UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILIS TOGA. 1948

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

TESIS DE DIPLOMA

Potencial genotóxico de *Capraria biflora* L. mediante el ensayo de micronúcleos transplacentarios

Autor(a):

Seila Hernández Cordovez

Santa Clara

2017

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

TESIS DE DIPLOMA

Potencial genotóxico de *Capraria biflora* L. mediante el ensayo de micronúcleos transplacentarios.

Autor(a):

Seila Hernández Cordovez

Tutor:

MSc. Arianna Valido Díaz

Unidad de Toxicología Experimental (UTEX)

Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, "Serafín Ruiz de Zárate Ruiz".

Calle 7ma, número 80, entre: Prolongación de Colón y Hospital Arnaldo Milián Castro. Santa Clara.

Santa Clara

2017

"…El único camino abierto a la prosperidad constante y fácil es el de conocer, cultivar y aprovechar los elementos inagotables e infatigables de la naturaleza…"

José Martí

A mis ángeles de la guarda:

mamá y papá

Agradecimientos

Cuando el camino recorrido llega a su fin, solo nos queda dar gracias por aquellas experiencias vividas durante el andar, porque a veces hay que dejar detrás todo aquello que nos hizo fuerte, pero nunca olvidar a los que siempre estuvieron, sin esperar nada a cambio. La vida nos da oportunidades maravillosas y no quisiera pasar por alto este momento, para así agradecer:

A todos los que de una forma u otra hicieron que esta universidad estuviese en el capítulo más importante de mi vida, a los que ofrecieron su ayuda, a los que tendieron su mano cuando se les necesitaba. A los que dudaron, si a ellos, me dieron mucha fuerza para proponérmelo y lograrlo.

A los profesores del departamento por hacer de estos cinco años los más amargos pero dulces, son cuestiones del momento.

A mi tutora Arianna por su paciencia y dedicación, las largas horas y los fines de semana que pasamos en ardua labor para que todo saliera con buen tiempo.

A “las niñas de Santa Clara”, como le decimos; fue grato tenerlas en el aula.
A las chicas de mi cuarto, sin ustedes no hubiese sido posible, fue cómodo mis cinco años compartiendo el mismo techo, solo porque son ustedes, son especiales, no lo duden.

A Ignacio por demostrarme lo fácil que es cambiar para no ser excluido, lo admiro mucho de ti, eres fuerte.

A Sheila por perseverar para ser mi amiga, hasta que lo logró y hoy le agradezco su perseverancia. Gracias amiga por compartir momentos buenos y malos, por reír, por llorar, por estar cuando se te necesitaba, mis más honestas gracias por ser tú, nunca cambies.

A Alejandro, sin ti…no sé, mejor contigo. Gracias por existir y coincidir en mi camino, juntos hemos llorado y hemos reído, pero compartir contigo fue lo mejor. Ojalá y todos tuviesen un Alejandro al pasar por la universidad, las noches de estudio, las fastidiosas

guardias de madrugada, las fiestas, sin ti no hubiese tenido sentido. Te agradezco mi “Pepe grillo”, mi hermano, mi amigo.

A mi familia que a pesar de pasar momentos duros, ocasiones de duda y desenfrenos, me apoyaron incondicionalmente en mi carrera, a todo y cada uno de ellos, sin su presión no estuviésemos aquí hoy disfrutando ya de un final feliz.

Gracias a lo que no se ve, solo se siente y ese es el impulso de ser cada día mejor, por lo que te propones metas, lo que te hace llegar a la cima sin ni siquiera saber cómo lo hiciste…. Todo está en el empeño y la fuerza que le pongas a lo que quieres obtener.

A todos muchas gracias

RESUMEN

Se determinó el potencial genotóxico del extracto acuoso de *Capraria biflora* L. mediante el ensayo de micronúcleos transplacentarios. Esta especie podría constituir una terapia alternativa y/o complementaria en el tratamiento de procesos inflamatorios. Se le han realizado estudios tradicionales de genotoxicidad pero su actividad en un sistema de mayor acierto al riesgo genotóxico no ha sido explorada. Se diseñaron cinco grupos experimentales de madres gestantes de la línea BALB/c/Cenp., un control positivo con ciclofosfamida (50 mg/Kg), un control negativo con agua destilada (10 ml/Kg) y tres grupos a las dosis de 400, 800 y 1600 mg/Kg del extracto, los cuales fueron tratados los días 14, 15 y 16 de la gestación. Al efectuar la cesárea fueron tomados cinco fetos por madre los que constituyeron los grupos del seis al 10 de la investigación. Fueron determinados la frecuencia de eritrocitos micronucleados, los índices de genotoxicidad y citotoxicidad en la médula ósea de las madres y el hígado de los fetos, mientras que en la sangre periférica de ambos solo se determinó el índice de genotoxicidad mediante la presencia de reticulocitos micronucleados. La sustancia en estudio no mostró genotoxicidad ni citotoxicidad, no aumentó significativamente la frecuencia de células con micronúcleos en médula ósea de las madres ni en hígado fetal, ni la frecuencia de reticulocitos micronucleados en sangre periférica ($p \leq 0,05$). Los resultados demostraron que el extracto acuoso obtenido de las hojas de *Capraria biflora* L. no es genotóxico en el ensayo aplicado según las dosis evaluadas y el modelo seleccionado.

Palabras Claves: *Capraria biflora* L, genotoxicidad, micronúcleos, médula ósea, sangre periférica, hígado fetal.

ABSTRACT

The genotoxic potential of aqueous extract obtained from the leaves of *Capraria biflora* L. was determined in the transplacental micronucleus test. This species could be used as an alternative therapy and/or as a complimentary treatment for inflammatory processes. This plant has been studied in a genotoxicity traditional test but their activity in a system of more success to the genotoxic risk has not been explored. Mothers' mice pregnant of the line BALB/c/Cenp. were designed in five experimental groups, a positive control with cyclophosphamide (50 mg/Kg), a negative control with distilled water (10 ml/Kg) and three groups with the extract under evaluation (400, 800 y 1600 mg/Kg), which were treated the days 14, 15 and 16 of the gestation. Five fetuses were taken by mother after caesarean. These fetuses constituted the groups from the six to ten of the research. The frequency of micronucleated bone marrow cells, the genotoxicity and citotoxic indexes were determined in the bone marrow of the mothers and the liver of the fetuses, while in peripheral blood alone the genotoxicity index was determined by presence of micronucleated reticulocytes. The aqueous extract didn't show genotoxicity neither citotoxic activity. It didn't increase the frequency of cells significantly with micronucleus in the mothers' bone marrow neither in fetal liver, the frequency of micronucleated reticulocytes in peripheral blood ($p<0.05$). The results demonstrated that the aqueous extract obtained from the leaves of *Capraria biflora* L. is not genotoxic in the test applied according to the evaluated doses and the selected model.

Key words: *Capraria biflora* L., genotoxicity, micronucleus, bone marrow, peripheral blood, fetal liver.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN 1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4
2.1. Toxicología. Generalidades 4
2.2. Genotoxicología 4
2.2.1. Metabolismo de los agentes genotóxicos 5
2.2.2. Ensayos de genotoxicidad 6
2.2.3 Estrategias regulatorias en los ensayos de genotoxicidad 7
2.2.4. Ensayos de micronúcleos 8
Formación de micronúcleos 9
Micronúcleos transplacentarios 10
2.3. Ciclo estral, apareamiento y gestación de ratones BALB/c/Cenp. 10
2.4. Hígado en la etapa fetal 12
2.4.1. Formación y funciones del hígado 12
2.4.2. Metabolismo 13
2.4.3. Hematopoyesis 13
2.5. Plantas medicinales 14
2.6. Especie *Capraria biflora* L. 15
2.6.1. Descripción botánica 15
2.6.2. Composición química 17
2.6.3. Usos tradicionales de Capraria biflora 18
2.6.4. Estudios farmacológicos previos 18
2.6.5. Estudios toxicológicos previos 19
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS 20
3.1. Modelo biológico. Caracterización 20
3.2. Procesamiento del material vegetal 21
3.2.1. Recolección 21

3.2.2. Secado y molinado 21
3.2.3. Obtención del extracto 21
3.3. Evaluación del potencial genotóxico 22
3.3.1. Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de madres 23
3.3.2. Ensayo de micronúcleos en hígado fetal 24
3.3.3. Ensayo de micronúcleos en sangre periférica de roedores 24
3.4. Aspectos éticos de la investigación 25
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 28
4.1. Modelo biológico 28
4.2. Procesamiento del material vegetal 28
4.2.1. Recolección 28
4.2.2. Secado y molinado 29
4.2.3 Obtención del extracto 30
4.3 Evaluación del potencial genotóxico 30
4.3.1 Ensayo de micronúcleos transplacentarios en médula ósea materna e hígado fetal 30
4.3.2 Índice de citotoxicidad 37
4.3.3 Ensayo de micronúcleos transplacentarios en sangre periférica de madres y neonatos 40
4.4 Aspectos éticos de la investigación 44
CONCLUSIONES 45
RECOMENDACIONES 46
Referencias Bibliográficas .....
Anexos .....

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En muchas ocasiones para curar determinadas patologías que afectan la salud, se ha tenido que recurrir a ciertos procedimientos terapéuticos que se apartan de la medicina convencional. En la actualidad esta alternativa médica experimenta un auge cada vez más creciente; sin embargo, éstas no son absolutamente nuevas, casi en su totalidad son los resultados de técnicas y procedimientos usados tradicionalmente. La medicina natural cobra cada vez más defensores y ejecutores, debido fundamentalmente a las formas naturales de curación y a la carencia de efectos secundarios de estas terapias. Por lo tanto, surgen iniciativas científicas de establecer un tratamiento fitoterapéutico que involucre: la selección, dosificación, vía de administración y recomendaciones para el paciente acerca de la alternativa natural (Rodríguez *et al.*, 2014).

Este significativo aumento en la utilización de los vegetales, que constituyen una importante alternativa terapéutica, obedece no solo a los cambios culturales de muchos pueblos, sino también fundamentalmente al elevado costo de los fármacos. Los productos de plantas son menos potentes y en general, causan menos reacciones adversas que los productos farmacéuticos sintéticos. Pero no se debe olvidar que los extractos o los fitocomplejos están constituidos por varias moléculas bioactivas, algunas potencialmente tóxicas, donde la concentración podría ser crucial, de ahí que los estudios toxicológicos preclínicos son imprescindibles para respaldar y asegurar científicamente su efectividad e inocuidad (Vivo *et al.*, 2012).

Hoy en día, la mayoría de los países desarrollados, han creado leyes y regulaciones para controlar el proceso de producción y distribución de medicinas, vacunas, aditivos alimentarios, pesticidas, productos químicos industriales y otras sustancias con potencial toxicológico. Tales regulaciones casi siempre prescriben un régimen de evaluación toxicológica para generar información que permita a los toxicólogos determinar si los beneficios de una sustancia particular sobrepasan sus riesgos a la salud humana y al medio ambiente (Silbergeld, 2012; Wang *et al.*, 2015).

Para ello se evalúan los fármacos en ensayos de una sola exposición o toxicidad aguda, a dosis repetidas que van desde la exposición de 28 días hasta 1 año en roedores, ensayos de genotoxicidad que incluye estudios *in vitro* e *in vivo*, estudios de inmunotoxicología y por último la toxicología de la reproducción. Además se han incluido nuevos ensayos de toxicología especial los cuales se utilizan en dependencia del efecto farmacológico de la droga que se investiga (Gámez *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015).

En el ámbito internacional, la evaluación genotóxica de nuevos medicamentos es un requisito de carácter obligatorio y aunque no existe un consenso generalizado sobre qué tipos y cantidad de ensayos de genotoxicidad deben realizarse, existen criterios coincidentes para clasificar en genotóxicos o no, los productos químicos, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante dichos ensayos (CECMED, 2012).

La especie *Capraria biflora* L. (*Schrophulareaceae*) es una planta recomendada en afecciones que involucran episodios dolorosos o mediados por inflamación. Esta actividad farmacológica fue comprobada en un extracto acuoso obtenido de sus hojas a diferentes dosificaciones (200, 400 y 800 mg/Kg) tanto en modelos de inflamación aguda (edema plantar por carragenina, migración leucocitaria) como crónica mediante la inducción de granulomas por discos de algodón. Dosis similares fueron evaluadas en modelos de úlcera por etanol e indometacina, así como en modelos de analgesia mostrando actividad a las dosis ensayadas (Vicet, 2009; Valido, 2011).

En la composición química de la planta se comprobó la presencia de compuestos reductores, saponinas, compuestos fenólicos, taninos, aminoácidos y flavonoides siendo estos últimos los responsables de la mayoría de las atribuciones realizadas en los estudios farmacológicos (Vicet, 2009).

También se realizaron estudios de toxicidad aguda a dosis límite del extracto acuoso, concluyendo que no produce efectos tóxicos en ratas Wistar a un nivel de dosis de 2000 mg/Kg por vía oral (Acosta *et al.*, 2003). En este sentido se demostró científicamente que este mismo extracto administrado durante 28 días, no evidenciaba efectos tóxicos en ratas de la línea Sprague Dawley (Canto, 2013). Los últimos estudios realizados mostraron que la administración oral durante 14 días no evidenció efecto genotóxico en

eritrocitos de médula ósea (MO), ni de reticulocitos en sangre periférica, de ratones BALB/c/Cenp. (Cathrina, 2015).

Es conocido que la mayoría de las formas reactivas de las sustancias que provocan rupturas cromosómicas o dañan el aparato del huso son metabolitos producidos en los tejidos expuestos, se precisa que alcancen altas concentraciones del producto o del metabolito a este nivel para poder expresar el efecto, sin embargo la capacidad metabólica de la medula ósea suele ser limitada; lo que implica que aquellos productos que necesiten metabolización para ejercer su efecto o que los metabolitos derivados no sobrevivan en circulación generen falsos negativos en el ensayo de MO. Debido a estas limitaciones surgió la necesidad de realizar estudios con sistemas metabólicos con mayor acierto al riesgo genotóxico (Domínguez *et al.*, 2009).

Tomando en consideración estos aspectos se propone el siguiente **problema científico:**
No existen investigaciones reportadas que evalúen el potencial genotóxico del extracto acuoso de las hojas de *C. biflora*, en ensayos de micronúcleos transplacentarios con vistas a ampliar su perfil toxicológico.

Este trabajo científico parte de la **hipótesis** de que: La administración oral del extracto acuoso de las hojas de *C. biflora,* los días 14, 15 y 16 de la gestación, no muestra genotoxicidad en el ensayo de micronúcleos transplacentarios a la dosis de 400, 800 y 1600 mg/Kg en ratones BALB/c/Cenp.

Para comprobar dicha hipótesis se plantea el siguiente **objetivo general**:
Evaluar el potencial genotóxico del extracto acuoso de *Capraria biflora* L. mediante el ensayo de micronúcleos transplacentarios en ratones BALB/c/Cenp.

A partir de este objetivo general se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinar el potencial genotóxico del extracto acuoso de *C. biflora* en médula ósea materna.
2. Determinar el potencial genotóxico del extracto acuoso de *C. biflora* en hígado fetal.

3. Determinar el potencial genotóxico del extracto acuoso de *C. biflora* en sangre periférica materna y fetal.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Toxicología. Generalidades

En la actualidad, la mayoría de los países desarrollados, han creado leyes y regulaciones para controlar el proceso de producción y distribución de medicinas, vacunas, aditivos alimentarios, pesticidas, productos químicos industriales y otras sustancias con potencial toxicológico (Silbergeld, 2012). Tales regulaciones casi siempre prescriben un régimen de evaluación toxicológica para generar información que permita a los toxicólogos determinar si los beneficios de una sustancia particular sobrepasan sus riesgos a la salud humana y al medio ambiente (Caieme, 2016).

La toxicología se define como el estudio de los efectos adversos de agentes químicos, físicos o biológicos en organismos vivos y ecosistemas y está basado en el principio del siglo XVI que cualquier sustancia puede ser tóxica si es consumida en cantidad suficiente (Repetto y Repetto, 2009). Una de las misiones principales de la toxicología es identificar el efecto o grupos de efectos importantes con miras a prevenir enfermedades irreversibles o debilitadoras (Gámez y Más, 2007).

2.2. Genotoxicología

La Toxicología genética tuvo sus inicios en el año 1927, cuando Müller reporta la capacidad de los rayos X para inducir mutaciones en *Drosophila mellanogaster*. Luego Averbach en 1942 descubre las propiedades mutagénicas del gas mostaza, lo que permitió concebir una mejor definición para el concepto de mutagénesis. La sociedad de mutagénesis ambiental es fundada en 1969, y en este mismo año es reconocida la toxicología genética, como disciplina científica (Shayne, 2007; Cathrina, 2015).

En décadas posteriores la denominada tecnología del ADN recombinante ofreció metodologías que han resultado fundamentales en el conocimiento directo de la estructura y configuración del genoma, la identificación de genes específicos, la determinación de las alteraciones generadas en la información genética y su relación con la inducción del cáncer y otras enfermedades de base genética (Silbergeld, 2012).

La genotoxicidad puede definirse como la capacidad para causar daño al material genético, incluyendo tanto al ADN como a aquellos componentes celulares que están relacionados con las funciones y el proceder de los cromosomas dentro de la propia célula (AETOX, 2014; Arias, 2015). Existe una gran gama de ensayos genotóxicos a utilizar de forma estratégica y sensata según las propiedades del producto a evaluar y las condiciones de equipamiento. De esta forma se podrá dar una valoración real y veraz a los resultados obtenidos (Arrebola, 2014).

En la actualidad no existe un único test de mutagénesis capaz de proporcionar por sí solo información realmente relevante sobre la actividad del compuesto en estudio. Es imprescindible la realización de una batería de pruebas en las que se combinan test *in vitro*, sensibles a mutaciones que afectan incluso a un solo par de bases y que, además, permitan adquirir un cierto conocimiento sobre los mecanismos de acción, junto con otros *in vivo*, realizados en condiciones más realistas que, a pesar de su menor sensibilidad y de ser en general de realización más engorrosa, permiten integrar determinados factores que no son suficientemente considerados al utilizar sistemas experimentales procariotas o bien de un nivel de organización inferior al del individuo (Repetto y Repetto, 2009).

2.2.1. Metabolismo de los agentes genotóxicos

En realidad, la gran mayoría de los agentes genotóxicos son inertes en los seres vivos. Es a través de las enzimas metabólicas que las genotoxinas son biotransformadas a productos más reactivos, o electrofílicos, capaces de interactuar con diversas macromoléculas celulares, tales como las proteínas y los ácidos nucleicos. Los procariontes son incapaces de bioactivar promutágenos, y entre los eucariontes existen diferencias importantes en cuanto a la capacidad metabólica; ya que cada especie desplegó durante la evolución un grupo particular de enzimas para neutralizar los efectos nocivos de las toxinas naturales de origen vegetal (Brown, 2008).

En los eucariontes existen diferencias importantes en cuanto a la capacidad metabólica; ya que cada especie evolucionó de una manera particular. De hecho, las enzimas metabólicas muestran diferencias considerables en los diferentes órganos del individuo, entre los individuos de la misma especie y entre las diferentes especies. La actividad enzimática varía en el individuo dependiendo de la edad, el sexo, factores nutricionales,

niveles hormonales y otros factores biológicos (Tirunilai, 2012; Stuart, 2013). De hecho, las enzimas metabólicas muestran diferencias considerables en los diferentes órganos del individuo, entre los individuos de la misma especie y entre las diferentes especies. La actividad enzimática varía en el individuo dependiendo de la edad, el sexo, factores nutricionales, niveles hormonales y otros factores biológicos (Brown, 2008)

Los productos reactivos generados a través del metabolismo interactúan con el ácido desoxirribonucleico, produciéndose lesiones premutagénicas, o aductos, que en muchos casos se fijan y producen mutaciones puntuales en el AND , tales como sustituciones de bases, transiciones y transversiones, o bien mutaciones de corrimiento de marco de lectura. Sin embargo, en muchos casos, las lesiones premutagénicas son eficientemente reparadas por enzimas que funcionan en los organismos para mantener la integridad y fidelidad de los ácidos nucleicos (Cooper y Chen, 2012; Dricu, 2012).

Los mecanismos de reparación pueden funcionar antes o después de la replicación del ADN. Su eficiencia varía, ya que pueden reparar eficientemente, es decir, sin errores, situación que se presenta cuando la exposición a agentes genotóxicos es baja; o bien reparar de manera ineficiente, promoviendo errores en el ADN, lo que depende de la saturación del primer mecanismo y que generalmente ocurre cuando hay exposiciones altas (Cooper y Chen, 2012; Dricu, 2012). Sin embargo, ambos mecanismos se ven afectados por numerosas variables además de la exposición. Dependen también de la estructura química del mutágeno, del tipo de aducto formado y de la cantidad de daño inducido (Mishra, 2012).

2.2.2. Ensayos de genotoxicidad

Los estudios genotóxicos *in vitro* garantizan la detección del potencial mutagénico de numerosos compuestos. Dentro de estos estudios se destacan el ensayo de Ames, el de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana, el ensayo de la fracción microsomal de hígado de rata y el ensayo cometa (Silva *et al.*, 2015). Cada uno se encarga de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del marco de lectura o por sustitución de pares de bases del ADN, detectar los agentes que pueden provocar cambios en la estructura de los cromosomas, así como sustancias promutagénicas y daños al ADN en células individuales, mostrando las

rupturas de cadena y sitios lábiles al álcali en el ADN, al cuantificar su migración (Li y Chen, 2014; Yang *et al.*, 2016). Estos ensayos emplean como modelos experimentales microorganismos, células y órganos aislados, cultivos primarios y líneas celulares (Mishra, 2012; Akyıl y Konuk, 2015).

Aún los ensayos *in vivo* siguen siendo de gran utilidad y hasta el momento no se han podido sustituir por métodos alternativos en la toxicología experimental, no obstante se deben destacar el avance de técnicas que cada día van encaminadas a realizar un uso racional de los animales en las investigaciones, dentro de estas se destacan el principio de las “3R”, llamadas refinamiento, reducción y reemplazo (Abilev y Glaser, 2013). Dentro de los ensayos *in vivo* más utilizados se encuentra el ensayo cometa, el cual permite definir si una sustancia dada es capaz de alterar la estructura primaria en el ADN (Ruiz *et al.*, 2016; Kasamoto *et al.*, 2017). Otro ensayo, quizás el más clásico lo constituye el de micronúcleos en MO donde se determina el daño a nivel de cromosomas (Lebaron *et al.*, 2013).

Además se utiliza el ensayo de aberraciones cromosómicas en células hematopoyéticas de roedores; pero en poca medida por lo costoso que suelen ser los reactivos y las técnicas aún más especializadas que el de micronúcleos. Por último el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, el cual se efectúa a través del análisis de anomalías que se pueden presentar en la cabeza de los espermatozoides de los animales que se usen como patrón (OECD, 2014).

2.2.3 Estrategias regulatorias en los ensayos de genotoxicidad

Los estudios mutagénicos y genotóxicos en la toxicología experimental, se realizan cuando ya se han realizado todos los estudios de toxicidad aguda potencial del producto a evaluar en dos especies y por al menos dos vías, la que se propone para su uso en humanos y otra que por lo general es la vía intraperitoneal (Gopala *et al.*, 2016). Las autoridades regulatorias como la ICH (Conferencia Internacional sobre la Armonización), OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo) y EPA (Agencia para la Protección del Ambiente en Estados Unidos), exigen un ensayo *in vitro* que determine daño a nivel de genes y un ensayo *in vivo* que determine daño a nivel de los cromosomas (OECD, 2014). En los fármacos que se van a administrar por largos periodos de tiempo en el humano sea de forma preventiva o profiláctica, se deben realizar estudios de

carcinogénesis y al estar estrechamente relacionados estos dos tipos de evaluaciones, ya que por lo general la mayoría de las sustancias que son genotóxicas constituyen una fuente importante de sustancias cancerígenas, es necesario que se determine y evalué el daño a todos los niveles (Mishra, 2012).

Por lo general en los estudios de genotoxicidad *in vivo* se utilizan sustancias mutagénicas conocidas. Entre las más utilizadas se encuentra la ciclofosfamida (CF) y la bleomicina (BL). La primera es un agente alquilante que forma monoaductos y enlaces cruzados entre cadenas como consecuencia de la aparición de rupturas (efecto de los mecanismos de reparación). La segunda induce labilidad y ruptura de la estructura del ADN, al interactuar con el oxígeno y el hierro, produciendo radicales libres (Arencibia *et al.*, 2012a; Pereira *et al.*, 2016).

2.2.4. Ensayos de micronúcleos

Los micronúcleos (MN) fueron utilizados por primera vez por H.J. Evans, para cuantificar el daño cromosómico en las puntas de las raíces del haba, *Vicia faba* L. Subsecuentemente, el ensayo *in vivo* fue desarrollado independientemente por W. Schmid y J.A. Heddle y sus colegas. La primera propuesta del uso de los micronúcleos en cultivos de células fue por Countryman y Heddle en 1976, en cultivos de linfocitos humanos. Más tarde fue mejorado por Fenech y Morley en 1985 al desarrollar la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: *cytokinesis-block micronucleus*), en la que hacen uso del agente químico citocalasina-B que impide la citocinesis celular (Fenech y Morley, 1985).

El año 1999 fue crucial para el ensayo de MN ya que la técnica fue validada a nivel mundial y considerada como un biomarcador efectivo de daño en el ADN; desde entonces ha sido ampliamente utilizada como marcador de daño genotóxico (Torres y Zavala, 2013; Mellado *et al.*, 2017; Polychronis *et al.*, 2017). La prueba se realiza en diferentes tipos celulares: eritrocitos policromáticos de la MO, cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos jóvenes y maduros de la sangre periférica, queratinocitos, células de la mucosa bucal, hepatocitos de rata, células germinales y células de descamación de la vagina de la rata, entre otros (Arias, 2015; Björn *et al.*, 2016; Fucic *et al.*, 2017).

El ensayo de MN y de aberraciones cromosómicas es incluido actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras. Ambos ensayos son fácilmente reproducibles y brindan clara información sobre la proliferación celular en MO (Arencibia *et al.*, 2011b), además permite registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas (Arencibia *et al.*, 2011c).

Estos ensayos tienen por objeto determinar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de MN con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados (Arencibia *et al.*, 2003a). La detección de MN en eritrocitos jóvenes (reticulocitos) de la sangre periférica es una técnica que ofrece varias ventajas con respecto al análisis de la frecuencia de MN en MO: es más económica, sencilla y rápida, al mismo tiempo que analiza el mismo tipo de células. Este ensayo no es recomendado para su aplicación en ratas y humanos debido a la actividad del bazo en la eliminación de los eritrocitos micronucleados (Arencibia *et al.*, 2011a).

Formación de micronúcleos

Los micronúcleos son masas de cromatina que forman pequeños núcleos generalmente redondos u ovalados visibles al microscopio óptico. Tienen un diámetro aproximado de 0,4 a 1,6 micras y son conocidos como cuerpos de Howell-Jolly en el campo de la hematología. Se originan a partir de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros que durante el proceso de división celular quedan retrasados en la fase de segregación cromosómica (anafase), debido a errores durante la replicación, la posterior división del ADN, roturas cromosómicas o efectos propios de la radiación y sustancias genotóxicas, es así que no terminan siendo incorporados al núcleo de la célula hija. Estos cromosomas o fragmentos cromosómicos son visibles en el citoplasma bajo la apariencia de un pequeño núcleo, de ahí su denominación “micronúcleo” (Matheus y Bolaños, 2014; Valdivieso, 2016).

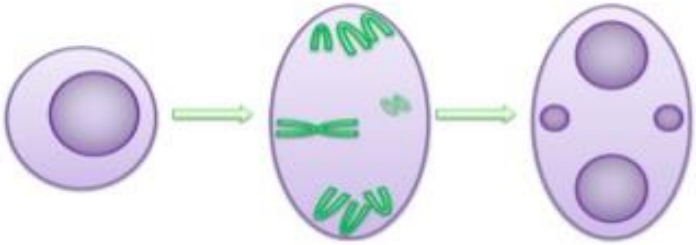


Figura 1. Formación de micronúcleos en el curso de la división celular (Lobo y Bolaños, 2014).

Cuando los eritroblastos de la MO se transforman en eritrocitos policromáticos, el núcleo principal es expulsado y el micronúcleo, caso de haberse formado, puede permanecer en el citoplasma, que de lo contrario quedaría enucleado. Resulta más fácil visualizar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de animales tratados es indicativo de la existencia de lesiones cromosómicas inducidas (Fig. 1) (Lebaron *et al.*, 2013).

Micronúcleos transplacentarios

El ensayo de MN transplacentarios ha sido utilizado por varios investigadores para demostrar la íntima relación entre el daño cromosómico causado en el hígado fetal y el efecto teratogénico causado por sustancias mutagénicas como la CF , a partir de la hipótesis planteada por Porter y Singh en el año 1998 de que el efecto clastogénico podría tener una expresión en el daño estructural cuando se administra la sustancia durante la preñez (Arencibia *et al.*, 2011a).

Este ensayo ha sido desarrollado con el objetivo de evaluar el potencial genotóxico en la descendencia y demostrar la capacidad de un agente de causar daños cromosómicos durante el periodo prenatal. Además realiza el registro de aberraciones cromosómicas, demostrando si una sustancia determinada puede ser clastogénica o aneugénica en el feto, a través de la exposición materna (Arencibia *et al.*, 2003a).

2.3. Ciclo estral, apareamiento y gestación de ratones BALB/c/Cenp.

El ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro) dura de 4 a 6 días con un estro (o celo) de aproximadamente 8-12 horas. Durante el estro, las hembras están receptivas y

aceptan la monta del macho. El proestro y estro culminan en la ovulación y constituyen la face de liberación de estrogenos, mientras que el metaestro y el diestro (o pseudopreñez o preñez) conforman la fase progestacional o luteal. Otro rasgo particular de las hembras, es la capacidad de entrar en estro dentro de las 24 horas posterior al parto. Este fenómeno se conoce como estro posparto y permite a la hembra quedar preñada inmediatamente, aumentando su ya enorme prolificidad (Benavides y Guénet, 2003).

En las condiciones del laboratorio, las hembras de ratón son usadas como reproductoras entre las 6-8 semanas, dependiendo de las líneas y genotipos. Sabiendo que la duración del ciclo estral en las hembras es de 4-5 días podemos inferir que, en un momento determinado al azar, una de cada cuatro hembras estará en celo, y por lo tanto receptiva para la cópula. En el laboratorio con un ciclo de luz/oscuridad estándar (12 horas luz/12 horas oscuridad), el celo se produce generalmente luego de la medianoche (Benavides y Guénet, 2003). Según los autores también se puede ver influenciado por el eje hipotálamo-hipófisis (Zuñiga et al., 2001).

En los ratones el esperma del macho coagula dentro de la vagina bajo la forma de un “tapón vaginal” relativamente duro (semejante a miga de pan masticada), que persiste unas 6 a 12 horas. Este tapón está formado por una mezcla de secreciones de las glándulas sexuales accesorias del macho, principalmente las glándulas coagulantes (Zuñiga *et al.*, 2001) y secreciones vaginales. Debido a este tapón vaginal (a diferencia de otros mamíferos), la hembra del ratón puede ser fecundada sólo por un macho. La presencia del tapón vaginal es un detalle de manejo esencial para los trabajos que requieran la confirmación (y el cálculo del tiempo) de la preñez, por lo cual es recomendable controlar las hembras bien temprano a la mañana siguiente de la monta. El ratón es una especie politoca (ovulación múltiple) y por lo tanto porta varios fetos en la misma gestación. El eventual aborto de uno de los fetos no impide la llegada a término de los otros; lo que constituye una ventaja evolutiva. La gestación dura entre 18,5 y 19,5 días en las hembras primíparas, y entre 19 y 21 en las multíparas, dependiendo del estado fisiológico y la constitución genética de la hembra y del número de crías que esté gestando (Benavides y Guénet, 2003).

La mayoría de los nacimientos se producen en las horas de oscuridad según algunos autores, mientras que otros señalan que no hay relación entre el inicio del parto y el ciclo lumínico. El primer feto por lo general sale del cuerno derecho, y el resto es expulsado al azar (Zuñiga, 1999). Los ratones paren en general entre 4 y 8 crías, pero no es raro que en el laboratorio den a luz sólo un par de crías (Benavides y Guénet, 2003).

2.4. Hígado en la etapa fetal

2.4.1. Formación y funciones del hígado

El hígado es el principal órgano responsable de sintetizar proteínas del sistema complemento. Además, contiene un gran número de células fagocíticas las cuales ingieren bacterias de la sangre mientras ésta pasa por el citado órgano. En los primeros días de la gestación ya se considera el hígado como un órgano diferenciado. Primero se forma el divertículo hepático o esbozo hepático, consiste en cordones celulares de proliferación rápida que se introducen en el *septum transversum*, es decir, la placa mesodérmica entre la cavidad pericardíaca y el pedículo del saco vitelino (Sadler y Langman, 2007).

Luego los cordones hepáticos epiteliales siguen introduciéndose en el *septum*, la comunicación entre el divertículo hepático y el intestino anterior (duodeno) disminuye de calibre, formándose de tal manera el conducto colédoco. Este produce una pequeña evaginación ventral que dará origen a la vesícula biliar y al conducto cístico. Durante el desarrollo ulterior los cordones hepáticos epiteliales se entremezclan con la venas onfalomesentéricas y umbilicales para formar los sinusoides hepáticos. Los cordones hepáticos se diferencian en el parénquima y forman el revestimiento de los conductos biliares. Las células hematopoyética, células de Kupffer, y las células del tejido conectivo derivan del mesodermo del *septum transversum* (Sadler y Langman, 2007).

En el feto, la sangre oxigenada de la placenta llega a través de la vena umbilical y pasa en gran parte por el conducto venoso al interior del corazón “shunteando” al hígado; este diseño biológico, deja al hígado en un ambiente relativamente hipóxico, permitiendo que el sensor de oxígeno hepático influya en la producción de eritropoyesis. Luego el conducto venoso comienza a estrecharse, enviando cantidades crecientes de sangre oxigenada al hígado, de lo que se concluyó que la constricción del conducto venoso se

correlaciona cronológicamente con el cambio de sitio de la producción de eritropoyesis; de hepática a renal (Delabaere y Gallot, 2016).

2.4.2. Metabolismo

En los fetos varios procesos metabólicos son inmaduros, en parte por la persistencia de un patrón fetal en la actividad de varios procesos enzimáticos. El metabolismo del hígado fetal se dedica sobre todo a la producción de proteínas requeridas para el crecimiento. Cerca del momento del nacimiento, las principales funciones son producir y almacenar nutrientes esenciales, excretar bilis y establecer los procesos de eliminación. La adaptación extrauterina exige la síntesis de enzimas nuevas (Sadler y Langman, 2007). Dentro del hepatocito, las actividades metabólicas y sintéticas se hallan contenidas en el interior de numerosos orgánulos celulares. La oxidación y el metabolismo de diversos tipos de sustratos, la oxidación de los ácidos grasos, los procesos fundamentales de la gluconeogénesis y el almacenamiento y la liberación de la energía se producen en las mitocondrias (Roskams y Desmet, 2008).

En el hígado es donde se metabolizan la mayor parte de los xenobióticos, dando lugar a metabolitos, en ocasiones más tóxicos que la sustancia de partida. Debido a su misión como vía primaria de destoxificación, el hígado actúa protegiendo a otros órganos, aunque ello le provoque su propio daño (Matheus y Bolaños, 2014).

2.4.3. Hematopoyesis

El hígado es el principal órgano hemopoyético durante el periodo embrionario; eritroide primero, granulocítico y megacariocítico después. Una vez que el divertículo hepático emerge a partir del tubo intestinal en desarrollo, las células hemopoyéticas migran allí desde el saco vitelino y proliferan formando islotes sanguíneos, constituyendo el comienzo de la segunda etapa o fase hepática de la hemopoyesis que en la rata se extiende aproximadamente desde la mitad del periodo gestacional comenzando a decaer a partir del día 17 de gestación. La función de las células hemopoyéticas durante esa etapa será, no sólo expandirse y diferenciar en los distintos linajes hemopoyéticos, sino también contribuir a la maduración de los compartimientos epiteliales del hígado, emitiendo señales específicas en este sentido (Torres, 2014).

La eritropoyetina es una glucoproteína acídica, con un peso molecular estimado en 34,000 daltons (Escalante *et al.*, 1996), comienza en la vida fetal del ratón en los primeros días de la gestación, ocurre predominantemente en el hígado del feto y luego aumenta la producción en MO en forma progresiva, llegando a ser exclusiva en este órgano al término. La actividad eritropoyética es regulada principalmente por el mecanismo de ¨feedback¨ que involucra la tensión de O_2 tisular. Durante la vida fetal, el hígado es el sitio predominante para la formación de eritropoyetina. Luego del nacimiento se desvía al riñón (Torres, 2014).

En la actualidad se cree que el lugar serían las células del intersticio peritubular renal (CEFEN, 2000). En el ser humano, los eritrocitos son producidos por el saco vitelino en el primer trimestre; por el hígado en el segundo trimestre como también en el bazo y los ganglios linfáticos en menor cantidad; por la MO en el tercer trimestre y después del nacimiento. Similar sucede en ratones de la línea BALB/c/Cenp. pero con un tiempo diferente (Valdivieso, 2016).

En la última etapa de la vida fetal, el hígado es el órgano hemopoyético por excelencia, los eritroblastos hepáticos después del día 16 de la gestación sufren cuatro divisiones y las dos últimas ocupan alrededor de 12 horas. Las células postmitóticas se desarrollan por cinco horas hasta que se completa la enucleación y el eritroblasto policromatófilo permanece en el hígado cinco horas, antes de pasar a circulación contiene el ARN por 15 horas aproximadamente. Como la salida diaria de eritrocitos jóvenes del hígado es alrededor del 60 % del número que existe en circulación fetal, la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en la sangre será aproximadamente 60 % de la frecuencia pico en el hígado fetal (Torres, 2014). Cerca del nacimiento las células hepáticas alcanzan su madurez y adquieren un estado quiescente, mientras que la hemopoyesis es exportada a la MO y otros órganos linfoides, agotando los nichos hemopoyéticos hepáticos (Valdivieso, 2016).

2.5. Plantas medicinales

El hombre utiliza las plantas con propósitos medicinales desde tiempos prehistóricos y aún hoy tienen un papel clave en el mantenimiento de la salud de la mayor parte de la población mundial, pese a los avances de la medicina moderna. Se estima que en el

mundo se utilizan cerca de 10000 especies vegetales con fines medicinales, la mayor parte en sistemas de medicina tradicional (Martínez *et al.*, 2014).

Aunque los conocimientos ancestrales con fines terapéuticos de las plantas han sido de vital importancia a lo largo de la historia, no podemos limitarnos a la sabiduría popular ya que la validación científica de ciertas propiedades de las plantas medicinales es una necesidad (Quintana, 2012). Los extractos de las plantas superiores constituyen mezclas complejas que contienen un gran número de sustancias con propiedades mutagénicas y carcinogénicas, y su uso constante ha sido correlacionado con la ocurrencia de enfermedades en las poblaciones, de ahí el peligro potencial que encierra el consumo indiscriminado de fármacos de origen vegetal, debido a los escasos datos que se poseen sobre la acción mutagénica de las plantas medicinales consumidas por la población (Remigio *et al.*, 2001).

2.6. Especie *Capraria biflora* L.

La especie *C. biflora*, es usada como te de hierbas. Varios autores la consideran análoga al te de China y es la única de su género a la que se le confieren usos medicinales (Ideker, 1996; Canto, 2013). Esta planta se conoce en Cuba por varios nombres tales como escabiosa o esclaviosa, maguiro o maguira viuda (Roig, 1988). Es conocida por otros nombres en otros países del área tales como Puerto Rico, México, Venezuela y Estados Unidos de América. Y esos nombres incluyen claudisa, coat-weed, fregosa, escobo entre otros (Morais *et al.*, 1995).

2.6.1. Descripción botánica

Capraria biflora (Fig. 2) es un subarbusto o hierba perenne, erecta, con tallos de 0,40 a 2 m de altura. Posee un tallo ramificado desde la base y más arriba, ramas alternas, los tallos hirsutos (pelos largos, erectos y más o menos tiesos), ocasionalmente glabros (sin pelos) pero siempre con pelos escasos en las ramas jóvenes, de 3 a 5 mm de diámetro en la sección media (Durán, 2006).

Reino: *Plantae*
División: *Magnoliophta*
Orden: *Scrophulariales*
Familia: *Scrophulariaceae*

Género: *Capraria*
Especie: *C. biflora L.*

Esta planta presenta hojas alternas espatuladas (con forma de espátula) a lanceoladas (con forma de lanza), de 1,4 a 12 cm de largo por 0,3 a 3,2 cm de ancho, el margen serrado (dientes agudos dirigidos hacia el ápice) a lo largo de la parte media superior, con 3 nervios principales emergiendo cerca de la base, sumergidos en el haz, resaltados en el envés, la base cuneada (márgenes rectos o cóncavos que forman un ángulo de 45 a 90º), el ápice acuminado (márgenes rectos o convexos que terminan en un ángulo menor de 45º), glabras o moderadamente hirsutas, con glándulas inconspícuas y sésiles. Presenta una inflorescencia axilar, de 1 a 3 flores por axila; los pedícelos (soporte de la flor en la inflorescencia) de 5 a 17 mm de largo por 0,3 a 0,4 mm de ancho, glabros o glandular-pubescentes (D´Arcy, 1979).

Figura 2. Especie *Capraria biflora,* perteneciente a la familia *Scrophulariaceae* (Durán, 2006).

Posee flores blancas, perfectas (hermafroditas), ligeramente zigomórficas (con un eje de simetría) a casi regulares, de 10 a 13 mm de largo en antesis (al abrir), cáliz 5 veces lobulado, los lóbulos lanceolados, de 3 a 5,3 mm de largo por 0,7 a 0,8 mm de ancho, libres más o menos hasta la base, el ápice acuminado, glabros a pubescentes, ciliados; corola bilabiada, tubular-campanulada, el tubo de la corola blanco, el ápice con manchas púrpura en la sección ventral interna, con tricomas vilosos (pelos largos, suaves y

curvados) a lo largo de la parte ventral de la garganta, de 5 a 10 mm de largo; 5 pétalos, extendidos, ovados (forma de huevo) a oblongos, el ápice agudo, los extremos encorvados hacia atrás después de la antesis, los lóbulos de 4,5 a 6 mm de largo por 2 a 3,2 mm de ancho; estambres 4 a 5, didínamos (con dos pares desiguales), el par posterior exserto (que sale) aproximadamente de 0,5 a 0,8 mm pasando el tubo, opuestos a los lóbulos de la corola, los filamentos glabros, las anteras dorsifijas (antera unida en la espalda al filamento), de 0,8 a 1 mm de largo por 0,4 a 0,7 mm de ancho; ovario súpero (las estructuras florales se encuentran insertas por debajo del ovario), ovoide, de 1,8 a 3 mm de largo por 1 a 1,5 mm de ancho, glabro, el estilo incluido, de 2,5 a 4 mm de largo por 0,1 a 0,2 mm de ancho, glabro a esparcidamente piloso, el estigma elipsoide, entero (Durán, 2006).

Sus frutos son de forma capsular (fruto seco, simple que abre al madurar), elíptico y ovoide, verde, de 4,5 a 6 mm de largo por 3 a 4 mm de ancho, punteado-glandular, la dehiscencia loculicida (por medio de cavidades donde se alojan las semillas), la placenta en forma de clavija, el cáliz persistente, glabro; semillas numerosas, oblongas, pardas, de 0,5 a 0,8 mm de largo por 0,3 a 0,4 mm de ancho, finamente reticuladas (Durán, 2006).

2.6.2. Composición química

Algunos investigadores han aislado una sustancia denominada biflorina de las raíces de la planta, que se identificó como una naftoquinona, con actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas y otros gérmenes (Gongalves De Lima *et al.*, 1962). Otros investigadores reportaron la presencia de compuestos tipo taninos, en abundancia en los extractos acuosos de la planta, aunque no son informadas las características estructurales de los mismos (Morais *et al*., 1995).

En el extracto acuoso de las hojas de *C. biflora* se comprobó la presencia de compuestos reductores, saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos y aminoácidos. Mediante las técnicas cromatográficas y espectroscópicas empleadas fueron identificadas por primera vez la presencia de naringenina, manitol, derivados metoxilados de apigenina y luteolina, el ácido 7-O-β apigeninglucurónido y feoforbide. La cromatografía gaseosa de la fracción clorofórmica permitió la identificación, de los ácidos palmíticos, laúrico y hendecanoico (Vicet, 2009).

2.6.3. Usos tradicionales de Capraria biflora

Las hojas de *C. biflora* son usadas para aliviar algunos desordenes dérmicos, como escabiosis y escozor. También se refiere su uso en el tratamiento de dolor de oído, hemorroides, reumatismo y procesos inflamatorios (Scofield, 2002). En Yucatán se usa para sangrado de la nariz, reflujo blanco y granos de la piel (Duno, 2010). Recientemente en un estudio etnobotánico realizado en el municipio Santa Clara, Villa Clara sobre el uso tradicional de las plantas medicinales como antiinflamatorias y/o gastroprotectoras se pudo conocer el valor cultural que se le atribuye a la especie *C. biflora* como antiinflamatoria por la población de esta localidad (Machado, 2013).

2.6.4. Estudios farmacológicos previos

Las primeras investigaciones se desarrollaron por Gongalves de Lima en 1954 y 1958, al y evaluar la actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas y otros gérmenes de un principio activo denominada biflorina aislada a partir de las raíces de la planta (Gongalves De Lima *et al.*, 1962). Se desarrollaron otras investigaciones con esta molécula que permitieron verificar la actividad citotóxica y el potencial antioxidante de la biflorina tanto *in vitro* como *in vivo*. Se demostró además que esta molécula es capaz de incrementar la respuesta lograda por el 5-fluorouracilo (5-FU) inoculado en modelos de tumores, lo cual demostró que la biflorina actúa como un agente inmunoadyuvante (Vasconcellos *et al*., 2007).

En estudios realizados se comprobó, a través de técnicas experimentales el efecto analgésico (test de contorsiones y plato caliente) del extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de *C. biflora*. Adicionalmente se evaluó los efectos antiinflamatorio agudo (edema plantar por carragenina, peritonitis inducida por carragenina y evaluación de la migración leucocitaria en embriones de *Danio rerio*. Estos experimentos demostraron que el extracto posee una potente actividad antiinflamatoria a dosis de 200 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal y 400 mg/Kg vía oral, así como una moderada actividad analgésica a dosis de 200 mg/Kg de peso al comparar con los fármacos de referencia utilizados (Vicet, 2009).

Valido (2011), evaluó la actividad antiinflamatoria crónica y gastroprotectora del extracto acuoso de las hojas de esta planta, mediante varios modelos de experimentación. El efecto antiinflamatorio se comprobó mediante el modelo experimental de granulomas

inducidos por discos de algodón, concluyendo que posee actividad a todas las dosis estudiadas 200, 400 y 1600 mg/Kg. Para comprobar la actividad gastroprotectora se emplearon las técnicas de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto y por indometacina; con el primer modelo se obtuvo actividad grastroprotectora a todas las dosis estudiadas, con porcentajes de inhibición similares a la atropina, mientras que con el modelo de úlcera por indometacina, resultó que las dosis más activas fueron las de 400 y 800 mg/Kg, con porcentajes de inhibición comparables a la ranitidina.

2.6.5. Estudios toxicológicos previos

Se realizó un estudio de toxicidad límite a dosis única con objetivo de evaluar el posible grado de toxicidad del extracto acuoso de *C. biflora*. El ensayo se realizó según las regulaciones de la Organización para la Cooperación Económica y para el Desarrollo (OECD, 2014), a través del test de dosis límite a un nivel de dosis de 2000 mg/Kg por vía oral (CYTED., 2002). El ensayo preliminar concluyó que no se observó afectaciones en los animales tanto por el peso vivo y el análisis macroscópico de los órganos lo que muestra que no existía evidencias de ningún signo de toxicidad ni mortalidad en los grupos tratados (Vicet, 2009).

En 2013 se realizó un trabajo con el objetivo de evaluar la toxicidad por dosis repetida (28 días) del extracto acuoso de las hojas de esta planta en ratas de la línea Sprague Dawley administrando por vía oral en las dosis de 400, 800 y 1600 mg/Kg de peso vivo. El ensayo concluyó que el extracto acuoso de las hojas de *C. biflora* no evidenciaba efectos tóxicos en los animales (Canto, 2013). Recientemente Cathrina (2015) evaluó el potencial genotóxico *in vivo* del extracto acuoso de las hojas de *C. biflora* empleando una dosis de 800 mg/Kg en ratones de la línea BALB/c/Cenp., mediante los modelos de MO y sangre periférica. Los resultados obtenidos le permitieron demostrar el bajo potencial genotóxico del extracto en los modelos seleccionados.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX) adscrita a la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, y en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), en el periodo comprendido entre septiembre de 2016 y marzo de 2017.

3.1. Modelo biológico. Caracterización

Se utilizaron 37 ratones (25 hembras y 12 machos) consanguíneos de la línea BALB/c/Cenp., agnotobióticos del tipo heteroxénicos libres de patógenos específicos (specific pathogen free, SPF) de 6-8 semanas de edad y con un intervalo de peso inicial de 20 ± 2 g. Esta especie es ampliamente utilizada en técnicas de farmacología y toxicología experimental por la facilidad de su manipulación, su fácil manutención, la reproducibilidad de los resultados obtenidos en los estándares establecidos internacionalmente, así como la amplia base de datos fármaco- toxicológicos con que se cuenta de las líneas producidas en Cuba (Arencibia *et al.*, 2009a).

El modelo biológico fue suministrado por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con su correspondiente certificado de calidad genética e higiénico sanitaria (Anexo 1). Al ser recepcionados en el UTEX se procedió según el Diagrama de Flujo propuesto por la Unidad de Garantía y la Calidad (UGC) para las investigaciones experimentales.

Los animales fueron inspeccionados para comprobar el estado de salud general, se seleccionaron al azar, el 10% del total recibido, incluyendo los animales moribundos. A los seleccionados se le realizó una inspección clínica y exámenes de hemoquímica, hematología y patología. Se tomaron aleatoriamente muestras de heces fecales y orina para evaluación parasitológica. El proceso de cuarentena se extendió por 7 días. La alimentación consistió en Dieta completa concentrada fórmula: **ALY**co® EMO 1002 y EAO 1004, ciclo I, lote 0652017 (Anexo 2). Se le suministró agua apta para consumo humano. El acceso a ambos fue a libre demanda.

Al finalizar la semana de cuarentena los animales que presentaron un estado de salud general aceptable y certificados como saludables fueron asignados a los grupos del experimento de forma aleatoria, estos fueron alojados en cajas T- 2 a razón de 5 animales/caja, con cama de viruta. Al determinar el día cero de la preñez, fueron alojadas a razón de una hembra por caja.

Se empleo el método de ponche en la oreja para la identificación de los modelo biológicos y las cajas donde se alojaron se identificaron mediante tarjetas, donde se mostraba: número del protocolo, número de la caja, grupo de tratamiento, número del animal, sexo, especie, línea. Durante todo el estudio los parámetros ambientales fueron monitoreados mediante un medidor de temperatura y humedad relativa. La temperatura de la sala se mantuvo entre los 20 ± 2 º C, la humedad relativa entre 50-70 % y el fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

3.2. Procesamiento del material vegetal

3.2.1. Recolección

La recolección del material vegetal se realizó en áreas aledañas al río Arimao en el municipio de Manicaragua, provincia Villa Clara, entre los meses de noviembre de 2016 y febrero de 2017. Ejemplares de la planta fueron identificados con muestras patrón bajo el número ULV-08132, del Herbario “Dr. Alberto Alonso Triana” del jardín botánico de la UCLV.

3.2.2. Secado y molinado

El secado (Estufa Binder USA) y el molinado (Molino IKA WERKE, Alemania) de las hojas de *C. biflora* fueron realizados según la técnica utilizada por Vicet (2009). El material vegetal resultante se almacenó en bolsas de polietileno en una desecadora protegida de la luz y la humedad, hasta el momento de su utilización.

3.2.3. Obtención del extracto

Para la obtención del extracto acuoso, 50 g del material vegetal seco y molinado fueron sometidos a un proceso de extracción sólido-líquido (por reflujo) en medio acuoso (Vicet, 2009). Se preparó una solución que garantizó las dosis de ensayo, sobre la base de los sólidos totales.

Figura 3. Método por reflujo para la obtención del extracto acuoso de *Capraria biflora*.

3.3. Evaluación del potencial genotóxico

Los ensayos realizados en la investigación fueron regidos bajos las regulaciones descritas por las leyes de la OECD del 2014, específicamente la guía 474 (ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos)

El apareamiento se realizó por tríos (2 hembras y un macho) según el plantel reproductivo propuesto por Benavides yGuénet (2003). El día cero de la gestación se diagnosticó por la presencia del tapón vaginal para luego conformar los grupos experimentales (5 animales/grupo). Como control negativo se utilizó la sustancia vehículo del extracto que fue el agua destilada. Como control positivo se administró la CF (Lote: PCYDKB401) la cual es ampliamente empleada en estudios de genotoxicidad.

Grupo 1- Control negativo con agua destilada 10 mL/Kg
Grupo 2- Control positivo con ciclofosfamida (CF) 50 mg/Kg
Grupo 3- Extracto de *C. biflora* 400 mg/Kg
Grupo 4- Extracto de *C. biflora* 800 mg/Kg
Grupo 5- Extracto de *C. biflora* 1600 mg/Kg

Las administraciones fueron realizadas en la mañana para no interferir en el ciclo circadiano de los animales de experimentación. El extracto acuoso fue administrado por vía oral, en los días 14, 15 y 16 de la gestación mediante cánulas de administración intragástrica, mientras que la CF fue administrada por vía intraperitoneal el día 16 de la gestación. (Saínz, 2001).

Las cesáreas se realizaron 48 horas después de la última administración y fueron seleccionados 5 neonatos por madre gestada para el diseño de cinco grupos (del 6 al 10) de 25 neonatos cada uno. Además, se tomaron las muestras de sangre periférica y MO para el caso de las madres y de sangre periférica e hígado fetal para el caso de los fetos (Arencibia *et al.*, 2009b).

Grupo 6- Fetos provenientes de las madres del grupo 1
Grupo 7- Fetos provenientes de las madres del grupo 2
Grupo 8- Fetos provenientes de las madres del grupo 3
Grupo 9- Fetos provenientes de las madres del grupo 4
Grupo 10- Fetos provenientes de las madres del grupo 5

Se realizaron dos observaciones diarias, una en el horario de la mañana, comprendido entre las 8:30 y las 10:30 horas y en la tarde, entre las 15:00 y 16:00 horas. Este procedimiento se basó en la detección de lesiones, así como las posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, sistema cardiovascular, gastrointestinal, el estado de la piel, el pelo, la coloración de las mucosas y de los ojos según recomendaciones de las entidades regulatorias (Arencibia *et al.*, 2011c).

3.3.1. Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de madres

Un fémur de cada madre fue extraído y la cavidad medular se lavó gentilmente por flujo introduciendo una aguja con jeringuilla cargada con 5mL de suero bovino fetal (SBF). La médula así obtenida se centrifugó a 1000 (rpm) por espacio de 10 min y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos. Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 h a temperatura ambiente para su secado y posterior fijación en metanol absoluto durante 5 min, para luego establecer una tinción en giemsa al 5% durante 12-15 min.

Las láminas se codificaron y el análisis se realizó por dos observadores independientes “a ciegas”, utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión) (Tice *et al.*, 2000; OECD, 2014). Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromáticos (EPC) y normocromáticos (ENC) en 2000 células/animal para calcular el índice de citotoxicidad dado por la relación de EPC/ENC de la población total de eritrocitos. Se contabilizó la cantidad de EPC portadores de micronúcleos en base a 1000 eritrocitos por lámina (2000 x animal) (Arencibia *et al.*, 2011c).

3.3.2. Ensayo de micronúcleos en hígado fetal

Se realizó una ligera incisión en la cavidad abdominal del feto y este se extrajo en su totalidad. Luego se empleó un mortero estéril que contenía entre 4-5 ml de SBF y utilizando una malla metálica se procedió a la maceración, el contenido resultante fue centrifugado a 1000 (rpm) por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas porta objetos. Las láminas (mínimo: 2/ feto) se mantuvieron durante 24 horas a temperatura ambiente para su secado. Posteriormente se procedió a su fijación en metanol absoluto por 5 minutos y se realizó una tinción en giemsa al 5% durante 12-15 minutos (Arencibia *et al.*, 2011c). Para la codificación y el análisis de los EN, EP, índice de genotoxicidad y citotoxicidad se procedió similar a la tecnica de médula ósea.

3.3.3. Ensayo de micronúcleos en sangre periférica de roedores

Previamente fueron preparadas las láminas con una solución de naranja de acridina a una concentración de 1 mg/mL. Se tomaron 10 µl de la solución y se extendieron con una varilla de cristal sobre la lámina previamente calentada a 70°C. Estas fueron secadas a temperatura ambiente y almacenadas en un lugar seco para su posterior empleo (Hayashi *et al.*, 1993).

En las madres al finalizar la cesárea y en los fetos, posterior a esta, se obtuvo la sangre periférica por el procedimiento del tijereteado de la cola. Fueron tomaros 5 µl y colocados sobre la lámina previamente preparada con naranja de acridina. Igualmente fueron montadas dos láminas por animal, las cuales fueron codificadas. El análisis se realizó por dos observadores independientes. Fue registrada la frecuencia de los reticulocitos con micronúcleos (MNRETs) sobre la base de 1000 reticulocitos por láminas (2 000 x animal). La lectura se realizó en un microscopio de fluorescencia con la combinación de un filtro

azul excitador de 480 nm y un filtro barrera amarillo-naranja 515 nm y evaluada con un aumento total de 400x (Arias, 2015).

En los análisis estadísticos se utilizó el paquete de programas estadísticos SPSS para Windows versión 22 del 2013. Primero se realizó un análisis descriptivo de los datos para conocer su naturaleza y sus principales tendencias. Para ello se calcularon las principales medidas de tendencia central y de dispersión de los grupos de dosis. Luego se realizó un análisis de la normalidad de los datos utilizando el test de ShapiroWilk, el cual arrojó como resultado que los datos no se distribuían normalmente, por lo que se procedió a la utilización de pruebas no paramétricas en el análisis de los datos. Luego se compararon las frecuencias de eritocitos y reticulocitos micronucleados, los índices de genotoxicidad y citotoxicidad entre los grupos de dosis. Para ello se utilizaron el test no paramétrico de Kruskal Wallis para el análisis de varianzas de los diferentes grupos y luego el test de Mann Whitney para localizar las diferencias entre las parejas de grupos.

3.4. Aspectos éticos de la investigación

Los datos obtenidos en el experimento fueron recogidos en las planillas diseñadas con este fin y archivados junto al protocolo y proyecto de investigación en la Unidad de Garantía de la Calidad (UGC) de la UTEX. Los estudios fueron conducidos teniendo en cuenta las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).Todas las actividades se ejecutaron según lo establecido por los Procedimientos Normativos Operacionales (PNO) y sujetos a las inspecciones programadas por la UGC del UTEX para controlar la correcta ejecución de los experimentos (Anexo 3). Los animales fueron eutanasiados mediante la técnica de dislocación cervical con previa atmósfera de éter según establece la Unión Europea, el Consejo Canadiense del Cuidado de Animales (UE, 2007; CCAC, 2010).

Se cumplieron las normas de bioética y bioseguridad relacionadas con la experimentación animal (Dueñas, 2000). El personal involucrado en el estudio contó con la calificación y experiencia necesarias en el manejo y cuidado del animal de laboratorio. Se cumplieron los requisitos reflejados en el Manual de Bioseguridad de la UTEX, dando lugar a la correcta manipulación de las muestras y desechos biológicos, el eficiente uso de los implementos de seguridad para el investigador, así como la ejecución de las pruebas en lugares idóneos, que garanticen no solo la calidad de la investigación, sino también la protección del personal y del medio ambiente.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Modelo biológico

Según un estudio realizado en el Instituto Finlay de la Habana, Cuba, la línea de ratones BALB/c/Cenp. difiere significativamente de las demás líneas evaluadas en estudios de genotoxicidad en cuanto a su sensibilidad. En esta se observaron los resultados más bajos del índice de citotoxicidad y genotoxicidad, a la par de responder de forma aceptable a la CF. Igualmente (Arencibia *et al.*, 2011a) reporta los índices endógenos más bajos de daño al ADN empleando las técnicas de micronúcleos y aberraciones cromosómicas. Estos estudios demostraron la estabilidad de esta línea con respecto a otras evaluadas siendo esta la más propicia para emplear como biomedelo en el ensayo de micronúcleos, cuando es utilizada la CF como control positivo (Arencibia *et al.*, 2012b).

Por otra parte las guías OECD exigen la utilización de roedores para los ensayos de genotoxicidad, y refieren la ciclofosfamida dentro de los controles que deben ser empleados. Todo lo anterior sustenta la elección de esta línea de ratones y el control seleccionado para el desarrollo de la investigación. El mismo biomodelo ha sido empleado por (Arencibia *et al.*, 2011a; Arias, 2015; Cathrina, 2015).

4.2. Procesamiento del material vegetal

4.2.1. Recolección

Para la recolección de material vegetal con fines farmacéuticos debe asegurarse la identidad de la droga; que debe ser recolectada e identificada por un personal experto y capacitado. En el presente trabajo, se realizó, la identificación taxonómica del material vegetal por un especialista en la temática, como criterio seguro de su identidad botánica, observándose una total correspondencia con las características del material recogido en herbario y con la descripción botánica establecida en la literatura (D´Arcy, 1979; Martínez *et al.*, 2014), (Fig. 4).

A B

Figura 4. Características macromorfológicas de *Capraria biflora* (A: Material vegetal recolectado); (B: *C. biflora* tomado de: (D´Arcy, 1979)).

La recolección de drogas provenientes de plantas cultivadas asegura una fuente natural valiosa para la obtención de productos de calidad, lo que no siempre se logra en el caso de las drogas obtenidas de plantas silvestres. En la droga que nos ocupa la recolección del material se realizó de forma manual, pues es la técnica que se aconseja para plantas silvestres. Se realizó en horas tempranas de la mañana, tomando las partes aéreas y procurando dejar ramas suficientes para garantizar el normal desarrollo de la planta y así un uso sostenible de este recurso natural. El lavado cuidadoso con agua potable garantizó la limpieza del material vegetal (Vicet, 2009).

4.2.2. Secado y molinado

El secado mediante calor artificial permitió eliminar suficiente cantidad de humedad como para favorecer la conservación de la calidad de la droga y prevenir el deterioro de la misma, ya sea por enmohecimiento, acción de enzimas y/o bacterias y posibles alteraciones químicas por este concepto. Esta operación resulta ventajosa pues adicionalmente a que se fijan los constituyentes, se facilitan los procesos de trituración necesarios para obtener una forma más conveniente para su comercialización y almacenamiento (Cathrina, 2015).

4.2.3 Obtención del extracto

Se obtuvo un extracto acuoso (Fig. 5) por el método de reflujo, con similares características organolépticas (color pardo rojizo intenso, transparente, sin partículas en suspensión y olor característico aromático y un pH ligeramente básico) a las reportadas por (Vicet, 2009; Valido, 2011; Canto, 2013; Cathrina, 2015) en sus respectivas investigaciones.

Figura 5. Extracto acuoso obtenido de las hojas de *C. biflora* por el método de reflujo.

4.3 Evaluación del potencial genotóxico

En el estudio no se reportaron muertes ni alteraciones en los signos clínicos. No se evidenciaron síntomas de afecciones del sistema respiratorio, del sistema nervioso, del sistema cardiovascular ni del gastrointestinal. No se detectaron lesiones en la piel, cambios de coloración en las mucosas y ojos, ni piloerección. Resultados similares fueron obtenidos en las investigaciones de (Vicet, 2009; Valido, 2011; Canto (2013)) donde no se reportó ningún caso de aparición de signos de toxicidad en la evaluación clínica de los animales tratados con extracto acuoso de *C. biflora* a dosis de 2000 mg/Kg (dosis fija) y 400, 800 y 1600 mg/Kg (dosis repetida).

4.3.1 Ensayo de micronúcleos transplacentarios en médula ósea materna e hígado fetal

El ensayo de micronúcleos en MO de roedores está incluido actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras, tales como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo y la agencia estadounidense

para la Protección del Medio Ambiente. Es fácilmente reproducible y brinda información clara sobre la proliferación celular en MO (Arencibia *et al.*, 2011c).

En la MO existe una misma célula madre para todas las células sanguíneas, ya que esta es pluripotencial y da origen a células madres comprometidas con la línea celular linfoide, denominada (unidad formadora de colonias linfoides) y otras comprometidas con las líneas celulares mieloides (unidad formadora de colonias mieloides). Esta última es la que tiene como descendientes a células madres para cada tipo de células sanguíneas, en el caso de la línea eritrocitaria esta célula madre recibe el nombre de hemocitoblasto (Cueto *et al.*, 2015; Valdivieso, 2016). Los eritrocitos maduros, llamados eritrocitos normocromáticos (ENC) experimentan un color rosa-naranja ante esta tensión debido a la desaparición gradual de dicho ARN (Norppa y Falck, 2003).

Una de las primeras variables que se emplea para la determinación del potencial genotóxico es el número de eritocitos policromáticos micronucleados en 2000 células, como indicador de daño genotóxico. La Tabla I muestra los resultados de la frecuencia de aparición de micronúcleos en 2000 células por animal, en MO de madres que fueron administradas con el extracto acuoso de *C. biflora*, así como los dos grupos controles.

Como se puede apreciar el grupo control negativo mostró la menor frecuencia de MN, resultado esperado ya que el agua destilada no presenta una actividad genotóxica, (aunque esta reportado que posee una taza de MN expontáneos según la especie), seguido de las dosis en estudio, cuya frecuencia de MN aumentó según se incrementaron las dosis. Como era de esperar el control positivo mostró la mayor frecuencia de la tabla, ya que la CF es un genotóxico conocido.

Tabla I: Frecuencia de eritrocitos micronucleados e índice de genotoxicidad (%) en médula ósea de madres administradas con extracto acuoso de *C. biflora.*

Grupo	N	M.N/2000	±DE	Índice de genotoxicidad
Control negativo	5	3,8*	0,60	0,19
Control positivo	5	49,4***	0,55	2,47
Dosis 400mg/Kg	5	5,8*	0,45	0,29
Dosis 800mg/Kg	5	10,8**	0,46	0,54
Dosis 1600mg/Kg	5	15,8**	0,50	0,79

*Diferentes cantidades de asteriscos muestran diferencias significativas p<0,05. Test Kruskal-Wallis entre los grupos de experimentación y test Mann-Whitney entre parejas de grupos.

Es interesante destacar que para la dosis de 400 mg/Kg la frecuencia de aparición de MN representa el 36.8% de la mayor dosis empleada, mientras que esta última representa el 31.8% del control positivo. De lo que se puede deducir que la frecuencia de aparición de MN aunque pudiera haber aumentado de forma significativa al aumentar las concentraciones del extracto, la mayor dosis representa menos del 50% del control positivo empleado.

Al analizar la significación en el test de varianza de Kruskal-Wallis (Anexo 5), este demostró que existían diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0,01$ altamente significativa). Al analizar el test de Mann – Whitney (Anexo 6) encontramos que todos los grupos se diferencian significativamente del control negativo (asteriscos marcan diferencias significativas al 5%), excepto la dosis de 400 mg/Kg para un ($p \leq 0.05$), sin embargo esta dosis mostró diferencias con las de 800 mg/Kg y 1600 mg/Kg mientras que entre estas últimas existieron diferencias entre ellas para un ($p \leq 0.05$). Además se pudo apreciar que los grupos se diferenciaron estadísticamente del control positivo empleado.

Otra variable muy relacionada con la frecuencia de aparición de MN es el índice de genotoxicidad el cual no es más que la frecuencia de MN observados en 2000 células, expresado en porcentaje, de lo que se puede deducir que cuando una sustancia muestra menores valores en la frecuencia de MN observados menor será este índice. En este sentido la Tabla I, muestra los valores del índice de genotoxicidad para cada uno de los grupos de las madres. Como se puede apreciar el menor índice corresponde al control

negativo seguido de las dosis en estudio. En correspondencia con la frecuencia de MN el mayor índice fue alcanzado por el control positivo con un valor de 2,47. Estos resultados se encuentran insertados en (Fig.10) del (Anexo 10) del documento.

Como se puede apreciar los índices de genotoxicidad de las dosis en estudio (0,29%, 0,54% y 0,79%) ordenados en orden creciente de dosis y el control negativo (0,19%), se mantuvieron por debajo de un 1%. Aunque este valor no es referativo para la valoración de la genotoxicidad, investigaciones reportadas donde han sido evaluadas sustancias con igual índice (1%) o menor, como en el caso de las dosis en estudio, han sido relacionadas con un bajo potencial genotóxico (Arrebola, 2014; Arias, 2015).

Resultados similares fueron obtenidos por (Lagarto *et al.*, 2014) el cual realizó pruebas de genotoxicidad empleando los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Momordica charantia* L., usando ratones NMRI/Cenp. Estos no mostraron un aumento significativo en la frecuencia de eritrocitos micronucleados, y se obtuvo un índice de genotoxicidad de 0,3 % para una dosis de 100 mg/Kg de peso. Por otra parte Arias (2015) logró valores semejantes a los que se presentan en nuestro estudio, usando una fracción butanólica de *Agave brittoniana* T. subsp. *Brachypus* en ratones de la línea BALB/c/Cenp., aunque los porcientos de genotoxicidad mostrados por esta planta fueron más elevados (0,4 para la dosis de 1 mg/Kg y 0,7 para la dosis de de 5 mg/Kg) que los exhibidos por el extracto acuoso de *C. Biflora*.

El hígado fetal en la etapa de gestación representa un blanco atractivo para la exploración del comportamiento genotóxico pues convergen en un solo órgano dos funciones de vital importancia, el metabolismo (el cual en los días 15 y 16 de la gestación es superior al de la médula) y la hematopoyesis.

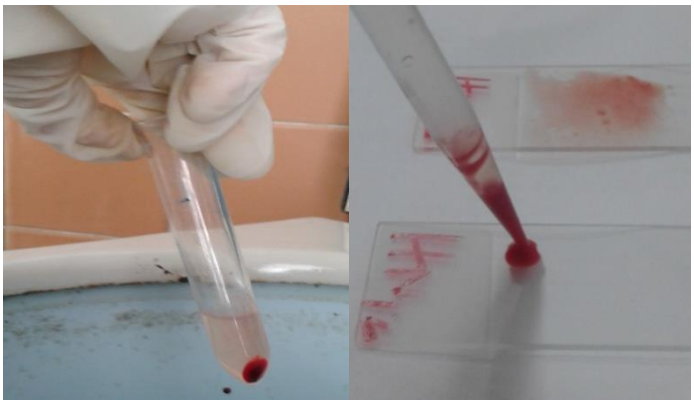


Figura 6. Botón celular obtenido tras centrifugación de una muestra de hígado fetal del control positivo.

Es válido destacar que aunque la tinción es la misma que en la MO, el botón celular formado después del proceso de centrifugación fue más denso por lo que se pudo realizar un proceso de extensión de mayor calidad para la posterior lectura de los eritrocitos. (Fig. 6).

A continuación se muestra en la tabla II la frecuencia de eritrocitos micronucleados así como el índice de genotoxicidad obtenidos mediante la administración de *C. biflora.* El análisis de varianza de Kruskal-Wallis (Anexo 5) demostró que existían diferencias significativas entre los grupos experimentales (p≤0,01 altamente significativa).

Tabla II: Frecuencia de eritrocitos micronucleados e índice de genotoxicidad (%) en hígado de fetos cuyas madres fueron administradas con extracto de acuoso de *Capraria biflora.*

Grupo	N	M.N/2000	±DE	Índice de genotoxicidad
Control negativo	25	6,52*	0,51	0,33
Control positivo	25	59,52****	0,51	2,97
Dosis 400 mg/Kg	25	10,24*	1,01	0,51
Dosis 800 mg/Kg	25	15,64**	0,49	0,78
Dosis 1600 mg/Kg	25	19,44***	0,82	0,92

*Diferentes cantidades de asteriscos muestran diferencias significativas p<0,05. Test Kruskal-Wallis entre los grupos de experimentación y test Mann-Whitney entre parejas de grupos.

Al analizar el test de Mann – Whitney (Anexo 7), encontramos que todos los grupos se diferencian significativamente del control negativo excepto la dosis de 400 mg/Kg para un p≤ 0.05, sin embargo esta dosis mostró diferencias con las de 800 mg/Kg y 1600 mg/Kg y a su vez la dosis de 800 mg/Kg presentó diferencias estadísticas con la dosis 1600 mg/Kg de peso vivo para un p≤ 0.05. También se pudo apreciar que los grupos se diferenciaron

estadísticamente del control positivo empleado en la investigación. Estos resultados se encuentran insertados en (Fig.13), (Anexo 10) del documento.

Es válido destacar que, aunque el índice de genotoxicidad aumenta al incrementarse las dosis estas tienden a los valores del control negativo empleado. En este mismo sentido se debe señalar que aunque se mantiene un comportamiento similar en los dos sistemas ensayados (MO e hígado fetal) los valores en el hígado son superiores a los mostrados en la médula, incluso las dosis de 800 mg/Kg y 1600 mg/Kg se difrencian significativamente, esto demuestra la mayor suceptibilidad de los tejidos fetales, para corroborar el comportamiento de los ensayos tradicionales.

Es interesante que algunos mutágenos y carcinógenos no reaccionan directamente, sino que necesitan ser metabolizados a intermediarios electrofílicos. El principal sitio de metabolismo es la fracción microsomal de los hepatocitos, por presentar sistemas enzimáticos de activación o detoxificación. Sin embargo, sustancias químicas tales como las Nitrosaminas y el Benceno que generan metabolitos de vida corta, no son muy activos en el ensayo de MN en MO, aun cuando muestran propiedades mutagénicas marcadas *in vitro* una vez que han sufrido activación metabólica (Saínz, 2001).

Los resultados negativos observados en el ensayo de MN con metabolitos de vida corta se deben probablemente a la inactivación inmediata del metabolismo reactivo en el sitio de producción (hepatocito) y así se imposibilita que el mismo, por la vía de circulación sanguínea alcance la MO donde pudiera inducir MN en los EPC examinados. Además, el tejido diana del ensayo de MN, es la MO, ya que exhibe baja actividad metabólica, de esta forma promutágenos y procancerígenos pueden dar falsos negativos, cuando son evaluadas por la MO del animal adulto. Debido a estas limitaciones fue preciso implementar ensayos con sistemas metabólicos más eficaces y que la población examinada fuera más sensible (Saínz, 2001).

Resultados similares con respecto al índice de genotoxiciad en hígado fetal fueron obtenidos por (Arencibia *et al.*, 2011a) con ratones de la línea BALB/c/Cenp. empleando el agua destilada como control negativo. Por otro lado Arencibia *et al.* (2003b) demostró la baja frecuencia espontánea de eritrocitos en hígado fetal (índices de genotoxicidad y

citotoxicidad) usando como biomodelo ratones NMRI/Cenp., destacando la sensibilidad de los tejidos fetales a la acción de la CF.

Estudios realizados con la CF demuestran una íntima relación con el daño cromosómico causado en el hígado fetal (Domínguez y Friman, 2000). La CF es un citostático potente que pertenece al grupo de los alquilantes de base. Su uso como control positivo ha sido ampliamente evaluado en los ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad (Abdella, 2012).

Los agentes aneuploidogénicos (como colchicina, vincristina y vinblastina), se caracterizan por bloquear la polimerización de microtúbulos durante la formación del huso mitótico; originando de esta manera el rezago de cromosomas completos, que no se incluyen en los núcleos hijos. Mientras que los agentes clastogénicos, como son las radiaciones y algunos medicamentos antineoplásicos (como la CF, la arabinosa-c, el busulfan y el metotrexate), actúan como análogos de base. Por lo tanto se intercalan en el ADN, e inhiben su síntesis y ocasionan posteriormente un debilitamiento de enlace entre las bases, lo que termina por producir una fractura cromosómica (Díaz *et al.*, 2012).

La CF es el control positivo de elección pues posee grupos químicos que tienen la propiedad de unirse en forma covalente con elementos nucleofílicos de las células, reemplazando un átomo de hidrógeno por un grupo alquilo en la molécula del ADN. Generalmente en el nitrógeno 7 de la guanina. Se considera bifuncional debido a que posee dos radicales activos que reaccionan con grupos intracadena formando puentes con el filamento molecular helicoidal que determina la muerte celular. La actividad de la CF es máxima durante la replicación celular, cuando parte del ADN no está apareado y es más susceptible a la alquilación. Es por ello que es más dañina al ADN durante la fase de división celular, pues es cuando los cromosomas de la célula están más expuestos a la acción de agentes externos, por lo cual se analizan las células en metafase. Se trata de que las células analizadas confluyan todas en una fase puntual de la división celular, en el caso de la mayoría de los estudios realizados es en metafase (Arencibia y Arrebola, 2014; Arrebola, 2014).

Remigio *et al.* (2001) realizó un estudio de genotoxicidad con extractos de 6 plantas donde utilizó 40 mg/Kg de CF como control positivo en ratones de la línea NMRI/Cenp. y

obtuvo un índice de genotoxicidad de 1,88 %. Por otra parte Segovia *et al.* (2016) utilizó el extracto acuoso de las hojas de *Luehea divaricata,* en este estudio se utilizaron 50 mg/Kg de CF como control positivo en ratones Swiss albinos y presentó un índice de genotoxicidad de 3,03 %, similar al obtenido en nuestra investigación (2,97 %).

La principal importancia que tiene el test de micronúcleos transplacentarios es que representa un ensayo de confirmación para aquellos casos en que los ensayos tradicionales de MO y sangre periférica den negativos o exista alguna duda sobre su comportamiento. En estudios anteriores fue evaluado el potencial genotóxico en MO y sangre periférica a la dosis de 800 mg/Kg en ratones de la línea BALB/c/Cenp. Fueron obtenidos valores de índice de genotoxicidad de 2,98 para hembras, similares a los resultados obtenidos en la presente investigación , por lo que podemos inferir que el extracto acuoso empleado mantiene un comportamiento similar en el hígado de los fetos, lo que se puede traducir en la ausencia de una actividad genotóxica a nivel de cromosomas (Cathrina, 2015).

4.3.2 Índice de citotoxicidad

Cuando existe la presencia de un agente xenobiótico, éste induce un efecto citotóxico sobre las células nucleadas precursoras de la MO, causando muerte celular o reducción de la división celular, produciendo un descenso en la formación de EPC modificando la relación entre EPC/ ENC conocido como índice de citotoxicidad medular (Smith, 1996; Cathrina, 2015). Por tanto, un menor valor en el índice de citotoxicidad indica un mayor efecto citotóxico, debido a que el índice de citotoxicidad es inverso al índice de genotoxicidad.

En este sentido fueron calculados los índices de citotoxicidad para los grupos experimentales. En la (Fig. 7) se muestran los resultados luego de aplicar la relación EPC/ENC. El análisis de varianza de Kruskal-Wallis (Anexo 5) demostró que existían diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0,01$ altamente significativa). Los resultados mostrados por el test de Mann-Whitney (Anexo 6) evidenciaron diferencias significativas entre parejas de grupos para ($p \leq 0,05$). La información estadística con la media y desviación estandart se encuentra en la Tabla V del (Anexo 8) de este documento.

Como se puede observar el mayor índice de citotoxicidad corresponde al control negativo con un valor de 1,27 lo cual evidencia la ausencia de efecto citotóxico que presenta el agua destilada, no así para el caso del control positivo que muestra una disminución de dicho índice con un valor de 0,85. Es interesante destacar que las dosis de 400 y 800 mg/Kg no muestran diferencias con el control negativo empleado, aunque si lo hacen con la dosis de 1600 mg/Kg para un ($p \leq 0,05$). El índice EPC/ENC, indicador de la proliferación celular en la MO, fue estadísticamente diferente ($p \leq 0,05$) en los grupos tratados con el extracto y el control positivo, lo que indica ausencia de efecto citotóxico del tratamiento a todas las dosis del estudio, por lo que se puede afirmar que el extracto no interfiere negativamente en la división celular. Resultados similares fueron reportados por Gutiérrez et al. (2005) donde se utilizó la línea BALB/c/Cenp. como biomodelo en el ensayo.

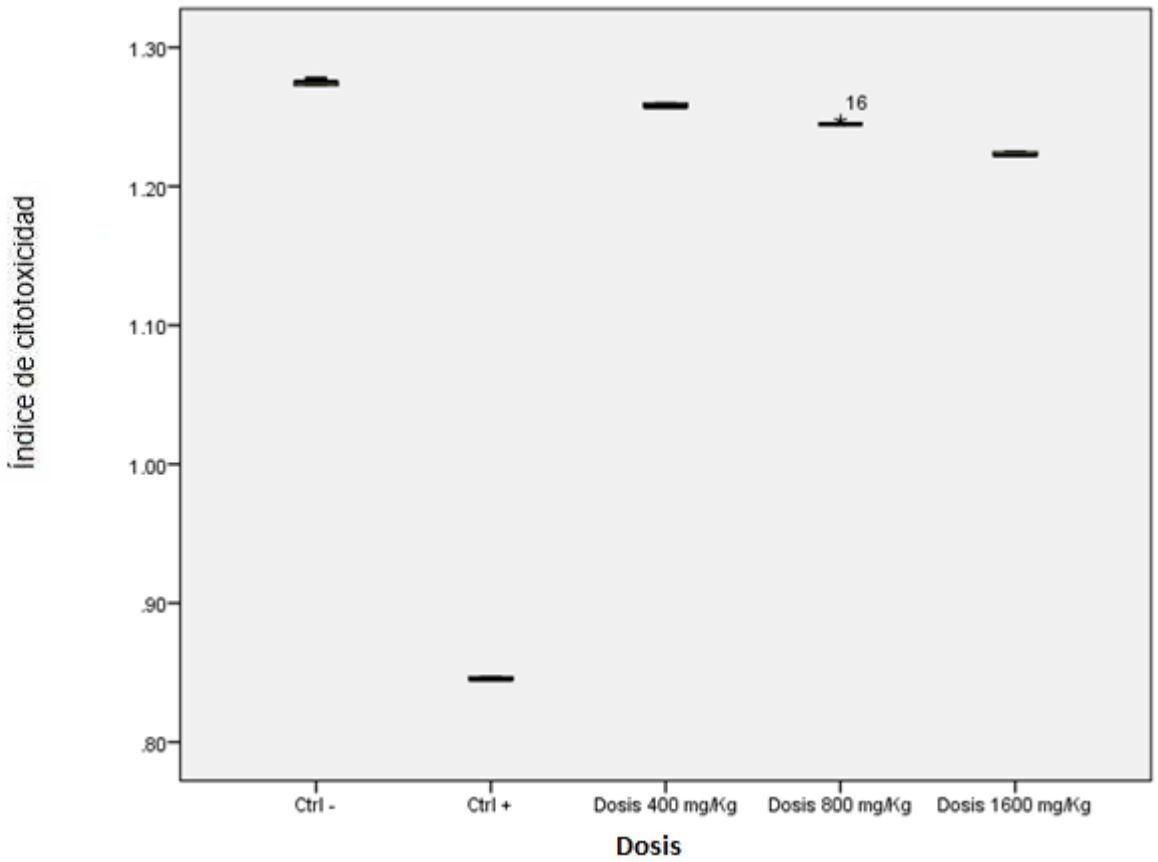


Figura 7. Índice de citotoxicidad en Médula Ósea de las madres.

En la investigación realizada por Arencibia *et al.* (2003b) se emplearon ratones MINR/Cenp., a los que les fueron administrados dos sustancias vehículos para luego determinar el índice de citotoxicidad. Estas sustancias mostraron indices de (1,22 y 1,26) similares a los de la nuestra investigación (1,27) lo cual valida los resultados mostrados por nuestro control negativo. Cathrina (2015) evaluó el efecto citotóxico al administrar 800 mg/Kg de extracto acuoso de *C. biflora* en ratones de la línea BALB/c/Cenp. La investigadora obtuvo un índice de 1,40 para las hembras, muy similar a los resultados obtenidos en nuestra investigación, lo que corrobora el comportamiento del extracto.

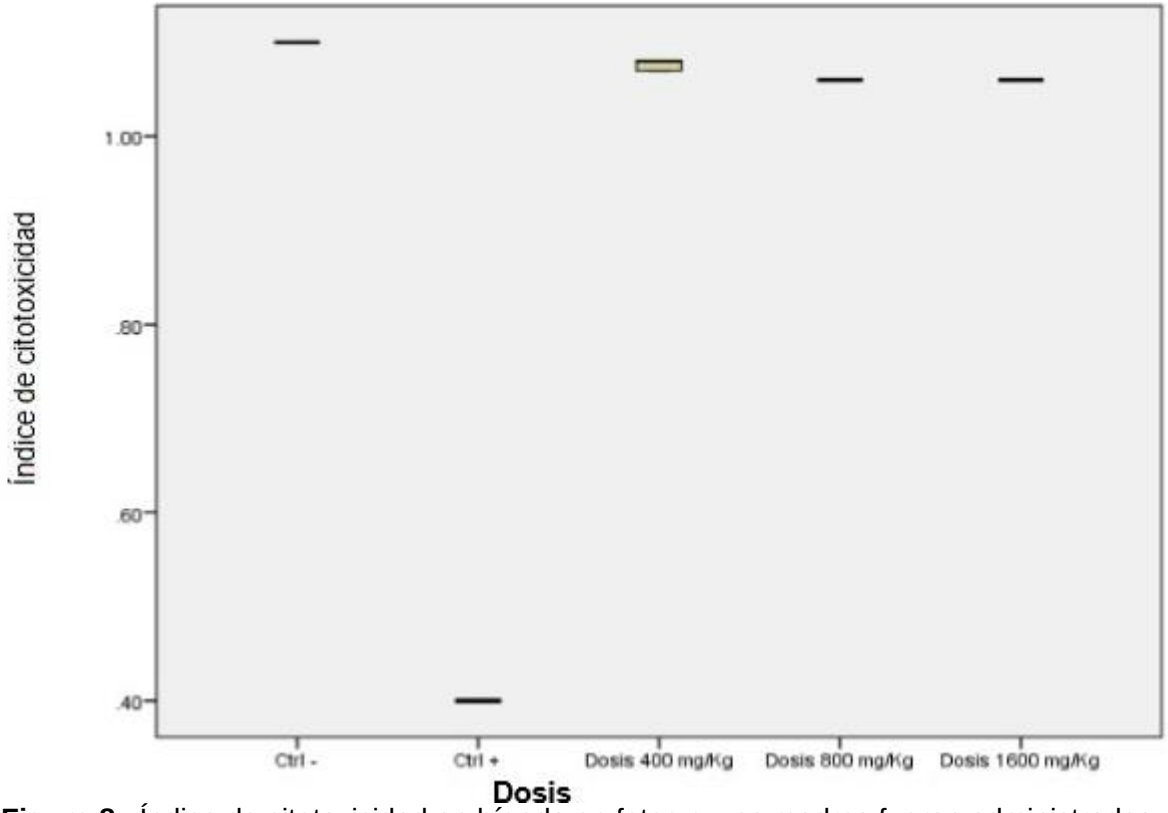


Figura 8. Índice de citotoxicidad en hígado en fetos cuyas madres fueron administradas con extracto acuoso de *Capraria biflora*.

Al analizar los resultados que presentan en la (Fig. 8) los grupos de los fetos, el mayor índice de citotoxicidad (menor efecto citotóxico) corresponde a los fetos cuyas madres fueron administradas con agua destilada mostrando un valor de 1,09. Para el caso de los fetos cuyas madres fueron administradas con CF se evidenció el mayor efecto citotóxico (menor índice de citotoxicidad) con un valor de 0,40.

El análisis de varianza de Kruskal-Wallis (Anexo 5) demostró que existían diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0,01$ altamente significativa). El test de Mann-Whitney (Anexo 6) mostró que existen diferencias significativas entre parejas de grupos ($p \leq 0,05$). Los resultados de genotoxicidad y citotoxicidad obtenidos en células hepáticas de fetos fueron mayores a los obtenidos en las madres. Estos resultados refuerzan la teoría de que los tejidos fetales son más suceptibles a la acción de los mutágenos en los días 16 y 17 de la gestación. Esto se debe a que en el hígado existen mecanismos de detoxificación, los cuales en la mayoría de los casos permiten una alta capacidad metabolizadora de los xenobióticos, estos procesos son prácticamente inmaduros en los fetos de ratones permitiendo de esta forma comprobar con mayor grado de exactitud el daño genotóxico al nivel evaluado (Arencibia *et al.*, 2012a).

En principio, el conjunto de enzimas de los eucariontes hidroliza, oxida y reduce compuestos extraños, reacciones que se llevan a cabo en el sistema de citocromos P-450 que se encuentran en el citoesqueleto y en el retículo endoplásmico de las células con núcleo. Los productos intermedios así generados en ocasiones se conjugan con proteínas, formándose compuestos altamente reactivos. En las células existen numerosas enzimas que activan a los promutágenos, pero también otras enzimas que desintoxican e inactivan a los productos intermedios: el equilibrio entre estas dos funciones celulares es el que en última instancia determina el potencial genotóxico del promutágeno (Tirunilai, 2012; Stuart, 2013).

4.3.3 Ensayo de micronúcleos transplacentarios en sangre periférica de madres y neonatos

En el mundo de la toxicología genética es conocido que una sola prueba no puede detectar con exactitud o predecir confiablemente los efectos genotóxicos de una sustancia en el ser humano; debido a esta razón es importante contar con alternativas para su evaluación. La prueba de MN en RETs de sangre periférica, constituye una solución viable para comprobar los resultados obtenidos en MO e hígado fetal con vistas a corroborar los resultados mostrados en los anteriores sistemas de ensayos (Zúñiga-González, 2014).

En primer lugar se diferencia en proeritoblasto, que es la primera célula de la línea eritropoyética reconocible. Los proeritoblastos se dividen y diferencian y dan lugar al

eritoblasto I, que es un eritoblasto basófilo y donde comienza la síntesis de hemoglobina. El eritrocito I se vuelve a dividir y diferenciar y se transforma en eritroblasto II que aún es basófilo y donde continúa la síntesis de hemoglobina y aún presenta un núcleo definido. Por lo tanto el eritoblasto II se divide y diferencia y da lugar al policromatófilo. El policromatófilo ya contiene una gran cantidad de hemoglobina, núcleo reducido y no se divide, solo se diferencia dando lugar al acidófilo o normoblasto (eritoblasto ortocromático). Por lo tanto tiene mucha hemoglobina con núcleo reducido y poco definido, después se vuelve a diferenciar y se transforma en un reticulocito que es considerado un glóbulo rojo inmaduro porque ya no tiene núcleo, solo unos filamentos de cromatina y su hemoglobina es la de un glóbulo rojo. El reticulocito sale a la sangre y se transforma en un glóbulo rojo maduro que circula por sangre (Valdivieso, 2016).

Los reticulocitos en sangre periférica se pudieron observar con una fluorescencia roja debido a la presencia de ARN ribosomal en los mismos, mientras que las células nucleadas normales mostraron una fluorescencia parda oscura. Además, los MN se vieron con una coloración fluorescente verde-amarilla (Fig. 9).

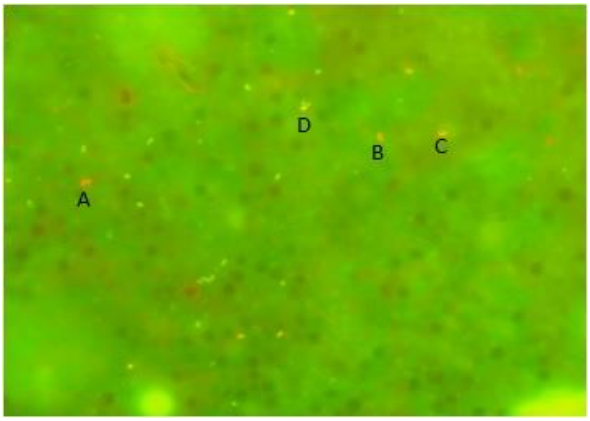


Figura 9. Micronúcleos en médula ósea de madres y neonatos teñido con naranja de acridina; (A), (B), (C) y (D) Micronúcleos.

En la tabla III y IV se puede observar el comportamiento con respecto a la frecuencia de RETs con MN en la sangre periférica materna y fetal de los cinco grupos experimentales. El análisis de varianza de Kruskal-Wallis (Anexo 5) demostró que existían diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0,01$ altamente significativa) para los dos ensayos.

Al analizar el test de Mann – Whitney (Anexo 6), encontramos igualmente que, todos los grupos se diferencian significativamente del control negativo, para un ($p \leq 0.05$), excepto la dosis de 400 mg/Kg para un ($p \leq 0.05$). Sin embargo las dosis de 800 mg/Kg y 1600 mg/Kg no se diferencian en sangre periférica materna mientras que si lo hacen en sangre periférica fetal para un ($p \leq 0.05$). También se pudo apreciar que los grupos del estudio se diferenciaron estadísticamente del control positivo empleado. Estos resultados corroboran el comportamiento mostrado en la MO e hígado fetal.

Tabla III: Frecuencia de MN en sangre periférica de madres administradas con extracto acuoso de *Capraria biflora.*

Grupo	N	M.N/2000	±DE	Índice de genotoxicidad
Control negativo	5	5,75*	0,56	0,29
Control positivo	5	50,80***	1,10	2,54
Dosis 400 mg/Kg	5	8,80*	1,10	0,44
Dosis 800 mg/Kg	5	11,60**	0,90	0,58
Dosis 1600 mg/Kg	5	15,80**	0,45	0,79

*Diferentes cantidades de asteriscos muestran diferencias significativas p<0,05. Test Kruskal-Wallis entre los grupos de experimentación y test Mann-Whitney entre parejas de grupos.

Estos resultados se encuentran insertados en las (Fig.12 y 13) de los (Anexo 12 y 13) del documento respectivamente.

Tabla IV: Frecuencia de M.N en sangre periférica de hígado fetal cuyas madres fueron administradas con extracto acuoso de *Capraria biflora.*

Grupo	N	M.N/2000	±DE	Índice de genotoxicidad
Control negativo	25	7,36*	0,95	0,37
Control positivo	25	54,88****	0,73	2,74
Dosis 400 mg/Kg	25	10.36*	1,35	0,52
Dosis 800 mg/Kg	25	14.24**	1,27	0,71
Dosis 1600 mg/Kg	25	18.56***	0,92	0,93

*Diferentes cantidades de asteriscos muestran diferencias significativas p<0,05. Test Kruskal-Wallis entre los grupos de experimentación y test Mann-Whitney entre parejas de grupos.

Similares resultados fueron obtenidos por (Díaz *et al.*, 2012) al igual que Lobo yBolaños (2014), en evaluaciones realizadas con el fin de comprobar el índice de genotoxicidad en sangre periférica mediante la prueba de MN.

La similitud de los resultados obtenidos entre los grupos administrados con el extracto y el control negativo, sugieren que *C. biflora* no tiene efecto citotóxico ni genotóxico en las condiciones evaluadas, a la dosis y el modelo seleccionado. El proceso de evaluación regulatoria del riesgo puede ser dividido en 3 fases que son; identificación del peligro, estimación de la vulnerabilidad y caracterización del riesgo (Repetto y Repetto, 2009).

Es importante comentar que la ausencia de efecto mutagénico y citotóxico del extracto acuoso de *C. biflora* observado en este estudio no se relaciona con una inadecuada exposición a la sustancia ensayo, ya que las dosis por vía orales de este producto entre 100 y 800 mg/Kg, inferiores a las utilizadas en el presente estudio, han producido efectos farmacológicos importantes (Vicet, 2009; Valido, 2011). Además se utilizó una dosis de 1600 mg/Kg (el doble de la última dosis empleada en farmacología) por debajo de 2000 mg/Kg (dosis fija) pero muy cercana a esta, en un esquema de dosis repetida (14, 15 y 16 de la gestación) por tanto, el empleo de esta dosis durante más tiempo descarta que la exposición de la sustancia haya sido insuficiente.

Hasta el momento la planta no tiene reportado ningún estudio de toxicología en el cual se halla reportado actividad tóxica a ninguna de las dosis estudiadas ni con ningún modelo biológico empleado (Vicet, 2009; Canto, 2013; Cathrina, 2015). Aunque en nuestro estudio el extracto acuoso de *C. biflora* no haya resultado tóxica a nivel de cromosomas, se deben realizar otros estudios como el Test de Ames así como otros ensayos donde se evalúe el potencial genotóxico a diferentes niveles en el material genético. De esta forma se contaría con una valoración más amplia sobre el perfil toxicológico de la planta con vistas a su preformulación como fitomedicamento y posible inclusión en ensayos clínicos.

4.4 Aspectos éticos de la investigación

Las visitas realizadas por la Unidad de la Garantía de la Calidad comprobaron que los animales sujetos a la investigación no se encontraban en condiciones de estrés, pues se mantuvieron con una conducta exploratoria normal. Esta reportado que esta variable pudiera provocar alteraciones en los resultados de la investigación. Por otra parte se comprobó el cumplimiento de los PNO establecidos para cada ensayo. Las auditorias por parte de la comisión de bioseguridad fueron favorables comprobándose el uso de la ropa sanitaria y guantes en las salas experimentales.

CONCLUSIONES

1. La administración oral del extracto acuoso de *Capraria biflora* en madres durante los días 14, 15 y 16 de la gestación, no mostró efecto genotóxico en MO.
2. La administración oral del extracto acuoso de *Capraria biflora* durante los días 14, 15 y 16 de la gestación, no mostró efecto genotóxico en hígados de neonatos.
3. La administración oral del extracto acuoso de *Capraria biflora* durante los días 14, 15 y 16 en ratones gestantes no mostró efecto genotóxico en sangre periférica de neonatos y madres.

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios *in vitro* con preferencia el test de AMES donde se analice mutaciones puntuales en células procariotas (daño a los genes).
2. Realizar estudios de reproducción específicamente en el segmento III (teratogénesis).

Referencias Bibliográficas

Abdella, E. (2012) Short-term comparative study of the cyclophosphamide genotoxicity administered free and liposome-encapsulated in mice. *Iranian Journal of Cancer Prevention.* 5: 51-60.

Abilev, S. y Glaser, V. (2013) Genetic Toxicology: Findings and Challenges. *Russian Journal of Genetics.* 49: 81-93.

Acosta, S., Muro, L., Sacerio, A., Monteagudo, G., Peña, A. y Narku, O. (2003) Anti-inflammatory Effects of an Aqueous Extract of Capraria biflora L. *Acta Farm. Bonaerense.* 22: 53-55.

AETOX (2014) *Glosario de términos toxicológicos.* [En línea] Disponible desde: http://www.aetox.es/glosario-toxicologico/glosater-f-g-h-i/ [Consultado].

Akyıl, D. y Konuk, M. (2015) Detection of genotoxicity and mutagenicity of chlorthiophos using micronucleus, chromosome aberration, sister chromatid exchange, and Ames tests. *Environmental Toxicology.* 30: 937–945.

Arencibia, D., Rosario, L. y Suárez, Y. (2003a) Ensayo de micronúcleos transplacentarios en roedores, una buena opción en toxicología experimental. *Retel.*

Arencibia, D., Rosario, L., Suárez, Y. y Delgado, L. (2003b) El ratón NMRI como biomodelo en el ensayo de micronúcleos. *Revista de toxicología en línea.*

Arencibia, D., Rosario, L., López, Y., Fariñas, M., Infante, J. y Díaz, D. (2009a) Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. *Retel.* 22: pp.1-15. .

Arencibia, D., Rosario, L., Morffi , J. y Curveco, D. (2009b) Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel.* 25: 22-38.

Arencibia, D., Rosario, L., Suárez, Y. y Delgado, L. (2011a) Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos transplacentarios en ratas Sprague Dawley. *InVet.* 13: 53-61.

Arencibia, D., Rosario, L., Suárez, Y. y Vidal, A. (2011b) Comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Revista Cubana de Farmacia.* 21: 17-21.

Arencibia, D., Vidal, A., Rosario, L., Emilia Suárez, Y. y Delgado, L. (2011c) Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *Vaccimonitor.* 20: 28-33.

Arencibia, D., Arrebola, I., Rosario, L., Suárez, Y. y Delgado, L. (2012a) Comparación entre dos biomodelos murinos (ratones Balb/c y ratas Sprague Dawley) en el ensayo de micronúcleos transplacentarios. *Revista Cubana de Farmacia.* 46: 17-21.

Arencibia, D., Rosario, R. y Vidal, A. (2012b) Comparación entre líneas de ratones en el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea. *Rev.MVZ Córdoba* 17: 2957-2963.

Arencibia, D. y Arrebola, D. F. (2014) Evaluación de la eficiencia de diferentes biomodelos de los murinos en los ensayos de genotoxicidad mediante técnicas citogenéticas. La Habana, Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón".

Arias, D. (2015) Evaluación genotóxica de un extracto butanólico de Agave brittoniana T. subsp. brachypus en ratones balb/c. In: *Biología.* Santa Clara, Cuba: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

Arrebola, D. (2014) Evaluación de la eficiencia de diferentes biomodelos de los murinos en los ensayos de genotoxicidad mediante técnicas citogenéticas. In: *Doctor en Ciencias de la Salud., Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". .*

Benavides, F. y Guénet, J. (2003) *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*Universidad de Alcalá: España.

Björn, D., Stoimir, K., Werner, B., Sonja, K. y Jovana, K. (2016) Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (Alburnusalburnus) assessed using the comet and micronucleus assay. *Science of The Total Environment.* 573: 1441-1449.

Brown, T. (2008) Genomas. En: Panamericana, E. M. (ed.). pp. 59-78.

Caieme, M. (2016) Cambios morfológicos en fetos de ratas de la línea Wistar de progenitores con Síndrome Metabólico inducido por sacarosa. In: *Biología.* Santa Clara, Cuba.: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Canto, M. (2013) Evaluación de la toxicidad por dosis repetida del extracto acuoso de las hojas de Capraria biflora L. In: *Farmacia.* Santa Clara, Villa Clara: Universidad Central de las Villas.

Cathrina, D. (2015) Evaluación del potencial genotóxico del extracto acuoso de las hojas de Capraria biflora L. Villa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.

CCAC (2010) CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science. Ottawa, Canadá.

CECMED (2012) Buenas prácticas de laboratorio no clínico. En: CECMED (ed.). pp. 1-120.

CEFEN (2000) Anemia del recién nacido prematuro. Recomendaciones para el tratamiento. *Arch. argent. pediatr.* 98.

Cooper, D. y Chen, J. (2012) *Mutations in Human Genetic Disease*, 246-294 pp.

Cueto, G., Montoya, B., Ruiz, J., Toro, J. y Urbiñez, K. (2015) *Monografía*Universidad de Medicina: Colombia.

CYTED. (2002) Métodos de evaluación de la actividad farmacológica de plantas medicinales. *Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para desenvolvimiento. .*

D´Arcy, G. (1979) Capraria. *Flora of Panama. Ann. Missouri Bot. Gard.* 66: 208-211.

Delabaere, A. y Gallot, D. (2016) Fisiología fetal. *EMC-Ginecología-Obstetricia.* 52: 1-9.

Díaz, C., Martínez, S., Escalera, F., Salgado, S., Carrillo, F., Macías, H. y Peña, B. (2012) La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos *Abanico Veterinario* 2.

Domínguez, A., Tamayo, M., Pérez, I., Salas, H., Pérez, O. y Batista, A. (2009) Evaluación citotóxica y genotóxica del adyuvante AFCo1 por el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón NMRI. *VacciMonitor.* 18: pp. 13-17.

Domínguez, Y. y Friman, M. (2000) Montaje y estandarización de la técnica de Micronúcleos Trasplancetarios. *I Taller Latinoamericano sobre Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis. X Congreso Latinoamericano de Toxicología.* pp. 48-53.

Dricu, A. (2012) *Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment.*, 289-301 pp.

Dueñas, R. (2000) Identificación de prioridades y necesidades. . *El sistema Nacional de Bioseguridad.*: La Habana: Centro Nacional de Seguridad Biológica.

Duno, R. (2010) Capraria biflora. Flora de la Península de Yucatán.

Durán, C. (2006) *Flora de Veracruz*Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Veracruz, México.

Escalante, E., Luchtenberg, G. y Sola, H. (1996) Eritropoyetina recombinante. Actualizacion. *Rev. Hosp. Mat. Inf. Ramón Sardá* 244.

Fenech, M. y Morley, A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation research.* 147.

Fucic, A., Guszak, V., Keser, T. y Wagner, J. (2017) Micronucleus, cell-free DNA, and plasma glycan composition in the newborns of healthy and diabetic mothers. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.*

Gámez, R. y Más, R. (2007) Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *CENIC Ciencias Biológicas.* 38: 1-5.

Gámez, R., Gutiérrez, A., Mas, R., Pardo, B., García, H. y Bucarano, I. (2012) In Vitro Genotoxic Potential of D-003 on the Blood Lymphocytes Chromosomal Aberration Test. *Retel.* 38.

Gongalves De Lima, O., D´Albuquerque, L. y Navarro, C. (1962) Novo método de extracao e purificacao da bifloria con possibilidade industrial. *Revista do Instituto de Antibióticos.* 1: pp. 79-81.

Gopala, K., Gopa, G. y Saryu, G. (2016) In vitro and in vivo genotoxicity assessment of the dopamine receptor antagonist molindone hydrochloride. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 57: 288–298.

Gutiérrez, A., Fernández, I., Gámez, R. y García, H. (2005) Evaluación genotóxica *in vivo* del D-004 en el ensayo de micronúcleos en médula ósea en ratones. *CENIC, Ciencias Biológicas.* 6.

Hayashi, M., Tice, R., Macgregor, J., Anderson, D., Blakey, D. y Kirshvolders, M. (1993) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mut Res.* 120-134.

Ideker, L. (1996) Capraria Mexicans (Scrophulariaceae) endangered addition to the United States flora. *Sida.*

Kasamoto, S., Masumori, S., Tanaka, J., Ueda, M., Fukumuro, M., Nagai, M., Yamate, J. y Hayashi, M. (2017) Reference control data obtained from an in vivo cometmicronucleus combination assay using Sprague Dawley rats. *Experimental and Toxicologic Pathology.*

Lagarto, A., Sánchez, E., Piloto, J., Remigio, A., Barzaga, P., Rodríguez, C., Carballo, C., Couret, M., Vega, Y. y López, R. (2014) Evaluación preclínica y estudio de estabilidad de extractos a partir del follaje de *Momordica charantia* Lin. *Rev. Bras. Pl. Med., Campinas.* 16: 782-788.

Lebaron, M., Schisler, M., Torous, D., Dertinger, S. y Gollapudi, B. (2013) Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test. *Environ Mol Mutagen.* 3: 222-228.

Li, Y. y Chen, T. (2014) Handbook of Nanotoxicology, Nanomedicine and Stem Cell Use in Toxicology. *Genotoxicity of Silver Nanoparticles.* DOI: 10.1002/9781118856017.ch4: 87-98.

Lobo, M. y Bolaños, A. (2014) Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud.* 18.

Machado, Y. (2013) Uso tradicional de plantas medicinales como antiinflamatorias y/o gastroprotectoras en el Municipio de Santa Clara. Universidad Central de las Villas. Villa Clara. Cuba.

Martínez, R., Pérez, R., Huete, A. y Rivera, S. (2014) Evaluación en vivo de la actividad analgésica y antinflamatoria y formulación de un gel de extracto de *Capraria biflora* (perulera) en el periodo noviembre-mayo 2014.

Matheus, T. y Bolaños, A. (2014) Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo.* 18: 18-26.

Mellado, P., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A., Marcos, R., Pichardo, R. y Cameán, A. (2017) In vitro toxicological assessment of an organosulfur compound from Allium extract: Cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity studies. *Food and Chemical Toxicology.* 99: 231-240.

Mishra, D. (2012) Mutagenesis. *Intech.* 4: 1-239.

Morais, N., Nogueira, C., López, M. y Vasconselos, N. (1995) Inorganic analytical study of medicinal plants. *An Assoc. Bras Quim.* 4: pp. 14-19.

Norppa, H. y Falck, G. (2003) What do human micronuclei contain? *Mutagenesis.* 18: 220-233.

OECD (2014) *Guideline for the testing of chemical. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.*DRAFT TG 474: Paris: OECD Publishing.

Pereira, L., Oliveira, A., Meireles, G., Furio, M., Tasso, M., Bruno, V., Dorta, D. y Palma, D. (2016) Comparative Study of Genotoxicity Induced by Six Different PBDEs. *Basic & ClinicalPharmacology&Toxicology.* 119: 396–404.

Polychronis, D., Giannakopoulos, E., Vlastos, D. y Matthopoulos, D. (2017) Determination of genotoxic effects of methidathion alkaline hydrolysis in human lymphocytes using the micronucleus assay and square-wave voltammetry. *Bioelectrochemistry.* 113: 9-14.

Quintana, K. (2012) Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de achillea (*Achillea millefolium* l.) y guaviduca (*Piper carpunya* ruiz & pav.) en ratas (rattus norvegicus) con lesiones gástricas inducidas. In: *Facultad de ciencias.* Ecuador: Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.

Remigio, A., Pérez, G., Fernández, N., Bada, A., Arteaga, M. y Mancebo, A. (2001) Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Revista de Toxicología.* 18: 75-78.

Repetto, M. y Repetto, G. (2009) *Toxicología fundamental*. 4. Sevilla: España.

Rodríguez, Y., Vera, L., Moreno, K., Montilla, J., Guevara, C. y González, R. (2014) Conocimiento sobre el uso del plantago-major como terapia alternativa en lesiones inflamatorias bucales. *RevVenezInvestOdont.* 2: pp. 106-115.

Roig, J. (1988) *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba.*La Habana., pp. 510-11. pp.

Roskams, T. y Desmet, V. (2008) Embryology of extra- and intrahepatic bile ducts, the ductal plate. *Anat Rec.* 291.

Ruiz, M., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A., Pichardo, S., Moyano, R., González, J. y Cameán, A. (2016) Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay. *Food and Chemical Toxicology.* 98: 240-250.

Sadler, T. W. y Langman, J. (2007) *Embriología médica: con orientación clínica*.

Saínz, O. (2001) *Estandarización de tres técnicas de genotoxicidad y evaluación genotóxica del bioactivo G-1 y del BIOPLANT.*Universidad de La Habana.

Scofield, D. (2002) Medicinal usage: Capraria biflora, L. (Scrophulariaceae). *The figwort family.*

Segovia, E., Arrúa, R., Barrozo, N., Duré, R., Nakayama, H. y Peralt, I. (2016) Evaluación de los efectos mutagénicos/antimutagénicosde Luehea divaricata en ratones. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 14: 102-106.

Shayne, C. (2007) *The mouse. Toxicology. Animal models in toxicology.* 2. New York: Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group.

Silbergeld, E. (2012) *Toxicología*Ginebra.

Silva, E., Ribeiro, C., Fernandes, F., Perez, A., Noda, C., Melo, D. y Chen-Chen, L. (2015) Genotoxic, cytotoxic, antigenotoxic, and anticytotoxic effects of sulfonamide chalcone using the Ames test and the mouse bone marrow micronucleus test. *Plos One.* 10.

Smith, F. (1996) Third International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use- A toxicologist's perspective. *Toxicologic Pathology.* 25: 519-528.

Stuart, D. (2013) The Mechanisms of DNA Replication. *Intech.*: 400-485.

Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. y Sasaki, Y. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis.* 35: 206-221.

Tirunilai, P. (2012) Recent Trends in Cytogenetic Studies - Methodologies and Applications. . *Intech.*

Torres, J. (2014) Biología molecular y celular de las células troncales hepáticas In: *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.* Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.

Torres, O. y Zavala, M. (2013) Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *El Residente* 8: 4-12.

UE (2007) Recomendación de la comisión de 18 de junio de 2007 sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *Diario Oficial de la Unión Europea.* pp. 25-36.

Valdivieso, G. (2016) Efecto del extracto acuoso de Maytenus macrocarpa "Chuchuwasi" sobre embriones preimplantacionales de ratón (Mus musculus). In: *Biología.* Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor De San Marcos.

Valido, A. (2011) Evaluación preclínica de la Actividad antiinflamatoria y gastroprotectora del extracto acuoso a partir de las hojas de Capraria biflora L. In: *Farmacia.* Santa Clara, Villa Clara, Cuba: Universidad Central de las Villas.

Vasconcellos, C., Bezerra, D., Fonseca, A., Pereira, M., Lemos, T. y Pessoa, O. (2007) Antitumor Activity of Biflorin, an o-Naphthoquinone Isolated from Capraria biflora. . *Biol Pharm Bull.* 30: pp. 1416-1421.

Vicet, L. (2009) Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la especie *Capraria biflora* L. In: *Farmacia.* La Habana, Cuba: Universidad de la Habana.

Vivo, T., Sánchez, C., Cacik, F. y Sequin, C. (2012) Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia docencia tecnologia.* 45.

Wang, X., Tan, Z., Pan, Y., Liu, Q., Huang, L., Cheng, G., Chen, D., Tao, Y., Liu, Z. y Yuan, Z. (2015) Safety assessment of aditoprim acute, subchronic toxicity and mutagenicity studies. *Journal of Applied Toxicology.* 35: 1415–1426.

Yang, H., Zhang, X., Liu, H., Cui, W., Zhang, Q., Li, Y. y Yu, Z. (2016) Lanthanum nitrate genotoxicity evaluation: Ames test, mouse micronucleus assay, and chromosome aberration test. . *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 810: 1-5.

Zúñiga-González, G. M. (2014) Selección de animales para ser utilizados como indicadores de agentes genotoxicos mediante el conteo de micronúcleos. *VacciMonitor.* 23-26.

Zuñiga, J. (1999) *Principios de la ciencia de animales de laboratorio*.

Zuñiga, J., Turi, S. y Milocco, R. (2001) *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. 1º.

Anexos

Anexo 1. Certificado de calidad genética e higiénico sanitaria de ratones BALB/c/Cenp.

GC.CC.14.09 **Dirección de Aseguramiento de la Calidad**

Folio: 0109 **Grupo de Aseguramiento de la Calidad**

CENPALAB — CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCION DE ANIMALES DE LABORATORIO

CERTIFICADO DE CALIDAD GENÉTICA DE ROEDORES SPF

Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas
Ratón	-	-	-	BALB/c/Cenp	11010917	2

Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora
40	60	100	20-25g	8-9sem	F.C.M. Villa Clara	17/03/17	11:05

Origen de la línea

Los progenitores fueron importados del Laboratorio Charles River, Italia, para la producción de la línea BALB/c/Cenp.

Características zootécnicas y control de la Colonia de Producción

Los animales importados fueron inspeccionados en el momento de la recepción y son mantenidos en condiciones controladas para su reproducción con un sistema de apareamiento que permite garantizar las características de esta línea de ratón consanguíneo. Se mantiene una periódica confirmación de los rasgos fenotípicos de esta línea por medio de inspecciones clínicas sistemáticas, además se analizan los parámetros zootécnicos para evaluar el comportamiento reproductivo y productivo. Para preservar la integridad genética de cada línea són eliminados de las colonias aquellos ratones que les detectan nuevas características que indiquen la aparición de nuevas mutaciones

DISTRIBUCIÓN GENES COLOR DE LA CAPA* **Fecha** 31-08-16

Locus	a	b	c	d
Alelos	AA	bb	cc	DD

Control e Inspección Genética del Banco Genético

Los bancos genéticos mantenidos en condiciones controladas (SPF) con un Sistema de apareamiento que permite garantizar las características de esta línea de ratón consanguíneo son inspeccionados genéticamente para confirmar los rasgos y características genéticas de la línea. Los aspectos inspeccionados son: Identificación de reproductores y animales para reemplazo, control del Pedigree y las generaciones, aplicación del sistema de apareamiento establecido, selección de animales para el reemplazo, inspección de las tarjetas de cría y registros de control genético, entre otros.

INSPECCIÓN GENÉTICA **Fecha** 11/08/16

Resumen conclusivo

Todos los aspectos inspeccionados mostraron un adecuado comportamiento en la línea, lo que demuestra que en todos los aspectos relacionados con el manejo genético existe un medioambiente equilibrado que garantiza el mantenimiento de las características y de la calidad genética de la misma.

** Basado en los resultados del control genético, establecido en el Plan de Control de la Calidad y que es efectuado por la Especialista de Genética del CENPALAB.*
La frecuencia del monitoreo genético es de 1 año y los resultados del mismo son válidos por igual período de tiempo.

CENPALAB — CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCION DE ANIMALES DE LABORATORIO

Grupo Aseguramiento de la Calidad

Realizado:		Aprobado:	
Esp. de Genética del CENPALAB	Firma	Esp. Liberación de Aseg. Calidad	Firma

Anexo 2. Certificado de calidad de la fórmula del alimento.

GC.CC.09.13 **Dirección de Aseguramiento de la Calidad**

Folio: 0109 **Grupo de Aseguramiento de la Calidad**

CENPALAB — CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

CERTIFICADO DE CALIDAD DE ROEDORES SPF. Salud y Zootecnia

Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas
Ratón				BALB/c/Cenp	11010917	2

Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora
40	60	100	20-25g	8-9sem	F. C. M. Villa Clara	17/03/17	11:05

Dictamen Zootécnico e Inspección Clínica

Los animales en el momento de la expedición se encuentran clínicamente sanos, sus características morfológicas, fisiológicas y reproductivas se corresponden con la especificación de calidad de este producto. Proceden de una colonia con ambiente controlado y mantenidos en un sistema de producción intensivo aprobados para la línea, la alimentación se realiza con alimentos concentrados fórmulas **ALYco®** EMO 1002 y EAO 1004 esterilizable a razón de 3.40 a 6 g diarios. Dicha producción se encuentra bajo las BPP y un Sistema de Gestión de la Calidad que garantiza el estado higiénico sanitario de los animales que se expiden.

Resultados de Bacteriología *

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Salmonella sp.	Cult/ Sert		X		21/10/16	*Streptococcus pneumoniae*	Cult/ Serot		X		18/07/16
Streptococcus β hemolítico	Cult/ Sert		X		18/07/16	*Pasteurella pneumotropica.*	Cult/ ELISA		X		18/07/16
Bordetella bronchiseptica	Cult/ ELISA		X		09/12/16	*Clostridium piliformis*	Insp. Clínica		X		01/02/16
Corynebacterium kutscheri	Cultivo		X		21/10/16	*Leptospira sp*	ELISA		X		06/06/16
Helicobacter sp	Cultivo		X		01/02/16	*Cytrobacter freundii*	Cultivo		X		01/02/16
Streptobacillus moniliformis	Cultivo			X	-	*Mycoplasma pulmonis*	Cult/ ELISA		X		19/04/16
Dermatofitos	Insp. Clínica/Cultivo		X		18/07/16						

Resultados de Parasitología *

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Endoparásitos	DIR/FLOT		X		18/10/16
Toxoplasma gondii	ELISA		X		14/09/16
Ectoparásitos	INSPECCIÓN		X		18/10/16

Resultados de Patología *

Fecha: 18/10/16

Examen macroscópico:

No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas.

Resultados de Virología * (Serología)

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Virus de la Hepatitis (MHV)	ELISA/IFA		X		07/11/16	*Coriomeningitis linf.* (LCM)	ELISA/IFA		X		07/11/16
Reovirus Reo Tipo 3 (REO 3)	IFA		X		07/11/16	*Sendai*	ELISA/IFA		X		07/11/16
Encefalomielitis (TEMV)	IFA		X		07/11/16	*Polyoma*	IFA		X		21/04/16
Pneumonía del ratón (PVM)	ELISA/IFA		X		07/11/16	*Adenovirus* (MAD)	ELISA/IFA		X		21/04/16
Virus diminuto del ratón (MVM)	ELISA/IFA		X		07/11/16	*Citomegalovirus* (MCMV)	IFA		X		21/04/16
Rotavirus (EDIM)	ELISA/IFA		X		21/04/16	*Deshidrogenada Láctica* (LDH)	Test LDH Plasma			X	-
Ectromelia	ELISA/IFA		X		21/04/16	*Virus K*	IFA		X		21/04/16
Hantaan	IFA			X	-	*Virus Tímico* (MTV)	IFA			X	-

* Según lo certificado por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los expedientes de la línea archivados en la Dirección de Calidad. Documento de referencia *"Recomendaciones del monitoreo microbiológico para Roedores mantenidos y criados en condiciones controladas"*.

Válido a partir de **ENERO /2017** hasta **MARZO /2017**.

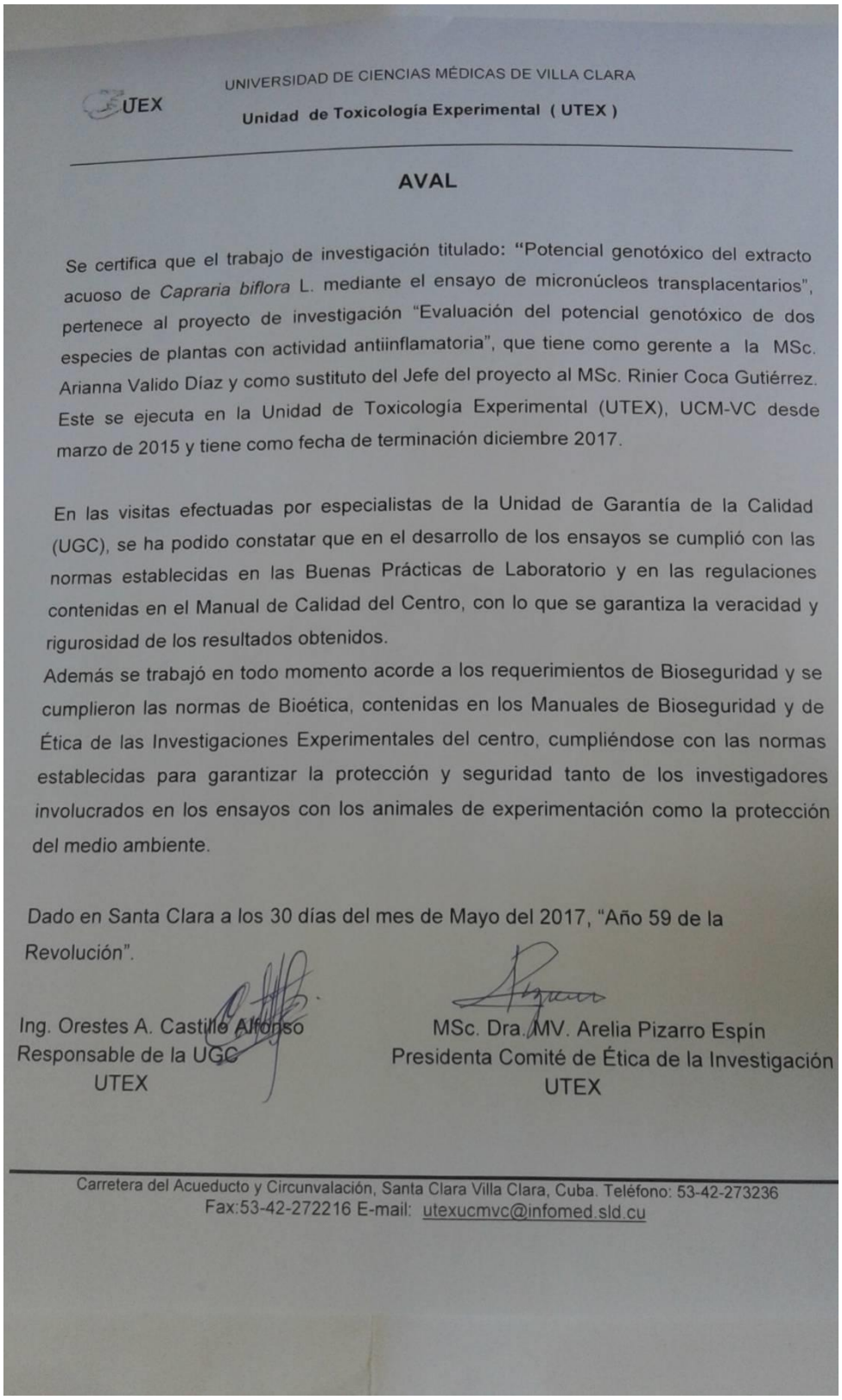
Este certificado es copia fiel de la original que se elabora a partir de la liberación de la línea para su comercialización.

	Realizado por	Aprobado por	Revisado por
Cargo	Especialista Dpto. Aseg. Calidad	Dirección de Producción	Distribuidor
Firma			

CENPALAB — Grupo Aseguramiento de la Calidad

Dirección de Producción de Animales Gnotobióticos

Anexo 3. Aval de la Unidad de Garantía de la Calidad de la UTEX.



UTEX

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE VILLA CLARA

Unidad de Toxicología Experimental (UTEX)

AVAL

Se certifica que el trabajo de investigación titulado: "Potencial genotóxico del extracto acuoso de *Capraria biflora* L. mediante el ensayo de micronúcleos transplacentarios", pertenece al proyecto de investigación "Evaluación del potencial genotóxico de dos especies de plantas con actividad antiinflamatoria", que tiene como gerente a la MSc. Arianna Valido Díaz y como sustituto del Jefe del proyecto al MSc. Rinier Coca Gutiérrez. Este se ejecuta en la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX), UCM-VC desde marzo de 2015 y tiene como fecha de terminación diciembre 2017.

En las visitas efectuadas por especialistas de la Unidad de Garantía de la Calidad (UGC), se ha podido constatar que en el desarrollo de los ensayos se cumplió con las normas establecidas en las Buenas Prácticas de Laboratorio y en las regulaciones contenidas en el Manual de Calidad del Centro, con lo que se garantiza la veracidad y rigurosidad de los resultados obtenidos.

Además se trabajó en todo momento acorde a los requerimientos de Bioseguridad y se cumplieron las normas de Bioética, contenidas en los Manuales de Bioseguridad y de Ética de las Investigaciones Experimentales del centro, cumpliéndose con las normas establecidas para garantizar la protección y seguridad tanto de los investigadores involucrados en los ensayos con los animales de experimentación como la protección del medio ambiente.

Dado en Santa Clara a los 30 días del mes de Mayo del 2017, "Año 59 de la Revolución".

Ing. Orestes A. Castillo Alfonso
Responsable de la UGC
UTEX

MSc. Dra. MV. Arelia Pizarro Espín
Presidenta Comité de Ética de la Investigación
UTEX

Carretera del Acueducto y Circunvalación, Santa Clara Villa Clara, Cuba. Teléfono: 53-42-273236
Fax:53-42-272216 E-mail: utexucmvc@infomed.sld.cu

Anexo 4. Test de normalidad.

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	GruposDosis Madres	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MedMN	Ctrl -	.473	5	.001	.552	5	.000
	Ctrl +	.367	5	.026	.684	5	.006
	Dosis 400 mg/Kg	.473	5	.001	.552	5	.000
	Dosis 800 mg/Kg	.473	5	.001	.552	5	.000
	Dosis 1600 mg/Kg	.473	5	.001	.552	5	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Anexo 5. Test de Kruskal-Wallis.

Ranks

	GruposDosis Madres	N	Mean Rank
MedMN	Ctrl -	5	3.00
	Ctrl +	5	23.00
	Dosis 400 mg/Kg	5	8.00
	Dosis 800 mg/Kg	5	13.00
	Dosis 1600 mg/Kg	5	18.00
	Total	25	
Medgindex	Ctrl -	5	3.00
	Ctrl +	5	23.00
	Dosis 400 mg/Kg	5	8.00
	Dosis 800 mg/Kg	5	13.00
	Dosis 1600 mg/Kg	5	18.00
	Total	25	
Medcitoindex	Ctrl -	5	23.00
	Ctrl +	5	3.00
	Dosis 400 mg/Kg	5	18.00
	Dosis 800 mg/Kg	5	13.00
	Dosis 1600 mg/Kg	5	8.00
	Total	25	
SanMN	Ctrl -	5	3.00
	Ctrl +	5	23.00
	Dosis 400 mg/Kg	5	8.20
	Dosis 800 mg/Kg	5	12.80
	Dosis 1600 mg/Kg	5	18.00
	Total	25	
Sangindex	Ctrl -	5	3.00
	Ctrl +	5	23.00
	Dosis 400 mg/Kg	5	8.20
	Dosis 800 mg/Kg	5	12.80
	Dosis 1600 mg/Kg	5	18.00
	Total	25	

Test Statistics[a,b]

			MedMN	Medgindex	Medcitoindex	SanMN	Sangindex
Chi-Square			23.483	23.483	23.319	23.239	23.239
Df			4	4	4	4	4
Asymp. Sig.			.000	.000	.000	.000	.000
Monte Carlo Sig.	Sig.		.000[c]	.000[c]	.000[c]	.000[c]	.000[c]
	99% Confidence Interval	Lower Bound	.000	.000	.000	.000	.000
		Upper Bound	.000	.000	.000	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupos Dosis Madres

c. Based on 10000 sampled tables with starting seed 2000000.

Anexo 6. Test de Mann-Whitney en madres en estudio.

Report

GruposDosis Madres		MedMN	Medgindex	Medcitoindex	SanMN	Sangindex
Ctrl -	Mean	3.80	.1900	1.2748	5.60	.2800
	N	5	5	5	5	5
	Std. Deviation	.447	.02236	.00217	.548	.02739
Ctrl +	Mean	49.40	2.4700	.8457	50.80	2.5400
	N	5	5	5	5	5
	Std. Deviation	.548	.02739	.00093	1.095	.05477
Dosis 400 mg/Kg	Mean	5.80	.2900	1.2584	8.80	.4400
	N	5	5	5	5	5
	Std. Deviation	.447	.02236	.00140	1.095	.05477
Dosis 800 mg/Kg	Mean	10.80	.5400	1.2452	11.60	.5800
	N	5	5	5	5	5
	Std. Deviation	.447	.02236	.00113	.894	.04472
Dosis 1600 mg/Kg	Mean	15.80	.7900	1.2232	15.80	.7900
	N	5	5	5	5	5
	Std. Deviation	.447	.02236	.00135	.447	.02236
Total	Mean	17.12	.8560	1.1694	18.52	.9260
	N	25	25	25	25	25
	Std. Deviation	17.018	.85090	.16611	16.843	.84214

Anexo 7. Test de Mann-Whitney de neonatos en estudio.

Report

GruposDosisNeonatos		HigMN	Higgindex	Higcitoindex	HigSanMN	HigSangindex
Ctrl -	Mean	6.52	.3260	1.1000	7.360	.3680
	N	25	25	25	25	25
	Std. Deviation	.510	.02550	.00000	.9522	.04761
Ctrl +	Mean	59.52	2.9760	.4000	54.880	2.7440
	N	25	25	25	25	25
	Std. Deviation	.510	.02550	.00000	.7257	.03629
Dosis 400 mg/Kg	Mean	10.24	.5120	1.0768	10.360	.5180
	N	25	25	25	25	25
	Std. Deviation	1.012	.05058	.00476	1.3503	.06752
Dosis 800 mg/Kg	Mean	15.64	.7820	1.0600	14.240	.7120
	N	25	25	25	25	25
	Std. Deviation	.490	.02449	.00000	1.2675	.06338
Dosis 1600 mg/Kg	Mean	19.44	.9720	1.0600	18.560	.9280
	N	25	25	25	25	25
	Std. Deviation	.821	.04103	.00000	.9165	.04583
Total	Mean	22.27	1.1136	.9394	21.080	1.0540
	N	125	125	125	125	125
	Std. Deviation	19.233	.96163	.27117	17.4146	.87073

Leyenda para las tablas de resultados estadísticos:

MedMN: Frecuencia de MN en médula ósea de madres en estudio

Medgindex: Índice de genotoxicidad en médula ósea de madres en estudio

Medcitoindex: Índice de citotoxicidad en médula ósea de madres en estudio

SanMN: Frecuencia de MN en sangre periférica de madres en estudio

Sangindex: Índice de genotoxicidad en sangre periférica de madres en estudio

HigMN: Frecuencia de MN en hígado de fetos

Higgindex: Índice de genotoxicidad en hígado de fetos

Higcitoindex: Índice de citotoxicidad en hígado de fetos

HigSanMN: Frecuencia de MN en sangre periférica de fetos

HigSangindex: Índice de genotoxicidad en sangre periférica de fetos

Anexo 8.

Tabla V: Eritrocitos policromáticos y normocromáticos. Índice de citotoxicidad en médula ósea de madres.

Grupos	Número	EP	EN	EP/EN (citotoxicidad)	±DE
Control negativo	5	1120,8 ±0,10	879,2 ±0,20	1,27*	0,005
Control positivo	5	916,4 ±0,40	1083,6 ±0,50	0,84***	0,010
Dosis 400mg/Kg	5	1114,4 ±0,20	885,6 ±0,20	1,25*	0,005
Dosis 800mg/Kg	5	1109,2 ±0,20	890,8 ±0,20	1,24*	0,005
Dosis 1600mg/Kg	5	1100,4 ±0,30	899,6 ±0,40	1,22**	0,010

*Diferentes cantidades de asteriscos muestran diferencias significativas $p<0,05$. Test Kruskal-Wallis entre los grupos de experimentación y test Mann-Whitney entre parejas de grupos.

Anexo 9.

Tabla VI: Eritrocitos policromático y normocromáticos. Índice de citotoxicidad en hígado fetal de neonatos.

Grupos	N	EP	EN	EP/EN (citotoxicidad)	±DE
Control negativo	25	1046,88 ±0,20	953,12 ±0,20	1,09*	0,005
Control positivo	25	571,88 ±0,50	1428,12±0,60	0,40***	0,020
Dosis 400 mg/Kg	25	1036,40 ±0,30	963,60 ±0,30	1,07*	0,010
Dosis 800 mg/Kg	25	1029,36 ±0,30	970,64 ±0,30	1,06*	0,005
Dosis 1600 mg/Kg	25	1022,96 ±0,20	967,04 ±0,10	1,05**	0,005

*Diferentes cantidades de asteriscos muestran diferencias significativas p<0,05. Test Kruskal-Wallis entre los grupos de experimentación y test Mann-Whitney entre parejas de grupos.

Anexo 10.

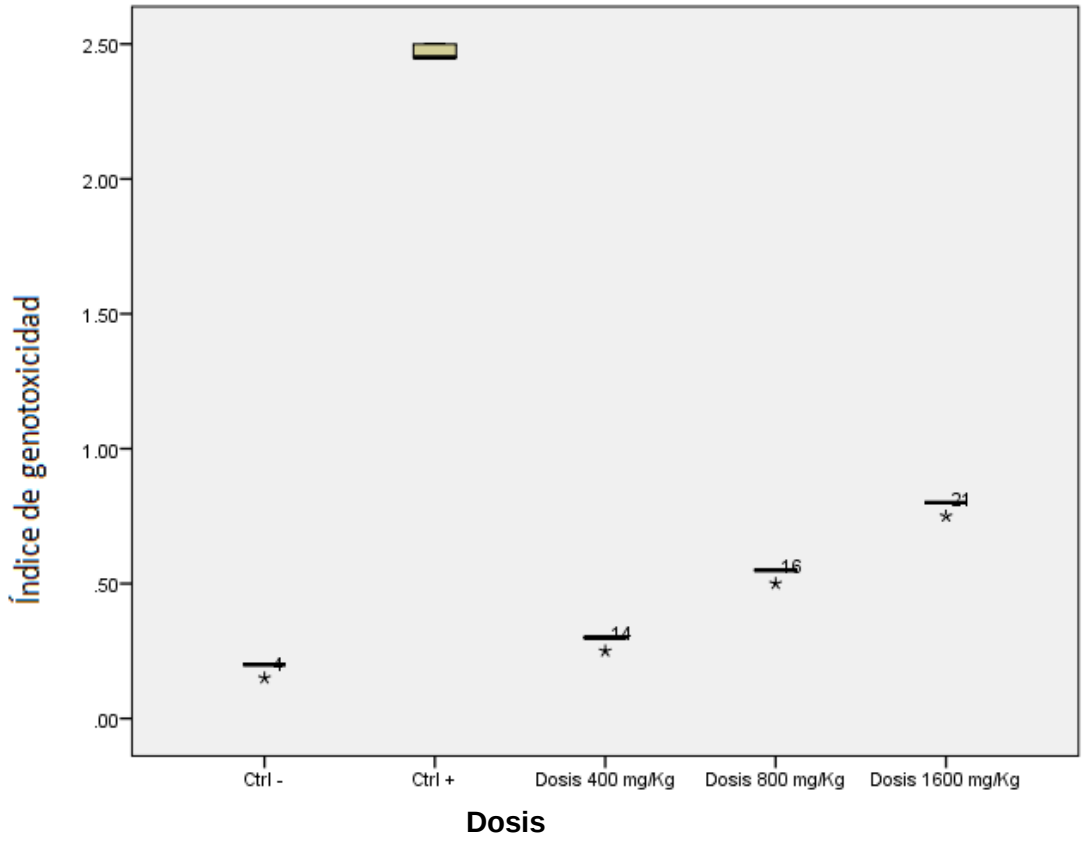


Figura 10. Índice de genotoxicidad en médula ósea de madres administradas con extracto acuoso de *Capraria biflora*.

Anexo 11.

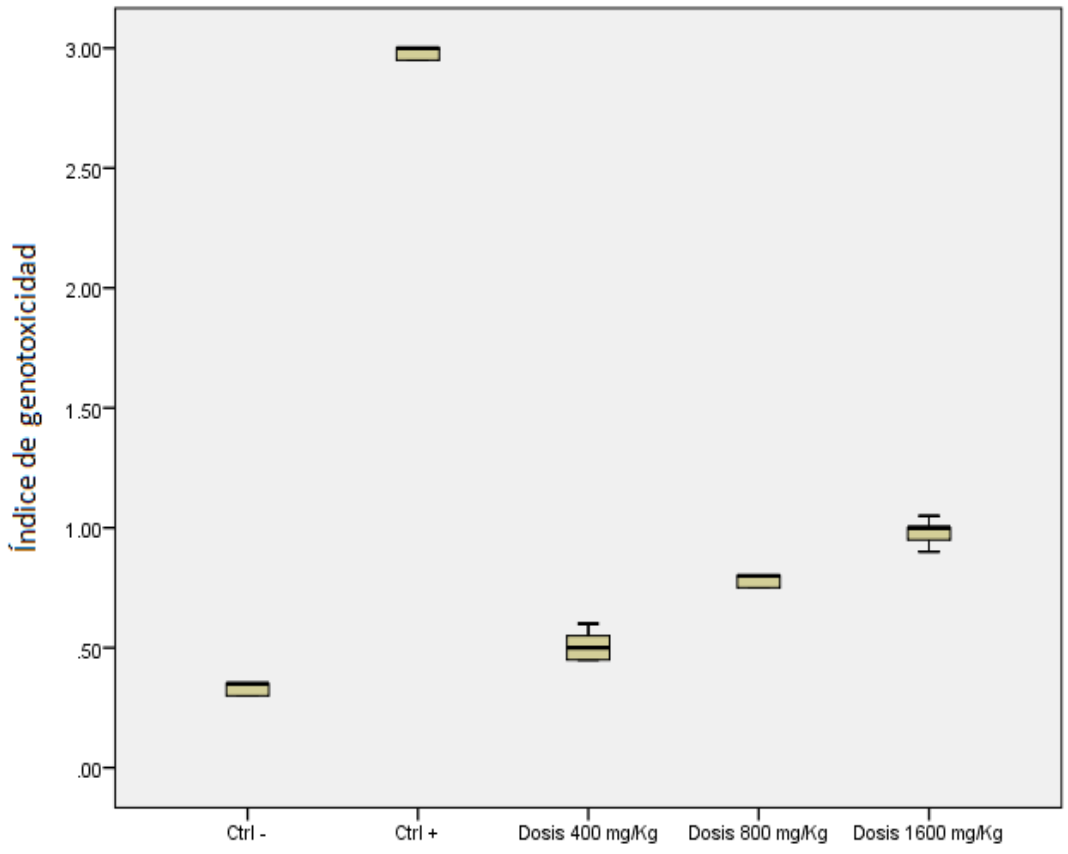


Figura 11. Índice de genotoxicidad en hígado de fetos cuyas madres fueron administradas con extracto acuoso de *Capraria biflora*.

Anexo 12.

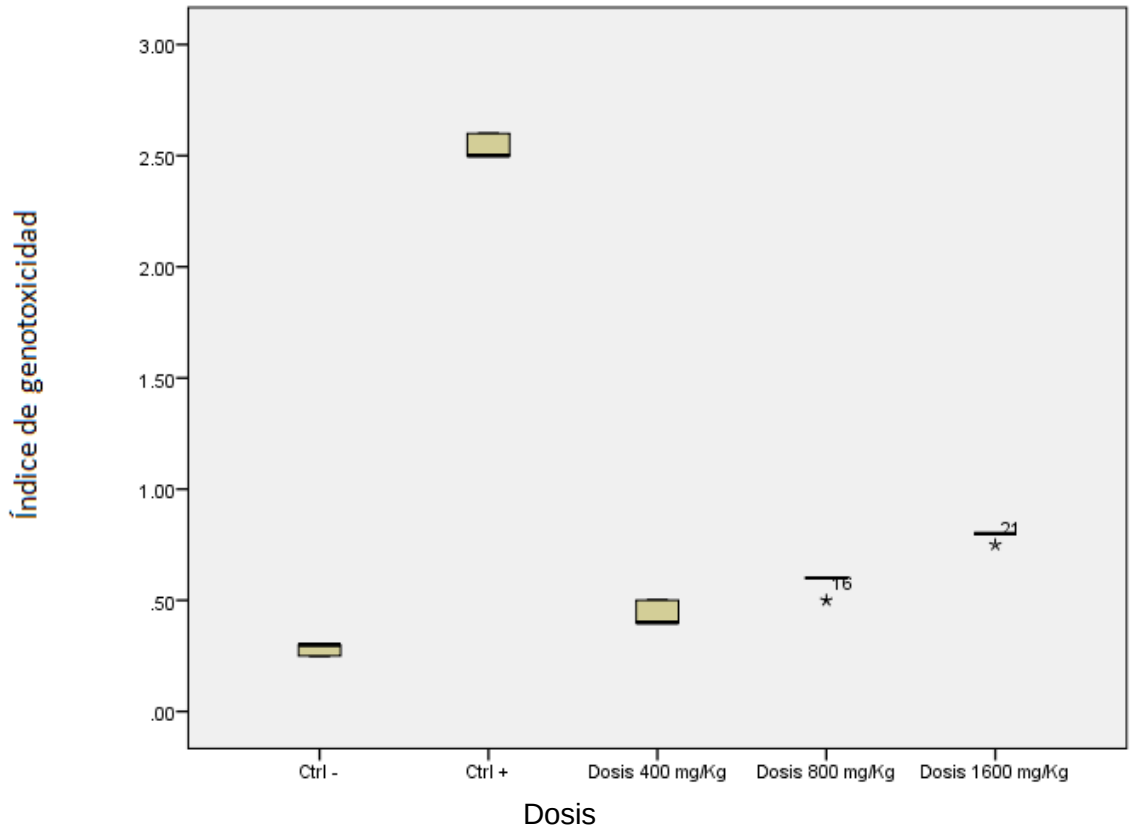


Figura 12. Índice de genotoxicidad en sangre periférica de madres administradas con extracto acuoso de *Capraria biflora*.

Anexo 13.

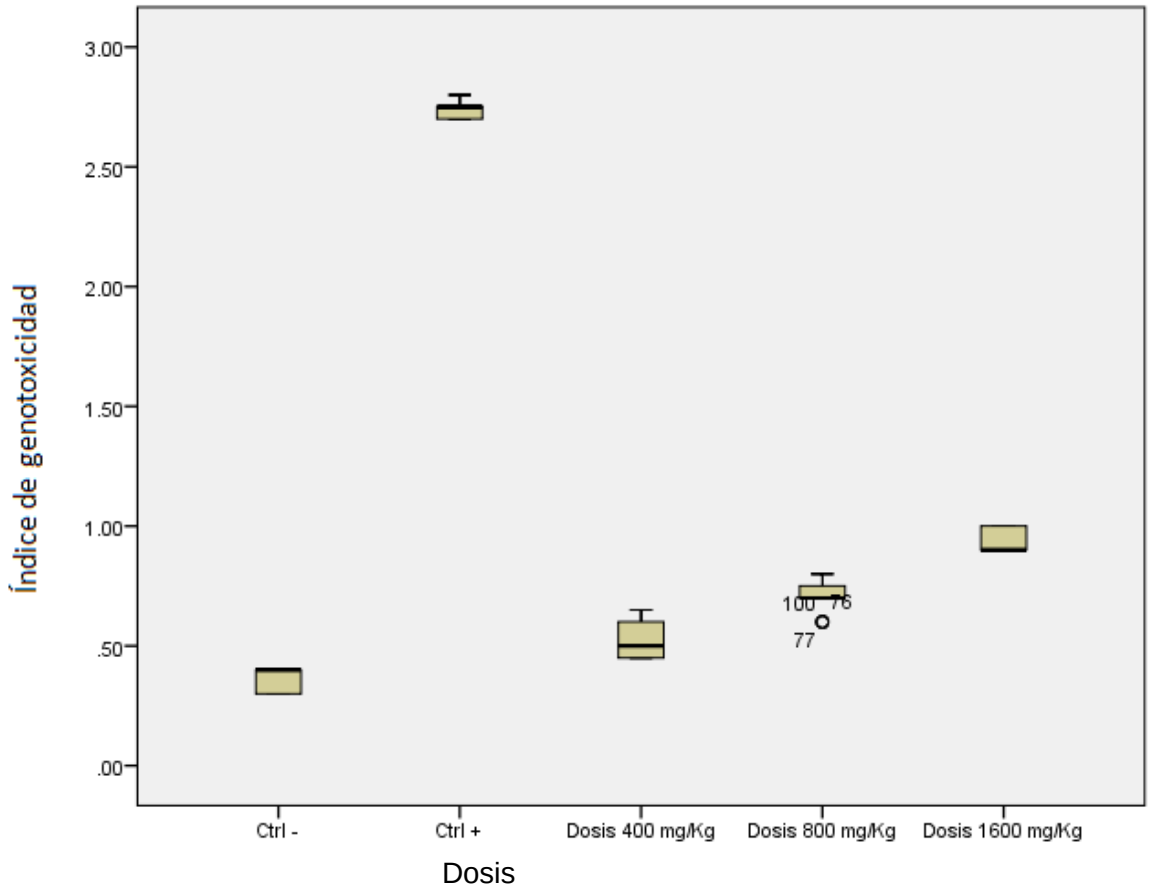


Figura 13. Índice de genotoxicidad en sangre periférica de fetos cuyas madres fueron administradas con extracto acuoso de *Capraria biflora*.