

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO EN EXTRACTOS FLUIDOS DE *PLANTAGO LANCEOLATA* L. (LLANTÉN MENOR) Y *MATRICARIA RECUTITA* L. (MANZANILLA)

Lic. Ángel Vizoso Parra,¹ Lic. Alberto Ramos Ruiz,² Lic. Aida Villaescusa González,³ Dra. MercedesDécalo Michelena⁴ y Dr. José Betancourt Badell⁵

Resumen

Mediante 2 ensayos de genotoxicidad, segregación mitótica en *Aspergillus nidulans* D-30 y la inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón se procedió a evaluar la posible acción genotóxica de los extractos fluidos de *Plantago lanceolata* L. (llantén menor) y *Matricaria recutita* L. (manzanilla). En el ensayo de segregación mitótica se evaluaron los extractos fluidos de llantén menor y manzanilla con 5 y 6 concentraciones en un rango de 0,6 a 4,76 y 0,016 a 0,652 mg de sólidos totales/mL respectivamente. En el ensayo de inducción de micronúcleos se probaron para el llantén menor dosis de 1,875; 3,750 y 6,000 g/kg peso corporal (pc) y en el caso de la manzanilla dosis de 1,23; 1,96 y 2,45 g/kg pc. En ninguno de los ensayos realizados se detectó la ocurrencia de efectos citotóxicos y genotóxicos.

Descriptores DeCS: PLANTAGO; ASPERGILLUS NIDULANS; MEDULA OSEA; TESTS DE MUTAGENICIDAD; TESTS DE MICRONUCLEOS; RATONES.

Summary

Potential genotoxic action of fluid extracts of *Plantago lanceolata* L. (Llantén menor), and *Matricaria recutita* L. (Chamomille) was assessed by 2 genotoxic trials: mitotic spreading in D-30 *Aspergillus nidulans* and micronuclei induction in bone marrow of the mouse. In mitotic spreading trial, fluid extracts of *Plantago lanceolata* L. and Chamomille, with 5 and 6 concentrations in a range of 0,6-4,76, and 0,016-0,652 mg of total solids/mL, respectively, were assessed. In micronuclei induction trial, for *Plantago lanceolata* L., dose of 1875; 3,750, and 6,000 g/kg of body weight (bw), and in the case of Chamomille, dose of 1,23; 1,96, and 2,45 g/kg of bw), were tested. In none of trials performed, it was possible to detect occurrence of cytotoxic and genotoxic effects.

Subject headings: PLANTAGO; ASPERGILLUS NIDULANS; BONE MARROW; MUTAGENICITY TESTS; MICRONUCLEUS TESTS; MICE.

El uso de la medicina verde como alternativa del empleo de medicamentos sintéticos proporciona un arsenal valioso para el desarrollo de la industria médico-farmacéutica. Para esto se hace necesario los estudios farmacológicos, toxicológicos y genotóxicos de los extractos fluidos, acuosos, tinturas y liofilizados de las plantas comprendidas dentro del Programa Nacional de Plantas Medicinales. Entre los

efectos que pueden dañar el material hereditario, se puede señalar las mutaciones génicas y las aberraciones cromosómicas, las cuales pueden producir transformaciones malignas e incluso la transmisión de alteraciones genéticas a la descendencia. Dentro de las investigaciones se procedió a evaluar el posible efecto genotóxico de los extractos fluidos de *Plantago lanceolata* L. (llantén menor) y *Matricaria recutita* L. (manzanilla).

¹ Licenciado en Ciencias Biológicas. Investigador Auxiliar.

² Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar.

³ Licenciada en Biología. Investigadora Agregada.

⁴ Doctora en Medicina. Especialista de I Grado en Microbiología.

⁵ Doctor en Medicina. Profesor Asistente.

El llantén menor es una planta medicinal y a partir de sus hojas se preparan infusiones y extractos fluidos con propiedades farmacológicas reconocidas, tales como antiinflamatoria, anticatarral, diurética, litíásica urinaria. También se le atribuyen propiedades como marcador biológico en la contaminación ambiental (Mora, TA, 1993. Apuntes sobre el estudio preclínico de un extracto a partir de *Folium plantaginis* y *Lanceolatae*. Trabajo de diploma, Universidad de La Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos).

La manzanilla es una planta medicinal muy usada por la población. A partir de sus flores se preparan infusiones a las que se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antiinfecciosas, antifúngicas y sedantes, comprobadas experimentalmente. Popularmente se emplea como antidiarreico.¹

Los ensayos genotóxicos se comenzaron con el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 (diploide) que pone de manifiesto la ocurrencia de segregación somática ocasionada por recombinación mitótica, aneuploidía y clastogénesis.²

Para llevar a cabo una adecuada evaluación genotóxica de estos 2 extractos fue necesario emplear un ensayo *in vivo* con el objetivo de que propiedades metabólicas y toxicocinéticas estuvieran en condiciones semejantes al hombre.

Para esto se seleccionó el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, prueba validada internacionalmente que detecta daño cromosomal.³ No se reportan estudios genotóxicos de estas plantas.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el posible efecto citotóxico y genotóxico de 2 plantas medicinales, evaluándose sus extractos en 2 sistemas de ensayo a corto plazo: inducción de segregación somática en el ascomiceto *Aspergillus nidulans* D-30 y el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón.

Métodos

MATERIAL VEGETAL

El llantén menor se recolectó en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig", Güira de Melena, provincia de La Habana, en Enero de 1993. La manzanilla se recolectó en Pinar del Río en diciembre de 1992. Los extractos fluidos se elaboraron en la Empresa Laboratorio Farmacéutico "Saúl Delgado".⁴ En el caso del llantén menor, la muestra estudiada provenía del lote 1/93; cuyas características físico-químicas fueron las siguientes: sólidos totales, 23,8 %; pH 4,6 %; etanol, 18,6 % (v/v); densidad relativa, 1,085 %. Respecto a la manzanilla, se empleó en los ensayos extracto fluido del lote 1/93, con la siguiente caracterización: sólidos totales, 16,3 %; pH 5,3 %; etanol 37,9 % (v/v); densidad relativa, 1,01 %.

ENSAYO DE SEGREGACIÓN MITÓTICA

Se empleó la cepa *Aspergillus nidulans* D-30,⁵ obtenida de las cepas haploides A593 y A594 procedentes del *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC) en Atlanta, USA. El medio de cultivo empleado fue medio completo (MC).⁶

Se diseñó un protocolo experimental de exposición en medio sólido (MC)⁷ que evalúa la toxicidad (IT) y la genotoxicidad en término de reducción del diámetro de las colonias y de la frecuencia de sectores segregantes coloreados (FSC), con relación al control negativo (solvente) respectivamente, observada para cada concentración de los extractos estudiados.

Para estimar la toxicidad, las placas se inocularon en punto con conidios de la cepa diploide D-30 y el diámetro de las colonias se midió a las 72 h de incubación a 37 °C. Para evaluar la genotoxicidad las placas con MC se inocularon en 5 puntos radialmente distribuidos en las placas y se incubaron a 37 °C por un período de 6 a 10 d.⁷

Se ensayaron concentraciones (en mg de sólidos totales/mL de MC) hasta 4,76 (llantén menor) y 0,652 (manzanilla), porque a partir de esos valores se observaron alteraciones sobre el aspecto, color y conidiación de las colonias que impedían la visualización de los sectores segregantes de color.

El control negativo empleado fue etanol al 20 y al 37,9 %, a la concentración final presente en las máximas dosis de los extractos ensayados, 0,4 % (v/v) y 0,16 % (v/v) para el llantén menor y la manzanilla, respectivamente.

El control positivo utilizado fue el hidrato de cloral a una concentración de 6 mM.⁵

Para el análisis estadístico los datos primarios se normalizaron aplicando la transformación $\sqrt{(x + 0,5)}$ a los sectores segregantes. Después se le aplicó un Anova simple.⁸

ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

Se emplearon ratones (*Mus musculus*) albinos de la línea no isogénica Suizo procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM. Los animales tenían al comienzo del experimento 8 semanas de nacidos con un peso promedio de $43,8 \pm 4,0$ g (llantén menor) y $26,8 \pm 2,9$ g (manzanilla).

Durante el experimento recibieron agua y comida (ratonina peletizada) son restricción y se mantuvieron en condiciones de humedad y temperaturas convencionales.

Se establecieron 6 grupos experimentales de 10 animales de ambos sexos (control negativo, control positivo, control espontáneo y 3 dosis).

Los animales se seleccionaron al azar, separándose los grupos en jaulas independientes. La administración de los productos fue por vía oral como lo indica su uso terapéutico en un volumen equivalente a un 3 % (llantén menor) y 1,5 % (manzanilla) de su peso. Las dosis se establecieron sobre la base de la LD₅₀ (dosis letal media) de los productos correspondiendo un valor de 7,50 g/kg y de 7,43 g/kg para el llantén menor y la manzanilla, respectivamente (Tillán, J., Laboratorio de Control Biológico del CIDEM; comunicación personal) y como máximo una dosis equivalente al 80-50 % de la LD₅₀.⁹ Se tuvo en cuenta que el contenido de etanol administrado no resultase letal, para lo cual se estableció un límite máximo de 4,74 g/kg teniendo en cuenta que la LD₅₀ para el etanol en las condiciones experimentales fue de 7,8 g/kg. Respecto al resto de las dosis, se seleccionaron fracciones no inferiores al 25 % de la dosis máxima.

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

| Concentración (mg sólidos/mL) | Colonias analizadas | Toxicidad | | Genotoxicidad | | |
|--|------------------------|------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|------------------|
| | | Diámetro (mm) | IT ^a (%) | Colonias analizadas | Sectores segregantes | FSC ^b |
| Llantén menor | | | | | | |
| Etanol (0,4 %) ^c | 8 | 42 | | 100 | 74 | 0,74 |
| 0,6 | 8 | 45 | -7,14 | 100 | 57 | 0,57 |
| 1,19 | 8 | 44 | -4,76 | 100 | 40 | 0,40 |
| 1,90 | 8 | 45 | -7,14 | 100 | 46 | 0,46 |
| 2,38 | 8 | 46 | -9,52 | 100 | 47 | 0,47 |
| 3,57 | 8 | 48 | -14,28 | 100 | 47 | 0,47 |
| 4,76 | 8 | 48 | -14,28 | 100 | 48 | 0,48 |
| Manzanilla | | | | | | |
| Etanol (0,16 %) ^c | 8 | 45 | | 100 | 64 | 0,64 |
| 0,016 | 8 | 45 | 0,0 | 93 | 49 | 0,52 |
| 0,065 | 7 | 45 | 0,0 | 92 | 32 | 0,35* |
| 0,630 | 7 | 46 | -2,2 | 77 | 30 | 0,39* |
| 0,326 | 8 | 46 | -2,2 | 100 | 42 | 0,42* |
| 0,652 | 8 | 45 | 0,0 | 100 | 23 | 0,23* |
| Hidrato de Cloral ^d 6 mM | 8 | 13 | 69,0** | 100 | 246 | 2,46** |

^a Índice de toxicidad (reducción del diámetro de la colonia respecto al control negativo) ^b Frecuencia de Sectores por Colonia ^c Control Negativo ^d Control Positivo *p < 0,05, **p < 0,01 (estadístico de *Dunnett*).

El esquema de tratamiento consistió en 2 administraciones separadas por un intervalo de 24 h. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 24 h después de la última administración.¹⁰

Las muestras de médula ósea obtenidas³ se fijaron con etanol al 95 % (v/v) durante 5 min y se secaron al aire durante 24 h. Posteriormente se tiñeron con Giemsa al 5 % (v/v) en agua corriente durante aproximadamente 20 min. Se contaron 1000 eritrocitos policromáticos (PCE) por animal, y además, los eritrocitos normocromáticos (NCE) por cada 250 PCE, para calcular el índice de toxicidad (IT) dado por la relación PCE/NCE. Los micronúcleos (MN) se identificaron de acuerdo a lo recomendado en "The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test."¹¹

Como controles negativos se empleó etanol al 20 % y 38 %; como control positivo se utilizó ciclofosfamida, 20 mg/kg.

Para la evaluación estadística los valores del IT y el porcentaje de PCE micronucleados (mPCE) se normalizaron empleando la transformación $\sqrt{(x+1)}$. Los valores transformados se procesaron mediante un análisis de varianza de 2 vías, teniendo en cuenta el sexo y las dosis ensayadas.¹²

Resultados

SEGREGACIÓN MITÓTICA EN *ASPERGILLUS NIDULANS* D-30

La tabla 1 muestra los resultados de los extractos fluidos estudiados. En el caso del llantén menor se observa una

estimulación del crecimiento de las colonias, como lo demuestra el signo negativo del IT. Con relación a la manzanilla, tampoco se evidencia un efecto inhibitor del crecimiento de las colonias en las concentraciones estudiadas. No se encontró efecto genotóxico significativo en el extracto fluido del llantén menor al realizarle un análisis de varianza simple a la FSC ($p = 0,41$). Sin embargo, en el extracto de manzanilla sí se observó una fuerte significación ($p = 3,19 \times 10^{-4}$) debido a la disminución de este parámetro con respecto al control negativo para todas las concentraciones ensayadas.

ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de inducción de micronúcleos para los 2 extractos fluidos. Como se puede apreciar, no existen diferencias significativas en el IT con relación al control negativo entre dosis ($p = 0,55$), sexo ($p = 0,10$) ni a la interacción dosis-sexo ($p = 0,33$) para el llantén menor. Tampoco para la manzanilla se halló diferencia significativa respecto a las dosis ($p = 0,29$), sexo ($p = 0,72$) ni para la interacción dosis-sexo ($p = 0,50$).

Para el % mPCE, indicador de daño genético, en el caso del llantén menor, no se observaron diferencias significativas en cuanto a sexo ($p = 0,58$), dosis ($p = 0,97$) ni a la interacción sexo-dosis ($p = 0,77$). En lo que respecta a la manzanilla tampoco se encontraron diferencias significativas entre sexos ($p = 0,19$), dosis ($p = 0,61$) ni la interacción sexo-dosis ($p = 0,92$).

TABLA 2. Resultados del ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón

| Dosis (mg/kg) | IT ± DS ^a | PCE analizados | mPCE ^b | %mPCE ± DS |
|-----------------------------|----------------------|----------------|-------------------|---------------|
| Llantén menor | | | | |
| Etanol ^c 4,74 | 1,23 ± 0,13 | 10330 | 31 | 0,30 ± 0,14 |
| 1,875 | 1,25 ± 0,23 | 10300 | 25 | 0,25 ± 0,11 |
| 3,750 | 1,31 ± 0,29 | 10430 | 31 | 0,29 ± 0,12 |
| 6,000 | 1,22 ± 0,24 | 10250 | 27 | 0,26 ± 0,18 |
| Manzanilla | | | | |
| Etanol ^c 4,74 | 1,53 ± 0,55 | 10179 | 17 | 0,27 ± 0,18 |
| 1,23 | 1,76 ± 0,32 | 10410 | 20 | 0,19 ± 0,07 |
| 1,96 | 1,37 ± 0,42 | 10308 | 15 | 0,15 ± 0,15 |
| 2,45 | 1,42 ± 0,54 | 10365 | 24 | 0,23 ± 0,20 |
| Agua destilada | 1,22 ± 0,28 | 10180 | 25 | 0,24 ± 0,19 |
| Ciclofosfamida ^d | | | | |
| 0,02 | 0,55 ± 0,08** | 10380 | 112 | 1,18 ± 0,23** |

^a Índice de Citotoxicidad (relación PCE/NCE)^b PCE micronucleados

^c Control Negativo ^d Control Positivo ** p < 0,01

Para el control negativo los valores del IT y el % mPCE no presentan diferencias significativas respecto al control espontáneo. En el caso del % de mPCE estos valores se encuentran en el rango reportado para la frecuencia espontánea (0,12-0,49 %) por 15 laboratorios en un estudio del IPCS (*International Program of Chemical Safety*).¹³ Por lo tanto puede concluirse que el etanol administrado en los controles no afecta el parámetro evaluado en el ensayo.

Discusión

Respecto a la toxicidad en el ensayo de segregación somática, a valores superiores de las concentraciones ensayadas, aunque no se observó reducción del diámetro de las colonias, sí se presentaron alteraciones morfológicas y de conidiación que impedían la visualización de los sectores de color segregantes. Estos efectos no están asociados con la concentración del etanol, que en este caso es muy baja (0,4 % y 0,16 %) en el medio de cultivo para ambos extractos. Pues existen reportes que indican que se puede emplear hasta concentraciones de 2 % en el método de incorporación en placa.¹⁴ Estos efectos citotóxicos que se observan a valores superiores de la dosis máxima establecida pueden deberse a sustancias complejas con actividad fungistática o fungicida, que a determinadas concentraciones pueden actuar sobre el complejo ciclo celular y de crecimiento del hongo, sin dañar

el material genético, pero que pueden actuar sobre otras estructuras celulares y funciones metabólicas del microorganismo.

Con relación a la ausencia de genotoxicidad de los extractos de plantas medicinales estudiados, se debe a que los componentes presentes no tienen efecto sobre los procesos hereditarios. Con relación a la manzanilla, la disminución de la FSC, la cual no es dosis dependiente pero que llega a ser un 64 % para la dosis máxima, el efecto observado se puede deber a la presencia en el extracto de sustancias que actúen como antimutágenos.

Por los resultados negativos obtenidos en este ensayo *in vitro*, que tiene una mayor sensibilidad que la prueba de micronúcleos *in vivo*, era de esperarse la ausencia de daño genético en esta última, como efectivamente se comprobó.

Los extractos fluidos de *Plantago lanceolata* L. (Llantén menor) y *Matricaria recutita* L. (Manzanilla) no mostraron efecto genotóxico porque:

- No se indujo segregación mitótica en el *Aspergillus nidulans*.
- No se indujo de una forma significativa la formación de micronúcleos en médula ósea de ratón.

En el caso de la manzanilla sería recomendable evaluar este extracto en presencia de mutágenos conocidos para obtener información sobre su posible acción antimutagénica.

Referencias bibliográficas

1. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1988:1125.
2. Käfer E, Scott BR, Kappas A. Systems and results of tests for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res* 1986;167:9-34.
3. 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.
4. 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.
5. Käfer E. Tests which distinguish induced crossing-over and aneuploidy from secondary segregation in *Aspergillus* treated with chloral hydrate and g rays. *Mutat Res* 1986;164:145-66.
6. Scott BR, Käfer E. *Aspergillus nidulans*: an organism for detecting a range of genetic damage. En: De Serres FJ, Hollaender A, eds. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. New York: Plenum, 1982:447-79.
7. Ramos A, Torre R de la, Alonso N, Villaescusa A, Vizoso A, Betancourt J. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *J of Ethnopharmacol* 1996;52:123-27.
8. Sigarroa A. *Biometría y Diseño Experimental. Primera Parte*. La Habana: Ministerio de Educación Superior 1985:276-337.
9. Heddle JA, Cimino MC, Romayana F, Shelby MD, Turker JD, Vanpans PH, MacGregor JT. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen* 1991;18:277-91.
10. Mavourin K, Blakey D, Cimino M, Salamone M, Heddle J. The in vivo micronucleous assays in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the USEPA GENE-TOX Program. *Mutat Res* 1990;239:29-30.
11. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Sex difference in the micronucleus test. *Mutat Res* 1986;172:151-63.
12. Lovell DP, Ardenon D, Albanese R, Amphelett G, Clare G, Ferguson R, et al. Statistical analysis of in vivo cytogenetic assays. En: Kirkland DJ, ed. *Statistical evaluation of mutagenicity test data*. Cambridge: University, 1989:184-230.
13. MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, et al. Guidelines for the conduct of micronuclei assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res* 1987;169:103-12.
14. Kappas A. On the mechanisms of induced aneuploidy in *Aspergillus nidulans* and validation of tests for genomic mutations. *Prog Clin Biol Res* 1989;318:377-84.

Recibido: 28 de febrero del 2000. Aprobado: 12 de septiembre del 2000.
Lic. *Ángel Vizoso Parra*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) Ave. 26 No. 1065 entre Cerro y Boyeros, Plaza, Ciudad de La Habana. Cuba. CP 10600. Teléfono: (537)810818, 810830. FAX(537) 33556. e-mail: cidem@infomed.sld.cu