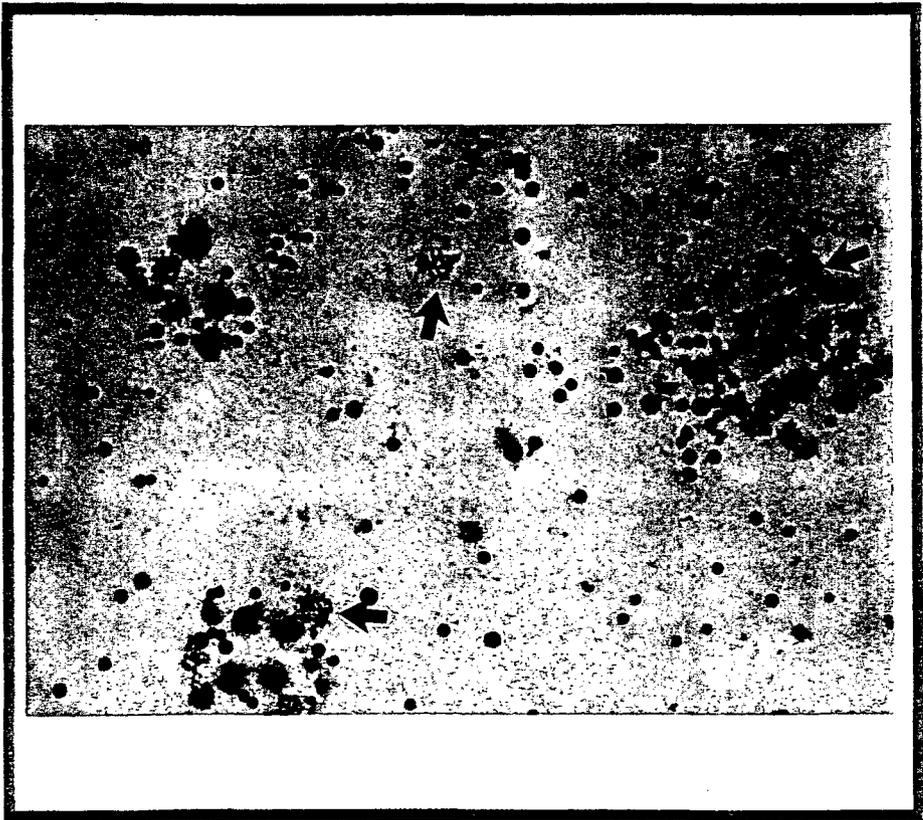
GRAFICA 3

No.	DOSIS mg / k	MEDIA *	DES. ESTAN.	N
1	0	4.9	0.663	4
2	0.646	18.4	5.367	5
3	1.29	16.54	4.664	5
4	2.583	16.7	9.08	5
5	5.167	14.68	4.489	4

* No. DE I.M. EN
300 CEL.

CUADRO 3

FIGURA 6



Indice Mitótico de ratón.

CONCENTRACIONES ACTIVAS EN MICROLITROS Y CONCEN--
TRACION DE CARBOHIDRATOS DE LOS EXTRACTOS PARA --
PRODUCIR "IN VITRO" 100% INMOVILIZACION-AGLUTINA-
CION DE ESPERMATOZOIDES DE RATON.

		microlitros	carbohidratos
1.- <u>Kalanchoe blossfeldiana</u>	*	10	500 ug/ml
2.- <u>Echeveria gibbiflora</u>	*	15	1700 ug/ml
3.- <u>Bursera multijuga</u>	*	100	424 ug/mg
4.- <u>Sedum oxipetalum</u>	*	20	102.5 ug/mg

* Sistema de incubación 2×10^7 espermatozoides por -
0.5 ml de Ham F-10 pH 7.4.

CUADRO No. 4

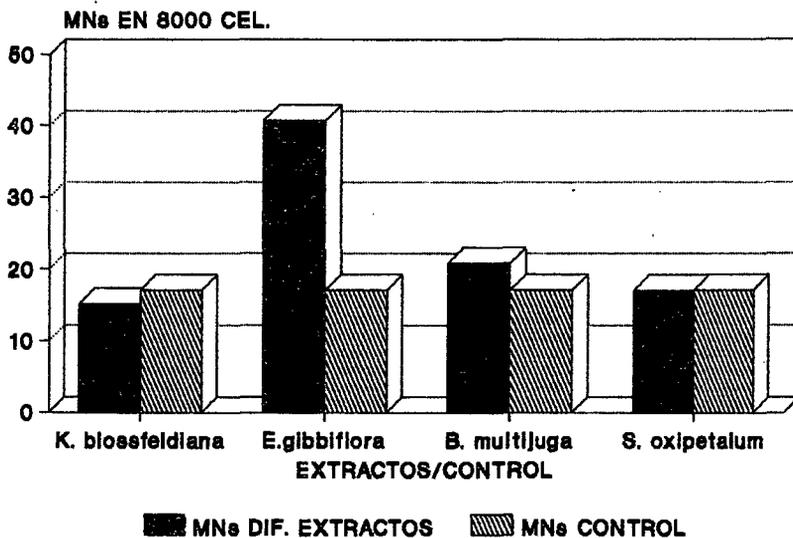
FIGURA 7**Espermatozoides de ratón aglutinados con extracto**

MICRONUCLEOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATONES TRATADOS CON LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS.

La prueba de MNs en sangre periférica con extractos' mostró diferencias significativas entre grupos al aplicarles' el ANOVA de Fisher (*) con $p < 0.05$ y con el ANOVA de Kruskal Wallis (**), al aplicarles la t-Student con $p < 0.05$ se pudo ver que las diferencias fueron al comparar el grupo control con los grupos tratados con Echeveria gibbiflora y Burse ra multijuca con $p < 0.05$ y $n = 50$.

(CUADRO 5, GRAFICA 4).

MICRONUCLEOS EN SANGRE PERIFERICA CON EXTRACTOS DE PLANTAS



GRAFICA 4

No.	EXTRACTOS	MEDIA *	DES. ESTAN.	N
1	CONTROL	17.077	5.225	10
2	K. blossfeldiana	15.167	3.869	10
3	E. gibbiflora	40.8	19.058	10
4	B. multijuga	20.888	3.312	10
5	S. oxipetalum	16.935	5.42	10

* No. DE MNS EN
8000 CEL.

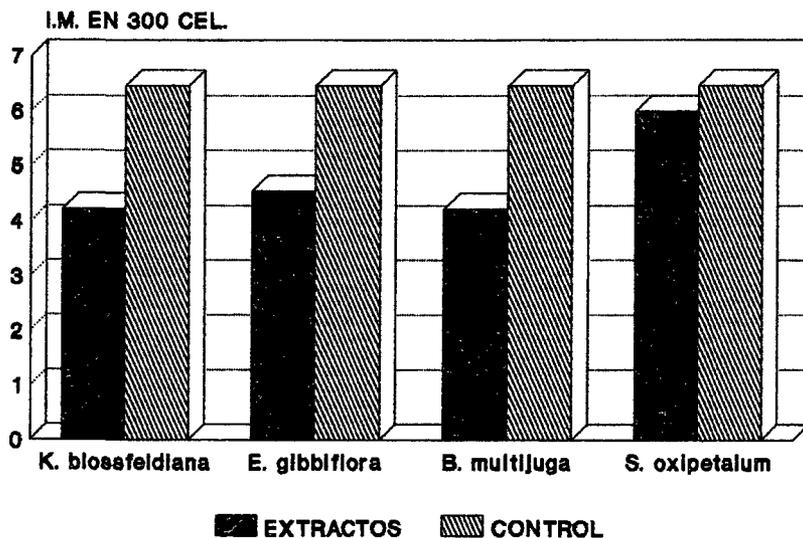
CUADRO 5

INDICE MITOTICO EN MEDULO OSEA DE RATON, TRATADOS
CON EXTRACTOS DE LAS PLANTAS.

La prueba de Índice mitótico con extractos no mostró diferencias significativas entre grupos al aplicarles el - - ANOVA de Fisher (*) y ANOVA de Kruskal-Wallis (**) con $p < 0.05$ lo que se confirma al aplicarles la t-Student con $p < 0.05$ y $n = 50$.

(CUADRO 6, GRAFICA 5).

INDICE MITOTICO EN MEDULA OSEA CON EXTRACTOS DE PLANTAS



GRAFICA 5

No.	EXTRACTOS	MEDIA *	DES. ESTAN.	N
1	CONTROL	6.469	4.24	10
2	<i>K. blossfeldiana</i>	8.15	3.189	10
3	<i>E. gibbiflora</i>	4.552	0.926	10
4	<i>B. multijuga</i>	4.218	2.893	10
5	<i>S. oxipetalum</i>	6	4.798	10

* No. DE I.M. EN
300 CEL.

CUADRO 6

D I S C U S I O N E S

MICRONUCLEOS EN SANGRE PERIFERICA Y MEDULA OSEA

Para determinar las dosis de colchicina se realizó un experimento piloto utilizándose las siguientes concentraciones:

mg / K

10.3	8.266	4.133	2.133	1.033
------	-------	-------	-------	-------

En este ensayo los animales usados presentaron un cuadro de intoxicación y murieron, exceptuando los animales tratados con 1.033 mg/K de colchicina, partiéndose de ésta, para las subsecuentes dosis, las cuales se delimitaron disminuyendo la concentración de colchicina por mitad cada vez -- (CUADRO 1, GRAFICA 1).

En la prueba de MNs en sangre periférica, las diferentes concentraciones de colchicina no dieron una respuesta dosis-dependiente, comportándose como única dosis, con respecto a los controles si hay diferencia significativa en el incremento de los MNs.

El no haber encontrado respuesta dosis-dependiente puede ser debido a que de manera natural la mayoría de los --

eritrocitos micronucleados son eliminados de la circulación - por el sistema reticuloendotelial principalmente por el bazo. Otra posibilidad sería el que los rangos de colchicina no fueran suficientemente amplios para observar dosis-respuesta en sangre periférica, dichos rangos no se pudieron incrementar - por la toxicidad del compuesto, por lo que se sugiere utilizar un agente menos tóxico y con conocida acción statmocinética o/y clastogénica.

De esta manera tenemos en médula ósea las mismas concentraciones de colchicina dieron una respuesta dosis-dependiente muy probablemente a este nivel no existen mecanismos - que eliminen ningún tipo de células dañadas, podemos decir -- que la prueba de MNs en médula ósea es más sensible, sin embargo utilizar la técnica es más laborioso, puede presentar - mayores problemas, implica la muerte del animal y mayor costo (CUADRO 2, GRAFICA 2).

Los problemas que se presentaron al realizar estos - experimentos fueron los siguientes:

Al leer los frotis de los ensayos 1, 2, 4, 6, no se encontraron MNs, no por que no haya, sino muy probablemente - debido a que en la técnica original (34) reportan el uso del suero fetal bovino el que sustituimos por solución salina fisiológica al 0.9% esta dió excelentes resultados con rata y - no así con ratón por el pequeño volumen de material que se extrajo, por lo que se sugiere usar el mayor número de huesos - posibles.

Así tenemos que la técnica presenta las siguientes:

VENTAJAS:

- * Fácil y rápida.
- * Se utiliza solo el agente a probar.
- * El significado de los MNs es claro.
- * La formación MNs espontánea es baja y uniforme en cada especie.
- * In vivo como In vitro, el número de células contables es ilimitado.
- * La técnica puede realizarse en células que estén en continua división como en médula ósea, células germinales así como en sangre periférica.
- * Es utilizable en Mamíferos, en otros vertebrados y vegetales.

DESVENTAJAS:

- * En células con poco citoplasma no son fácilmente distinguibles de lóbulos de núcleo normal o de proyecciones.
- * No detecta agentes que no producen fracturas o rezagos anafásicos (Esto es reareglos cromosómicos sin ocurrencia de fragmentos acéntricos: - Traslocación, Inversiones).
- * No se puede utilizar en poblaciones celulares que no se dividen.
- * No detecta procarcinógenos, ni promutágenos con períodos cortos de aplicación que requieren reactivación metabólica.
- * No detecta cancerígenos órgano-específicos.
- * No detecta cancerígenos especie-específicos.

INDICE MITOTICO

Se probaron diferentes cantidades de colchicina dentro del rango reportado en la literatura 0.001 - 1 (72), - (CUADRO 3).

La concentración que permitió observar mayor número de mitosis fue 0.646 mg/K sin que haya sido estadísticamente significativa al compararla con las otras dosis. Dado que en las diferentes concentraciones se van incrementando al doble cada vez hasta la dosis más alta que fue de 5.16 mg/K la cual produjo diarrea al animal, se decidió promediar las diferentes dosis excepto la más alta. El promedio de las concentraciones fue 0.045 mg/K, dosis muy similar a la utilizada en cultivos 0.05 mg/K (72), por lo que se decidió ésta última para los ensayos con extractos de plantas, (CUADRO 3, GRAFICA - 3).

MICRONUCLEOS EN SANGRE PERIFERICA E INDICE MITOTICO
EN MEDULO OSEA CON EXTRACTOS DE PLANTAS

Originalmente se pensó que la concentración de carbohidratos sería la base para determinar las dosis de los extractos, sin embargo la actividad "in vitro" varía independientemente de éstos; por lo que en este experimento se asignó la cantidad de extracto administrado en base a la aceptación del animal.

Tomando en cuenta que en las cuatro plantas utiliza-

das en este experimento la cantidad de carbohidratos no está directamente relacionado con la actividad aglutinante - inmovilizante de los espermatozoides "in vitro" como se reporta en la literatura (53), se sugiere tomar como parámetro para determinar las dosis el peso seco de cada extracto.

Los extractos de Echeveria gibbiflora y Bursera multijuga produjeron un incremento en el número de MNs, lo que indica que los extractos contienen compuestos de efecto genotóxico, en el caso de Kalanchoe blossfeldiana y Sedum oxipetalum no se observaron diferencias estadísticamente significativas al compararlas con los controles, sin embargo al observar el comportamiento de K. blossfeldiana contra el control, se aprecia una ligera disminución en el número de MNs lo que podría hablar de un efecto protector a la formación de MNs (73). (CUADRO 5, GRAFICA 4)

Dado que al acelerar la división celular puede haber mayor margen de error y dar origen al incremento de MNs, se descartó la posibilidad de que los extractos estuvieran alterando la división celular por medio de la prueba de I.M. la cual reflejó que los animales tratados contra los controles no presentan diferencia estadísticamente significativa. (CUADRO 6, GRAFICA 5)

Como el volumen tomado por los animales varía, al ser diluido el extracto en el agua del bebedero no ingieren la cantidad programada, además se contamina y hay que cambiar

a diario la dilución por lo que se propone que para futuros ensayos se dé a los animales de manera forzada los extractos diluidos en un volumen conocido.

Al momento de probar los extractos para ver su efecto anticonceptivo "in vivo", se propone separar los compuestos de los extractos de E. gibbiflora y B. multijuga y verificar si la parte activa no es la genotóxica, en el caso de K. blossfeldiana se sugiere ampliar el número de muestra para constatar si tiene actividad protectora a la formación de MNS (73).

MICRONUCLEOS EN MEDULO OSEA EN ANIMALES TRATADOS CON EXTRACTOS

Para estos experimentos no se trabajaron los MNs en médula ósea, dado que solo se extrajeron de los animales huesos largos de las patas posteriores, el material medular que de éstos se obtuvo fue muy poco; dado que el procedimiento para tener mitosis y MNS es diferente se optó por realizar el I.M.

Para futuros trabajos se sugiere extraer el mayor número de huesos posibles y dividir en 2 el material medular para realizar ambas pruebas.

C O N C L U S I O N E S

La prueba de Mns en sangre periférica con diferentes dosis de colchicina no mostró un efecto dosis-dependiente aún que si hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a controles.

La prueba de MNs en médula ósea con diferentes dosis de colchicina mostró un efecto dosis - dependiente.

La prueba de I. M. no mostró un efecto dosis - dependiente sin embargo las diferentes dosis con respecto al control, originaron un incremento estadísticamente significativo.

Al aplicar la prueba de MNs en sangre periférica con animales tratados durante 30 días con extractos de las plantas, se observó que E. gibbiflora y B. multijuga producen un incremento de MNs estadísticamente significativo con respecto al control, por lo tanto la hipótesis de trabajo no es válida para estas dos plantas.

Sin embargo al aplicarles la prueba de I. M. no hay diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cabeza M. 1990. Hormonas y reproducción. Cuadernos CBS Ed UAM. ed. 3ra, México D.F.
- 2.- Dexeu Trías de Bes S., Forroll T. E., Barri R. P.N., Buxa deras R., Tur P.R. 1990. Anticoncepción. Ed. Salvat, ed.- 2da. España.
- 3.- Ejoval E., 1970. Coitus interruptus: Manual of Family - planning and contraception practice. Edited by Baltimor,- Williams and Wilkins. ed. 2da.
- 4.- Hafez E.S.E. 1979. Male contraception in: Human reproduction conception and contraception; Edited by Hafez E.S.E. Harper & Raw Publisher. ed. 2na. Univ. Wayne, Detroit, - Michigan; 843 - 853.
- 5.- Koetsawan S. 1977. Injected Long-acting meroxiprogesterone acetate effect on human lactation and concentration in milk. J. Med. Assoc. Thai. 60: 57 - 60.
- 6.- Edgren R., Sturtenvant F.M. 1976. Potencies of oral contraceptives Am. J. of Obstet. and Gynecol. 125: 1029 - 1038.
- 7.- Masters W. H., Jhonson V.E., Kolony R. 1987. Massexualidad humana. Ed. Grijalbo, ed. 9na, Barcelona, España, vol 1.
- 8.- Johnson AB , Maness RF., Wheeler R.G. 1976. Calcareous deposits formed on IUDS inhuman exposures. Contraception 14: 507 - 517.
- 9.- Huacuja L., Delgado NM Anzar., Rosado A. 1987; Mineral deposits formation in bioactive IUDS. Adv. Contra. Delv. - Sys. III: 251 - 258.
- 10.- Edmund W. 1981. La ciencia de las plantas y su historia.- Botánica principios y problemas. Ed. C.E.C.S.A. éd. 2da.- 25 - 32.
- 11.- Capasso F., Balestrieri B., Macolo N. 1980. Actividad de las plantas medicinales, Medicina tradicional III. Ed. Co mité Editorial. ed. 4ta. Méx. 10.
- 12.- Pakrashi A., Pakrashi P. LP. 1977. Antiespermatogen effect of the extract of Aristolocha indica Linn on mice. IJ. -- Exp. Biol. 15: 256 - 259.

- 13.- Kholkute S.D. Chartterjee S., Udapa K. 1976. Effect of - Hibiscus rosa sinensis Linn on oestrous cycle & reproductive organs in rats. I.J. Exp. Rep. 703 - 704.
- 14.- Kholkute, Chartterjee S., Udapa K., 1977. Studies on the antifertility sopotentiality of Hibiscus rosa sinsensis - Planta Médica. 35 - 39.
- 15.- Kholkute S.D., Mudgal V., Udapa K. 1977. Studies on the - antifertility of Hibiscus rosa sinensis 35 - 39.
- 16.- Das R. P. 1980. Effect of papaya seed on the genital or-- gans & fertility of male rats. Indian J. of Exp. Biol. - 18: 408 - 409.
- 17.- Stolzemberg S. J. Parkhurst R M. 1974. Spermicidal ac-- tions of extracts and compounds from Phytolaca dodecandra Contra. 10: 135 - 143.
- 18.- Pakrashi A., Smayal S., Benerjee R., Sen M.R. 1985. Effec of malvaviscus konzattii flower extract on male fertility Contra. 31: 101 - 108.
- 19.- Maldenov I.V. 1982. Agglutination of human spermatozoa - with extract form Arum maculata & Arum orientale. Medicine Biochimie. 35: 1165 - 1167.
- 20.- Kamboj V. P. and Dhawana B.N. 1982. Research on plants - for fertility regulation in India. J. of Ethno. 6: 191 - 226.
- 21.- Chang H.M., Yeung H.W., Tso W-W and Koo A. 1984. Advances in Chinese medicinal materials resarch. Ed. World Scienti fic.
- 22.- Qi-Xian S., Friend D., 1989. Gossypol-Induced Inhibition' of Guinea Pig sperm capacitation 'in vitro'. Biol. Rep. - 29: 1027 - 1032.
- 23.- Kennedy W., A Van der H., Straus W., Bhattacharyy A., Wa- ller D., Zanereid L., Polakoshi K. 1983. Gossypol inhibi- tion of acrosin and procrosin and oocyte penetration by human espermatozoa. Biol. Rep. 999 - 1009.
- 24.- Hoffer A., Agarmal A., Melzar P., Naqui R., Lin-dberg M., Matlin S. 1987. Ultraestructural fertility and espermici- dal studies whit isomers and derivatives of gossypol in - male hamsters. Biol. Rep. 37: 909 - 924.
- 25.- Qian SZ., Zhong Ch-Q., Xu Y. 1986. Effect of Triptericium wilfordii hook. f. on fertility or rats. Contra. 33: 105- 110.
- 26.- Qian SZ., Zhong CH-Q., Xu Y. 1986. Antifertility effect - of Triptericium wilfordii inmen. Adv. Contracep. 2: 253 - 254.

- 27.- Goodman and Gilman's. 1990. The pharmacological basis of therapeutics. Ed. Pergamon press, Inc. ed. eighth. United States of America.
- 28.- Thomas L., M.D., M.P.H. 1985. Teber's Encyclopedic medical dictionary. Ed. Clyton ed. 16 Philadelphia. 1994 -- 1985.
- 29.- Editors George CHO., Blaschke 1990. Annual review of -- pharmacology and toxicology. Ed. Annual Reviews INC., Palo Alto Calif. USA. Vol. 30.
- 30.- Morris S., Kupchan Ph D. 1970. Recent advances in chemistry of tumor inhibitors of plant origin Trans. ny Acad.-sci. Ind. Med. III, 32: 85 - 106.
- 31.- Hall I., Lee K., Mar E. CH., Starenes Ch. O. 1977. Antitumor agents 21. A Proposed mechanism for inhibition of - cancer Growth by Tenulin and Helenalin and Related Cyclopetenones. J. Med. Cem. Vol. 20 3: 333 - 337.
- 32.- Heddle JA., Cimino MC., Hayashi MM., Romagnaff., Shgelby' MD., Tuxker JD, Vanparys Ph., Mac Gregor JT. 1991. Micro nuclei an index of cytogenetic damage: past, present and future. Environ. Mol. Mutagen. 18: 277 - 291.
- 33.- Heddle JA., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., Mac Gregor JT., Newwel GW., Salamone MF. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity A report of the' U.S. Environmental protection agency gene-tox program. Mutation Res 1983; 123: 61 - 118.
- 34.- Schmid W. 1975. The micronucleus tests. Mutation Res. 31: 9 - 15.
- 35.- Heddle JA., Lue CB, Saunder F, Benz D. 1978. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the-micronucleus method. Cancer Res 38: 2983 - 2988.
- 36.- Harat JW., Hartley-Asp B. 1983. induction of micronuclei in the mouse: revised timing of the final stage of ery--thropoiesis. Mutation Res. 120: 127 - 132.
- 37.- Yamamoto K.I. and kikuchi Y. 1980. A comparasion of diameters of micronuclei induced by clestogens and by spindle poissons. Mut. Res. 71: 127 - 131.
- 38.- Tice R.R., Luke C.A. and Shelby M. D. 1987. Methyl Isocyanate: An Evaluation of in vivo Cytogenetic Activity. Environ. Mutagen. 9: 37 - 58.
- 39.- Shuilin H., Baker RSU. 1989. Iniatiating carcinogen, -- triethylenemelamine, induces micronuclei in skin target' cells. Environ Mol Mutagen. 14: 1 - 15.

- 40.- Livingston GK., Reed RN., Olson BL., Lockey JE. 1990. -- Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. environ Mol. Muta gen. 136 - 144.
- 41.- Dolittle DJ., Lee CK., Ivetl JL., Mirsalis JC., Riccio E. Rudd CJ., Burger GT., Hayes AM., 1990. Comparative studies in the genotoxic activity of mainstream smoke condensate from cigarettes which burn of only hot tobacco. Environ Mol Mutagen 15: 93 - 105.
- 42.- Schmezer P., Pool BL., Lefever PA., Callander RD., Ratpan F., Tinwell H., Ashby J. 1990. Assay Specific genotoxicity of n-nitrosodibenzylamine to the rat liver in vivo. Environ. Mol. Mutagen. 15: 190 - 197.
- 43.- Ashby J., Lebebre PA., 1992. Mitogenesis, micronuclei - and carcinogenesis in the rat liver: Some basic inconsistencies. Environ Mol. Mutagen. 20: 29 - 38.
- 44.- Lahdetic L. 1983. Micronucleus induced during meiosis by ethyl methanesulfonate, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene in male rats. Mutation Res. 120 - 257.
- 45.- Russo A., Levis AG., Further evidence for the aneuploidogenic properties of chelating agents: induction of micronuclei in mose male germ cell by EDTA. Environ Mol. Muta gen. 19: 125 - 131.
- 46.- Trzos RJ., Petzold GL., Brunden MN., Suenberg JA. 1978.- The evolution of sixteen carcinogens in the rat using - the micronucleus test. Mutation Res. 58: 79 - 86.
- 47.- Hayashi M., Morita t., Kodoma Y., Sofuni T., Ishidate M. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood raticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutation Res. 2 and 5: 245 - 249.
- 48.- Choy WN., Henika PR., Willhite CC., Tarantal AF. 1993. - Incorporation of micronucleus study into a developmental toxicology and pharmacokinetic study of L-Selenomethionine in non human primates. Environ. Mol. Mutagen. 21: 73-80.
- 49.- Jaylet A., Deparis P., Ferrier V., Grinfeld S., Siboulet R. 1986. A new micronucleus test using peripheral blood' erythrocytes of the newt Pleurodeles waltl to detect mutagens in freshwater pollution. Mutation Res. 164: 245 - 257.
- 50.- Bhunya SP., Jena GB. 1992. Genotoxic potential of the or ganochlorine insecticide lindane (gama-GHC): an in vivo' study in chickens. Mutation Res. 272: 175 - 181.

- 51.- Ham AW. 1976. Tratado de Histología. Ed. Interamericana. ed. 7ma. México, México. 43 - 45.
- 52.- Boolom EE., Nanna VC. and Dietert RR. 1987. Teratogenig' of Chemical Mutagens to Detection by Direct DNA labeling and sister Chromatid exchange Induction. Environ Mutagen 9: 3 - 18.
- 53.- Zuñiga G., Huacuja R.L., Carranco A., Marchant H., Guzman man A., 1992. Efectos os Sedum oxipetalum ethanol extracts on human/mice epididimal sperm: Motility, Viability and' Structural Changes. ADV. CONFDELIV SVST 8: 2221 - 2231.
- 54.- Ramirez M. M.P. 1987. Extractos etanolicos de Sedum oxie petalum y su efecto sobre la motilidad y la viabilidad - de los espermatozoides de humano y de ratón. Tesis profesional para obtener el título de Lic. en Biología. Fac.- de Ciencias Biológicas. U de G.
- 55.- Huacuja R. L. 1992. Comunicación personal.
- 56.- Huacuja R. L., Delgado M., Carranco A., Reyes R., Rosado A. 1990. Actividad aglutinante e inmovilizante del extracto etanólico de Bursera fagaroides sobre espermatozoides de humano de otros mamíferos. Arch. Invest. Méd.- (Méx.), 21: 393.
- 57.- Huacuja R.L., Tobaada J., Ortega A., Marchant A., Reyes' R. and Delgado N. 1985. Inmovilization and agglutination' effects Echeveria gibbiflora crassulaceae aqueous crude extract on human espermatozoa. Ad. in contraceptive Delivery Sistem. II: 229 - 236.
- 58.- Huacuja R.L. 1992. Datos no publicados.
- 59.- Jones J. 1987. Sistemática vegetal. Sistema de clasificación de Cronquist. Ed. Mc Graw Hill. ed 2da. 14: 373 - 503.
- 60.- Standley P. 1922. Trees and Shurbs of México. 23: 307.
- 61.- Sánchez S. 1984. La Flora del Valle de México. Ed. herre ro. México. 184 - 188.
- 62.- Mac Vaugh R., Rezendowski J. 1965. Sypnopsis of the genus Bursera l. in western México with notes on the material' of Bursera collected by Sessé & Mociño. Reprinted from - Kew Bulletin Vol: 18: 2: 361 - 364.
- 63.- Rzendowski y Rzendowski 1967. Flora fanerogámica del Valle de México. Ed. C.E.C.S.A. Vol: 241 - 248.
- 64.- Innes C. 1982. The handbook of cacti and succulents. Char tewell Books, INC. A Division of Book sales, INC. Hong - Kong. 118.

- 65.- Rodríguez L. y pezteguía. 1985. Cactus y otras suculentas en Cuba. Ed. Científico-Técnica. Habana Cuba. 187 - 188.
- 66.- Bolikov NP., Kuelshov VP., Chevotarer HN., V.I., Midian - SA., 1974. Population cytogenetic investigation of new-borns in moscow. Humangenetik 22: 139 - 152.
- 67.- Baker RJ. and Qumsiyeh MB. 1988. Methods in Chiropteran - Mitotic chromosomal studies-ecological and Behaviors methods for study of bats. Ed. by Thomas H. Hunz. Smithsonian institution Press. Wasintong D.C. Londn. 533.
- 68.- Von Im., and Schmid W. 1973. The micronucleus test. Methodological aspects. Mut. Res. 19: 109 - 117.
- 69.- Gollapudi B. and Kamara O.P. 1979. Application of simple - Giemsa-staining method in the micronucleus test. Mutation Res. 64: 45 - 46.
- 70.- Gudi., Xu J. and Thilagae A. 1992. Assessment of the in - vivo aneuploidic/micronucleus assay in mouse bone marrow - cell with 16 chemicals. Environ. Mol. Mutagen. 20: 106 - 116.
- 71.- Hewitt B.R. 1958. Spectrophotometric determination antro - na of total carbohydrates. Nature. 122 - 246.
- 72.- Sharma AK, Sharma A. 1980 Chromosome techniques theory and practice. 3a. ed. Butterworth ICo. Boston. 711.
- 73.- Morris dl. and Ward JB. 1990. Coumarin Inhibits Micronu - clei formation Induced by not Fernale ICR Mice.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente

Número

Sección

SRITA. OLIVIA TORRES BUGARIN

P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "ESTANDARIZACION DE LAS PRUEBAS DE MICRONUCLEOS E INDICE MITOTICO PARA DETERMINAR GENOTOXICIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD "IN VITRO" AGLUTINANTE - INMOVILIZANTE DE LOS ESPERMATOZOIDEOS DE RATON" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado el M. en C. Luis Huacuja Ruíz.

A T E N T A M E N T E

"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., 29 de mayo de 1993

EL SECRETARIO

ENCARGADO DEL DESPACHO DE LA DIRECCION



FACULTAD DE
 CIENCIAS BIOLÓGICAS

BIOL. JESUS ALBERTO ESQUIVOSA-ARIAS

c.c.p.- El M. en C. Luis Huacuja Ruíz, Director de Tesis.-pte.

c.c.p.- El expediente del alumno

JAEA/cglr.

Al contestar este oficio cítese fecha y número



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE.

Guadalajara, Jal. Agosto de 1993.

Dr. Eulogio Pimienta Barrios
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad de Guadalajara.

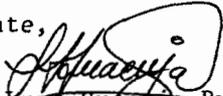
P r e s e n t e .

Por este conducto comunico a usted que la Srita. OLIVIA TORRES BUGARIN, pasante de la Lic. en Biología, ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado: ESTANDARIZACION DE LAS PRUEBAS DE MICRONUCLEOS E INDICE MITOTICO PARA DETERMINAR GENOTOXICIDAD DE PLANTAS CON ACTIVIDAD AGLUTINANTE-INMOVILIZANTE DE LOS ESPERMATOZOIDES DE RATON, realizado en la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del I.M.S.S.

Así mismo le informo que he revisado el manuscrito de dicha tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos.

Sin mas por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,


M. en C. Luis HUACUJA Ruiz
Director de Tesis.

SI AL PRINCIPIO DE UN
LARGO VIAGE CONOCIERAMOS
TODAS LAS DIFICULTADES
QUE NOS ESPERAN POCOS LO
EMPRENDERIAN

DAN RATHER