

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)

## Evaluación del potencial genotóxico de *Boerhavia erecta* L.

Lic. Janet Piloto Ferrer,<sup>1</sup> Lic. Alberto Ramos Ruiz,<sup>2</sup> Lic. Angel Vizoso Parra,<sup>3</sup> Lic. Arilia García López,<sup>4</sup> MSc Marta Guerra<sup>4</sup> y Lic. Reinaldo Rivero<sup>5</sup>

### RESUMEN

Se evaluó la actividad mutagénica de un extracto acuoso de follaje liofilizado de *Boerhavia erecta* L. Se emplearon 2 pruebas: de Ames e inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. En el ensayo de Ames, los resultados fueron negativos en todas las cepas probadas de *Salmonella typhimurium*: TA 1535, TA 1537, TA 98 y TA 100, con un protocolo de incorporación en placa y concentraciones hasta 5 mg de liofilizado/placa. En el ensayo de micronúcleos, se hicieron 2 administraciones orales a razón de 10 mL/kg, separadas 24 h, con sacrificio 24 h después de la última aplicación. Las dosis fueron 500, 1 000 y 2 000 mg de liofilizado/kg. No se observaron variaciones en la relación entre eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocromáticos, indicador de toxicidad medular. Tampoco se encontraron alteraciones significativas en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados entre los distintos grupos de tratamiento. Se comprobó que el extracto acuoso de follaje liofilizado de *B. erecta* no parece inducir efectos mutagénicos en los 2 sistemas de ensayo donde se evaluó.

**Palabras clave:** *Boerhavia erecta* L., test de Ames, test de micronúcleo, genotoxicidad.

*Boerhavia erecta* L. de la familia Nictaginaceae, conocida en Cuba como tostón está ampliamente distribuida en América, Asia Oriental y en África Tropical, donde las decocciones de sus partes aéreas se usan tradicionalmente, como antiespasmódico y expectorante, para el tratamiento de la epilepsia, para la secreción biliar y las congestiones del hígado.<sup>1</sup>

Otros efectos demostrados han sido: actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) y antiparasitaria, de raíces y semillas, en diferentes microorganismos. Se ha detectado actividad en los extractos etanólicos al 80 % contra la *Entamoeba histolytica*, *in vitro* e *in vivo* en ratas, en la amebiasis hepática y en especies de dermatofitos (*Trichophotum mentagophytes*).<sup>2-7</sup>

Entre los compuestos encontrados en estudios fitoquímicos se destacan principalmente los alcaloides, retinoides y los flavonoides, además de aminoácidos, ácidos grasos insaturados, fitoecdisonas y lignonas, sin contar el alto contenido de minerales que poseen las especies de este género.<sup>8-14</sup>

Como parte de las investigaciones farmacológicas y toxicológicas auspiciadas por el Programa Nacional de Plantas Medicinales, encaminado a fundamentar científicamente los usos tradicionales atribuidos a la flora cubana, se realizó este estudio para evaluar el potencial mutagénico de un extracto acuoso liofilizado de esta planta.

### MÉTODOS

Se emplearon 2 ensayos: la prueba de Ames, que detecta mutaciones génicas y el de micronúcleos, un ensayo ampliamente validado internacionalmente que evalúa daño genético causado por agentes clastogénicos y aneugénicos *in vivo*.

### **Material vegetal**

La planta se cultivó en la Estación Experimental de Plantas Medicinales “Dr. Juan Tomás Roig”. Se colectó en mayo de 1999. Un ejemplar de la misma se conserva en el herbario de la institución con número ROIG 4642. El liofilizado se preparó con un extracto acuoso (relación material vegetal:solvente, 300 g:2400 mL) del follaje de la planta en el Laboratorio de Productos Naturales. La fecha de elaboración fue 29 de septiembre de 1999.

### **Ensayo de Ames**

Se emplearon 4 cepas de *Salmonella typhimurium*, TA 1535, TA 1537, TA 98 y TA 100, cortesía del Dr. *Bruce N. Ames* (Universidad de California en Berkeley, EE.UU.). Se empleó el método de incorporación en placa del extracto acuoso liofilizado de *B. erecta* en concentraciones de 50 a 5 000 µg de sólidos totales liofilizados/placa. El ensayo se realizó según protocolos bien estandarizados.<sup>15</sup> Se probaron 5 concentraciones, mediante siembra de 3 placas por cada concentración en un experimento único. La prueba se realizó en presencia y ausencia de activación metabólica externa, provista por fracción S9 (4 %, concentración final) obtenida a partir de hígado de ratas tratadas con fenobarbital y 5,6 benzoflavona. Las placas se incubaron a 37°C y se contaron las colonias revertantes a las 48 h. Los resultados se analizaron utilizando el programa SALANAL versión 1.0 de la Environmental Protection Agency (EPA) EE.UU. Como criterios de genotoxicidad se asumieron: aumentos significativos y dosis dependientes en la frecuencia de revertantes.

### **Ensayo de micronúcleos**

Se establecieron 5 grupos experimentales: control negativo (agua destilada), control positivo (ciclofosfamida, 20 mg/kg en dosis única 24 h antes del sacrificio) y 3 dosis de 500, 1 000 y 2 000 mg de sólido liofilizado/kg. Cada grupo contó con 10 animales, 5 de cada sexo. Se emplearon ratones suizos de la colonia del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, con 5 semanas de nacidos y un peso de 20 a 23 g. El extracto se administró por vía oral a razón de 10 mL/kg, en 2 dosis separadas 24 h y se procedió al sacrificio 24 h después de la última aplicación.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Las muestras de médula ósea se obtuvieron según lo establecido.<sup>16,17</sup> Estas se fijaron con etanol al 95 % (v/v) durante 5 min y secadas al aire durante 24 h. Finalmente se tiñeron con Giemsa al 5 % (v/v) en buffer fosfato pH 6,8 durante 20 min aproximadamente.

Se contaron al menos 2 000 eritrocitos policromáticos (PCE) por animal y además, los eritrocitos normocromáticos (NCE) presentes por 250 PCE para estimar la relación PCE/NCE, indicador de citotoxicidad medular.

Para el procesamiento estadístico de los datos, se normalizaron los valores de PCE/NCE y el porcentaje de PCE micronucleados (MNPCE) para cada animal empleando la

transformación  $\sqrt{(x + 1)}$ . Después se procedió a realizar un análisis de varianza de una vía considerando los tratamientos. Las comparaciones individuales se realizaron utilizando la prueba t de *Student*.

Como criterios de genotoxicidad se asumió: la existencia de incrementos significativos en la frecuencia de PCE micronucleados así como el que estos aumentos estuvieran directamente relacionados con las dosis administradas (relación dosis-respuesta).

## RESULTADOS

La tabla 1 resume los resultados del ensayo de *Ames*. Como puede observarse, no hubo incremento dosis dependiente de la frecuencia de revertantes por colonia para ninguna de las cepas de *Salmonella* ensayadas, que es el indicador de mutagenicidad para esta prueba, para concentraciones de hasta 5 mg/placa, valor que se acepta como límite superior de exposición en ausencia de toxicidad o de problemas de solubilización.<sup>18</sup>

Tabla 1. *Ensayo de Ames en Salmonella typhimurium para el extracto acuoso liofilizado de B. erecta*

Concentración µg/placa	Colonias revertantes/placa ± DS			
	TA-98		TA-100	
	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)
0 <sup>a</sup>	22,67 ± 4,73	19,00 ± 4,36	109,00 ± 4,	111,33 ± 8,08
50	24,33 ± 5,51	18,00 ± 1,73	108,33 ± 28,33	110,00 ± 0,58
150	24,00 ± 8,54	20,00 ± 5,20	88,00 ± 30,79	112,68 ± 7,51
500	21,33 ± 4,04	29,33 ± 3,06	123,00 ± 15,52	107,67 ± 5,95
1 500	33,33 ± 6,44	35,67 ± 20,60	81,00 ± 22,61	108,67 ± 7,57
5 000	26,67 ± 5,03	19,33 ± 5,77	138,67 ± 16,20	115,00 ± 1,66
Control positivo <sup>1</sup>	3 100,00 ± 100,00	1 600,00 ± 41,42	600,00 ± 40,00	791,00 ± 0,40

  

Concentración µg/placa	Colonias revertantes/placa ± DS			
	TA-1535		TA-1537	
	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)
0 <sup>a</sup>	9,67 ± 1,53	5,00 ± 3,00	13,67 ± 3,06	12,00 ± 5,57
50	7,33 ± 2,52	8,00 ± 1,00	20,33 ± 7,51	14,00 ± 1,00
150	13,00 ± 6,68	14,00 ± 6,00	14,33 ± 6,11	16,33 ± 3,21
500	11,33 ± 0,58	10,67 ± 2,52	11,67 ± 1,53	17,33 ± 2,08
1500	9,00 ± 2,00	3,67 ± 0,58	14,00 ± 2,00	16,00 ± 4,36
5000	9,33 ± 2,31	11,87 ± 7,02	16,33 ± 5,86	15,33 ± 6,35
Control positivo <sup>1</sup>	167,33 ± 66,01	725,33 ± 60,57	386,00 ± 33,28	500,00 ± 50,00

<sup>1</sup>Controles positivos: S9: azida de sodio, 1,5 µg/placa para las cepas TA 1535 y TA 100, ácido picrolónico: 100 µg/placa para la cepa TA 98, ICR 170: 10 µg/placa para la cepa TA 1537, cepas TA 1537, TA 98, benzo (α) pireno: para la cepa TA 100, ciclofosfamida: 500 µg/placa para la cepa TA 1535.

En el ensayo *in vivo*, prueba de micronúcleos, las tablas 2 y 3 muestran que no se observan diferencias entre control y dosis para la relación PCE/NCE ni el valor de MNPCE/1000PCE.

Tabla 2. Resultados del ensayo de micronúcleos en ratones machos tratados con extracto de *B. erecta*

Tratamiento (mg/kg)	PCE/NCE $\pm$ DS	% MNPCE $\pm$ DS
Controles		
Agua destilada	1,82 $\pm$ 0,11	1,00 $\pm$ 0,61
Ciclofosfamida, 20 mg/kg	2,83 $\pm$ 0,32	33,10 $\pm$ 9,55**
Extracto de <i>B. erecta</i>		
500	4,29 $\pm$ 1,88	0,80 $\pm$ 0,75
1000	2,15 $\pm$ 0,71	0,90 $\pm$ 0,54
2000	2,49 $\pm$ 0,84	1,50 $\pm$ 0,50

\*\*  $p < 0,01$

Tabla 3. Resultados del ensayo de micronúcleos en ratones hembras tratados con extracto de *B. erecta*

Tratamiento (mg/kg)	PCE/NCE $\pm$ DS	% MNPCE $\pm$ DS
Controles		
Agua destilada	1,74 $\pm$ 0,04	1,30 $\pm$ 0,57
Ciclofosfamida, 20 mg/kg	2,80 $\pm$ 0,35	31,9 $\pm$ 9,37**
Extracto de <i>B. erecta</i>		
500	1,44 $\pm$ 0,70	0,90 $\pm$ 0,41
1 000	1,76 $\pm$ 0,48	1,40 $\pm$ 0,42
2 000	3,29 $\pm$ 1,88	1,87 $\pm$ 0,85

\*\*  $p < 0,01$

## DISCUSIÓN

Tal como puede observarse a partir de los resultados, el liofilizado del extracto acuoso de *B. erecta* estudiado no parece inducir efectos mutagénicos en los 2 sistemas de ensayo donde se evaluó.

Entre los componentes químicos del follaje de esta planta, se encuentran algunos pertenecientes a familias químicas que han sido registradas como antimutagénicas, entre ellos, los flavonoides, que pueden haber influido en que la respuesta haya sido negativa al antagonizar cualquier efecto genotóxico que pudiera inducir algún otro compuesto presente en el extracto, situación muy común en la mayoría de las especies vegetales y que contribuye a fundamentar la inocuidad de su uso en la medicina tradicional.

## SUMMARY

Evaluation of the genotoxic potential of *Boerhavia erecta* L.

The mutagenic activity of an aqueous extract of freeze-dried foliage of *Boerhavia erecta* L. was evaluated. 2 tests were used: Ames' test and micronucleus induction in mouse bone marrow. In Ames' test, the results were negative in all the tested strains of *Salmonella typhimurium* : TA 1535, TA 1537, TA 98 and TA 100, with a protocol of incorporation to plaque and concentrations up to 5 mg of freeze-dried/plaque. In the micronucleus test, 2 oral doses of 10 mL/kg were administered separated by 24 hours, with sacrifice 24 hours after the last application. The doses were 500, 1 000 and 2 000 mg of freeze-dried/kg. No variations were observed in the relation between polychromatic erythrocytes and normochromatic erythrocytes, an indicator of medullary toxicity. No significant alterations were observed in the frequency of the micronucleated polychromatic erythrocytes among the different treatment groups. It was proved that the aqueous extract of freeze-dried foliage of *B. Erecta* does not seem to induce mutagenic effects in the two assay systems where it was assessed.

**Key words:** *Boerhavia erecta* L., Ames' test, micronucleus test, genotoxicity.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Editorial Ciencia y Técnica;1988.p.128-9.
2. Olukoya DK, Idika N, Odugbemi T. Antibacterial activity of some medicinal plants from Nigeria . J Ethnopharmacol. 1993;39(1):69-72.
3. Kumar S, Bagachi GD, Darokar MP. Antibacterial activity observed in the seeds of some coprophilous plants. International J Pharmacog. 1997;35(3):179-84.
4. Sohni YR, Bhatt RM. Activity of crude extract formulation in experimental hepatic amebiasis and immunomodulation studies. J Ethnopharmacol. 1996;54(2-3):119-24.
5. Sohni YR, Kaimal P, Bhatt RM. The antiamebic effect of crude drug formulation of herbal extract against *Entamoeba histolytica* *in vitro* and *in vivo*. J Ethnopharmacol. 1995;45(1): 43-52.
6. Aynehchi Y. Screening of banaan plants for antimicrobial activity. Acta Pharm Suecia. 1982;19(4):303-8.
7. Dhai M. Screening of indian plants for biological activity. Part I. Indian J Exp Biol. 1968;6:232-47.
8. Bramadlhayalaselvane A, Rajaseram K. Chemotaxonomic studies on South Indian species of Nictaginaceae. J Economic Taxonomic Botany. 1984;18:499-500.
9. Fadeyi MO, Adeoye AO, Olowokudejo JD. Epidermall and phytochemical studies in genus *Boerhavia* (Nyctaginaceae) in Nigeria. Int J Crude Drug Res. 1989;27:178-84.
10. Souza Brito ARM, Robineau LG, Bighetti BJE, Gracioso JS, Hiruma-Lima CA. Antinociceptive effect of *Boerhavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) in mice. J Ethnopharmacol. 1999 (en prensa).
11. Mussana I. Two 12<sup>a</sup> hydroxyrotenoids from *B. coccinea*. Phytochemistry.1986;25(11): 2688-9.
12. Ferrari F, Mussana I, Goulart Sant Ana AE. Two new isoflavonoids from *B. coccinea*. J Nat Prod. 1991;54(2):597-8.
13. Srivastava R, Shukia YN. An insaturated acid from *B. diffusa*. Indian Drug.1998;35(2):103-4.

14. Suri OP, Kart R, Jamwal RS, Suri KA, Atal CK. *Boerhavia diffusa*, a new source of phytoecdysones. *Plant Med.* 1982;44:180-1.
15. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983;113:173-215.
16. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagens.* 1991;18:277-91.
17. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Hollaender A, editor. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection.* New York: Plenum;1976.p.31-53.
18. Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, et al. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat Res.* 1994;312: 217-33.

Recibido: 3 de febrero de 2006. Aprobado: 12 de mayo de 2006.

Lic. *Janet Piloto Ferrer*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Departamento de investigaciones Biológicas. La Habana, Cuba.

<sup>1</sup>Licenciada en Ciencias Biológicas

<sup>2</sup>Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar

<sup>3</sup>Licenciado en Ciencias Biológicas. Investigador Auxiliar.

<sup>4</sup>Licenciada en Microbiología.

<sup>5</sup>Licenciado en Ciencias Farmacéuticas.