

APLICACION DE UNA METODOLOGIA “IN VITRO” PARA EVALUAR LA TOXICIDAD DE EXTRACTOS VEGETALES

HELBER DE J. BARBOSA*.
CARLOS A. GUERRERO**.
DIEGO ARIAS*.

RESUMEN

La presente investigación evaluó el efecto tóxico de cinco extractos vegetales utilizados con fines medicinales, observando la influencia sobre el ciclo celular de linfocitos aislados de sangre periférica, utilizando dos técnicas complementarias: la citogenética y la molecular. Los análisis citogenéticos y el estudio molecular de proteínas de la fracción citoplasmática y de la cromatina, condujo a la determinación de los efectos tóxicos causados por los extractos vegetales en estudio. La destrucción celular, la presencia de configuraciones anormales con regiones hiper Cromáticas y las alteraciones cromosómicas, con separación prematura del centrómero, sugieren que la intensidad del efecto depende del tipo de extracto, de la naturaleza de las estructuras químicas y de la cantidad aplicada. Los mencionados fenómenos, se deben probablemente a un efecto directo de los agentes químicos contenidos en los extractos sobre la cromatina o una alteración de los genes que codifican para proteínas que intervienen en la condensación de la misma.

SUMMARY

In order to evaluate the cytotoxicity of five vegetal extracts, two complementary techniques were used: cytogenetic and molecular. The toxic effect were determined on the cellular cycle of lymphocytes isolated of periferic blood. Cytogenetic analysis and molecular study of proteins led to the measurement of toxic effects of the extracts. Cellular destruction or abnormalities, hyperchromic regions, chromosomic alterations, early separations of centromer suggest that the effect depends on the type of extract, the chemical compounds present and the applied dose. Those effects are probably due to alterations on the chromatin or on the genes that codifie for the proteins involved in its condensation.

* Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias.

** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Nacional de Colombia, Apdo. 14490 Santafé de
Bogotá, Colombia

INTRODUCCION

A través de la historia, popularmente se han utilizado los extractos vegetales de una manera intuitiva y empírica, con fines medicinales, dado que poseen estructuras que producen un efecto fisiológico (1). El auge de los productos fitoterapéuticos como parte de la medicina alternativa, en respuesta a factores como el alto costo de los medicamentos y de la asistencia médica, obliga a crear líneas de investigación que conduzcan a establecer pruebas que permitan asegurar el uso de medicamentos que llevan como principio activo extractos vegetales, con el menor riesgo posible. Los métodos farmacológicos para evaluar el efecto terapéutico y grado de toxicidad, están basados en la observación de hechos experimentales sobre el organismo vivo. En este caso el investigador se vale de técnicas fisiológicas y bioquímicas, utilizando el animal como unidad experimental, para encontrar datos cuali y/o cuantitativos sobre la acción terapéutica y el grado de toxicidad de sustancias que se encuentran dentro de un extracto. Pero la controversia presentada entre sociedades protectoras de animales e investigadores, junto con los argumentos de la industria farmacéutica sobre lo prolongado que resulta la obtención de resultados, son igualmente, los cuestionamientos sobre la extrapolación de los resultados al hombre por las variaciones en las características genéticas y porque el modelo animal no permite evaluar el efecto molecular. es decir a nivel bioquímico y del ciclo celular. Todo esto lleva a la búsqueda de metodologías que aporten una información complementaria, que permitan caracterizar a nivel citogenético y molecular los efectos de una sustancia sobre la célula, por ejemplo sobre el ciclo celular, lo que permite conocer el grado de toxicidad y los posibles mecanismos de acción. (2,3, 4, 5, 6, 7, 8). Las técnicas *in vitro* son un modelo biológico reproducible y verificable que permiten utilizar líneas celulares como, Hela, fibroblastos, hepatocitos y células no transformadas como los linfocitos de sangre periférica. Esto permite utilizar menos el animal ó usarlo mas racionalmente como parte del proceso investigativo. La presente investigación buscó medir el grado de toxicidad de sustancias que se encuentran dentro de un extracto vegetal a través de un análisis citogenético y observación de los cambios a nivel de las proteínas estructurales y funcionales.

También se midió el efecto tóxico de los extractos *P. vaccinoides*, *C. americana*, *T. neriifolia*, *B. pilosa* y *V. toronis* que son utilizados con fines medicinales, aplicando dos técnicas complementarias, la citogenética y la molecular. Aislado linfocitos de sangre periférica y realizando un análisis citogenético y estudio molecular de proteínas de la fracción citoplasmática y de cromatina se pudo caracterizar los efectos tóxicos causado por sustancias químicas que se encuentran dentro de un extracto vegetal. Se observó destrucción celular, configuraciones anormales con regiones hiperromáticas que sugieren condensación de la cromatina en forma anormal. El grado del efecto dependió de la cantidad aplicada y del tipo de extracto. Igualmente se encontró alteraciones cromosómicas, como metafases apretadas y separación prematura del centrómero. A nivel electroforético se observaron algunos cambios en el número e intensidad de bandas de proteínas de la cromatina y citoplasma, cambios que dependen del tipo de extracto. Los fenómenos presentados, probablemente se deben a un efecto directo de las estructuras del extracto o a una alteración de la expresión génica.

PARTE EXPERIMENTAL

Selección del material de estudio y obtención de los extractos

Para el estudio de citotóxicidad fueron seleccionadas 5 plantas medicinales de uso popular; *Pentacalia vaccinoides* (venadillo), *Curatella americana* (chaparro), *Thevetia neriifolia* (cabalongo), *Bidens pilosa* (chipaca) y *Viburnum toronis*. (chucua). Las cantidades aplicadas en cada tratamiento, fueron: Co (Control), C1 (1 mg), C2 (500 µg), C3 (500 ng) y C4 (500 pg)

Las partes de las plantas recolectadas (hojas, frutos o corteza) se secaron en una estufa con flujo de aire a 50 °C durante 48 horas. El material seco se pulverizó y se tomaron muestras de 100 gramos que se sometieron al proceso de maceración con alcohol etílico del 96 %. Los extractos obtenidos fueron almacenados en frascos de vidrio en refrigeración a 4 °C.

Obtención de linfocitos y aplicación de los tratamientos

Se aislaron células blancas de sangre periférica, utilizando un gradiente (Ficol-hypaque) se colocaron en medio de cultivo RPMI con suero fetal bovino al 10 % y 0.3 mL (500 µg/mL) de fitohematoglutina (PHA), incubándose a 37 °C por 60 horas. Cumplido el tiempo se determinó el número de células por mL utilizando la cámara de Neuberger. Los linfocitos se suspendieron en medio fresco de RPMI con suero fetal bovino al 10 % y fueron distribuidas 500.00 células/0.5 mL en los tubos de ensayo para aplicarles los tratamientos. Los extractos alcohólicos seleccionados se aplicaron en las can-

tidades antes señaladas y se dejaron en contacto con los linfocitos T durante una hora a 37 °C. Se les adicionó colchicina y nuevamente incubados por 20 minutos. Posteriormente se trataron con solución hipotónica de cloruro de potasio 0.075 M por 8 minutos, luego se adicionó solución fijadora de metanol-ácido acético (3:1) y se centrifugaron. Al pellet se le adicionó solución fijadora por 30 minutos. Posteriormente se hicieron tres lavados con la misma solución, se extendieron en láminas y se colorearon con Giemsa (8).

El análisis se hizo observando al microscopio 1.000 células para cada extracto y tratamiento, repitiéndose 5 veces cada ensayo. Primero se hizo un recorrido general de la lámina analizando la cantidad de células, luego en zig-zag de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, incluyendo células estimuladas (blastos y metafases) y no estimuladas. En el análisis se tuvo en cuenta la forma, el tamaño, la integridad celular y cromosómica. Para la evaluación con respecto al tamaño, se hizo con base a un trabajo realizado por otro investigador (C.A. Gerrero, com. Pers) (9) con quien se fijó un patrón de referencia arbitrario, el número cero que se observa a través del microscopio. Las células que tenían un tamaño igual o mayor al número cero, son catalogadas como estimuladas y las de menor valor como no estimuladas. A las metafases observadas se les analizó su morfología.

Estudio Electroforético: separación de proteínas

Para esta técnica se siguió el método descrito en la literatura con leves modificaciones. (8, 10). Se realizó primero el procedimiento para obtener cromosomas metafásicos hasta la incubación después de agregar la solución de colchicina. Cumplido los 20 minutos, cada eppendorf se centrifugó a 1.200rpm durante siete minutos descartándose el sobrenadante. Al pellet de cada recipiente se le adicionó 1.5 mL de solución buffer BLCB (Buffer de Lisis de las Células Blancas) de pH 7.4 se mezcló en vortex por 30 segundos dejándose en reposo durante 30 minutos para luego volver a mezclar fuertemente en vortex. Posteriormente el contenido de cada muestra se pasó tres veces consecutivas por una jeringa con aguja número 23 y tres veces por una jeringa tipo insulínica, luego se centrifugó por 20 minutos a 3.000 rpm. Recuperándose el pellet y el sobrenadante en eppendorf separados. El sobrenadante, donde se encuentran las proteínas citoplasmáticas, se recolectó en un eppendorf, agregándose 600 µL de solución de ácido tricloroacético al 10% en acetona y mercaptoetanol al 0.3 %, se mezcló fuertemente en vortex y se almacenó a 4 °C durante 14 horas. Cumplido el tiempo, se procedió a centrifugar los eppendorf a 12.000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante teniendo cuidado de no extraer el pellet y se adicionó un mL de acetona, se mezcló en vortex durante 30 segundos y se centrifugó a 12.000 rpm durante cinco minutos descartándose el sobrenadante. Esta operación de lavado con la acetona se repitió 4 veces para

eliminar residuos de ácido tricloroacético. Después del último lavado se dejó secar a temperatura ambiente durante 2 horas. Al pellet seco de todas las muestras se resuspendió adicionando por igual 60 µL de una solución buffer de Laemmli que contiene 0.065 M de tris-HCl, 2% p/v SDS, 5% v/v *B*-mercaptoetanol; 2mM EDTA; 10% v/v de glicerol (8.10) se mezcló con el vortex durante 30 segundos y se colocó en agua hirviendo durante tres minutos. Luego se agitó nuevamente en vortex y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora antes de almacenar a -20 °C hasta la realización de la electroforesis.

Proteínas de la cromatina

Al pellet dejado después de separar el sobrenadante que contiene las proteínas citoplasmáticas se le adicionó un mL de solución buffer BLCB y 200 µL de tolueno, se mezcló fuertemente y se centrifugó por 5 minutos a 12.000 rpm. Luego se recuperó la fase líquida, descartándose la capa sobrenadante de tolueno donde se encuentran lípidos. Para no tomar restos celulares de la fase orgánica o interfase, se introdujo la pipeta con presión positiva y no se tomó toda la fase líquida. A la fase líquida recuperada se le agregó 200 µL de una solución al 10 % de ácido tricloroacético en acetona y mercaptoetanol al 0.3 % se almacenó a 4 °C durante 14 horas para precipitar las proteínas de la cromatina. Posteriormente se les hizo el mismo tratamiento realizado para las proteínas citoplasmáticas y finalmente se almacenó a -20 °C hasta la realización de la electroforesis.

Electroforesis

Las proteínas citoplasmáticas y de la cromatina fueron analizadas por el sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS descrito por Laemmli (SDS-PAGE). (11, 12) En cada pozo se colocaron, con una microjeringa Hamilton, 12 µL de cada una de las muestras. Es decir, se puso igual cantidad en cada pozo de cada uno de los extractos en sus respectivas cantidades. La electroforesis se condujo a 15 mA por lámina de gel en una minicámara Hofer SE 250. La electroforesis se detuvo cuando el marcador azul de bromofenol alcanzó el extremo del gel. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata de acuerdo a la metodología descritas por Blum et. al. (13) (1987) Acosta y Mayo (14), (1989) Los geles fueron almacenados en 50 % v/v de metanol-agua a 4 °C y posteriormente fotografiados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudio citogenético y electroforético

El material extendido en láminas, se observó al microscopio y se clasificó como: a.- células grandes y uniformes en morfología, denominadas blastos o células estimuladas. b.- Células pequeñas y uniformes en morfología. c.- Metafases

y d.- células destruidas total o parcialmente con pérdida de la membrana citoplasmática y nuclear, sin uniformidad morfológica. La destrucción celular se registró con cruces, de acuerdo al grado de afección. Los valores fueron expresados entre cero (sin destrucción celular) y cuatro cruces, (destrucción de todas las células). Se utilizó un control negativo sin tratamiento y como control positivo el tetracloruro de carbono, una sustancia altamente tóxica para la célula.

Los resultados experimentales obtenidos se tabularon como variables (blastos, células pequeñas, número de metafases y destrucción celular) y evaluaron aplicando el paquete estadístico SAS que incluye análisis de varianza. (Estadísticas de Duncan's, Student-Newman-Keuls (SNK) y Tukey's). El tratamiento estadístico permitió observar el efecto de la cantidad aplicada y del tipo de extracto sobre cada variable estipulada. Tomando como referencia los valores promedios (tablas 2 a 7) se observó que la intensidad y tipo de efecto depende de la cantidad aplicada. Además los extractos presentaron diferente grado de efecto sobre cada una de las variables en estudio.

El efecto de la cantidad de extracto aplicada sobre el número de blastos o células estimuladas, células pequeñas, metafases, índice mitótico e índice metafásico, fue mayor para las cantidades de 1 mg y 500 µg presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control que no llevaba tratamiento. Las cantidades de los extractos que menos efecto presentaron sobre las variables en estudio fueron las de 500 ng y 500 pg, esta última no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

Una de las variables más afectadas por la cantidad de sustrato aplicado, aunque con diferente grado de efecto, de acuerdo al tipo de extracto, fue la destrucción celular con cantidades de 1 mg y 500 µg, donde se observó la más alta destrucción celular, para todos los extractos. No obstante, algunos extractos como *C. americana* y *P. vaccinoides* en cantidades de 1 mg causaron destrucción total, similar a la del control positivo. De otro lado *Bidens pilosa* presentó una destrucción celular menor que los demás extractos. Los demás extractos, en las cantidades antes citadas, solo causaron alteraciones de la morfología celular y/o cromosómica como formas amorfas, condensación polarizada de la cromatina y diferente grado de hipercromia. También se observó en varias células la presencia de divisiones simultáneas y asimétricas. Las alteraciones cromosómicas consistieron en separación prematura del centrómero, originada por separación simultánea y a destiempo de las cromátidas hermanas.

Los extractos, independiente de la cantidad aplicada presentaron un efecto diferencial sobre cada variable. Así *C. americana* afectó el número de blastos causando una dismi-

nución del 63% mientras para *P. vaccinoides* fue del 43 %. Los extractos *T. neriifolia*, *B. pilosa* y *V. toronis* presentaron un efecto bajo sobre el número de blastos, pero presentaron diferencias con respecto al control.

Otra variable afectada es la cantidad de células catalogadas como pequeñas. Los extractos *P. vaccinoides* y *V. toronis* Killip & Smith presentaron el mayor número de células pequeñas con diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás extractos y al control.

Las metafases también fueron afectadas por el tipo de extracto. Los extractos *C. americana*, *P. vaccinoides* y *V. toronis* tuvieron una mayor incidencia en el número de metafases, cuyo valor tiende a cero. *B. pilosa* y *T. neriifolia* presentaron un efecto menos marcado, encontrándose un alto número de metafases durante los ensayos realizados.

El índice mitótico, que es el resultado de la suma del número de células estimuladas y el número de metafases dividido por el número total de células leídas, es alterado en forma diferencial por los extractos. Por ejemplo *C. americana* y *P. vaccinoides* presentaron el índice mitótico más bajo respecto a los demás extractos, pero diferenciable del control. El índice metafásico, que corresponde al número de metafases dividido por el número total de células leídas, presentó disminución por efecto del tipo de extracto y de la cantidad aplicada. No obstante los extractos presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto solo al control. La tabla 1 resume el grado de efecto de cada extracto sobre cada variable en estudio.

Tabla 1: Efecto de los extractos sobre las diferentes variables (ordenados de arriba hacia abajo en orden descendente con respecto al grado de efecto)

VARIABLES

	Blastos	Células P	Metafases	I. Mitótico	I. Metafási.	Destrucción
Grado	E4	E2	E3	E3	E3	E2
de	E3	E4	E4	E4	E2	E1
Efecto	E5	E3	E2	E5	E4	E5
del	E1	E5	E1	E1	E1	E3
Extract.	E2	F1	E5	E2	E5	E4
	C0	C0	C0	C0	C0	C0

E1: *Pentacalia vaccinoides*

E2: *Curatella americana*

E3: *Thevetia neriifolia*

E4: *Bidens pilosa*

E5: *Viburnum toronis*

C0: Control (no lleva tratamiento)

También se analizaron proteínas citoplasmáticas y de cromatina utilizando el sistema de electroforesis SDS-PAGE gel descrito por Laemmli (1972). Se utilizaron proteínas marcadoras de peso molecular de 68, 45, 25, 18 y 14 Kda. Las bandas más conspicuas del control de cada gel se compararon respecto a ausencia-presencia e intensidad con las presentes en cada uno de los tratamientos aplicados. Presentándose solo diferencias para la cantidad de 1 mg en todos los extractos en estudio.

Las células que recibieron diferentes cantidades de los extractos mostraron alteración en el ciclo celular reflejada en una disminución en el número de blastos o células estimuladas, aumento en el número de células pequeñas, disminución en el índice mitótico y metafásico, destrucción celular y alteración en la morfología celular y cromosómica. Indicando que las estructuras químicas de los diferentes extractos están ejerciendo toxicidad en la célula linfocítica y que depende de la cantidad aplicada, del tiempo de contacto y la naturaleza de la estructura molecular.

Se presentaron fenómenos comunes en todos los extractos como la destrucción celular, dependiente de la cantidad. También regiones hipercromáticas; lo que sugiere condensación de la cromatina, el fenómeno se presenta en las células en forma total o sectorizada. Las malformaciones celulares y cromosómicas, probablemente se deben a un efecto directo de las estructuras del extracto sobre la condensación de la cromatina o una alteración de la expresión de genes que codifican para proteínas que intervienen en la condensación de la cromatina. Los hallazgos electroforéticos como la presencia o ausencia de bandas de proteínas obedece a una acción directa de las estructuras sobre las proteínas, clivándolas, adicionando o sustrayendo grupos como fosfatos, azufre y azúcares que se reflejan en una variación en el patrón electroforético. Esta alteración puede ser causada por alteraciones post-traduccionales al modificarse la estructura proteica que conlleva a una variación en la función de la proteína. Estos cambios proteicos a la vez pueden ser los responsables de las alteraciones observadas a nivel citogenético. El extracto *C. americana* en cantidad de 1 mg presentó alta destrucción celular, lo que probablemente se deba al alto contenido de taninos, que contiene grupos polifenólicos que interactúan con el oxígeno del grupo carbonílico o el nitrógeno de la cadena lateral de cualquiera de los aminoácidos que conforman las proteínas de la membrana citoplasmática y de la cromatina. También las saponinas que con sus grupos apolares e hidrofílicos pueden variar las propiedades fisicoquímicas, no solo del medio que rodea la célula sino de la permeabilidad de la membrana, causando una ruptura de ésta. Cantidades menores (500 µg) causan configuraciones anormales, como diferentes formas con divisiones simultáneas y asimétricas, regiones

hipercromáticas lo que sugiere la condensación de la cromatina en forma anormal. Probablemente el fenómeno que induce a la condensación y la división acelerada y prematura, es el responsable de inducir la separación prematura del centrómero observado en la metafases analizadas, donde las cromátides hermanas se separan simultáneamente y a destiempo, en un orden no cronológico. *P. vaccinoides*, el alto contenido de alcaloides con estructuras pirroizidínicas es responsable de los diferentes fenómenos citogenéticos presentado en un alto porcentaje de células. *V. toronis* por el contenido moderado de saponinas, explica que los efectos citogenéticos sean similares, aunque en menor intensidad al *C. americana*. *T. nerifolia* contiene un heterósido llamado tevetina que a pesar de presentar bioactividad sobre el miocardio las altas concentraciones producen un efecto tóxico sobre la célula. Esto quizá explique los fenómenos hallados con este extracto. Las estructuras del extracto de *B. pilosa* no producen efecto similar al observado para los demás extractos. Sin embargo, debe aclararse que no se han realizado estudios a largo termino, es decir, analizar la actividad celular durante varias horas o días después de retirado el extracto. Por esto no podemos señalar la severidad del efecto a posteriori de ningún extracto.

En general se puede afirmar que los efectos tóxicos presentados por los diferentes extractos en estudio son consecuencia de la reacción entre las entidades químicas presentes en los extractos y las estructuras celulares. El contacto entre las moléculas, a nivel de la membrana citoplasmática, modifica las condiciones fisicoquímicas, alterando el ciclo celular y desencadenando malformaciones celulares. Por ejemplo, una de las reacciones que ocurre con mayor frecuencia y que puede causar destrucción celular en forma total y/o parcial, se debe a la presencia en el extracto vegetal, de taninos (compuestos polifenólicos con grupos altamente reactivos) los cuales interactúan con las proteínas de la célula formando macromoléculas insolubles que se precipitan. Además pueden

causar inhibición enzimática e interfieren dentro del ciclo celular interrumpiendo secuencias de reacciones bioquímicas fundamentales para la formación de proteínas, o directamente en la expresión de uno o varios genes.

Igualmente la interacción entre las diferentes estructuras químicas, incluidas las saponinas, lactonasterpénicas, alcaloides y cumarinas (todas con grupos químicos altamente reactivos) con las moléculas celulares, interfiere en el desarrollo normal del ciclo celular, causando alteraciones celulares. Por ejemplo, la disminución en el número de células estimuladas, la variación en tamaño y la forma celular (estados amorfos). Estos efectos probablemente se llevan a cabo a través de mecanismos diferentes.

Entre las diferentes estructuras presentes en los extractos, las más tóxicas son los alcaloides que contienen estructuras de la pirrolizidina y los heterósidos cardiotónicos que a pesar de poseer bioactividad tienen una ventana terapéutica muy estrecha y el grado de efecto tóxico presentado por los diferentes extractos utilizados en el presente estudio sobre los linfocitos T es función directa de la cantidad aplicada.

Las técnicas aquí aplicadas permiten obtener información en relativo corto tiempo y así complementar la información observada en el animal íntegro y poder detectar la relación riesgo/beneficio. Además de poder aplicar estas mismas técnicas, pero utilizando elementos radioactivos que permitiría analizar posibles efectos sobre el DNA o proteínas de la célula. También recomendándose estudios complementarios, utilizando las sustancias aisladas y purificadas de cada uno de los extractos en estudio para identificar la o las sustancias responsables del efecto tóxico.

Valores promedios (expresados en porcentaje) de los 5 experimentos realizados para cada cantidad y cada uno de los extractos

Tabla 2 Extracto *Pentacalia vaccinoides*

Cantidad	% Promedio Blastos	% Promedio C. P. *	% Promedio Metafases	% Promedio I Mitótico	% Promedio I Metafási	destrucción
C1	22.9	83.1	0.0	19.60	0.00	+++
C2	35.2	64.6	0.2	35.42	0.20	++
C3	55.1	41.4	3.5	58.60	3.50	+
C4	66.6	27.2	6.1	72.70	6.5	--

* C. P Células pequeñas

Tabla 3 Extracto *Curatella americana*

Cantidad	% Promedio Blastos	% Promedio C. P. *	% Promedio Metafases	% Promedio I Mitótico	% Promedio I Metafási	destrucción
C1	2.6	57.4	0.0	2.60	0.00	+++
C2	4.0	56.6	0.0	4.00	0.00	++
C3	45.5	51.0	3.5	49.02	3.50	+
C4	66.7	26.3	7.0	75.50	8.92	+

Tabla 4 Extracto *Thevetia neriifolia*

Cantidad	% Promedio Blastos	% Promedio C. P. *	% Promedio Metafases	% Promedio I Mitótico	% Promedio I Metafási	destrucción
C1	40.3	58.9	0.8	41.14	0.80	++
C2	55.5	42.7	1.8	53.30	1.82	+
C3	65.0	30.9	4.1	69.00	4.06	--
C4	70.3	23.9	5.8	76.10	5.84	--

Tabla 5 Extracto *Bidens pilosa*

Cantidad	% Promedio Blastos	% Promedio C. P. *	% Promedio Metafases	% Promedio I Mitótico	% Promedio I Metafási	destrucción
C1	38.5	61.2	0.3	38.80	0.12	+
C2	57.3	40.9	1.6	58.90	1.58	+
C3	69.8	26.5	3.7	73.50	3.74	--
C4	72.7	22.1	5.2	77.90	5.29	--

Tabla 6 Extracto *Viburnum toronis*

Cantidad	% Promedio Blastos	% Promedio C. P. *	% Promedio Metafases	% Promedio I Mitótico	% Promedio I Metafási	destrucción
C1	39.6	60.2	0.2	39.80	0.18	+++
C2	48.6	51.0	0.4	49.00	0.44	++
C3	65.2	32.6	2.2	67.40	2.24	+
C4	69.8	27.2	3.0	72.80	3.02	--

Tabla 7 valores promedios de los 5 experimentos del controles (sin tratamiento)

Ensayo	% Promedio Blastos	% Promedio C. P. *	% Promedio Metafases	% Promedio I Mitótico	% Promedio I Metafási	destrucción
**E1	750	243	170	75.70	17.00	----
**E2	725	147	128	85.30	12.80	----
**E3	807	46	147	95.40	14.70	----
**E4	820	42	138	95.80	13.80	----
**E5	805	85	110	91.50	11.00	----
Promedio	781	113	138	92.00	13.80	----

** Ensayo

BIBLIOGRAFIA

1. N. R. Farnworth, «Las plantas Medicinales en la terapéutica» *Bol of SanitPanam*, **107** (4), 314-320, (1989)
2. A. M. Goldberg, J. M. Frazier, "Opciones alternativas al uso de animales de laboratorio " *Investigación y Ciencia* **157**, 10-17, (1989)
3. R. Shrivastava, J.W. John Rispat, G. Chevalier, and R. Massingham, "Can the In vivo maximum tolerated dose be predicted using In vitro techniques? working hypothesis " *ATLA* **19** (2), 393-402, (1993)
4. R. Jover, J. Posada, J.V. castell, J.M. Gómez, "Hepatotoxicity of opiates and cocaine on different hepatic cellular systems". *ATLA*, **17** (3), 40-45, (1990)
5. W. C. Evans, "FARMACOGNOSIA" Editorial Interamericana. XIII edición, Bogotá, 50-78, 300-555, (1989)
6. R.J. Freshney. Culture of animal cells 2da ed. Alan R. Liss Inc. N.Y. 1-6. 245-47, 1988
7. S. Hellberg, L. Eriksson, et. al. " Analogy models for prediction of human toxicity" *ATLA*, **18** (2), 103 - 116, (1990)
8. C.A. Gerrero, " Aislamiento y caracterización de una proteína de 71 Kda del síndrome de Roberts, que reproduce in vitro las características citogenéticas del síndrome, en un individuo normal Tesis Universidad Nacional de Colombia Santafé de Bogotá, (1993)
9. C. A. Gerrero, Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia, comunicación personal, (1995)
10. L.P. Moreno, Un complejo de especies gemelas en el género *Eurema* Hubner (Lepidoptera: pieridae) evidencias biológicas y electroforéticas Tesis, Universidad Nacional de Colombia, (1992)
11. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **680**, 227, (1970)
12. N. P. Rao, T.R. Johnson, Sperling, K. (Ed.) 1982 Premature Chromosome condensation. Academic press.
13. H. Blum, Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gel. *Electroforesis* **8**, 93, (1987)
14. O. Acosta, And M. A. Mayo, Inusual electrophoretic properties of the coat protein of raspberry ring spot nepovirus. *Intervirolgy* **31**, 31, (1989)