
Aberraciones cromosómicas *in vitro* para evaluar genotoxicidad de extractos de *Abuta grandifolia* (abuta) y *Alchornea castaneifolia* (hiporuro)

IN VITRO CHROMOSOME ABERRATION ANALYSIS TO EVALUATE GENOTOXICITY OF EXTRACTS OF *Abuta grandifolia* (ABUTA) AND *Alchornea castaneifolia* (HIPORURO)

María Luisa Guevara-Fujita¹, Erika Castillo C.², Yanina Enríquez V.³,
Eva Ramos Li⁴, Ricardo Fujita A.⁵, Benjamín Castañeda C.⁶

RESUMEN

La evaluación de plantas medicinales usando parámetros de genotoxicidad, nos permite indicar si alguno de sus componentes puede provocar daño al material genético, a niveles génico o cromosómico. Este daño puede estimarse y determinará si el uso de la planta es conveniente o si por el contrario, el efecto benéfico aludido, se ve opacado por el probable efecto genotóxico. De forma alternativa, esta misma metodología permitiría detectar el efecto protector de una planta frente a la acción de mutágenos, lo cual redundaría en beneficio de los usuarios.

OBJETIVO

Evaluar, *in vitro*, el efecto genotóxico del extractos de *Abuta grandifolia*, "Abuta" y *Alchornea castaneifolia*, "Hiporuro"

MATERIALES Y METODO

Se realizaron cultivos de linfocitos obtenidos de sangre periférica, agregando los extractos de *Abuta grandifolia*, "Abuta" y *Alchornea castaneifolia*, "Hiporuro" a diferentes concentraciones. Posteriormente, se realizó la evaluación citológica de aberraciones cromosómicas.

RESULTADOS

Se encontró un número elevado de aberraciones cromosómicas, tanto para el cultivo con *Abuta* como para el de *Hiporuro*. Este efecto se observó a diferentes concentraciones de extracto.

CONCLUSIONES

Las aberraciones cromosómicas encontradas en el presente trabajo, implicarían un efecto genotóxico de ambas plantas medicinales en el sistema *in vitro* empleado. Se requiere más estudios a diferentes niveles de organización que complementen los resultados reportados en este trabajo.

PALABRAS CLAVE

Genotoxicidad, aberraciones cromosómicas *in vitro*, *Abuta grandifolia*, *Alchornea castaneifolia*.

SUMMARY

The evaluation of plants used in traditional medicine based on genotoxic parameters, allows researchers to determinate if some component could promote, genetic or chromosomal damage. This damage can be measured and, allow to determine the convenience of its use or, on the contrary, if its beneficial effect is undermined by the genotoxic effect. Moreover, this method would make it possible to detect the protective effect of the plant as opposed to a mutagen, which would enhance the benefit of its use.

OBJECTIVE

To evaluate the genotoxic effect of extracts of *Abuta grandifolia*, "Abuta" and *Alchornea castaneifolia*, "Hiporuro", using an *in vitro* test.

1 D.C., Docente Investigador, Centro de Genética y Biología Molecular (CGBM), Facultad de Medicina Humana (FMH), Universidad San Martín de Porres (USMP).

2 Bach. en Genética y Biotecnología, Técnica de Laboratorio, CGBM, FMH, USMP.

3 Licenciada en Tecnología Médica, Docente Investigador, Laboratorio de patología, FMH, USMP.

4 Q.F., Técnica de Laboratorio, Centro de Medicina Tradicional Andina (CMTA), FMH, USMP.

5 PhD, Docente Investigador, Jefe del CGBM, FMH, USMP.

6 Doctor en Medicina, Director del Instituto de Investigación FMH, USMP.

MATERIALS AND METHOD

Lymphocytes were cultured from peripheral blood, adding Abuta or Hiporuro extracts in different doses. Cytological evaluation of chromosome aberration was performed and registered.

RESULTS

An increased number of chromosome aberrations in Abuta and Hiporuro culture were found for different doses of extract.

CONCLUSIONS

Chromosome aberrations found in the present work, would implicate a genotoxic effect in both plants in the system used. More studies are needed to complement the results of this research.

KEY WORDS

Genotoxicity, in vitro chromosome aberrations, *Abuta grandifolia*, *Alchornea castaneifolia*.

INTRODUCCION

La evaluación de plantas medicinales usando parámetros de genotoxicidad reviste importancia debido al uso tradicional de las mismas y al hecho de que existen muy pocos estudios de este tipo en nuestro país. Es por ello que se hace necesario el uso de pruebas que puedan indicar si un compuesto puede provocar daño al material genético a diferentes niveles (génico o cromosómico). Este daño puede estimarse y determinará si el uso de la planta es conveniente o si por el contrario, el efecto benéfico aludido, se ve opacado por el probable efecto genotóxico. De forma alternativa, esta misma metodología permitiría detectar el efecto protector de una planta frente a la acción de mutágenos, lo cual redundaría en beneficio de los usuarios.

En el presente trabajo se evaluaron dos plantas de uso tradicional por sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias: *Abuta grandifolia* (Abuta) (extractos obtenidos a partir de hojas) y *Alchornea castaneifolia* (Hiporuro) (extractos obtenidos a partir de corteza). *Abuta grandifolia* es ampliamente usada en medicina tradicional, sobre todo como analgésico y antiespasmódico. Los alcaloides presentes en la planta podrían tener un efecto en la producción de óxido nítrico por los macrófagos activados, lo que explicaría el efecto anti-inflamatorio¹. *Alchornea castaneifolia* presenta un efecto anti-inflamatorio y analgésico comparable al producido por el diclofenaco, con la ventaja de no producir daño a la mucosa gástrica².

Estudios preliminares sobre los efectos de Abuta e Hiporuro hechos en animales de laboratorio, han mostrado que el Hiporuro, usado en ratones, muestra mayor inhibición de las contracciones abdominales en los animales comparado con los efectos del Ibuprofeno. Igualmente, en el caso de Abuta, se encontró un efecto anti-inflamatorio que justifica su uso en medicina tradicional³. También se ha reportado que los extractos de *Alchornea castaneifolia* (Hiporuro), muestran inhibición de la síntesis de prostaglandinas, que son mediadores en los procesos inflamatorios, lo cual estaría en relación con sus componentes que incluyen flavonoides y taninos entre otros, que se comportan como inhibidores de la producción de prostaglandinas⁴. Otros autores han descrito actividad antimicrobiana, insecticida y antimalaria en Abuta, lo cual a nuestro entender, justifica plenamente continuar con los estudios que determinen sus componentes y sus efectos^{5,6,7}.

La prueba de aberraciones cromosómicas in vitro tiene validez según los Protocolos de la Agencia de Protección Ambiental (EPA- Environmental Protection Agency), como una prueba para determinar tanto actividad teratogénica como mutagénica⁸.

MATERIALES Y METODO

Obtención de extractos

Tanto las hojas de Abuta como la corteza de Hiporuro, se secan a una temperatura no mayor a 40°C, se pulverizan, tamizan y se obtienen extractos metanólicos, siguiendo la Metodología de Lock y Ciulei^{9,10}. Estos extractos son diluidos a una concentración de 0.125mg/ml. Esta solución stock es posteriormente pasada por filtros de polietilensulfona de 0.45 micras.

Cultivo de linfocitos

Las pruebas se realizaron con sangre periférica tomada de donantes voluntarios, a quienes se les extrae 10ml de sangre en jeringas con 1ml de heparina sódica (5000UI/ml). En frascos de cultivo Falcon de 25 cm², se siembra de 18 a 20 gotas de sangre periférica total, en 10ml de medio completo PBMax. Luego, a cada tubo se le añade una dosis determinada de extracto o mutágeno según se indica en la Tabla N° 1.

Los tubos son incubados a 37°C por 48 a 60 horas. Cuatro horas antes de la preparación citológica, se agrega al cultivo 0.1ml de Colcemid (concentración final de 0.1mg/ml). Cumplido el tiempo de incubación, se centrifuga a 1200rpm por 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende en 10ml de solución hipotónica (cloruro de potasio 0.075M), que actúa por 10 minutos a 37°C. Se centrifuga y se descarta

Tabla N° 1: Dosis de mutágeno y extracto usados en los experimentos

TUBO N°	VOLUMEN COLOCADO A 10ML DE MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN EXTRACTO
1	-	-
2	160 ul	MMC* 0.083ug/ml
3	1.25 ul	0.0000156 mg/ml
4	2.5 ul	0.0000312 mg/ml
5	5.0 ul	0.0000625 mg/ml
6	10.0 ul	0.000125 mg/ml
7	20.0 ul	0.00025 mg/ml
8	40.0 ul	0.0005 mg/ml
9	80.0 ul	0.001 mg/ml
10	160.0 ul	0.002 mg/ml
11	320.0 ul	0.010 mg/ml
12	640.0 ul	0.020 mg/ml

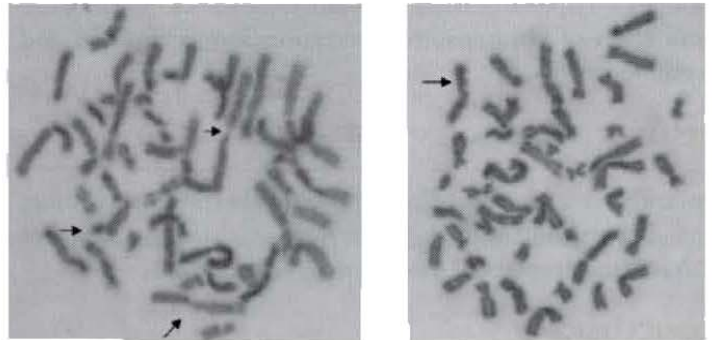
(*)MMC: mitomicinaC

el sobrenadante resuspendiendo el precipitado en solución fijadora fría (metanol y ácido acético en proporción 3:1). Se fija por 10 minutos y se repite el procedimiento hasta que el precipitado quede blanquecino. Por último, se resuspende en unas gotas de fijador frío y se preparan láminas goteando la muestra. Se colorea con Giemsa por 10 minutos.

RESULTADOS

Se observaron aberraciones cromosómicas tanto para el cultivo con extracto de *Abuta* como para el de *Hiporuro*, tal como se muestran en las imágenes (figuras 1 a 8).

Figuras 2: Efecto del extracto de *Abuta* (0.010 mg/ml), en el que se observa tres quebras cromosómicas (izquierda), y una quebra cromatídica (derecha).



Figuras 3: Cromosoma dicéntrico y fragmento acéntrico producidos por extracto de *Hiporuro* (0.000125 mg/ml).

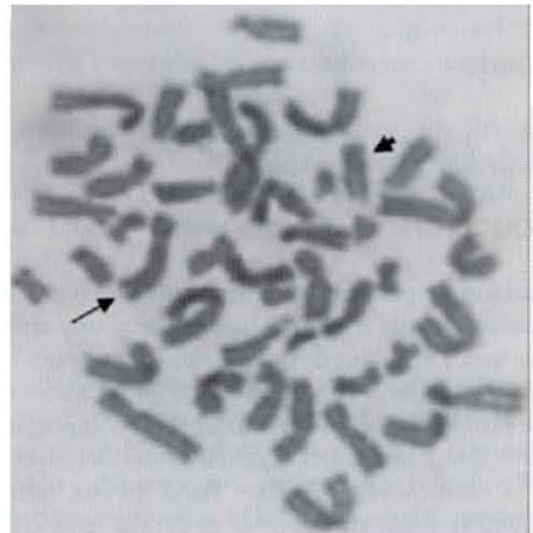


Figura 1: Efecto del extracto de *Abuta* (0.020mg/ml) en cultivo de linfocitos. Se observa quebra cromosomita (flecha), además de 47 cromosomas

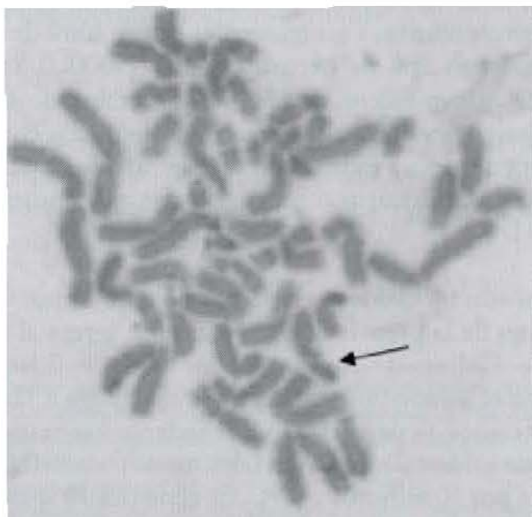
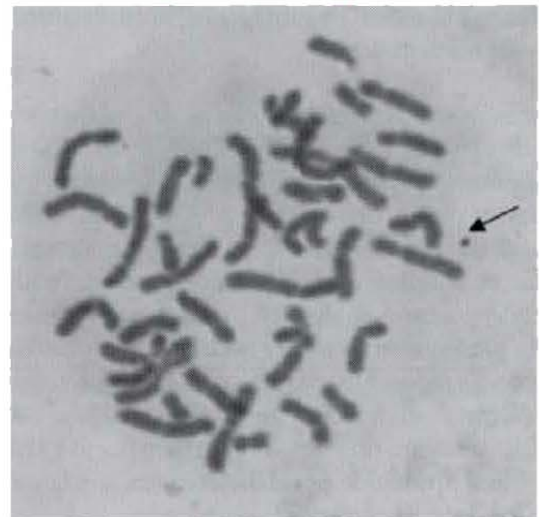


Figura 4: Fragmento acéntrico en cultivo bajo el efecto de *Hiporuro* (0.002mg/ml).



Figuras 5: Anillos encontrados en cultivos sometidos a Hiporuro, a concentraciones de 0.020mg/ml (izquierda) y 0.0005 mg/ml (derecha).

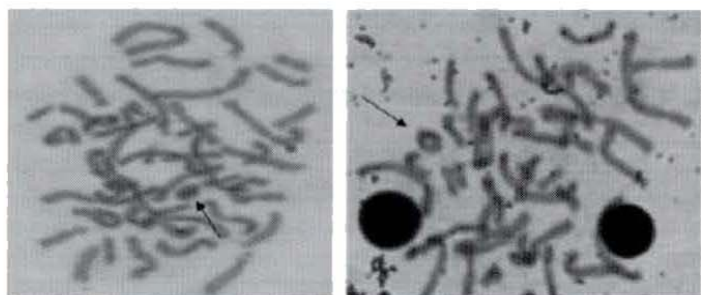
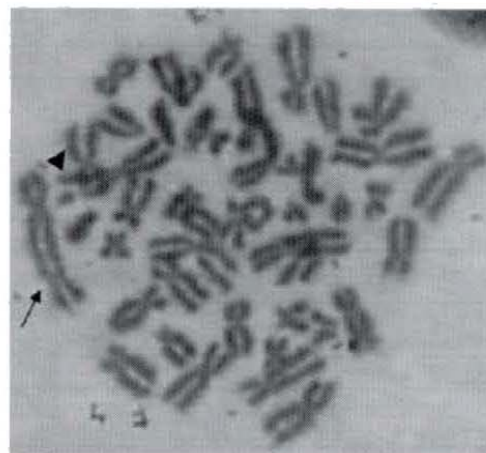


Figura 6: Cromosoma dicéntrico y fragmento acéntrico encontrados en cultivo de linfocitos con extracto de Hiporuro (0.0000625 mg/ml).



En las Tablas N° 2 y 3, se muestran las concentraciones y frecuencias de las aberraciones encontradas en los cultivos de Hiporuro y Abuta.

Tabla N° 2. Resultados del experimento con Extracto Metanólico de Hiporuro

Tubo N°	N° Metafases Analizadas	N° Aberraciones/célula				N° Total Aberraciones	Frecuencia Aberraciones (%)	Concentración Extracto (mg/ml)	Tipos de Aberraciones (*)
		1	2	3	4				
1	98	4	2	1	1	15	15.30	-	q cromat, q croma, ace
2	124	14	2	5	-	33	26.61	MMC (0.083ug/ml)	q cromat, q croma, ace, dic
3	79	11	2	-	-	15	18.98	0.0000156	q cromat, q croma, del, dic
4	100	14	2	1	-	18	18.00	0.0000312	q cromat, q croma, ace, dic
5	103	25	2	-	-	29	28.15	0.0000625	q cromat, q croma, ace, dic
6	128	18	2	-	-	22	17.18	0.000125	q cromat, q croma, ace, dic
7	124	9	3	1	-	18	14.51	0.00025	q cromat, q croma, ace
8	104	17	1	-	-	19	18.26	0.0005	q cromat, ace, r, dic
9	107	14	-	1	-	17	15.88	0.0010	q cromat, ace, q croma
10	51	7	1	-	-	9	17.64	0.0020	q cromat, q croma, ace
11	83	11	5	-	-	21	25.30	0.010	q cromat, q croma, ace, r
12	83	14	3	-	-	20	24.09	0.020	q cromat, q croma, ace, r

(*) q cromat: quiebra cromatídica; q croma: quiebra cromosómica; ace: acéntrico; dic: dicéntrico; r: anillo; del: deleción

Tabla N° 3. Resultados del Experimento con Extracto Metanólico de Abuta

Tubo N°	N° Metafases Analizadas	N° Aberraciones/célula			N° Total Aberraciones	Frecuencia Aberraciones (%)	Concentración Extracto (mg/ml)	Tipos de Aberraciones (*)
		1	2	3				
1	44	1	-	-	1	2.27	-	q cromat
2	124	14	2	5	33	26.61	MMC (0.083ug/ml)	q cromat, q croms, ace, dic
3	19	2	1	-	4	36.36	0.0000156	ace
4	2	1	-	-	1	50.0	0.0000312	q croms
5	7	-	1	-	2	28.6	0.0000625	q cromat, del
6	11	1	-	1	4	36.36	0.000125	q cromat, q croms, ace
7	9	2	-	-	2	28.6	0.00025	q cromat, q croms
8	8	2	-	-	2	33.3	0.0005	q croms
9	31	5	3	-	11	35.5	0.0010	q cromat, ace, q croms, dic
10	32	2	1	-	4	12.5	0.0020	q cromat, q croms
11	63	12	3	-	18	28.57	0.010	q cromat, q croms, ace
12	36	11	2	-	15	41.66	0.020	q cromat, ace

(*) q cromat: quiebra cromatídica; q croms: quiebra cromosómica; ace: acéntrico; dic: dicéntrico; r: anillo; del: deleción.

DISCUSION

Las pruebas in vitro con preparaciones cromosómicas se realizaron satisfactoriamente, empleando el medio de cultivo PBMax. La limitante de las dosis usadas en cada caso la da principalmente la capacidad de dilución de cada extracto, en el stock inicial.

En los cultivos realizados, se observó una amplia variación en el rendimiento de metafases, lo cual puede explicarse por el hecho de que, para ambos tipos de extractos, se produjo una disminución del índice mitótico en pruebas realizadas, evaluando este parámetro en células meristemáticas de cebolla^{1,11}.

El análisis de los resultados obtenidos nos muestra que, en efecto, y en comparación con la mitomicinaC (MMC), un mutágeno de tipo clastogénico, existen aberraciones que se consideran complejas y dan un indicio del efecto de los extractos a diferentes concentraciones, tanto para Abuta como para Hiporuro, ocasionando quiebras en el material genético.

Las aberraciones de tipo inestable, dicéntricos y anillos, son consideradas como parámetros de medida de genotoxicidad en diversos sistemas. Existen por ejemplo, curvas que relacionan la producción de aberraciones inestables con la dosis de rayos X o gamma recibida, lo cual indica daño al material genético^{12,13}. Este daño es usualmente reparado

gracias a los diversos mecanismos que los sistemas celulares tienen, pero cuando la maquinaria de reparación no actúa adecuadamente, puede dar lugar a la formación de aberraciones. Varias enfermedades humanas, que incluyen ciertos tipos de cáncer, pueden ser atribuidas a defectos en la reparación de DNA¹⁴.

En el caso de nuestros experimentos con los extractos estudiados, estamos frente a la posibilidad de daño genotóxico en el sistema *in vitro* utilizado. Este daño se expresa en los cromosomas dicéntricos y anillos encontrados, además de quiebras cromosómicas y fragmentos acéntricos en diversas dosis. Las dosis van desde 0.0000156mg/ml hasta la máxima dosis usada en los cultivos (0.020 mg/ml). Para el caso de Abuta, se ha encontrado un efecto citotóxico manifiesto, el mismo que se expresa como una inhibición de las metafases en cultivo, en comparación con el rendimiento de las células que no presentan mutágeno ni extracto, o incluso en los que sólo presentan mitomicinaC. Este resultado apoya hallazgos previos¹¹, donde se encontró una marcada disminución de los índices de células en división en meristemas de cebolla, usando extracto metanólico de Abuta.

Los hallazgos en el presente trabajo, ameritan un estudio más detallado de las plantas para evaluar si los probables efectos benéficos que se les atribuyen no se ven disminuidos por el efecto genotóxico que estamos reportando, teniendo así en cuenta la relación riesgo: beneficio.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se ha estandarizado la técnica *in vitro* de aberraciones cromosómicas, bajo las condiciones de nuestro laboratorio, lo cual permitió medir los efectos genotóxicos de extractos de dos plantas medicinales. Estas pruebas pueden extrapolarse a la evaluación de cualquier sustancia xenobiótica.

Las pruebas *in vitro* con cultivo de linfocitos, para extractos de Abuta e Hiporuro, muestran una frecuencia elevada de aberraciones cromosómicas en comparación con el control positivo (MitomicinaC). Las aberraciones inestables de tipo dicéntrico y / o anillo, son buenos marcadores que expresan daño genotóxico en las células del cultivo y por lo tanto, implican genotoxicidad.

Es necesario continuar con las pruebas de genotoxicidad en otros niveles de organización (Prueba de Ames, micronúcleos), a fin de evaluar si el probable efecto benéfico de las plantas medicinales estudiadas, se contrapone o no al efecto genotóxico que reportamos, para el sistema empleado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Castañeda, B., Castro de la Mata, R., Manrique, R., Paredes M. Ibáñez, L. Evaluación de la acción citotóxica y embriotóxica del extracto metanólico de *Alchornea castaneifolia* "Hiporuro". *Horizonte Médico* 2006; 6(1):22-28.
2. Castañeda, B. Evaluación fotoquímica, toxicológica, analgésica y antiinflamatoria del extracto metabólico de Hiporuro en animales de laboratorio. *Cultura* 2003; 17 21(17): 13-21
3. Rivas, E., Lengua, L., Liu, H., Salazar, A., Román, L., Salvador, I., Rabanal, P., Castañeda, B., Manrique, R., Ibáñez, L. Estudio de la actividad analgésica de extractos metanólicos de *Maytenus krukovii* (chuchuhuasi), *Alchornea castaneifolia* (hiporuro), *Sambucus nigra* (saúco) y *Aristeguietia discolor* (pulmonaria) en ratones frente a ibuprofeno. *Horizonte Médico* 2005; 1:57-61.
4. Andersson Dunstan, C., Noreen, Y., Serrano, G., Cox, PA, Perera, P y Bohlin, L. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays. *Journal of Ethnopharmacology* 1997; 57:35-56.
5. Ciccía, G., Coussio, J y Mongelli, E. Insecticidal activity of some Colombian medicinal plants. *J of Ethnopharmacology* 2000; 72:185-189.
6. Garavito, G., Rincón, J., Arteaga, L., Hata, Y Bourdy, G., Gimenez, A., Pinzón, R y Deharo, E. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *J of Ethnopharmacology* 2006; 107:460-462.
7. Kloucek, P., Svobodova, B., Polesny, Z., Langrova, I., Smrcek, S y Kokosha, L. Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. *J of Ethnopharmacology* 2007; 111:427-429
8. EPA. **Health Effects Test Guidelines** OPPTS 870.5375. In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. August, 1998.
9. Lock, O. Investigaciones fotoquímicas. Métodos en el estudio de productos naturales. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Segunda Edición. Junio 1994, pp. 3-8.
10. Ciulei, I. Methodology for Analysis of Vegetal Drugs. Ministry o Chemical Industry, Bucharest, Romania, pp. 1-67.
11. Castañeda, B., Castro de la Mata, R., Manrique, R., Paredes M. Ibáñez, L. Evaluación de la acción antimutagénica y embriotóxica del extracto metanólico de *Abuta grandifolia*, *Abuta*, *Bejuco de ratón*, *Butua*, *Barbasco* *Horizonte Médico* 2006; 6(1):36-44.
12. Guevara, ML. Nuclear abnormalities in cells of lymphoma patients treated with chemotherapy. Tesis para optar el grado de Master of Sciences Aberdeen University 1987.
13. Bauchinger, M. Quantification of low-level radiation exposure by conventional chromosome aberration analysis. *Mutation Research* 1995; 339(3):177-189
14. Griffiths, A.; Millar, J.; Suzuki, D.; Lewontin, R.; Gelbart, W. An introduction to Genetic Analysis. Seventh Edition. 2000: pp. 510-518.