

Estudio genotoxico

Dr. Julio A. Portal Pineda 1, Lic. Alberto Ramos Ruiz 2, Lic. Angel Vizoso Parra 2, Dr. José Betancourt Badel 3

RESUMEN:

Se presentan los resultados obtenidos, al evaluar la actividad genotóxica "in vitro" de una tintura al 50% de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck empleando como sistema de ensayo el hongo *Aspergillus nidulans*. Los resultados permiten concluir que la tintura fue tóxica al interferir en el crecimiento lineal del hongo y además genotóxica en el ensayo de segregación mitótica al producir un elevado número de sectores segregantes.

PALABRAS CLAVES: ASPERGILLUS NIDULANS, CITRUS SINENSIS, GENOTOXICIDAD.

1. Especialista de Primer Grado en Farmacología. Profesor Instructor. Master en Medicina Tradicional y Natural.
2. Investigadores del Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos.
3. Doctor en Ciencias. Especialista en Fisiología.

INTRODUCCION:

Las plantas medicinales constituyeron uno de los primeros recursos terapéuticos empleados por el hombre, disminuyendo después su utilización como consecuencia del desarrollo de la Industria Farmacéutica. Sin embargo, desde la década del 80, se aprecia un renacimiento internacional del interés por el uso de las plantas medicinales, lo cual ha provocado un cambio en los sistemas de salud, tanto en países desarrollados como en países en desarrollo, que ha llevado a formular programas de medicina tradicional herbolaria (1-2).

En Cuba, en el año 1986, el Ministerio de Salud Pública estimula la creación de un programa con estos fines y con varios objetivos: la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos en la atención primaria de salud, determinar la potencialidad de la flora como fuente de materia prima y brindar respaldo científico a las plantas medicinales que por tradición utiliza nuestra población; por lo que desde entonces se ha venido trabajando en la evaluación farmacológica y toxicológica de algunas especies y familias.

Dentro de este programa, nuestro centro (Facultad de Ciencias Médicas de Ciego de Ávila) ha jugado un importante papel en la evaluación de los cítricos, por lo que con este estudio tratamos de dar respuesta a una de las tareas planteadas con el objetivo de evaluar la acción tóxica y genotóxica de la tintura al 50% de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck en un sistema a corto plazo "in vitro" utilizando el hongo *Aspergillus nidulans*.

METODO:

Material Vegetal:

El Cítrico correspondió a la especie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, colectada en la Empresa de Cítricos de Ciego de Avila en el estadio del fruto verde hecho, el cual se alcanza en los meses de septiembre a octubre (año 1994).

El fruto fue pelado manualmente y la corteza se colocó en estufa de recirculación de aire, durante cuatro días (30-35 grados celcius), pasando por una moledora el material seco y posteriormente por un tamiz de 0.250 mm.

A la droga cruda se le determinaron parámetros de calidad según las Normas Ramales para Medicamentos de Origen Vegetal (3).

Con posterioridad se pasó a la preparación de la tintura al 50% en los Laboratorios de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de Ciego de Avila. Esta fue preparada por el método de la percolación,

utilizando como menstruo alcohol al 30% volumen/volumen. A la formulacion también se le determinaron parametros de calidad según las Normas Ramales para Medicamentos de Origen Vegetal (4).

Actividad tóxica y genotóxica mediante el sistema de ensayo en *Aspergillus nidulans*:

-Cepa: Se utilizó la cepa diploide (D-30) de *Aspergillus nidulans*, sintetizada según la técnica de Roper (1952) por De la Torre (5) empleando para ello cepas haploides (FGSC CEA593 y A594) provenientes del Fungal Genetics Stock Center en Atlantas, Estados Unidos.

Esta cepa es diploide, heterocigótica para cuatro marcadores recesivos del color de los conidios: amarillo, verde chartró, blanco y carmelita lo que permite determinar visualmente la aparición de segregantes mitóticos, de coloración diferente a la cepa diploide parental que crece de color verde amarillento, originados por crossing-over mitótico o no disyunción cromosómica (6).

-Medio de cultivo y solución: Se utilizó Medio Completo y Medio Mínimo para *Aspergillus nidulans* según Scott y Kaffer (7).

-Procedimiento experimental:

a)- Búsqueda del rango de concentraciones para el ensayo: Se utilizaron doce concentraciones de la tintura, teniendo en cuenta el máximo volumen de alcohol permisible y manteniendo constante el volumen de éste en cada dosis. Como dosis tope se seleccionó aquella a partir de la cual ya no es posible observar con precisión los sectores segregantes, debido a la toxicidad del producto.

Como control negativo se utilizó etanol al 30% y como control positivo hidrato de cloral a una concentración 6 mm. b)- Ensayo de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*.

La prueba de toxicidad y genotoxicidad de la tintura al 50% de la corteza del fruto del *Citrus sinensis* (L.) Osbeck se realizó por medio del ensayo de incorporación en placa (8).

Se tomó la cantidad de tintura calculada para cada tratamiento y se incorporó al medio de cultivo. En todos los casos la temperatura del medio se mantuvo entre 45 y 48 grados celcius para evitar la solidificación del mismo y después de incorporada cada concentración al medio se homogenizó bien y se vertió en placas Petri. También se incluyeron controles positivos y negativos.

Partiendo de ello y de la cepa *Aspergillus nidulans* D-30 mantenida creciendo en medio mínimo por 3-4 días antes de realizarse el experimento, procedimos a efectuar el ensayo de toxicidad y genotoxicidad.

Para conocer de modo cuantitativo la toxicidad de la tintura en estudio, se sembraron conidios en punto en el centro de la placa a razón de una colonia por placa y se incubó luego por 72 horas a 37 grados celcius (9). Se procedió entonces a medir el diámetro de las colonias, tomando como valor final el promedio de dos mediciones por diferentes lugares de la colonia. Para este tipo de estudio, se consideró como criterio de toxicidad, la reducción del diámetro de las colonias inoculadas en las placas con los tratamientos, comparados con el control negativo (10).

Se plantea que cuando hay una reducción del diámetro de las colonias entre el 1-15% la toxicidad es baja, del 16-30% la toxicidad es media y más del 30% la toxicidad es alta (11).

Para la determinación de la actividad genotóxica, las 14 placas por concentración se incubaron por siete días y se procedió a la lectura para registrar los sectores de color, indicadores de ocurrencia de eventos genéticos diversos, se determinó la frecuencia de sectores por colonia (FSC) (12) y el índice de segregación mitótica (ISMT), el cual representa el incremento de la FSC de los tratamientos con respecto al control (11).

Análisis estadístico:

Los resultados se procesaron por medio de ANOVA de una vía, previa realización de prueba de normalidad de cada grupo de concentración. Cuando la diferencia entre los tratamientos fue significativa, se realizó una prueba de comparación de medias por medio del test de Dunnett (13).

RESULTADOS:

Actividad tóxica:

Los resultados obtenidos en el rango de toxicidad se ofrecen en la TABLA 1, destacándose como desde dosis inferior empleada (0.05 mg/ml) el compuesto mostró toxicidad ligera frente a la cepa D-30 de *Aspergillus nidulans* y que ésta se comportó en ascenso a medida que se incrementó la dosis, por lo que para el estudio de la genotoxicidad se escogió un rango de dosis similar (desde 0.58 mg/ml hasta 2.92 mg/ml). En la TABLA 2, se expresa la toxicidad de la tintura a las dosis seleccionadas y se aprecia nuevamente que la velocidad de crecimiento lineal fue disminuyendo a medida que se incrementó la dosis, lo que se traduce en la disminución del diámetro de las colonias, siendo los valores del índice de toxicidad indicadores de una toxicidad baja para las dosis de 0.58 y 1.16 mg/ml y de toxicidad media para las dosis de 1.75, 2.33 y 2.92 mg/ml de la tintura.

Inducción de segregación mitótica:

En los resultados recogidos en la TABLA 3 se aprecia un incremento progresivo del número de sectores segregantes de color por colonia, que va desde 1.69 en el grupo control hasta 22 en la dosis mayor (2.92 mg/ml).

Se efectuó el ANOVA simple, entre las concentraciones empleadas, el que arrojó diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.001$). El test de Dunnett mostró diferencias estadísticamente significativas entre todas las dosis con respecto al control ($p < 0.01$).

DISCUSION:

Las preparaciones obtenidas a partir de vegetales, empleadas con fines farmacéuticos, constituyen mezclas muy complejas de diversas sustancias, en muchas de las cuales se han encontrado y estudiado inhibidores de la mutagénesis y/o carcinogénesis, y en otras, sustancias que inducen estos procesos. Incluso es posible encontrar ambos tipos de efectos en una misma preparación.

En la literatura de que disponemos, no se reportan estudios "in vitro" donde se hayan trabajado especies de cítricos para detectar actividad mutagénica. Solo hemos encontrado un estudio realizado en Japón con el jugo del *Citrus sinensis* (L.) Osbeck para valorar actividad antimutagénica, utilizando la cepa TA 98 de *Salmonella typhimurium* y el resultado fue negativo a una dosis de 0.5 ml/placa (14). En nuestro estudio fue evidente la respuesta mutagénica positiva en el hongo *Aspergillus nidulans* (cepa D-30) al exponerse frente a las distintas concentraciones de la tintura, la que resultó tóxica y genotóxica. Esto se pudo corroborar estadísticamente a través de la curva dosis respuesta que obtuvimos.

En cuanto al efecto tóxico, se ha reportado la actividad antifúngica del aceite esencial del *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (14). Este a pesar de no haber sido cuantificado en nuestra formulación, si se conoce su presencia, aunque debe ser a bajas concentraciones debido a la polaridad del solvente utilizado (alcohol al 30%) (15).

También fue evidente la actividad genotóxica, pero no pudimos determinar el tipo de evento genético que se puso de manifiesto porque no se realizó aislamiento y determinación del genotipo en los sectores segregantes.

CONCLUSIONES:

En las condiciones de ensayo descritas podemos concluir que:

1-La tintura al 50% de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck mostró actividad tóxica significativa en el test de incorporación en placa para *Aspergillus nidulans* (D-30) destacándose la reducción del diámetro de las colonias con el incremento de las concentraciones. 2-Se comprobó la actividad genotóxica como inductor de segregación mitótica en las concentraciones estudiadas en la cepa D-30 de *Aspergillus nidulans*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sierra Blazquez P. Programa de medicina tradicional herbolaria de Cuba. Rev Etnofarm 1980; 6(3): 51.2.

2. Morón Rodríguez F. Medicina tradicional y plantas medicinales. Situación internacional. Monografía presentada y distribuida en el I Congreso Nacional de Medicina Tradicional. La Habana, 1991: 2-8.3.
3. Normas Ramales para Medicamentos de Origen Vegetal. Droga Cruda. Proceso Tecnológico. Minsap. La Habana, 1992: 16-29.4.
4. Normas Ramales para Medicamentos de Origen Vegetal. Extractos y Tinturas. Proceso Tecnológico. Minsap. La Habana, 1992: 6-7.5.
5. Torres RA. Determinación de la actividad genotóxica en *Aspergillus nidulans* (tesis presentada en opción al grado científico de Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas) La Habana: Universidad, 1989.6.
6. Kaffer E, Scott BR, Kappas A. Systems and result of test for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. *Mut Res* 1986; 67: 9.7
7. Scott BR, Kaffer E. *Aspergillus nidulans*, an organism for detecting a range of genetic damage. Hollaender M, de Serres FJ. editores. *Chemical mutagens. En: Principles and methods for their detection*. New York: Plenum Press, 1982: 447-79.8.
8. Kappas A. On the mutagenic and recombinogenic activity of certain herbicides in *Salmonella typhimurium* and in *Aspergillus nidulans*. *Mut Res* 1988; 204: 615.9
9. Tzonoeva M, Kappas A, Giorgieva W, Vashkova R, Tziolas V. On the genotoxicity of the pesticides Endodan and Kilocan in 6 different test systems. *Mut Res* 1985; 157: 13.10.
10. Scarazzatti ME, Bonatelli J, Azevedo JL. Resistance to ethidium bromide in *Aspergillus nidulans*. *Experimental* 1979; 35: 307.11.
11. Kappas A. Genotoxic activity of plant growth regulating hormones in *Aspergillus nidulans*. *Carcinogenesis* 1983; 4: 1409.
12. Gualandi G, Marpurgo G. Methods for detecting the induction of mitotic chromosomal non-distribution in *Aspergillus nidulans*. En: Kilbey J, Legator M, Nichols W, Romel C. editores. *Handbook of mutagenicity test procedures*. New York: Elsevier Science Publishers, 1984: 707-20.13.
13. Dunnett C, Goldsmith H. When and how to do multiple comparison. En: Buncher CR, Tsay JY. editores. *Statistics in the pharmaceutical industry*. New York: Decker, 1981: 397-433.14. Aapralet. Illinois, USA, 1987-1988.15.
14. Domínguez XA. Aceites esenciales o esencias vegetal. En: *Métodos de Investigación Fitoquímica*. 2da ed. Mexico: Alianza Editorial, 1986: 63-103.

ANEXOS

Tabla 1. Resultados de la evaluación del rango de toxicidad de la tintura al 50% de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck en la cepa de *Aspergillus nidulans* D-30.

Concentración (mg/ml)	No.Colonias analizadas	Diámetro de las colonias(mm)	Indice de toxicidad(%)
Etanol al 30%(1)	4	41	0.0
0.25	4	38	7.3
0.25	4	35	14.6
0.58	4	32	21.0
0.87	4	30	26.8
1.16	4	28	31.7
1.46	4	28	31.7
1.75	4	27	24.1
2.04	4	26	26.5
2.33	4	25	39.0

2.61	4	25	39.0
2.92	4	25	39.0
3.20	4	23	43.9

(1) Control negativo.

Tabla 2. Toxicidad de la tintura al 50% de Citrus sinensis (L.) Osbeck sobre la cepa de Aspergillus nidulans D30.

Concentración (mg/ml)	No.Colonias analizadas	Diámetro de las colonias(mm)	Indice de toxicidad (%)
Etanol al 30%(1)	8	40	0.0
0.58	8	36	10.0
0.16	8	34	15.0
0.75	8	32	20.0
2.33	8	32	20.0
2.92		30	25.0
Hidrato de cloral 6mM(2)	8	13	69.0

(1) Control negativo (2) Control positivo

Tabla 3. Genotoxicidad de la tintura al 50% de Citrus sinensis (L.) Osbeck sobre la cepa de Aspergillus nidulans D-30. Inducción de segregación somática.

Concentración (mg/ml)	Número de colonias analizadas	Sectores Segregantes	FSC (1)	ISMI (2)
Etanol al 30 % (3)	23	39	1.69	1.00
0.58	25	97	3.88 **	2.29
1.16	27	237	8.77 **	5.18
1.75	22	260	11.81**	6.98
2.33	24	381	15.87**	9.39
2.92	27	594	22.00**	13.00
Hidrato de cloral 6mM (4)				

(1) Frecuencias de sectores por colonias (2) Índice de segregación mitótica inducida (3)Control negativo (4) ** $p > 0.01$