

INDUSTRIA MEDICOFARMACEUTICA. CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLÓGICAS

## AUSENCIA DE GENOTOXICIDAD EN EXTRACTOS FLUIDOS DE *Ortosiphon aristatus* Blume (TÉ DE RIÑÓN) Y *Lepidium virginicum* L. (MASTUERZO)

*Lic. Alberto Ramos Ruiz*,<sup>1</sup> *Lic. Aida Villaescusa González*<sup>2</sup> y *Lic. Angel Vizoso Parra*<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se procede a evaluar la posible actividad genotóxica de extractos fluidos de *Ortosiphon aristatus* Blume (té de riñón) y *Lepidium virginicum* L. (mastuerzo). Se realizan las pruebas de segregación somática en *Aspergillus nidulans* y la inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. En el ensayo de segregación mitótica, las colonias de *Aspergillus* crecieron durante 6 y 10 días en medio de cultivo agarizado con extracto fluido. Se evaluaron cinco concentraciones de los extractos, en un rango de 0,08 a 1,6 mg de sólidos totales/mL. Para ninguna de las concentraciones ensayadas en ambos extractos se encontraron incrementos significativos en la frecuencia de sectores segregantes por colonia, indicador de genotoxicidad para esta prueba. El test de micronúcleos se realizó en ratones albinos de la línea no isogénica suizo, a los que se hicieron dos administraciones orales de los extractos, separadas 24 h entre sí, con sacrificio 24 h después de la última aplicación. Para el extracto de mastuerzo las dosis aplicadas fueron de 0,6, 1,2 y 2,4 g/kg de pc (peso corporal) y del extracto de té de riñón fueron 1,75, 2,21 y 2,84 g/kg de pc. En ninguno de los extractos estudiados se detectaron efecto citotóxico sobre la proliferación celular en la médula ósea, ni aumentos significativos en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (mPCE), indicador de mutagenicidad para este ensayo, vinculados a los tratamientos con los extractos fluidos de mastuerzo y té de riñón.

**Palabras clave:** Genotoxicidad; *Ortosiphon aristatus*; *Lepidium virginicum*; *Aspergillus nidulans*; Test de micronúcleos.

### INTRODUCCION

En los estudios toxicológicos y farmacológicos considerados en el Programa Nacional de Plantas Medicinales, se prevé investigar la probable inducción de efectos genotóxicos de las plantas comprendidas en dicho programa. Estos efectos involucran una serie de daños genéticos (mutacio-

nes y aberraciones cromosómicas) que pueden producir graves trastornos en la salud, tales como el desarrollo de cáncer y la transmisión de alteraciones genéticas a la descendencia.

El té de riñón (*Ortosiphon aristatus* Blume) (figura 1) y el mastuerzo (*Lepidium virginicum* L.) (figura 2) son plantas medicinales con efectos

<sup>1</sup> Licenciado en Bioquímica. Investigador Agregado.

<sup>2</sup> Licenciado(a) en Biología. Investigador(a) Agregado(a).

diuréticos,<sup>1,2</sup> consumidas con relativa frecuencia por la población de nuestro país, ya sea como infusiones o droga seca. No se cuenta con datos acerca de la toxicidad genética de estas plantas. Teniendo en cuenta lo apuntado al inicio, se consideró oportuno obtener información experimental sobre la inducción posible de daños genéticos de sus extractos, mediante dos ensayos que detectan la inducción de *crossing-over* mitótico, aneuploidía, clastogénesis (segregación somática en *Aspergillus nidulans*) y daño cromosomal *in vivo* (test de micronúcleos en médula ósea de ratón).

En el *Aspergillus nidulans* se hace posible con relativa facilidad presentar cepas diploides convenientemente marcadas de la ocurrencia de segregación somática, ocasionada por *crossing-over* mitótico y/o malasegregación de cromosomas (como procesos primarios o mutaciones previas con efectos semidominantes sobre la viabilidad). Estas cepas son heterocigóticas para marcadores recesivos de color de los conidios y, al ocurrir alguno de los fenómenos antes mencionados, aparecen en las colonias expuestas sectores, bandas o puntos de conidiación de color diferente al resto.<sup>3</sup>

El ensayo de inducción de micronúcleos en la médula ósea de ratón es una prueba *in vivo* ampliamente validada y permite detectar agentes que causan, tanto ruptura cromosómica (y cromatídica), como pérdida de cromosomas completos (al afectar la función del huso mitótico). En ambos casos, la migración y distribución de parte del material genético se ven alteradas durante la anafase y telofase, lo cual conduce a la formación de núcleos secundarios o micronúcleos, que pueden identificarse fácilmente en eritrocitos jóvenes de la médula ósea.<sup>4</sup>

## MATERIALES Y METODOS

### Material vegetal

Estas plantas se cultivaron en Güira de Melena, provincia La Habana. El mastuerzo fue recolectado en octubre de 1992 y el té de riñón en diciembre del mismo año. Los extractos fluidos se elaboraron en la Empresa Laboratorio Farmacéutico "Saúl Delgado", según las normas establecidas.<sup>5</sup> En relación con el mastuerzo, la muestra estudiada provenía del Lote 1, con fecha de elaboración del 26 de octubre de 1992; contenía 78,6 mg/mL de sólidos totales y 21 % (v/v) de etanol.

Respecto al té de riñón, se empleó en los ensayos extracto fluido procedente del Lote 1/92, elaborado el 20 de enero de 1992, que con-



Figura 1. *Ortosiphon aristatus* Blume (té de riñón).

tenía 74 mg/mL de sólidos totales y 18 % (v/v) de etanol.

### Test de Segregación Mitótica en *Aspergillus nidulans*

Se empleó la cepa *Aspergillus nidulans* D-30,6 obtenida de los haploides A593(a) y A594(b) procedentes del Fungal Genetics Stock Center (FGSC) en Atlanta, EE.UU. El medio de cultivo empleado fue medio completo (MC).<sup>7</sup>

Se siguió un protocolo experimental de exposición en medio de cultivo agarizado, donde se siembran los conidios en punto y se incuban de 6 a 10 días a 37 °C.<sup>8</sup> En experimentos previos se determinó que la concentración máxima que se debía ensayar era de 1,57 para el mastuerzo y 1,48 para el té de riñón (en miligramos de sólidos totales/mL de MC). En los valores superiores, aunque no se observó toxicidad cuantitativa (como reducción del crecimiento lineal de la colonia), si se presentaron alteraciones en la morfología y conidiación,

que afectaban la visualización de los sectores segregantes.

Estos efectos no están relacionados con la presencia de etanol en el medio de cultivo (0,4 %), pues se ha comprobado que hasta concentraciones del 2 %, puede emplearse esta variante de incorporación en placa, sin interferir en la observación y cuantificación de la segregación mitótica.<sup>9</sup> Podría pensarse en efectos citotóxicos circunscritos a los procesos de diferenciación celular que conducen a la formación de esporas asexuales (conidios) en el ciclo vegetativo del hongo.



Figura 2. *Lepidium virginicum* L. (mastuerzo).

El crecimiento y desarrollo micelial es un proceso complejo, susceptible de ser interferido en sus múltiples etapas. Al respecto, se cita el caso de varios fungicidas como polioxin D, cicloheximida, carboxin, triarimol y nistatin, que afectan el crecimiento y no causan daño genético, pues su blanco de acción no se relaciona directa ni indirectamente con los mecanismos hereditarios.<sup>9</sup>

La toxicidad cuantitativa se evalúa a las 72 horas de la siembra con incubación a 37 °C. Esta se expresa como el porcentaje de reducción en el diámetro de la colonia respecto al control negativo (de solvente). La genotoxicidad se evalúa según la frecuencia de sectores segregantes de color de los conidios (marcadores recesivos en homocigosis), observada para cada concentración ensayada.<sup>8</sup>

### Test de Micronúcleos

La prueba se realizó en ratones albinos de la línea no isogénica suizo, procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM. Previo a la experiencia, los animales fueron sometidos a un período de adaptación durante una semana en el bioterio de la Facultad de Medicina "Dr. Salvador Allende" del ISCMH. Recibieron dieta (pienso peletizado "ratonina") y agua *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones de humedad y temperatura convencionales. Al comienzo del ensayo tenían entre ocho y diez semanas de nacidos, con un peso promedio de  $22,6 \pm 3,4$  g (té de riñón) y  $38,5 \pm 3,4$  g (mastuerzo).

Se establecieron cinco grupos de diez animales: control negativo, control positivo y tres tratamientos (cinco por cada sexo). Se administró extracto fluido por vía oral; la propuesta para su uso terapéutico, en un volumen de 3 mL/100 g de pc. La dosis máxima se seleccionó en un rango del 50 al 80 % de la LD50.<sup>4</sup> Para estos extractos la LD50, expresada en gramos de sólidos totales/kg de pc fue de 4,84 para el mastuerzo y 4,37 para el té de riñón (García CL. Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, comunicación personal). Respecto al resto de las dosis, se eligieron fracciones no inferiores al 25 % de la dosis máxima empleada.

El esquema de tratamiento seguido consistió en dos administraciones separadas por un intervalo de 24 horas y sacrificio 24 horas después de la última aplicación.<sup>10</sup>

Las muestras de médula ósea se obtuvieron según lo establecido.<sup>11</sup> Estas se fijaron con etanol al 95 % (v/v) durante cinco minutos y se secaron al aire durante 24 horas. Finalmente se tiñeron

con Giemsa al 5 % (v/v) en agua común durante aproximadamente 20 minutos.

Se contaron al menos 1 000 eritrocitos policromáticos (PCE) por animal y además, los eritrocitos normocromáticos (NCE) presentes por cada 250 PCE para estimar la relación PCE/NCE, indicador de citotoxicidad. Los micronúcleos se identificaron de acuerdo con los criterios establecidos.<sup>12</sup>

## RESULTADOS

### Segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*

En la [tabla 1](#) se muestran los resultados de dos experimentos. En todo el rango de concentraciones ensayadas la presencia de los extractos estimula el crecimiento lineal de las colonias, como lo demuestra el signo negativo del índice de toxicidad, que expresa en porcentaje la reducción del diámetro de la colonia respecto al control negativo. No se encontraron efectos genotóxicos al realizarse un análisis de varianza simple a la frecuencia de sectores por colonia (FSC). Este no arrojó diferencias significati-

vas en ningún caso:  $p = 0,73$  para el mastuerzo y  $p = 0,23$  para el té de riñón.

### Test de Micronúcleos

Los valores de PCE/NCE y porcentaje mPCE se procesaron mediante un análisis de varianza según el sexo y los tratamientos ensayados.

En el extracto fluido de mastuerzo no se encontraron diferencias significativas en la relación PCE/NCE, en cuanto al sexo ( $p = 0,43$ ), dosis ( $p = 0,15$ ) ni la interacción sexo - dosis ( $p = 0,28$ ). Tampoco para el extracto de té de riñón se halló significación en el sexo ( $p = 0,92$ ) ni la interacción sexo - dosis ( $p = 0,69$ ), aunque en la dosis ( $p = 0,09$ ) se aprecia una tendencia a la disminución.

Para el porcentaje de PCE micronucleados, en el mastuerzo no se hallaron diferencias significativas en el sexo ( $p = 0,55$ ), dosis ( $p = 0,43$ ) ni la interacción sexo - dosis ( $p = 0,79$ ). De manera similar, en el té de riñón, tampoco se detectaron diferencias significativas entre sexos ( $p = 0,81$ ), dosis ( $p = 0,80$ ) ni la interacción sexo - dosis ( $p = 0,87$ ). En la [tabla 2](#) aparecen resumidos

Tabla 1. Resultados del ensayo de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans* D-30

Concentración (mg/mL)	Índice de toxicidad <sup>1</sup>	Colonias analizadas	Sectores segregantes	FSC <sup>2</sup>
<b>Mastuerzo</b>				
Etanol (21 %) <sup>3</sup>		100	25	0,25
0,079	-17,5	100	26	0,26
0,393	-22,5	100	29	0,29
0,786	-17,5	100	28	0,28
1,179	-10,0	90	17	0,19
1,572	- 5,0	100	22	0,22
<b>Té de riñón</b>				
Etanol (18 %) <sup>3</sup>		97	55	0,57
0,074	-7,1	100	78	0,78
0,370	-4,8	100	68	0,68
0,740	-4,8	100	59	0,59
1,110	0,0	100	58	0,58
1,482	0,0	100	54	0,54
<b>Hidrato de cloral</b>				
6 mM <sup>4</sup>	+ 73,8	100	252	2,52*

<sup>1</sup> Reducción del diámetro de la colonia respecto al control negativo a las 72 h de incubación.

<sup>2</sup> Frecuencia de sectores por colonia.

<sup>3</sup> Control negativo.

<sup>4</sup> Control positivo: para el análisis estadístico se aplicó a los sectores encontrados en cada colonia la transformación  $\sqrt{(x + 0,05)}$  antes de realizar un ANOVA simple.

\*  $p < 0,01$  (test de Dunnett).

Tabla 2. Resultados del test de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratones tratados con extracto fluido de mastuerzo y té de riñón

Tratamiento (g/kg pc/día)	PCE/NCE <sup>1</sup> ± DE	PCE <sup>2</sup>	mPCE <sup>3</sup>	mPCE ± DE
<b>Mastuerzo</b>				
Etanol (21 %) <sup>4</sup>	1,32 ± 0,23	10 262	23	0,23 ± 0,12
0,605	1,40 ± 0,44	10 445	16	0,15 ± 0,10
1,210	1,55 ± 0,31	10 305	22	0,23 ± 0,18
2,422	1,30 ± 0,20	10 354	25	0,24 ± 0,12
<b>Té de riñón</b>				
Etanol (18 %) <sup>4</sup>	1,40 ± 0,42	10 307	14	0,14 ± 0,08
1,750	1,71 ± 0,40	10 299	18	0,18 ± 0,11
1,190	1,63 ± 0,22	10 131	19	0,19 ± 0,12
2,840	1,49 ± 0,28	10 177	16	0,16 ± 0,11
<b>Ciclofosfamida<sup>5</sup></b>				
0,040	0,59 ± 0,29*	10 256	326	3,53 ± 1,07*

Nota: Resultados promedio para 10 animales/grupo experimental (se agrupan los dos sexos).

<sup>1</sup> Indicador de citotoxicidad medular.

<sup>2</sup> PCE totales actualizados.

<sup>3</sup> PCE micronucleados.

<sup>4</sup> Control negativo, agua destilada.

<sup>5</sup> Control positivo; para el análisis estadístico se aplicó a los datos de PCE/NCE y % mPCE la transformación  $\sqrt{(x+1)^{15}}$  antes de realizar un ANOVA de dos vías.

\*\*  $p < 0,01$  (test de Dunnett).

los resultados para este ensayo. Se muestran los promedios correspondientes a cada tratamiento después de agrupar los datos de uno y otro sexos. Para el control negativo los valores se encuentran en el rango de frecuencia espontánea (0,12 - 0,49 %) reportado por 15 laboratorios en un estudio del International Program for Chemical Safety (IPCS),<sup>13</sup> y no se diferencian tampoco del valor de frecuencia espontánea encontrado en nuestras condiciones de trabajo, que es de  $0,24 \pm 0,20$ .

## DISCUSION

No se han encontrado referencias a la actividad genotóxica de estas plantas, ni a la presencia de componentes que puedan hacer pensar en la posibilidad de efectos mutagénicos, debido a la presencia de agrupaciones que funcionen como alertas estructurales conocidos. En los ensayos descritos en este trabajo no se hallaron evidencias de mutagenicidad, tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo*. Cabe señalar que la dosis propuesta por las autoridades de salud pública en nuestro país es de 2 a 6 mg/kg de pc diarios,<sup>14</sup> lo cual es muchas veces menor que la dosis máxima ensayada en los animales.

## SUMMARY

**Possible genotoxic activity of fluids extracts from *Ortosiphon aristatus* Blume and *Lepidium virginicum* L. was assessed. Two assays of somatic secretion in *Aspergillus nidulans* and induction of micronuclei in bone marrow of mouse were carried out. In the assay of mitotic secretion, colonies of aspergillus grew up during six and ten days in culture medium with fluid extract in agar. Five concentrations of extracts were assessed, in a range of 0,08 to 1,6 mg of total solids. No significant increases were found in any of the concentrations assayed regarding both extracts, in frequency of secretating sectors by colony, indicator considered as an of genotoxicity to this assay. Micronuclei test was performed in swiss non-isogenic strain of albino mice, which received oral administrations of extracts, at 24-hour intervals, animals were sacrificed 24-hour after last application. Doses of *Lepidium virginicum* were 0,6; 1,2; and 2,4 g/kg of body weight, where as doses of *Ortosiphon aristatus* were 1,75; 2,21; and 2,84 g/kg of body weight. No cytotoxic effect of the extracts studied was found on cellular proliferation in bone marrow, neither significant increases in the frequency of micronucleated polychromatic red cells (mPCE), which is an indicator of mutagenicity to this assay, linked to treatments with fluid extracts of the above-mentioned plants.**

**Key words:** Genotoxicity; *Ortosiphon aristatus*; *Lepidium virginicum*; *Aspergillus nidulans*; Micronuclei test.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Roig JT. Plantas Medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana:Editorial Científico-Técnica, 1974.
2. Casadebaig-Lafon J, Jacob M, Cassanas G, et al. Adsorbed plant extracts, use of extracts of dried seeds of *Ortosiphon stamineus* Benth. *Pharm Acta Helv* 1989;63:220-4.
3. Käfer E, Scott BR, Kappas A. Systems and results of tests for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res* 1986;167:9-34.
4. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, et al. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present and Future. *Environ Mol Mutagen* 1991;18:277-91.
5. Soler B, Méndez G, García M, Miranda M. Normas Ramales. Medicamentos de origen vegetal. Tinturas y extractos fluidos. La Habana: Ministerio de Salud Pública, 1992.
6. Käfer E. Tests which distinguish induced crossing-over and aneuploidy from secondary segregation in *Aspergillus* treated with chloral hydrate and g-rays. *Mutation Res* 1986;164:145-66.
7. Scott BR, Käfer E. *Aspergillus nidulans* an organism for detecting a range of genetic damage. En: Serres FJ de, Hollaender A eds. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. New York:Plenum, 1982:447-79.
8. De la Torre RA, Rúa R, Hernández G de la, et al. Genotoxic effects of niclosamide in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res* 1989;222:337-41.
9. Georgopoulos SG, Kappas A, Hastie, AC. Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as a criterion of fungitoxicity by interference with hereditary processes. *Phytopathology* 1976;66:217-20.
10. Garriott ML, Piper ChE, Kokino AJ. A simplified protocol for the mouse bone marrow micronucleus assay. *J Appl Toxicol* 1988;8:141-44.
11. Schmid, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Hollaender A ed. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. New York:Plenum, 1976:31-53.
12. The Collaborative Study Group for the micronucleus test. Sex difference in the Micronucleus Test. *Mutation Res* 1986;172:151-63.
13. MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, et al. Guidelines for the conduct of micronuclei assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Res* 1987;169:103-12.
14. Ministerio de Salud Pública. Guía terapéutica dispensarial de fitofármacos y apifármacos. La Habana: Ministerio de Salud Pública, 1992:87,108.
15. Lovell DP, Albanese R, Clare G, et al. Statistical analysis of in vivo cytogenetic assays. En: Kirkland DJ ed. *Statistical evaluation of mutagenicity test data*. Cambridge:Cambridge University, 1989:184-230.

Lic. Alberto Ramos Ruiz. Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos. Avenida 26 No. 1605, Nuevo Vedado, Ciudad de La Habana, CP: 10600, Cuba

**RESUMED** es una revista referativa cuatrimestral del Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. Su objetivo consiste en proporcionar a los profesionales, técnicos y estudiantes de la salud resúmenes, en idioma español, de artículos científicos publicados en revistas médicas internacionales, seleccionados según el criterio de expertos, y artículos de revisión solicitados a especialistas que resulten, en ambos casos, de especial interés para la atención primaria.

Toda la correspondencia debe dirigirse a:

### EDITORIAL CIENCIAS MEDICAS

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas  
Calle E No. 452, e/ 19 y 21, el Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba,  
CP: 10400.

Email: [resumed@infomed.sld.cu](mailto:resumed@infomed.sld.cu)

Fax: 33 3063. Télex: 0511202

Teléfonos: 32 5338, 32 4519 y 32 4579.

