

Evaluación de la cito-genotoxicidad *in vitro* en eritrocitos y linfocitos humanos de los extractos de *Croton niveus*, *Piper marginatum* e *Hyptis suaveolens*, especies vegetales utilizadas en medicina tradicional del Departamento del Atlántico en el año 2016.

**Jennifer Barros Meza
Jesús Cabrera Álvarez
Jaime Fuentes Forero
María Camila Garcés Wilches**



Departamento de Salud Pública

**Universidad del Norte
Medicina IX Semestre
Barranquilla – 2016**

Evaluación de la cito-genotoxicidad *in vitro* en eritrocitos y linfocitos humanos de los extractos de *Croton niveus*, *Piper marginatum* e *Hyptis suaveolens*, especies vegetales utilizadas en medicina tradicional del Departamento del Atlántico en el año 2016.

ESTUDIO CIENTIFICO EXPERIMENTAL

**Jennifer Barros Meza
Jesús Cabrera Álvarez
Jaime Fuentes Forero
María Camila Garcés Wilches**

Asesor Metodológico

Luz Marina Alonso, MSP, MSC.

Departamento de Salud Pública

**Universidad del Norte
Medicina IX Semestre
Barranquilla – 2016**

PÁGINA DE ACEPTACIÓN

**Amner Muñoz, PhD en Química
Asesor Científico**

**Ricardo Gutiérrez De Aguas, PhD en Biología
Asesor Científico**

**Luz Marina Alonso, MSP, MSC.
Asesor Metodológico**

**Tania Acosta M.D, PhD en Epidemiología
Jurado de Tesis**

**Barranquilla, Atlántico
22 de Junio de 2016**

CONTENIDO

	pág.
Resumen.....	5
Glosario	6
Introducción	9
Marco Teórico	12
Aspectos Metodológicos.....	17
Resultados.....	19
Discusión.....	25
Conclusiones	26
Recomendaciones	27
Referencias Bibliográficas	28
Bibliografía Complementaria	32
Anexos.....	33

Resumen

Introducción. En Colombia, el crecimiento exponencial de problemas de salud y los altos costos de los medicamentos han llevado a la población a retomar el uso de la medicina tradicional (MT) basadas en plantas, como una alternativa terapéutica. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de la población que vive en áreas rurales de los países en desarrollo depende de esta práctica médica para cubrir sus necesidades de salud. El INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de medicamentos y alimentos) tiene registro de sólo 95 especies aprobadas para uso medicinal. El propósito de esta investigación fue establecer si los extractos de *P. marginatum*, *C. niveus* e *H. suaveolens*, plantas utilizadas en medicina tradicional del Departamento del Atlántico, presentan efectos hemolíticos y cito-genotóxicos *in vitro* sobre células humanas.

Objetivo: Evaluar la cito-genotoxicidad *in vitro* en eritrocitos y linfocitos humanos de los extractos de *Croton niveus*, *Piper marginatum* e *Hyptis suaveolens*.

Materiales y Métodos: El material vegetal de las 3 plantas fue recolectado en los municipios de Tubará y Sabanalarga (Departamento del Atlántico) y las especies fueron identificadas por el Herbario Nacional Colombiano. De las hojas de cada planta se obtuvieron extractos etanólicos (EE) por percolación. Los EE fueron analizados por GC-MS, TLC y HPLC. Para evaluar la actividad hemolítica (eritrocitos humanos) se siguió el método modificado de Suwalsky (1) (espectrofotometría a 540 nm) y para la actividad citotóxica en linfocitos, se empleó el método de exclusión del colorante azul Tripán (%viabilidad celular) y para genotoxicidad se usó el método naranja acridina con bromuro de etidio. Para determinar las concentraciones letales y hemolíticas al 50% (CL_{50%} y CH_{50%}) se utilizaron diluciones seriadas entre 50 µg/mL - 1000 µg/mL, con sus respectivos controles. La evaluación de la actividad genotóxica se realizó mediante el ensayo de naranja de acridina con bromuro de etidio para determinar la presencia de cuerpos apoptóticos, células necróticas y células vivas.

Resultados: Los valores obtenidos de CH_{50%} por planta fueron: *P. marginatum* 811 ± 5 µg/mL; *C. niveus* 45 ± 9 % - 1000 µg/mL; *H. suaveolens* 643 ± 44 µg/mL. En cuanto a citotoxicidad CL₅₀ *P. marginatum* 178 ppm, y genotoxicidad con efecto necrótico y un 20% de apoptosis a 250 ppm

Conclusión: Se observó un aumento de la actividad hemolítica a medida que aumenta la concentración de los extractos evaluados. La especie que mostró el mayor grado de hemólisis fue *P. marginatum* a las concentraciones más bajas. Con respecto a citotoxicidad en linfocitos humanos se observó una disminución de la viabilidad celular en función del aumento de la concentración del extracto de *P. marginatum*. La actividad citotóxica del extracto de *P. marginatum* se puede considerar moderada ya que el valor promedio de la CL₅₀ fue 178 ppm. En el ensayo de genotoxicidad se observó un mayor efecto necrótico que apoptótico del extracto de *P. marginatum*. Sin embargo, es posible que por ser un análisis visual se puedan confundir unas células con otras.

GLOSARIO

- ❖ **Absorbancia:** es la intensidad de la luz con una longitud de onda específica y que es pasada por una muestra es la intensidad de la luz antes de que entre a la muestra
- ❖ **Alteración citogenética:** Alteraciones de los cromosomas en cuanto a su estructura, función y comportamiento.
- ❖ **Apoptosis:** muerte celular programada por el mismo organismo con el fin de autocontrolar su desarrollo y crecimiento.
- ❖ **Azul tripán:** es un colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas.
- ❖ **Célula mononuclear:** célula sanguínea caracterizada por poseer un único núcleo redondo, como los linfocitos o los monocitos.
- ❖ **Célula polimorfonuclear:** célula sanguínea caracterizada por poseer varios núcleos, como los neutrófilos.
- ❖ **Centrifugar:** Someter una masa o líquido a la acción de una centrifugadora.
- ❖ **Citocalasina-B:** droga aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*, actúa específicamente bloqueando la citocinesis al impedir la polimerización de la actina necesaria para la formación del anillo microfilamentoso requerido para la partición de la célula tras la telofase.
- ❖ **Citocinesis:** Proceso de separación y segmentación del citoplasma que tiene lugar durante la última fase de la mitosis.
- ❖ **Citostáticas:** del fármaco que inhibe la multiplicación o el desarrollo celular; se usa en el tratamiento del cáncer.
- ❖ **Citotoxicidad:** cualidad de ser tóxico a células.
- ❖ **Empírico:** Que está basado en la experiencia y en la observación de los hechos. Investigación científica: proceso que, mediante la aplicación del método científico, procura obtener información relevante y fidedigna (digna de fe y crédito), para entender, verificar, corregir o aplicar el conocimiento.
- ❖ **Eritrocito:** Célula de la sangre de forma redonda u ovalada y de color rojo que contiene hemoglobina y se encarga de transportar el oxígeno a todas las partes del cuerpo.
- ❖ **Extracto vegetal:** el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes.
- ❖ **Extracto:** Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, semilla u otra cosa por diversos procedimientos.
- ❖ **Fases de gradiente densidad:** En un medio líquido ocurre la separación de sustancias dependiendo del valor de su densidad.
- ❖ **Fitoterapia:** Tratamiento médico de algunas enfermedades basado en el empleo de plantas y sustancias vegetales.

- ❖ **Genotoxicidad:** capacidad para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos; el daño en el material genético incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula.
- ❖ **Hemólisis:** Destrucción de los hematíes o glóbulos rojos de la sangre que va acompañada de liberación de hemoglobina.
- ❖ **Heparinizada:** Tratamiento con heparina para prevenir la coagulación sanguínea
- ❖ **Homeostasis:** Conjunto de fenómenos de autorregulación, conducentes al mantenimiento de una relativa constancia en la composición y las propiedades del medio interno de un organismo.
- ❖ **In vitro:** se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.
- ❖ **Incubación:** es el tiempo comprendido entre la exposición a un agente y cuando los efectos principales aparecen.
- ❖ **Leucocitos:** Los leucocitos son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmunitaria, interviniendo así en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos.
- ❖ **Material genético:** guarda la información genética de una forma de vida orgánica y está almacenado en el núcleo de la célula.
- ❖ **Medicina homeopática:** método terapéutico natural que aplica clínicamente la ley de la similitud utilizando sustancias en dosis infinitesimales, es decir que las mismas sustancias que provocan un mal lo pueden curar cuando se administran en pequeñas dosis.
- ❖ **Medicina tradicional:** es el nombre que se da comúnmente a un rango de prácticas médicas tradicionales y supersticiones desarrolladas en China a lo largo de su evolución cultural milenaria
- ❖ **Micronúcleo:** son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas.
- ❖ **Muestras biológicas:** Se dice de material obtenido del cuerpo humano sea: ADN, ARN, orina, sangre, tejido, células y proteínas.
- ❖ **Mutagénesis:** Aparición de nuevas mutaciones; mutaciones de novo.
- ❖ **Necrosis:** expresión de la muerte patológica de un conjunto de células o de un tejido provocado por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar.
- ❖ **Plasma sanguíneo:** Fracción líquida, libre de células de la sangre.
- ❖ **Suspensión:** mezclas heterogéneas formadas por un sólido que se dispersan en un medio líquido

- ❖ **Terapéutica:** Parte de la medicina que se ocupa de los medios empleados en el tratamiento de las enfermedades y de la forma de aplicarlos.
- ❖ **Tratamiento:** es el conjunto de medios de cualquier clase (higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos o físicos) cuya finalidad es la curación o el alivio (paliación) de las enfermedades o síntomas.

Introducción

El uso de plantas como elemento medicinal prácticamente nació con el hombre, ha sido utilizado para curar enfermedades, dolores y para mejorar el estado de ánimo. Las propiedades, efectos y modo de aplicación de una gran variedad de plantas es conocida y utilizada por la mayoría de culturas pero sus principios activos fueron desconocidos hasta el SXVIII (2). Según la OMS, la medicina tradicional (MT) comprende las prácticas terapéuticas que han existido por lo menos durante cientos de años, antes del desarrollo y la difusión de la medicina moderna y en el día de hoy todavía están en uso. La medicina tradicional es la síntesis de la experiencia terapéutica de las generaciones, estas preparaciones comprenden plantas medicinales, minerales, etc. La evidencia más antigua registrada de su uso data de textos usados por las culturas china, griega, romana, siria, egipcia e india, y se remonta a unos 5000 años. Esto nos indica que la medicina herbaria y los medicamentos tradicionales, se han derivado de las ricas tradiciones de las antiguas civilizaciones (3).

Con el avance de la ciencia y el desconocimiento de los efectos de estas plantas que son ampliamente utilizadas por la población fue consecuente la realización de investigaciones para conocer sus propiedades. De los géneros en este estudio se ha encontrado evidencia en investigaciones sobre cito-genotoxicidad. Se encontró que en el género *Croton*, se ha reportado citotoxicidad in vivo (embriones de pez cebra) e in vitro (linfocitos) de *Croton Malambo* (4), usada comúnmente en nuestro medio. En la Universidad Nacional de Lima, Perú, se llevó a cabo un experimento en el que se evaluó el efecto antitumoral del aceite esencial de *Piper aduncum* (especie utilizada en desordenes gastrointestinales y genitourinarios) in vitro en siete líneas celulares tumorales humanas, este estudio demostró que los aceites esenciales de esta planta presentan citotoxicidad no selectiva, por lo tanto una baja seguridad al consumidor (5). En un estudio preliminar desarrollado en la Universidad del Norte se encontró que *P. marginatum* e *H. suaveolens* presentan moderada citotoxicidad (6).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de la población que vive en áreas rurales de los países en vía de desarrollo depende de la medicina tradicional para sus necesidades de carácter médico humano. En Colombia el crecimiento exponencial de los problemas de salud y los altos costos de los medicamentos sintéticos han llevado a la población a volver a sus raíces, aproximadamente el 40% de la población colombiana recurre a la Medicina tradicional (7), es por esto que el conocimiento sobre plantas medicinales se encuentra en auge, lo que le ha otorgado un lugar importante al momento de dar tratamiento a una enfermedad.

El instituto Humboldt publicó una encuesta en la cual se encontró que de 1.656 plantas medicinales conocidas, solo 206 especies (12,5%) presentan más de tres referencias documentadas en las que se evidencia su uso terapéutico tradicional, mientras que 1.442 (87,5%) especies no presentan este número de registros. Para el caso de las plantas medicinales exclusivas de Colombia, tan solo 5 especies

(2%) tienen 3 referencias de uso terapéutico tradicional, mientras que 208 especies (98%) no lo logran (8). Estos valores nos muestran el alto porcentaje de plantas que son empleadas en el país sin el respaldo de estudios que aprueben la utilización de estas sobre el cuerpo humano, lo que lleva a plantearse regulaciones para la utilización de estas. Actualmente el Instituto Nacional de Vigilancia de Alimentos y Medicamentos (INVIMA) cuenta con un registro de tan sólo 95 especies aprobadas para uso medicinal, de las cuales únicamente 11 son nativas, entre las plantas que se comercializa en el país se encuentran especies relacionadas como: *Croton lechleri*, *Piper aduncum* e *Hyptis capitata* (9). A través de la búsqueda sistemática realizada se llegó a la conclusión que no se encuentra literatura de la cito-genotoxicidad comprobada y establecida en los seres humanos por parte de las familias de plantas que se están valorando.

La importancia de la medicina tradicional ha llamado la atención del sistema de salud del mundo, como ocurrió durante la Conferencia Internacional sobre Medicina Tradicional para los Países de Asia Sudoriental, celebrada en febrero de 2013, la Directora General de la OMS, Dra. Margaret Chan, declaró que “las medicinas tradicionales de calidad, seguridad y eficacia comprobada contribuyen a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud. Para muchos millones de personas los tratamientos tradicionales y los prácticos de las medicinas tradicionales representan la principal fuente de atención sanitaria, y a veces la única. Esta forma de atención está próxima a los hogares, es accesible y asequible. Además, es culturalmente aceptada y en ella confían muchísimas personas. La asequibilidad de la mayor parte de las medicinas tradicionales las hace más atractivas en el contexto del vertiginoso encarecimiento de la atención de salud y de la austeridad casi universal. La medicina tradicional se destaca también como un medio para afrontar el incesante aumento de las enfermedades no transmisibles crónicas” (10).

La Medicina tradicional de calidad, seguridad y eficacia comprobadas contribuye a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud. Se calcula que en el mundo existen más de 450.000 especies vegetales, de las cuales podemos encontrar en Colombia casi 45.000, de estas aproximadamente 5.000 son utilizadas por nuestros indígenas y campesinos para tratar diversas afecciones (2).

Por todo lo anterior la OMS se ha planteado una serie de puntos que ayudarán a promover el uso seguro y eficaz de la Medicina tradicional (11): **a)** Facilita la integración de la medicina tradicional y complementaria (MTC) en los sistemas de salud mediante su apoyo a los Estados Miembros en el desarrollo de sus propias políticas nacionales para ese sector, **b)** Elabora directrices sobre la medicina tradicional y complementaria por medio de la elaboración y el establecimiento de normas, directrices técnicas y metodologías relativas a la investigación de productos, prácticas y profesionales; **c)** Alienta la investigación estratégica en materia de la medicina tradicional y complementaria, para lo cual respalda proyectos de investigación clínica sobre su seguridad y eficacia; **d)** Aboga por el uso racional de la medicina tradicional y complementaria mediante el fomento de

su utilización basada en pruebas científicas; **e)** Difunde información sobre medicina tradicional y complementaria, actuando como centro coordinador para facilitar el intercambio de información. Como objetivo general de nuestro proyecto está evaluar la cito-genotoxicidad *in vitro* en eritrocitos y linfocitos humanos de los extractos de *Croton niveus*, *Piper marginatum* e *Hyptis suaveolens*, y como objetivos específicos están determinar la actividad hemolítica de los extractos de *Croton niveus*, *Piper marginatum* e *Hyptis suaveolens* en eritrocitos humanos, establecer la citotoxicidad de los extractos de *Croton niveus*, *Piper marginatum* e *Hyptis suaveolens* en linfocitos humanos empleando el ensayo de azul tripán, y valorar la genotoxicidad de los extractos de *Croton niveus*, *Piper marginatum* e *Hyptis suaveolens* en linfocitos humanos mediante el test de micronúcleos. Con este proyecto se buscó ampliar la cobertura investigativa sobre la medicina tradicional, avanzar en el campo de estudios en plantas medicinales y extractos utilizados por la población en general, para mejorar la calidad de vida del hombre y poder influenciar, sirviendo de base para futuras investigaciones de la misma área.

Marco Teórico

En Colombia el uso de plantas medicinales sin conocimiento de sus efectos ha generado una gran controversia dentro de la población, lo que ha llevado a la comunidad científica colombiana y al ministerio de medio ambiente a estudiar las plantas de nuestro país. Los estudios se enfatizan en el conocimiento de los componentes químicos de las plantas para conocer los efectos secundarios sobre el cuerpo humano, convirtiendo esta situación en una problemática de la salud pública. Son pocos los estudios que se han realizado sobre los componentes químicos de las plantas, por ejemplo *Momordica charantia L.*, utilizada en la actualidad como antidiurético, antidiabético, purgante y para curar a personas con fiebre y paludismo, debe usarse con sumo cuidado debido a que es altamente tóxica, y puede causar un descenso brusco del contenido de azúcar en sangre y llevar al paciente a un estado de coma (2).

Para empezar a tratar el tema de citogenotoxicidad, que podrían tener los componentes de los tipos de plantas que vamos a estudiar, debemos concretar ciertas definiciones, primero que todo la citotoxicidad es un concepto que se puede aplicar en cualquiera de las siguientes situaciones: muerte celular o alteración de su metabolismo. Existen ensayos útiles para la determinación de la citotoxicidad, que son ampliamente empleados por su bajo costo, fácil cuantificación y reproducibilidad. Gracias a la experimentación y avance tecnológico hemos podido avanzar en este campo investigativo y determinar el potencial citotóxico de los compuestos de las plantas de interés, lo cual podrá tener futuras aplicaciones terapéuticas (12).

Los efectos citotóxicos se relacionan con daño a procesos vitales que desencadenan la activación de vías que llevan a la muerte celular (apoptosis, necrosis, autofagia, piroptosis) (13). Durante este proceso participan proteasas, cinasas y fosfatasa que regulan los diferentes pasos de estas vías, acabando dependiendo de la toxicidad con el número total de eritrocitos, plaquetas, linfocitos, monocitos y granulocitos. La genotoxicidad es la alteración en el ADN que en gran parte se genera por agentes naturales y sintéticos los cuales inducen a cambios en la estructura y por ende en la información contenida en la molécula (mutación). El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula conformada por dos cadenas de nucleótidos entrelazados que forman una doble hélice. El ADN contiene la información que codifica y determina la expresión de las proteínas del cuerpo (14).

La mutagénesis (generación de cambios en el ADN) puede afectar células somáticas o germinales. En las células somáticas (cualquier célula del cuerpo) o en células germinales (como ovulo o espermatozoide) la mutación puede transmitirse por división celular ocasionando degeneraciones, como cáncer, o muerte celular (apoptosis) (15).

Un ejemplo, es la planta *Croton lechleri* la cual posee actividad antitumoral en aplicación de gotas. Esto es gracias a que los extractos de la corteza y la savia seca presentan actividad citotóxica al tener la capacidad de inhibir la síntesis de ADN en células endoteliales. En un estudio posterior se demostró por medio de un ensayo *in vitro* realizado en células HCT116 de cáncer de colon el fuerte efecto en el clivaje de una caspasa endógena por la taspina proveniente de *Croton lechleri* a una concentración de 10 mM, esto induce la transformación a la forma activa de las proteínas proapoptóticas, la liberación de citocromo C y el aumento en la permeabilidad de las membranas mitocondriales de las células HCT116. El mismo autor demostró que el efecto citotóxico de la taspina se debe a que es un inhibidor de las enzimas topoisomerasa I y II y que en contraste a los inhibidores exclusivos de la topoisomerasa II como la doxorubicina, el etopósido y la motoxantrona, la taspina es citotóxica en líneas celulares que sobreexpresan los transportadores de drogas PgP o MRP. En ensayos *in vivo* en ratones Fayad demostró que la taspina de la planta *Croton lechleri* induce con un amplio espectro la apoptosis en células de carcinoma de colón (16).

En nuestro estudio para evaluar y cuantificar la posible citotoxicidad en linfocitos y eritrocitos principalmente empleamos la medida de concentración letal 50 (CL₅₀), esta es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los individuos expuestos a dicha sustancia durante un período determinado. El valor de la CL₅₀ se expresa en miligramos por litro (mg/L) o (mg/LKg) (17).

Las concentraciones deben tener una cantidad suficiente del extracto de la planta que se va a estudiar, para que se pueda cuantificar la variedad de efectos tóxicos y las tasas de mortalidad celular, si en dicho caso lo hay. Los resultados deben ser suficientes para que se pueda trazar una curva concentración/mortalidad y, si fuera posible, permitir una determinación válida de la CL₅₀ (18).

Debido a la exposición con los principios activos de las plantas existe la posibilidad de que la integridad genética se encuentre comprometida, es por esto que el ensayo de genotoxicidad consiste en la detección del número de micronúcleos para evaluar la inestabilidad genética inducida por estos agentes durante la fase de citocinesis (paso final en el proceso de mitosis donde ocurre la división del citoplasma).

Los modelos experimentales empleados para valorar la toxicidad de compuestos químicos se fundamentan en el sustrato biológico y en los indicadores de toxicidad. El sustrato es el material orgánico sobre el que se aplica un xenobiótico, mientras que los indicadores de toxicidad son los parámetros que permiten determinar las alteraciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato de ensayo (18).

Las diferentes metodologías que permiten la evaluación de extractos naturales en cultivos celulares han tenido un amplio desarrollo en las ciencias médicas, siendo un sistema efectivo para la evaluación de la toxicidad de rutina de muchos compuestos y elemento valioso para determinar el impacto en efectos sobre la proliferación celular, citotoxicidad y efectos antioxidantes. Si bien es cierto que el uso de animales es aún imprescindible para algunos tipos de experimentación en el área de las ciencias de la salud, particularmente los efectos de toxicidad crónica, hay muchas situaciones en las que la metodología *in vitro* pueden sustituir eficientemente los estudios *in vivo*, como es en el caso de este estudio. Se han realizado trabajos de validación que han demostrado que existe una alta correlación entre los ensayos de toxicidad (19).

Los modelos *in vivo* son preferidos sobre los modelos *in vitro* debido a que son más aproximados en cuanto a las condiciones en que se presenta y los resultados en organismos vivos, pero existen resultados que demuestran que el modelo *in vitro* es más concluyente que el *in vivo*. Tal lo demuestra el estudio realizado por el Dr. Ricardo González sobre la genotoxicidad del ozono, un gas que hace parte de nuestra atmosfera. En el modelo *in vitro* se demostró que O₃ induce daño en el ADN en leucocitos humanos de sangre periférica y que el daño fundamental es por rotura de la cadena del ADN mediada por la formación de H₂O₂. En cambio el modelo *in vivo* en animales de laboratorio a los que se les administró el O₃ inhalado, intramuscular, intraperitoneal, intratesticular e intrarrectal, en su mayoría han mostrado resultados negativos (20).

Por otra parte, el estudio de poblaciones celulares diferenciadas terminalmente permite hacer estudios sobre fenotipos particulares y establece el primer acercamiento hacia efectos selectivos. Estas pruebas son relativamente simples, rápidas y de bajo costo, proporcionando una evaluación valiosa sobre las sustancias que deberían ser descartadas o sujetas a caracterización posterior. De esta manera el aislamiento, propagación y caracterización de poblaciones celulares se destaca como la principal metodología para iniciar la caracterización *in vitro* de compuestos bioactivos (21).

Las plantas que se investigaron en este estudio son *Hyptis suaveolens*, *Piper marginatum* y *Croton niveus*.

HYPTIS

Hyptis es un género con 694 especies de plantas con flores pertenecientes a la familia Lamiaceae. Son usadas en la medicina tradicional para la diarrea, disentería y el dolor estomacal. Es el segundo género en importancia en el país, cuenta con 35 taxones y se distribuye primordialmente en la planicie orinocense pero cuenta con un grupo de especies en ambientes inestables o alterados en todo el país (22).

Hyptis suaveolens (llamada popularmente confitura, confiturilla, chan, salvia blanca) es conocida por su uso en medicina tradicional en el tratamiento de

inflamaciones, ulcera gástrica, gastritis e infecciones, su aceite esencial posee propiedades insecticidas y larvicidas (23).

Un estudio llevado a cabo en la Universidad autónoma de Morelos, México, estableció condiciones de cultivo adecuadas para la propagación *in vitro* de plantas y callos de *H. suaveolens*. En los extractos de raíces y partes aéreas se detectó la presencia de podofilotoxina que fue 3 veces mayor en las raíces. Estos cultivos presentaron una actividad citotóxica importante (24).

PIPER

El género *Piper* pertenece a la familia Piperaceae y comprende más de 1.200 especies, ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo (25), la gran mayoría de las cuales se encuentran en los trópicos de América (> 700 especies), seguido por las del Sur de Asia (> 300 especies), donde tiene especial importancia económica y comercial *Piper nigrum* (pimienta negra), *P. betle*, *P. officinarum*, *P. longum*, *P. cubeba*. Las especies de este género presentan propiedades insecticidas y repelentes por la presencia de aceites esenciales y piperamidas. (26). En particular, *Piper auritum* Kunth, conocida como Hoja Santa, acuyo o mumo (27), es una especie aromática originaria de México y distribuida hasta Colombia.

Piplartine es un componente alcaloide presente en las especies de *Piper*. Este metabolito secundario tiene significativa actividad citotóxica contra líneas de células tumorales, especialmente líneas celulares de leucemia humana, tales como HL-60, K562, Jurkat y Molt-4, así como antifúngico, antiagregación plaquetaria, ansiolítico y propiedades antidepresivas. Esta molécula fue aislada de *Piper tuberculatum*. Piplartine también ha sido estudiado por su genotoxicidad y la inducción de apoptosis en las células por V79 y su potencial mutagénico y recombinogénico en *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de la cerveza) (28). Piplartine ha mostrado citotoxicidad en cultivos de *S. cerevisiae*, ya sea en fase de crecimiento estacionario o exponencial. El tratamiento con Piplartine también ha inducido hebras rotas de ADN en células V79. En el análisis del ciclo celular, ha inducido detención del ciclo celular, probablemente como consecuencia del daño en el ADN. Por otra parte, también ha demostrado apoptosis dependiente de la dosis, como se observa por una disminución en el potencial de membrana mitocondrial y un aumento de la fragmentación del ADN internucleosomal (29).

Estudios farmacológicos del Hexano (extracto de hojas de *Piper truncatum*) han reportado efectos relajantes sobre los músculos lisos vasculares y traqueales. Muchos estudios han demostrado su amplia gama de actividades biológicas, incluyendo citotóxico, antibacteriano, antifúngico y efectos inhibidores sobre la producción del factor de necrosis tumoral-alfa (30). En la medicina popular brasileña, extractos de esta especie se utilizan para reducir la presión arterial.

Un estudio realizado con los extractos de 5 plantas colombianas sobre espermatozoides humanos se demostró que *Piper subpedale* presenta actividad espermicida, esta disminuye la movilidad espermática.

Durante el contacto con el extracto se mostraba que a los 5 minutos había un efecto reversible pero después de 10 minutos los espermatozoides se volvían completamente inmóviles (31).

CROTON

El género *Croton* pertenece a la familia Euphorbiaceae, comprende más de 1200 especies que se distribuyen en zonas tropicales y subtropicales. Suele usarse en medicina tradicional para el tratamiento del dolor de estómago e hipertensión (*C. schiedeanus*), como cicatrizante (*C. lechleri*) y para la malaria y fiebre amarilla (*C. leptostachyus*) (32). *C. tiglium* es una de las especies más tóxicas, el consumo de apenas 4 semillas puede producir diarrea sanguinolenta, gastroenteritis, cianosis, delirio y dificultad respiratoria en humanos; el aceite que posee esta semilla es considerado protumoral (33). Aunque no se encuentra documentado científicamente, empíricamente se habla de que el aceite de las semillas de *C. hirtus* causa irritación en la mucosa oral y las vías digestivas.

Se han reportado casos de hepatitis tóxica en varios hospitales de Belem, Brasil, debido al consumo en exceso del té de corteza y hojas de *Croton cajucara* cuyo propósito inicial era disminuir los niveles de glicemia (34).

En Maracaibo, Venezuela, se llevó a cabo un estudio que obtuvo como resultado que el extracto acuoso de *Croton pungens* posee una baja toxicidad aguda pero cuando fue administrado en forma subcrónica produjo alteraciones histológicas en los tejidos hepáticos, cardíacos y pancreáticos de animales experimentales (35).

La mayoría de las Euphorbiaceae contienen un látex blanco, muy venenoso que rebosa cuando se corta una rama o una hoja. Este látex está compuesto de agua, gránulos de almidón, alcaloides, enzimas, sustancias proteicas, resinas y gomas (36). Se ha evidenciado que el contacto directo entre animales y el látex de la planta puede provocar dermatitis con irritación, enrojecimiento y posible aparición de vesículas o ampollas; tras la ingestión de éstas se puede presentar ardor bucal, salivación excesiva, dificultad para deglutir, inflamación de lengua, esófago y estómago, de igual forma se ha establecido que puede producir dermatitis por contacto en seres humanos (37,38).

En la savia producida por la planta Mata de drago del género *Croton* evaluada por medio del método cometa y el ensayo de micronúcleos en ratones sometidos al tratamiento, se encontró efectos genotóxicos sobre células hepáticas y clastogénico en células de médula ósea de ratones a dosis muy elevadas (39).

Aspectos Metodológicos

Tipo de Estudio

El tipo de estudio es un diseño experimental. Se desarrollaron 3 experimentos, en los cuales estimamos la capacidad hemolítica, citotóxica y genotóxica de tres especies de plantas. La actividad hemolítica fue evaluada para las tres especies de plantas, la citotoxicidad y la genotoxicidad fue evaluada solo en *Piper marginatum*, para ello utilizamos los extractos de las hojas a diferentes concentraciones y las células sobre las cuales medimos los daños, que en este caso son eritrocitos y linfocitos. Cada ensayo se realizó por triplicado para tener mayor certeza en los resultados. La hemólisis se evaluó por medio de espectrofotometría, la citotoxicidad sobre linfocitos por exclusión de azul tripán y la genotoxicidad mediante el ensayo de naranja acridina con bromuro de etidio. Los extractos que utilizamos fueron aportados por el Laboratorio de Química de la Universidad del Norte.

Descripción de Procedimiento

Se emplearon glóbulos rojos y linfocitos obtenidos de 5 personas sanas de 18-30 años, quienes libremente consintieron la extracción de una muestra de aproximadamente 5ml de sangre, dicha extracción se llevó a cabo bajo todas las normas de bioseguridad pertinentes, las muestras se sometieron a cada una de las técnicas que establecen los protocolos que utilizamos para cumplir con el objetivo de esta investigación. El remanente de las muestras fue descartado de acuerdo a las normas de bioseguridad del laboratorio.

Para determinar la actividad hemolítica seguimos los pasos descritos en el **Anexo A**. Primero separamos los eritrocitos del resto de los componentes sanguíneos (plasma y leucocitos), preparamos una suspensión de glóbulos rojos de la cual adicionamos 100 μL a 100 μL de una muestra de los extractos, dejamos esto en incubación a 37 °C durante 30 minutos, centrifugamos y luego tomamos 100 μL de líquido sobrenadante, al cual le medimos la absorbancia a 540 nm, en un lector multipozo FLUOstar Omega, de esta manera medimos la absorbancia de la hemoglobina libre en el sobrenadante y determinamos el porcentaje de hemólisis. Para la evaluación de la citotoxicidad sobre linfocitos separamos éstos del resto de componente de la sangre mediante la separación de fases por gradientes de densidad, esta técnica se describe paso a paso en el **Anexo B**. Cuando tenemos listos los linfocitos tomamos una alícuota de suspensión celular y la llevamos a la concentración deseada del extracto que vamos testeamos, hasta tener un volumen final de 100 μL , incubamos por 30 min - 24 horas. Luego se extrajeron 50 μL de la suspensión y se mezcló con 50 μL de Azul tripán 0,4 %, llevamos 10 μL a la cámara de Neubauer para poder contar el número de células muertas (azules) y vivas (blancas), de esta manera obtuvimos el porcentaje de vitalidad (**Anexo C**).

Para el ensayo de genotoxicidad seguiremos los pasos descritos en el **Anexo D**. Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas

idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario, este se denomina “micronúcleo” (MN), visible fácilmente al microscopio óptico. El ensayo citogenético para la detección de micronúcleos (CBMN: *cytokinesis-block micronucleus*) se basa en la utilización de un agente químico, denominado citocalasina-B capaz de impedir la citocinesis permitiendo la división nuclear, proporcionando a las células un aspecto de células binucleadas monodividas. El recuento de micronúcleos se realiza sobre 1.000 células binucleadas y la muestra de partida puede variar aunque lo óptimo es el uso de linfocitos aislados de sangre periférica. Esta prueba es capaz de detectar rotura o pérdida cromosómica. Este último protocolo mencionado con anterioridad no fue realizado, se decidió cambiar por el ensayo de naranja acridina con bromuro de etidio (**Anexo E**) por ser un método más práctico y conveniente por el tiempo corto que teníamos para realizar las pruebas de investigación.

Validez y confiabilidad

Los protocolos han sido validados por la comunidad científica de la Universidad del Norte y utilizados ampliamente por los mismos. El ensayo de micronúcleos está considerado como un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. Actualmente se encuentra en gran auge dada su utilización en líneas de investigación sobre mutagénesis, para conocer *in vitro* el efecto genotóxico de nuevos agentes químicos tanto a nivel ambiental con nuevos plaguicidas y pesticidas, como en el ámbito sanitario con la utilización de nuevas drogas citostáticas en los tratamientos antitumorales (40).

El ensayo de naranja de acridina con bromuro de etidio se utiliza para visualizar cambios nucleares y formación de cuerpos apoptóticos (41). Los linfocitos se observan bajo un microscopio de fluorescencia y se cuentan para cuantificar la apoptosis, método que tiene igual eficacia que la técnica de micronúcleo pero con la diferencia que en el ensayo de naranja de acridina se pueden procesar muchas más muestras en menor tiempo aspecto que fue mucho más conveniente para nosotros en este trabajo (42).

Resultados

TABLA 1. PROMEDIO DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE *Piper marginatum*.

<i>P. marginatum</i>	
ppm	Medias y DS
1000	75±4
900	63±2
800	52±7
700	27±4
600	22±0
500	12±3

*Se muestra la actividad hemolítica a diferentes concentraciones del EE de *P. marginatum* con sus respectivas desviaciones estándar, podemos observar que a 1000 ppm se encuentra el valor más alto (75±4) y a 500 ppm el valor menor (12±3).

TABLA 2. PORCENTAJE DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE *Croton niveus*.

<i>C. niveus</i>	
ppm	Medias y DS
1000	45±9
850	14±2
700	15±3
550	10±2
400	5±1
250	8±1

*Se muestra la actividad hemolítica a diferentes concentraciones del EE de *C. niveus* con sus respectivas desviaciones estándar, podemos observar que a 1000 ppm se encuentra el valor más alto (45±9) y a 250 ppm el valor menor (8±1).

TABLA 3. PORCENTAJE DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE *Hyptis suaveolens*.

<i>H. suaveolens</i>	
ppm	Media y DS
1000	86±10
500	32±28
250	8±2
125	3±2
63	2±2
31	3±3

*Se muestra la actividad hemolítica a diferentes concentraciones del EE de *H. suaveolens* con sus respectivas desviaciones estándar, podemos observar que a 1000 ppm se encuentra el valor más alto (86±10) y a 31 ppm el valor menor (3±3).

TABLA 4. CONCENTRACIÓN LETAL 50 DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS ETANÓLICOS UTILIZADOS.

Extracto Etanólico	CH50%
<i>P. marginatum</i>	811±5
<i>H. suaveolens</i>	643±44
<i>C. niveus</i>	45±9 -1000 ppm

*Se muestran las CH₅₀ de los extractos etanólicos utilizados. No fue posible evidenciar la CH₅₀ para el EE de *C. niveus* ya que utilizando la concentración máxima no se lograba la hemólisis de por lo menos el 50% de los eritrocitos presentes en la muestra.

TABLA 5. CITOTOXICIDAD EN LINFOCITOS HUMANOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Piper marginatum*.

Concentración (ppm)	Vitalidad
1000	0
500	0
250	10±6
125	87±10
65,7	98±1
Control 0	94±5
DMSO 1%	96±2
H ₂ O ₂ 7,5	0±0

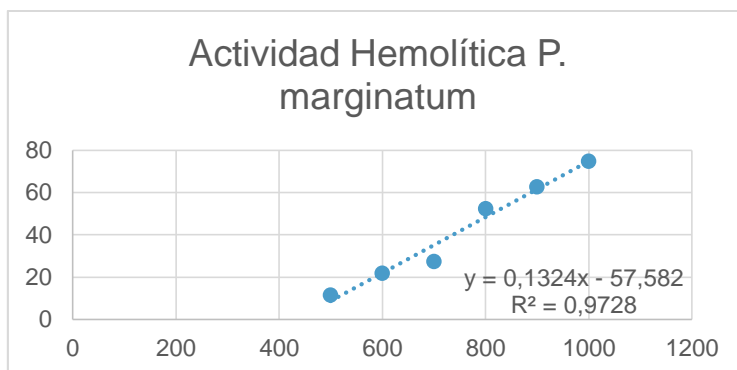
*Se observan las diferentes concentraciones de *Piper marginatum* vs el control negativo (DMSO 1%) que muestra 96±2 % de vitalidad, para una concentración de 65,7 ppm un 98±1 % de vitalidad, valor máximo de la tabla, para una concentración de 250 ppm un 10±6 % de vitalidad celular, y valores de 0% de vitalidad para las concentraciones de 500 y 1000, siendo los valores mínimos de la tabla.

TABLA 6. CONCENTRACIONES DE CL50 EN LINFOCITOS HUMANOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Piper marginatum*.

REPLICAS	CL50
R1	183
R2	192
R3	183
R4	176
R5	163
R6	163
R7	177
R8	186
Media	178
SD	12
%CV	7

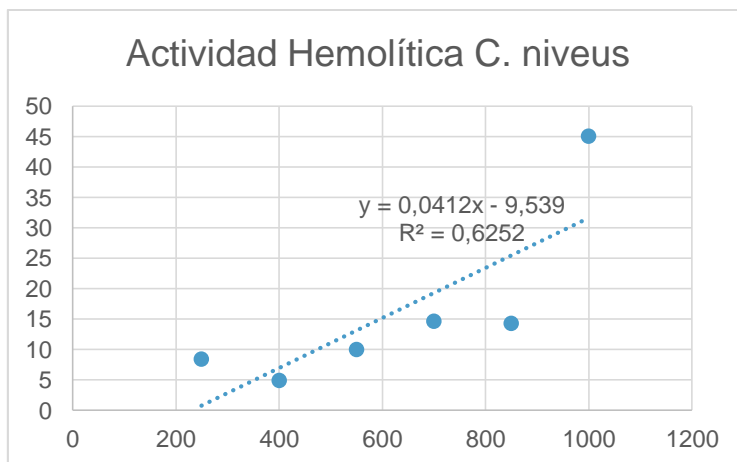
*Concentración letal media (CL50) calculada para linfocitos humanos con un valor máximo de CL50 igual a 192 en la réplica #2, y un valor mínimo de CL50 igual a 163 en la réplica # 5 y #6. Con una media de 178 promediando todos los valor de CL50 en todas las réplicas utilizadas en este ensayo.

FIGURA 1. CORRELACION ENTRE LA VITALIDAD Y LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *P. marginatum*.



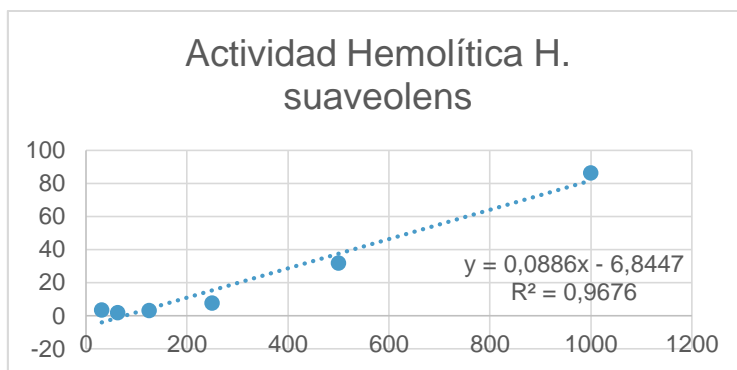
*La gráfica muestra una correlación positiva ($R=0,972$) entre la concentración del EE de *P. marginatum* y la actividad hemolítica del extracto.

FIGURA 2. CORRELACION ENTRE LA VITALIDAD Y LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *C. niveus*.



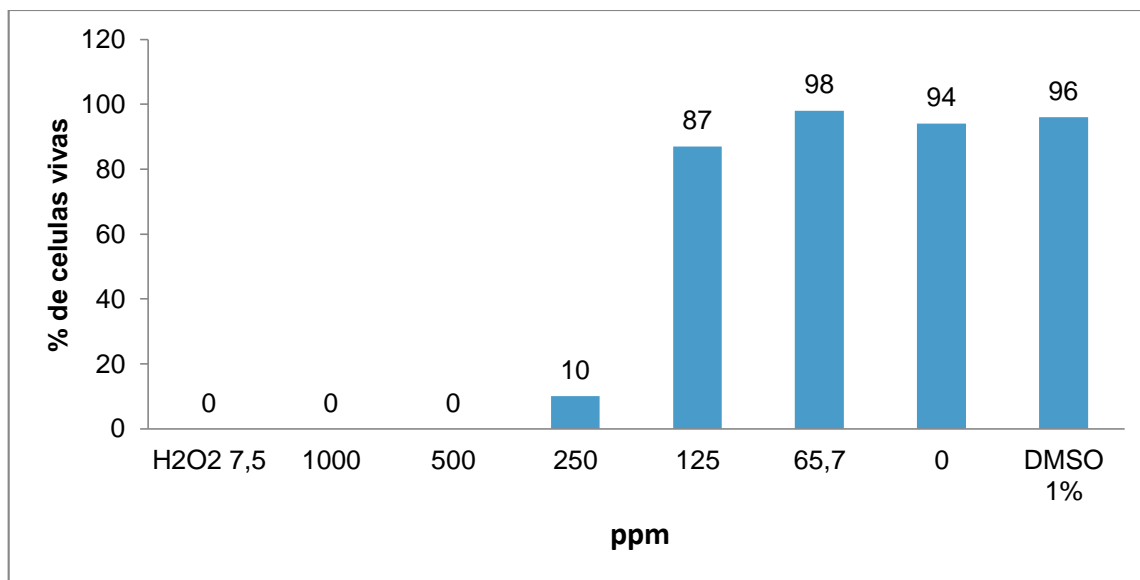
*La gráfica muestra una correlación positiva ($R= 0,625$) entre la concentración del EE de *C. niveus* y la actividad hemolítica del extracto.

FIGURA 3. CORRELACION ENTRE LA VITALIDAD Y LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *H. suaveolens*.



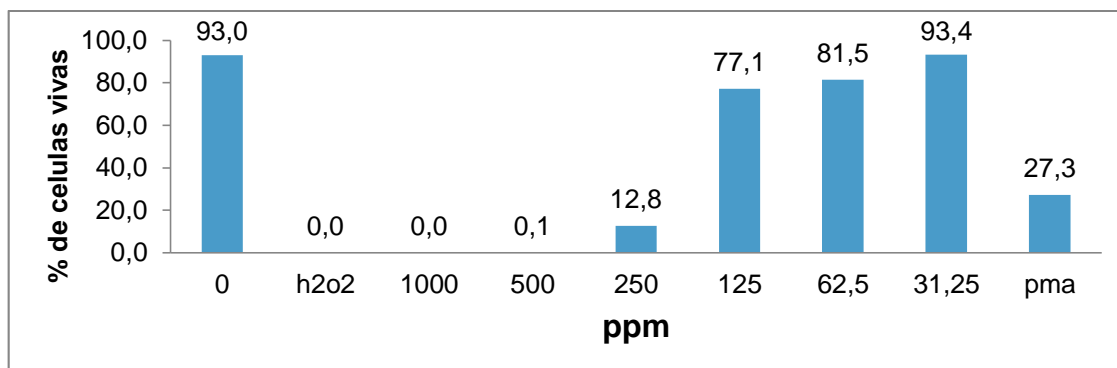
*La gráfica muestra una correlación positiva ($R = 0,967$) entre la concentración del EE de *H. suaveolens* y la actividad hemolítica del extracto.

FIGURA 4. PORCENTAJES DE VIABILIDAD CELULAR DE LINFOCITOS HUMANOS EN EXTRACTO ETANÓLICO DE *Piper marginatum*.



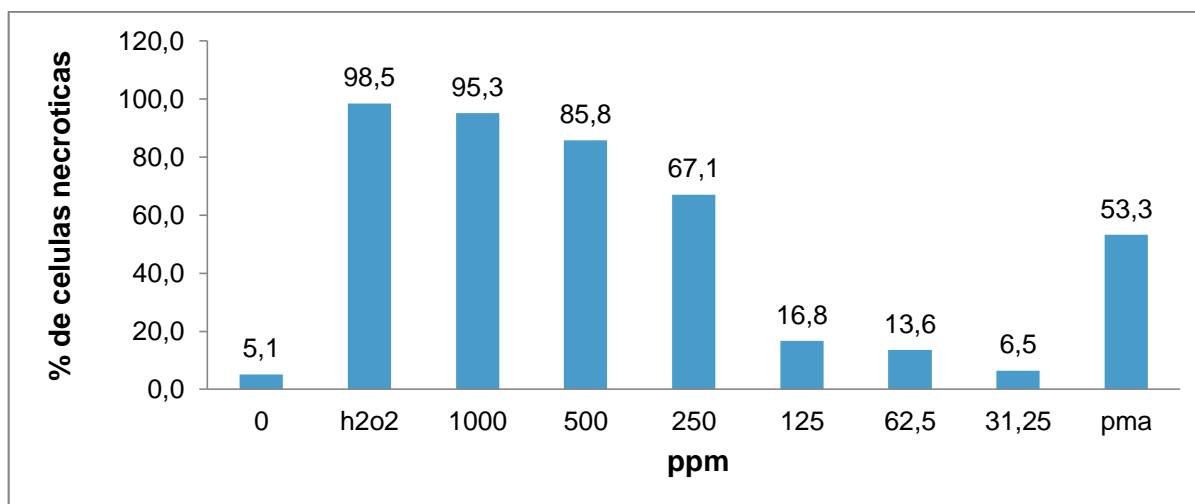
*A distintas concentraciones del extracto etanólico de *Piper marginatum* se evidencian los diferentes porcentajes de vitalidad celular (citotoxicidad), en la gráfica podemos apreciar el máximo valor de vitalidad de 98% a una concentración de 65,7 ppm, y un valor de 0% de vitalidad a concentraciones de 500 y 1000 ppm (Representación gráfica de Tabla 5).

FIGURA 5. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIVAS EN EL ENSAYO DE GENOTOXICIDAD PARA EL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Piper marginatum*.



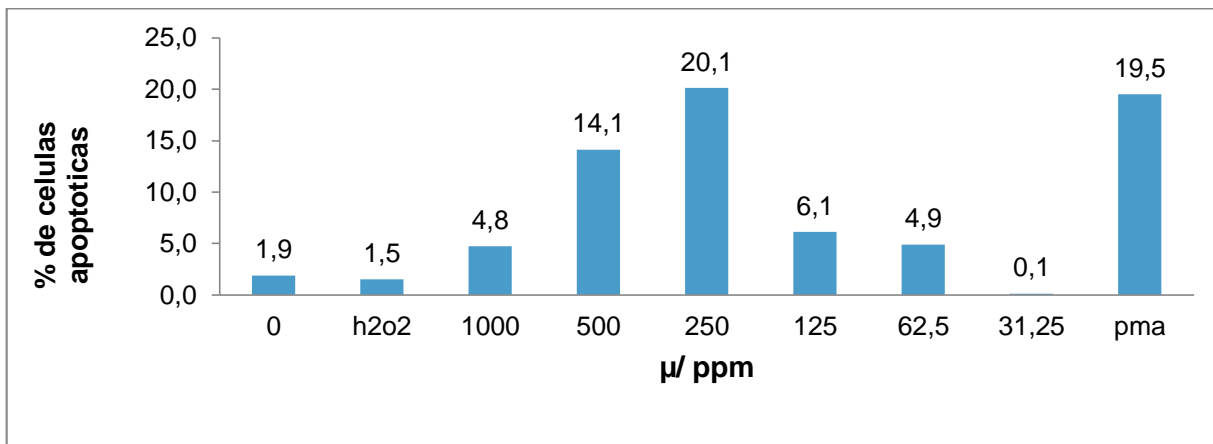
*Variabilidad de porcentajes de células linfocitarias humanas vivas a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Piper marginatum*, con un valor máximo de genotoxicidad del 0% en la concentración a 500 y 1000 ppm, y un valor mínimo de genotoxicidad de 93,4% de vitalidad celular a una concentración de 31,25 ppm del extracto.

FIGURA 6. PORCENTAJE DE CÉLULAS NECRÓTICAS EN EL ENSAYO DE GENOTOXICIDAD PARA EL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Piper marginatum*.



*Variabilidad de porcentajes de células linfocitarias humanas necróticas a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Piper marginatum*, con un valor máximo de genotoxicidad del 95,3% en la concentración a 1000 ppm, y un valor mínimo de genotoxicidad de 6,5% a una concentración de 31,25 ppm del extracto.

FIGURA 7. PORCENTAJE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS EN EL ENSAYO DE GENOTOXICIDAD PARA EL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Piper marginatum*.



*Variabilidad de porcentajes de células linfocitarias humanas apoptóticas a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Piper marginatum*, con un valor máximo de genotoxicidad del 20,1% en la concentración a 250 ppm, y un valor mínimo de genotoxicidad de 0,1% a una concentración de 31,25 ppm del extracto.

Discusión

Cuando el ser humano utiliza un producto común como las cremas dentales o está expuesto a factores externos como la contaminación ambiental existe la necesidad de conocer que aquello con lo cual nos exponemos es un agente seguro para nosotros. La mejor manera para conocer si un agente es dañino es midiendo las capacidad de daño que éste tiene a nivel celular mediante métodos como los utilizados en este estudio, los cuales son ampliamente conocidos y utilizados con dicho objetivo, anteriormente mencionado. Al trabajar con la exposición de un agente a una o varias concentraciones podemos obtener resultados de cuál es el nivel de daño cuando cambia la concentración, esto es con el objetivo de conocer el rango donde estos compuestos empiezan a ser un peligro para la vida.

Existe poca información sobre las plantas evaluadas para poder generar un punto de comparación debido a que sus efectos se estudian en líneas celulares diferentes como células embrionarias o se emplean con otros métodos como bactericidas. De los estudio que se encuentran descritos se encuentra uno realizado en la universidad del Norte donde se evaluó la capacidad citotóxica de los extractos etanólicos de *Piper marginatum*, *Hyptis suaveolens* y *Croton niveus* (43); como resultado se obtuvo que el extracto de *Piper marginatum* es una sustancia moderadamente toxica con un CL_{50} de 458 ± 40 Ug/ml. Nuestro experimento demostró que la concentración letal 50 mostro que la CL era de 178 Ug/ml, en comparación con el anterior se va una notable diferencia pero sigue siendo un compuesto calificado por su toxicidad moderada. Un estudio similar pero con una planta del mismo género de *Piper (Anduncum)* (43) mostro actividad citotóxica leve en línea celular tumoral con concentraciones por debajo de 250 Ug/ml. Los valores de *Piper marginatum* muestran una citotoxicidad moderada debido a que CL_{50} se encuentra entre 100 y 1000 Ug/ml.

Conclusiones

Como conclusión se espera que a futuro se logre ampliar la información sobre medicina tradicional y la fitología que actualmente es realmente escasa, seguir avanzando en las futuras investigaciones utilizando como base y ayuda los resultados arrojados en este estudio.

En cuanto a la actividad hemolítica se observó un aumento de esta, a medida que aumenta la concentración de los extractos evaluados. La especie que mostró el mayor grado de hemólisis fue *Piper marginatum* a las concentraciones más bajas.

De acuerdo al ensayo de citotoxicidad en linfocitos humanos se observó una disminución de la viabilidad celular en función del aumento de la concentración del extracto de *Piper marginatum*. La actividad citotóxica del extracto de *Piper marginatum* se puede considerar moderada ya que el valor promedio de la CL50 fue 178 ppm.

Según el ensayo de genotoxicidad realizado, se observó un mayor efecto necrótico que apoptótico del extracto de *Piper marginatum*. Sin embargo, es posible que por ser un análisis visual se puedan confundir unas células con otras.

Recomendaciones

Se tomó la decisión de realizar el ensayo de naranja acridina con bromuro de etidio para evaluar la genotoxicidad por ser más rápido ya que se requiere analizar un menor número de células y porque permite determinar la presencia de necrosis celular. Igualmente, realizar solo el ensayo de azul de tripán para evaluar la citotoxicidad del extracto de *Piper marginatum* en linfocitos humanos por ser la especie cuyo extracto mostró la menor actividad hemolítica. Por ello, se recomienda continuar con las investigaciones y realizar los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad para los extractos de *Croton niveus* e *Hyptis suaveolens*, así como realizar un mayor número de réplicas que permitan obtener resultados con mayor grado de confiabilidad. También, se recomienda realizar para el extracto de *Piper marginatum* el ensayo de genotoxicidad del “ADN en escalera” para corroborar los resultados obtenidos en este trabajo. Por último, se sugiere, con base en los resultados y conclusiones reportados en este trabajo, realizar ensayos de cito-genotoxicidad en líneas tumorales como HEM2 y MCF7, entre otras.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Suwalsky M, Villena F, Gallardo MJ. (2015). *Biochimica et Biophysica Acta*, **1848**, 76-82.
- (2) Fonnegra R, Jiménez SL. Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia. 2da ed. Editorial Universidad de Antioquia; 2007.
- (3) Kamboj VP (2000). Herbal Medicine. *Current Science*, 78, 35-9
- (4) Muñoz A, Puerto C, Rodríguez J, et al. Estudio químico-biológico de los aceites esenciales de *Croton malambo* H. Karst y su componente mayoritario, metileugenol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 13, núm. 4, 2014, pp. 336-343.
- (5) Arroyo J, Herrera-Calderón O, Chávez-Asmat R, et al. Efecto antitumoral in vitro del aceite esencial de *Piper aduncum* L. (matico) y su toxicidad oral en ratones. *An Fac med.* 2014, 75 (1):8-13.
- (6) Méndez A, Molina A, Aristizabal S, Yamaguchi L, Kato M, Muñoz A. Análisis por HPLC/DAD/ESI/MS/TOF y estimación de las capacidades antioxidantes y citotóxicas de los extractos etanólicos de hojas de *Croton niveus* Jacq., *Piper marginatum* Jacq. E *Hyptis suaveolens* (L.). *REVISTA PRODUCTOS NATURALES* ISSN 1916-2413. (2014) Volumen 4, Número 1
- (7) Organización mundial de la salud. 1. Who.int. [Artículo de internet]. Disponible en: http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA56/sa5618.pdf [Citado 17 de Mayo 2015].
- (8) Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial e instituto de investigación de recursos biológicos Humboldt. Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia. 2011 [Artículo de internet]. Disponible en: <http://www.asonatura.com/files/PautasparaelconocimientoconservacionyusosostenibledelasplantasmedicinalesnativasdeColombia.pdf> [Citado 17 Mayo 2015].
- (9) Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt Biocomercio Sostenible. ENCUESTA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS UNA APROXIMACIÓN AL MERCADO DE LAS PMYA EN COLOMBIA. [Artículo de internet]. [Citado 12/04/2015]. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/Comercio.pdfaw>.
- (10) Icurso de la Directora General de la OMS, Dra. Margaret Chan, en la Conferencia Internacional sobre Medicina Tradicional en los países de Asia Sudoriental. Nueva Delhi (India), 12 a 14 de febrero de 2013.
- (11) Gómez-Estrada et al.: Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 0117:27
- (12) Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. 2013
- (13) Freshney RI. (2000). *Culture of animal cell. A manual of basic technique.* New York: Jhon Wiley and Sons Inc.
- (14) Fink, S.L., Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 7, 1907-1916. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>.

- (15) Griffiths, Gelbart, Miller, Lewontin, (2000) Lección 7. Genotoxicidad: mutagénesis y carcinogénesis.
- (16) Teaf C, Middendorf P (2000). Mutagenesis and Genetic Toxicology. En P. L. Williams, R. C. James & S. M. Roberts (Eds.), *Principles of toxicology: Environmental and industrial applications* (pp 239 - 265). New York: John Wiley & Sons, Inc.
- (17) Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial 2011 e instituto de investigación de recursos biológicos alexander von humboldt. 1. Asonaturacom. [Artículo de internet]. Disponible en: [http://www.asonatura.com/files/PautasparaelconocimientoconservacionyusostenibledelasplantasmedicinalesnativasdeColombia.pdf](http://www.asonatura.com/files/PautasparaelconocimientoconservacionyusosostenibledelasplantasmedicinalesnativasdeColombia.pdf) [Citado 17 Mayo 2015].
- (18) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods - OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (19) Reppeto GRM. (1995). Métodos alternativos: Estudios toxicológicos in vitro. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- (20) Organización Panamericana de la Salud - Medicina tradicional 2005.
- (21) Scielo. . Scielo.sld.cu. [Artículo de internet]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002004000300008> [Citado 17 Mayo 2015].
- (22) Acevedo Fernández J, Angeles Chimal J, Rivera H.M, Petricevich López, V.L., Nolasco Quintana, N.Y., Collí Magaña, D.Y. & Santa-Olalla Tapia, J. (2013). Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 29-82). Barcelona: OmniaScience.
- (23) Fernández-Alonso J. Estudios en Labiatae de Colombia I. Novedades en los géneros *Salvia* e *Hyptis*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 1995; 19 (74): 469-480.
- (24) Jesus N, Falcao H, Lima G, Caldas Filho M, Sales I, Gomes I, et al. *Hyptis suaveolens* (L.) (Lamiaceae), medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. 2013; Vol 150: 982-988.
- (25) Veloz R, Rodríguez V, Rodríguez M, Villarreal M. Estudio Biotecnológico de Lignanos citotóxicos de la especie mexicana *Hyptis Suaveolens*. 2009.
- (26) Soltis P, Soltis D, Chase M. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. Nature. 1999, 402, 402-404.
- (27) Scott I, Jensen H, Philogene B, Arnason. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. Phytochemistry Reviews, January 2008, Volume 7, Issue 1, pp 65-75.
- (28) Maldonado A, Ortiz S, Dorado R. Preparados galénicos e imágenes de plantas medicinales. CEAMISH UAEM. México, 2004; 24.
- (29) Chahal J, Ohlyan R, Kandale A, Walia A, Puri S. Introduction, Phytochemistry, Traditional uses and Biological Activity of Genus Piper: A review. IJCP, Volume 2, Issue 2, May – July 2011.

- (30) Sunila E, Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 90, 339–346.
- (31) Elfahmi A, Komar Ruslan B, Sieb B. Lignan profile of Piper cubeba, an Indonesian medicinal plant, Biochemical Systematics and Ecology, 2007,35, 397- 402.
- (32) Ginet G, Dubier H, Luisa O, Angela A, Victor A, et al. Efecto de cinco extractos de plantas Colombianas sobre espermatozoides humanos. PLA. 2011; 17:1-12.
- (33) Garavito G, Rincon J, Arteaga L, Hata Y, Bourdy G, Gimenez A, et al. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 2006; 107: 460-2.
- (34) Díaz González G. Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia. Primera ed. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia; 2010.
- (35) Maciel M, Pinto A, Brabo S, Arruda A. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. Rev. bras. farmacogn. vol.17 no.4 João Pessoa Oct./Dec. 2007. [Citado el 10 de Abril de 2015] Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2007000400008&script=sci_ar_text
- (36) Torrico F, Ramos K, Morales A, Guarirapa L, Cando A, Guerrero G, et al. Evaluación de la toxicidad aguda, actividad analgésica e hipoglicemiante del extracto acuoso de *Croton pungens* en animales experimentales. Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences, at the Universidad del Zulia, Volume 21 N° 4, October - December 2013. Disponible en: <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/viewFile/18744/18728>
- (37) Herbario Virtual José Celestino Mutis [Internet]. Bogotá. [Citado el 10 de Abril de 2015]. Disponible en: http://aplicaciones2.colombiaaprende.edu.co/concursos/expediciones_botanicas/ver_herbarios_p.php?id=224&id_p=988
- (38) Mundo Animalia. [Citado el 10 de Abril de 2015]. Disponible en: http://www.mundoanimalia.com/articulo/Plantas_toxicas_para_nuestras_mascotas
- (39) Morton JF. 1962. Ornamental plants with toxic and or irritant properties. II Proc Fla State Hortic Soc 75: 484– 491
- (40) Maistro E, Ganthous G, Da Silva M, Zermiani T, Faloni S, et al. Dragon's blood *Croton palanostigma* induces genotoxic effects in mice. Journal of Ethnopharmacology, 2013. 147, 2, 406-411, ISSN 0378-8741, 10.1016/j.jep.2013.03.026
- (41) Kirsch-Volders M, Fenech M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. Mutagenesis 2001; 16: 51-58.

- (42) Shohreh N, Ali Akbar S, Nahid K, Jean-Francois N, Heidar- Ali Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue Department of Chemistry and Biology, University of Quebec at Trois-Rivieres, C.P. 500, TR, Que., Canada G9A 5H7, Revised 27 April 2006, Accepted 2 May 2006, Available online 10 July 2006.
- (43) Adriana L. Méndez¹, Andrés M. Molina. ANÁLISIS POR HPLC/DAD/ESI/MS/TOF Y ESTIMACIÓN DE LAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTES Y CITOTÓXICAS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE HOJAS DE *Croton niveus* Jacq., *Piper marginatum* Jacq. e *Hyptis suaveolens*. Universidad del Norte. Barranquilla
- (44) Arroyo J, Herrera O, Chavez R. Efecto antitumoral in vitro del aceite esencial de *Piper aduncum* L. (matico) y su toxicidad oral en ratones. Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

Bibliografía Complementaria

- J FA. Estudios en Labiatae de Colombia I. Novedades en los géneros Salvia e Hyptis. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 1995;(74).
- Jesus N, Falcao H, Lima G, Caldas Filho M, Sales I, Gomes I, et al. Hyptis suaveolens (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. J Ethnopharmacol. 2013; 150.
- Díaz González G. Plantas tóxicas de importacia en salud y producción animal en Colombia. Primera ed. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia; 2010.
- Maciel M, Pinto A, Brabo S, Arruda A. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from Croton cajucara Benth. Rev. Bras. Farmacogn. 2007 Oct-Dec; 17(4).
- Chahal J, Ohlyan R, Kandale A, Walia A, Puri S. Introduction, Phytochemistry, Traditional uses and Biological Activity of Genus Piper: A Review. IJCPR. 2011 May-July; 2(2).
- OMS. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005.
- P.Posadzki,A.Alotaibi,E.Ernst. Adverse effects of homeopathy: a systematic review of published case reports and case series. The international journal of Clinical Practice .2012.
- Griffiths, Gelbart, Miller & Lewontin, (2000) Lección 7. Genotoxicidad: Mutagénesis y carcinogénesis.
- Teaf, C & Middendorf, P. J. (2000). Mutagenesis and Genetic Toxicology. En P. L. Williams, R. C. James & S. M. Roberts (Eds.), Principles of toxicology: Environmental and industrial applications. New York: John Wiley & Sons, Inc
- OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods - OECD Publications Office, Paris, 1996.
- Estudio preliminar de la citotoxicidad y la genotoxicidad de un extracto de origen vegetal conocido como palmo rosado en células meristemáticas de Allium cepa 14- Revista Memorias - Vol. 5, Nº. 12 julio - diciembre de 2009.
- Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. 2013.

Anexo A.

PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE EXTRACTOS O ACEITES ESENCIALES EN ERITROCITOS HUMANOS

Este protocolo es una modificación de las metodologías propuesta por Yang *et al.* (2005) y Suwalsky *et al.* (2015).

1. Eritrocitos (RBC: Red Blood Cells) humanos fueron obtenidos a partir de sangre periférica de pacientes sanos; 5 mL de muestra de sangre heparinizada fueron centrifugados a 2500 rpm durante 10 min.
2. Luego de retirar el plasma y los leucocitos, el RBC fue lavado tres veces con buffer fosfato salino (PBS; pH 7,4);
3. Una suspensión de RBC al 4 % ($4,5 \times 10^5$ - $4,8 \times 10^5$ células/ μ L) fue preparada con PBS (pH 7,4); 100 μ L de dicha suspensión fueron adicionados a 100 μ L de muestra (AE o EE en concentraciones seriadas desde 1000 mg/L hasta 100 mg/), dejando en incubación a 37 °C durante 30 minutos.
4. Posteriormente se centrifugó a 2500 x g (3798 rpm) por 10 min; se tomaron 100 μ L de líquido sobrenadante, al cual se le midió la absorbancia a 540 nm, en el lector multipozo FLUOstar Omega.
5. Dodecilsulfato sódico (SDS; 0,5 mg/L) fue usado como control positivo y PBS (pH 7,4) como control negativo.
6. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Elaborado por Erika Torres, Química. Grupo de Investigación en Química y Biología, Universidad del Norte.

Revisado por: Juan David Rodríguez, Biólogo y Ricardo Gutiérrez, Ph.D. Grupo de Investigación en Química y Biología, Universidad del Norte.

Anexo B

PROTOCOLO DE SEPARACIÓN DE MONOCITOS POR GRADIENTE DE SEPARACIÓN CON FICOLL-HYPAQUE

1. PRECAUCIONES

Las muestras obtenidas si se destinan para cultivo se les deben realizar 3 lavados con PBS, pues el Ficoll-Hypaque es una solución a largo plazo tóxica para las células.

2. MATERIALES Y REACTIVOS

- Tubos Falcón para centrífuga de 15 mL estériles (3 tubos)
- Tubos Falcón de plástico de 50 mL estéril (1 tubo)
- Pipetas Pasteur de plástico estériles
- Gradilla
- Centrífuga

- Ficoll-Hypaque (4 mL)
- PBS
- Medio RPMI 1640

- Antibiótico (Estreptomicina-Penicilina)
- Suero Fetal Bobino

- Guantes de látex o vinilo estériles

Nota: realizar todos los procedimientos en Campana de flujo laminar

3. PROCEDIMIENTO

1. Obtener la muestra de sangre en tubo lila o verde con medidas de bioseguridad.
2. Diluir la sangre en proporción 1:1 en PBS estéril
3. Dispensar 2 mL de Ficoll-Hypaque en otro tubo Falcón de 15 mL
4. Tomar 8 mL de sangre diluida con PBS y dispensar muy cuidadosa y lentamente sobre el Ficoll-Hypaque. Poner el tubo inclinado y apoyar la punta de la pipeta sobre la pared del tubo para dejar deslizar la sangre suavemente sobre el Ficoll-Hypaque y poder formar una interfase (Ficoll debajo y sangre arriba).
5. Centrifugar a 2500 r.p.m. durante 30 minutos, a temperatura ambiente y sin freno al final de centrifugación.
6. Retirar cuidadosamente de la centrifuga y llevar a la gradilla. Verificar la formación de las fases de gradiente de densidad (arriba el plasma sanguíneo, debajo la banda de células mononucleares, debajo el Ficoll-Hypaque, debajo las células PMNs y debajo los eritrocitos aglutinados).

7. Extraer toda la banda de células mononucleares utilizando pipetas Pasteur de plástico y dispensar en tubo de centrifugación estéril, luego completar hasta 10 ml con PBS.
8. Centrifugar a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, a 4°C pudiendo utilizar freno al final de la centrifugación.
9. Extraer tubo de la centrífuga sin agitarlo.
10. Decantar sobrenadante y resuspender células del fondo con un pulso de vórtex o con golpes con las yemas de los dedos.
11. Completar nuevamente hasta los 10 mL con PBS.
12. Centrifugar a 1500 r.p.m. durante 15 minutos, a 4°C pudiendo utilizar freno al final de la centrifugación.
13. Descartar sobrenadante y resuspender células en 1 mL de medio RPMI 1640 + SFB (10%) + antibiótico (1%).
14. Determinar la concentración de células en Cámara de Neubauer y ajustar a más o menos 3000 cell/ μ L

Elaborado por Juan David Rodríguez, Biólogo. Grupo de Investigación en Química y Biología, Universidad del Norte.

Revisado por: Ricardo Gutiérrez, Ph.D. Grupo de Investigación en Química y Biología, Universidad del Norte.

Anexo C

PROTOCOLO DE EVALUACIÓN RÁPIDA DE TOXICIDAD EN LINFOCITO MEDIANTE LA TÉCNICA DE EXCLUSIÓN DEL COLORANTE AZUL TRIPAN

Este protocolo es para evaluar la toxicidad de sustancias, mediante la tinción del reactivo azul tripán.

1. Materiales y métodos

- Suspensión celular de 2500 cell/ μ l en medio RPMI 1640 +SFB 10%+ antibiótico 1% (estreptomomicina-penicilina)
- Sustancias a testear (aceites esenciales, extractos, entre otros) a una concentración definida
- Azul tripán
- Tubo Eppendorf 1,5 mL
- Pipetas Pasteur de plástico estériles
- Micropipetas 10 μ l y 200 μ l
- Cámara Neubauer
- Microscopio de contraste de fase

2. Procedimiento

- Tomar una alícuota de suspensión celular y llevarla a la concentración deseada del toxico a testear, para volumen final de 100 μ l.
- Resuspender suavemente
- Incubar a 37° C, durante 30 Min o 24 horas.
- Realizar controles positivos (metanol 20%) y negativos (DMSO 1%)
- Pasados el tiempo de incubación, tomar 50 μ l de la suspensión celular y mezclar con 50 μ l de Azul tripán 0,4 %.
- Tomar 10 μ l y cargar la cámara Neubauer
- Contar los cuatro cuadrantes **P** de 16 sub-cuadrantes cada uno (Imagen 1)

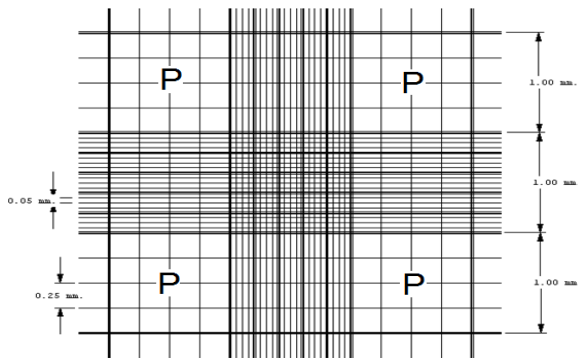


Imagen 1. Representación de los cuadrantes de una cámara de Neubauer

- Contar el número de células muertas (azules) y vivas (blancas)
- Determinar el porcentaje de vitalidad.

Elaborado por Juan David Rodríguez, Biólogo. Grupo de Investigación en Química y Biología, Universidad del Norte.

Revisado por: Ricardo Gutiérrez, Ph.D. Grupo de Investigación en Química y Biología, Universidad del Norte.

Anexo D.

PROTOCOLO PARA EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN CULTIVO DE LINFOCITOS, EVALUACIÓN DE CITO-GENOTOXICIDAD DE EXTRACTOS ETANOLICOS Y ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS.

Establecimiento de los Cultivos.

Establecer un cultivo de sangre periférica por concentración de extracto etanólico o aceite esencial, además de un cultivo para control positivo, uno para control negativo y un testigo, utilizando la muestra de sangre periférica de una sola persona, en la cámara de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Para esto se debe añadir 450 µL de sangre total a 3 mL de medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 15%, 1mM de L-Glutamina, antibiótico (Estreptomycina-Penicilina) al 2%, Fitohemaglutinina al 1%.

Condiciones de cultivo

Incubar a 37°C al 5% de CO₂ por 72 horas.

Pasadas las primeras 24 horas de establecido el cultivo, se procede a agregar las diferentes concentraciones de las sustancias a evaluar, un control positivo con Mitomicina 200µM y un control negativo con Dimetil sulfoxido al 1%.

Después de 44 horas de incubación, adicionar 92.78 µL de Citocalasina B para una concentración final de 6µg/mL Cyt-B.

A las 72 horas de cultivo realizar la cosecha de los linfocitos.

Cosecha celular, preparaciones citogenéticas y coloración.

1. Centrifugar todo el cultivo a 800 rpm por 9 minutos.
2. Descartar sobrenadante.
3. Con golpes muy suaves de los dedos despegar el pellet.
4. Adicionar 3 mL de solución hipotónica KCl (0.075M) a 4° C durante 1 minuto. Invertir suavemente.
5. Adicionar 1mL de solución fijadora de Carnoy (3 Metanol: 1 Ácido acético). Invertir suavemente para homogenizar.
6. Centrifugar a 800 rpm por 8 min.
7. Descartar sobrenadante.
8. Con golpes muy suaves de los dedos despegar el pellet.
9. Adicionar Carnoy hasta la marca de 5 mL. Invertir suavemente para homogenizar.

10. Centrifugar a 800 rpm por 8 min.
11. Repetir paso 7, 8 y 9 hasta obtener un pellet blanco o amarillento.
12. Re-suspender el pellet en una pequeña cantidad de fijador.
13. Preparar 2 placas por cultivo, añadiendo 8-10 gotas de la suspensión celular sobre las placas secas y frías, previamente lavadas con una solución al 50% de iodopolivinilpirrolidona (solución de antiséptico quirúrgico).
14. Secar al aire y colorear con Giemsa al 10% durante 8 min.

Criterio para contabilización de células:

Las células binucleadas deben seguir las siguientes características:

- Citoplasma distinguible
- Membrana plasmática y nuclear intactas
- Núcleos de igual forma, tamaño y tinción, pueden ser redondos u ovalados
- Pueden tener puentes nucleoplasmáticos
- Los nucleos pueden tocarse pero no solaparse
- Ningún núcleo en apoptosis

Los micronúcleos deben seguir las siguientes características:

- Diámetro entre 1/3 y 1/16 de la media del núcleo principal
- Tinción y forma similar a los núcleos de la célula
- No estar conectados a ningún núcleo

En condiciones óptimas se encuentran 35-60 % de células bi-nucleadas por cada 1000 células viables.

Frecuencia de micronúcleos

Se realiza la evaluación microscópica de 1000 células binucleadas, discriminándolas por número de micronúcleos (0, 1, 2), presencia o no de puentes o brotes. Se determina número total de micronúcleos, sumando las células que presentan 1 y 2 micronúcleos.

Siendo CB 1MN las células con 1 micronúcleo y CB 2MN las células con 2 micronúcleos.

La frecuencia basal de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica oscilan entre 0 y 2,5% .

Índice de proliferación

Donde es la frecuencia de células que presentan micronúcleos en cada una de las concentraciones.

Índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis o Índice de división nuclear

Contabilizar 500 linfocitos y se determina el porcentaje de células con uno, dos, tres y cuatro núcleos (mono, di, tri y tetranucleadas). Luego se aplica la fórmula:

Donde NI son: células mononucleadas, NII: células binucleadas, NIII: células trinucleadas y NIV: células tetranucleadas.

Elaborado por María José Bermejo. Estudiante Programa de Biología, Universidad del Atlántico.

Revisado por: Juan David Rodríguez, Biólogo; Ricardo Gutiérrez, Ph.D. Grupo de Investigación en Química y Biología, Universidad del Norte.

Anexo E.

PROTOCOLO DE GENOTOXICIDAD CON NARANJA DE ACRIDINA Y BROMURO DE ETIDIO.

Establecimiento de los Cultivos.

Mediante gradientes de densidad utilizando ficoly-hypack separar las células mononucleares, realizando un ajuste de aproximadamente: 2, 000,000 células por mL (ensayo de toxicidad 24 h). En medio RPMI 1640, SFB 15 %, antibiótico 2%. Utilizando cajas de 96 pozos siembre 95 µL de la suspensión celular a cada pozo. Cada ensayo es indispensable realizarlo mínimo por triplicado, con:

- Controles negativos (DMSO 1%),
- Controles positivos (Peróxido de hidrogeno)
- Células no tratadas las cuales deben dar una lectura de DO mayor ó igual a 1.

Condiciones de cultivo

Se incuban a 37 °C y 5 % de CO₂

Se prepara el extracto, fracción o sustancia en DMSO. De tal manera que al añadir 5 µL al pozo tenga la concentración deseada. Se añade 5 µL de la sustancia problema por pozo. Se incuban durante 24 horas para permitir que la sustancia actúe en todas las células.

Evaluación del tratamiento

Terminado el tiempo de incubación:

- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Adicionar 5 µL de la mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio
- Resuspender la muestra
- Adicionar 10 µL de la muestra a un portaobjetos, colocar un cubre objetos
- Leer en microscopio de fluorescencia usando un filtro de excitación de 490 nm y filtro de barrera de 530 nm.