

## Evaluación antígenotóxica del extracto etanólico de *Erythroxylum minutifolium* grises utilizando el ensayo SOS.

**Osney Leyva<sup>1</sup>, Alena Alonso<sup>2</sup>, Luis Alfredo Rosario<sup>3</sup>, Adriana Díaz<sup>2</sup>, Yalena Prado<sup>4</sup>, Idania Rodeiro<sup>5</sup>, Daniel Francisco Arencibia<sup>6</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratorios Biológicos Farmacéuticos, Avenida Independencia, km16 ½, Boyeros, Ciudad Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Centro de aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear, Apartado Postal 6122. Calle 30, # 502, e/ 5ta y 7ma, Miramar, Playa, Ciudad Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H). Calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Lisa, Ciudad Habana, Cuba.

<sup>4</sup>Facultad Ciencias Médicas Dr. Enrique Cabrera, Calzada Aldabó y D, Boyeros, Ciudad Habana, Cuba.

<sup>5</sup>Centro de Biopreparados Marinos, Loma y 13, Nuevo Vedado, Ciudad Habana, Cuba.

<sup>6</sup>Vicepresidencia de Investigaciones, Instituto Finlay. Avenida 17 e/198 y 200, Siboney, Playa, Ciudad de la Habana, Cuba.

Correspondencia a: Osney Leyva: [duconge@infomed.sld.cu](mailto:duconge@infomed.sld.cu)

## Resumen

Las plantas han sido utilizadas desde tiempos remotos para la cura de enfermedades. Bajo el nombre de *Erythroxyllum* o *Erythroxyllon* como género, en Cuba se describen 16 especies endémicas, cuyas propiedades antivirales han sido previamente reportadas. El presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación antigenotóxica de un extracto etanólico de *Erythroxyllum minutifolium* var Griseb en el ensayo de SOS Chromotest variante co-tratamiento. Los resultados mostraron que el extracto de *Erythroxyllum minutifolium* radioprotegió las células de la cepa *E. coli* PQ37 a una concentración de 100 ug/ml. Estos resultados pudieran estar influenciados por la composición fenólica del extracto.

Palabras claves: antigenotoxicidad, *Erythroxyllum*, flavonoides, ensayo SOS.

## Summary

Antigenotoxic evaluation of *Erythroxyllum minutifolium* griseb etanolic extract using SOS assay.

Plants have been used since remotes times for the treatment of different diseases. Under the name of *Erythroxyllum* or *Erythroxyllon* like genus, in Cuba are described 22 species. Some of these plants have been used in the traditional medicine due to its pharmacological properties. In this work the antigenotoxic potential of an etanolic extract of *Erythroxyllum minutifolium* var Griseb (ExM) was analized using a modified protocol of the SOS Chromotest, co-treatment variant. Results showed that *Erythroxyllum minutifolium* extract was antigenotoxic at the concentration of 100 ug/ml in the cells of *E. coli* PQ37. Results obtained can be influenced by the extract composition.

Keywords: antigenotoxicity, *Erythroxyllum*, flavonoid, SOS assay.

## Introducción

Las plantas medicinales como parte de la medicina tradicional han jugado un rol importante en el tratamiento de diversas patologías. Las propiedades etnomédicas de las plantas cubanas han contribuido y estimulado la conveniencia del uso, de forma sostenible, de nuestra flora (1). El género *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) está formado por tres especies pequeñas distribuidas en América, África y Madagascar. En Cuba se describen 22 especies, de ellas 16 son endémicas (2). Algunas de estas plantas han sido usadas en la medicina tradicional como antiinflamatorias en el tratamiento de bronquitis, neumonía, asma y otras afecciones respiratorias tanto en animales como en el hombre (3). Extractos acuosos e hidroalcohólicos de las hojas de las plantas de este género ha mostrado una importante actividad antimicrobiana (4), así como propiedades antivirales frente a los virus del herpes simple tipo I (VHS) (1), y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (2) como principales actividades farmacológicas. Además se han encontrado en algunas especies del género efectos anestésicos, analgésicos y estimuladores de las propiedades del hígado y riñones, como diuréticos y para el tratamiento de enfermedades venéreas y problemas musculares (5).

La mayoría de estos estudios han estado referidos a los flavonoides y alcaloides presentes (6). Los troncos y las hojas han sido las principales partes estudiadas (7). Datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que un extracto etanólico de *E. minutifolium* resultó citotóxico en células de *E. coli* PQ37 a la concentración de 200 ug/ml (8).

En este género han sido encontrados principalmente polifenoles como los flavonoides, fenoles y taninos, además de compuestos reductores (9). La mayoría de los flavonoides son flavonoles como la quercetina, el kaemferol y la ombuina. Estos aparecen mono o diglicosilados con azúcares como la glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa o con la combinación de estos (1).

La exposición de mamíferos a radiaciones ionizantes induce efectos dañinos que guían a la célula hasta la muerte y a un incremento del riesgo de enfermedades, particularmente el cáncer (10). Es por ello que existe un creciente interés en el desarrollo de nuevos radioprotectores en la medicina preventiva y la terapia adyuvante. Los radioprotectores son

agentes que reducen la toxicidad, la mutagenicidad y otros efectos biológicos adversos de las radiaciones ionizantes en los organismos vivos (11).

Las plantas constituyen la fuente principal de obtención de agentes protectores del ADN, los cuales, en su inmensa mayoría, son metabolitos secundarios de los que se desconoce su verdadero papel en las plantas (12). Muchos de los estudios de radioprotección de hoy en día se concentran en la evaluación del extracto completo, del constituyente aislado y en algunos casos del extracto fraccionado. La actividad antiemética, antiinflamatoria, antioxidante, inmunomoduladora, estimuladora del sistema hematopoyético y antioxidante, son algunos de los mecanismos por los cuales algunos extractos de plantas actúan frente a las radiaciones ionizantes (13).

Teniendo en cuenta estos reportes decidimos evaluar el posible efecto antigenotóxico de un extracto etanólico de *E. minutifolium* mediante la variante fluorescente del ensayo SOS Chromotest co-tratamiento.

## **Materiales y Métodos**

### ***Cepa bacteriana y su cultivo.***

Para este estudio fue utilizada la cepa de *Escherichia coli* PQ-37 desarrollada por Huisman y D'ari, en 1981(14) de genotipo: (F- thr leu his-4 pyrD thi galE galK or galT lac U169 srl300:: Tn10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Muc+ sfiA::Mud (Ap, lac)cts. El medio de cultivo utilizado fue Luria-Bertani (15) suplementado con 100 ug/mL de ampicilina (LBA). Los cultivos fueron crecidos durante toda la noche a 37oC en agitación (100 rpm); posteriormente se diluyeron en medio fresco (1/25) y se incubaron a igual temperatura y agitación hasta una densidad óptica de 0.4.

### ***Material vegetal.***

Las hojas de *Erythroxylum minutifolium* Griseb var. *minutifolium* se colectaron entre los años 2000 y 2005 en la Provincia de Pinar del Río y se depositaron algunos ejemplares en el herbario del Instituto Pedagógico de esa provincia. Las hojas de *Erythroxylum minutifolium* fueron identificadas por el Dr. Armando Urquiola (Director del Jardín Botánico, Pinar del Río).El extracto hidroalcohólico de *Erythroxylum minutifolium* (ExM) fue obtenido del Laboratorio de Productos Naturales del Centro de Química Farmacéutica como describen Álvarez y colaboradores (4).

### ***Preparación del extracto.***

Un stock de 5 mg/ml fue preparado para la realización de todos los ensayos. Como vehículo para disolver el extracto en estudio se utilizó 4 µl de DMSO (100 %) y luego completado 1 ml con agua destilada estéril.

### ***Irradiación.***

La irradiación se realizó en una fuente de <sup>60</sup>Co (modelo PX- -30M, Rusia), a una temperatura de 2 a 5°C. El valor de la tasa de dosis estuvo entre 20.45 Gy/min. La dosis absorbida fue calculada utilizando el dosímetro Fricke (16).

### ***Evaluación del potencial radioprotector y/o antígenotóxico del extracto etanólico de *Erythroxylum minutifolium*.***

Para evaluar la radioprotección del extracto se calculo el Factor de Inducción (FI) utilizando la variante fluorescente del ensayo SOS Chromotest biosensor del daño primario inducido en el ADN de las células irradiadas, tanto en presencia como en ausencia del mismo.

El cultivo de *Escherichia coli* crecido hasta una DO de 600nm de 0.4 fue posteriormente diluido (1/10) en un medio LB 2X suplementado con ampicilina (100 ug/ml) y distribuido en viales estériles a razón de 500 µL por vial, los cuales fueron irradiados a una dosis de 150 Gy. Las concentraciones finales evaluadas del extracto fueron: 5, 25, 50 y 100 ug/ml las que fueron probadas en esquemas de co-tratamiento (radiación gamma-concentración correspondiente del extracto). En cada procedimiento se incluyó un control negativo tratado con agua estéril y un grupo tratado exclusivamente con radiación gamma. El procedimiento experimental seguido se resume en la Tabla I.

Como criterio de genotoxicidad se utilizó el Factor de Inducción SOS (FI) según lo indicado por Quillardet y colaboradores (17). El FI se calculó según la fórmula de la figura I, donde (i) y (c), son los valores de fluorescencia para la concentración evaluada y el control negativo del experimento, respectivamente.

### **Análisis Estadístico.**

Fueron calculados los valores medios y errores estandar del factor de inducción SOS en el estudio de radioproteccion. La normalidad de los datos se comprobó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, los valores medios fueron comparados respecto a los controles considerados en cada caso, utilizando una prueba de t de Student con una significación del 95 %.

## **Resultados**

La radioprotección del extracto etanólico de *E. minutifolium* frente a radiación gamma fue evaluada utilizando una variante fluorescente del SOS Chromotest. La figura II muestra los valores de factor de inducción obtenidos al co-tratar las células de *E. coli* con las concentraciones del extracto y la radiación gamma. Los resultados muestran que solo la concentración de 100 µg/ml del extracto mostró un significativo efecto inhibitorio del daño inducido por radiación gamma.

## Discusión

A pesar de que existen reportes sobre la genotoxicidad de los polifenoles y flavonoides como la quercetina, existen múltiples trabajos sobre la antígenotoxicidad mostrada por estos componentes. Tal es el caso de la quercetina, como mayor componente de la flor comestible de *Sesbania javanica*, la cual mostró una fuerte inhibición del efecto mutagénico de la aflatoxina B1 y el benzo(a) pireno en más del 70% (18). Así mismo, cuatro antraquinonas aisladas de las partes aéreas de la planta japonesa *Rumex acetosa* resultaron antígenotóxicas contra mutágenos estándares usando el Test de Ames y el ensayo SOS Chromotest (19).

Teniendo en cuenta estos reportes nosotros evaluamos el posible efecto antígenotóxico y/o radioprotector de un extracto etanólico de *E. minutifolium* mediante la variante fluorescente del SOS Chromotest. Dado que a la concentración de 200 µg/ml el extracto fue citotóxico para las células de *E. coli*, nosotros excluimos dicha concentración de la evaluación del posible efecto radioprotector. De las concentraciones evaluadas solo la concentración de 100 µg/ml disminuyó significativamente el factor de inducción de la cepa de *E. coli* PQ37 ( $p < 0.05$ , Test t de Student). Dado que el 75 % del daño provocado por radiaciones es indirecto y es mediado por las especies reactivas del oxígeno generadas por la radiólisis del agua (20), los resultados encontrados por nosotros sugieren que este extracto etanólico podría actuar mediante el secuestro de radicales libres. Los polifenoles, componentes mayoritarios del extracto (9), son uno de los grupos químicos más estudiados por su efecto antioxidante. Polifenoles aislados de diferentes extractos como el ácido gálico, carotenoides, flavonoides, terpenos, licopenos, xantinas, melatoninas, entre otros, han sido reportados como radioprotectores. Su habilidad para proteger contra radiaciones se atribuye principalmente al secuestro de radicales libres (21-24).

Otro punto de vista interesante a considerar, es que los polifenoles del extracto actúen mediante el reforzamiento de los sistemas de recuperación y reparación celular como ha sido propuesto para los radioprotectores modelos (25). En este tipo de mecanismo, el extracto protege la célula principalmente incrementando la capacidad reparativa de esta, disminuyendo su capacidad mutagénica; lo que se traduce, por ende, en una disminución del nivel de daño sobre el ADN (26). En este sentido, se ha encontrado que el té verde del japon incrementa la

fidelidad de la ADN polimerasa III (27). El ácido tánico y compuestos relacionados con el pirogalol, incrementan la reparación por escisión (28). La coumarina, la vanillina, el cinnamaldehído y los terpenoides como el campfor, promueven reparación recombinacional (25) o interactuar directamente con el ADN favoreciendo a su vez la interacción con las enzimas de reparación (29).

Durante los últimos años ha sido notable el incremento en el número de estudios que reportan diversas plantas medicinales y componentes dietéticos como una fuente excelente de agentes quimiopreventivos y radioprotectores. La búsqueda de nuevos compuestos radioprotectores y el estudio de sus mecanismos de acción constituyen una vía para desarrollar metodologías más efectivas en el tratamiento del cáncer mediante el uso de la radio y quimioterapias (30).

Un punto clave en la búsqueda de agentes quimiopreventivos es la elección del sistema de ensayo a utilizar para detectar el efecto buscado. Los ensayos a corto plazo son en un principio los más adecuados si lo que se pretende es una caracterización de las propiedades antigenotóxicas y/o radioprotectoras de una muestra dada. En este sentido, el SOS Chromotest tiene ventajas como son: su flexibilidad para desarrollar diferentes esquemas de tratamiento, su rapidez y sensibilidad. El indicador en ellos considerado, la inhibición del daño primario inducido en el ADN, puede ser un excelente criterio para estudios de antigenotoxicidad y/o radioprotección de estos productos, como ha sido previamente indicado por otros autores (31). La versión fluorescente del SOS Chromotest utilizada en la presente tesis posee ventajas respecto al ensayo colorimétrico original: economía, menor dispersión de los datos dentro del experimento, aumento de la procesatividad y reducción del tiempo de lectura. Este ensayo resultó sensible al daño inducido por mutágenos inductores de la respuesta SOS en *E. coli* (32).

Futuros estudios de fraccionamiento del extracto etanólico de *E. minutifolium* serán necesarios para conocer qué compuestos son los responsables de la citotoxicidad y radioprotección detectadas en el mismo. Una efectiva separación de los componentes de las mezclas y la posterior evaluación genotóxica y antigenotóxica de estos, nos permitiría identificar qué componentes son útiles en áreas como la terapia de enfermedades relacionadas

con la mutación. Las propiedades antigenotóxicas y/o radioprotectoras a la concentración de 100 µg/ml aquí demostradas amplía el potencial terapéutico de esta planta. Profundizar en los mecanismos de acción de los componentes de sus extractos debe ser la vía para ampliar las posibilidades de uso de las mismas en quimiopreención de enfermedades degenerativas crónicas como el cáncer, la arteriosclerosis, coronarias, etc, relacionadas con las mutaciones.

Por otra parte, el actual estudio es el primer reporte sobre la acción radioprotectora del extracto etanólico de *E. minutifolium*. Los datos aquí obtenidos, deben ser confirmados en otros modelos experimentales con fines a su uso como agente terapeutico y/o radioprotector.

**Anexos**

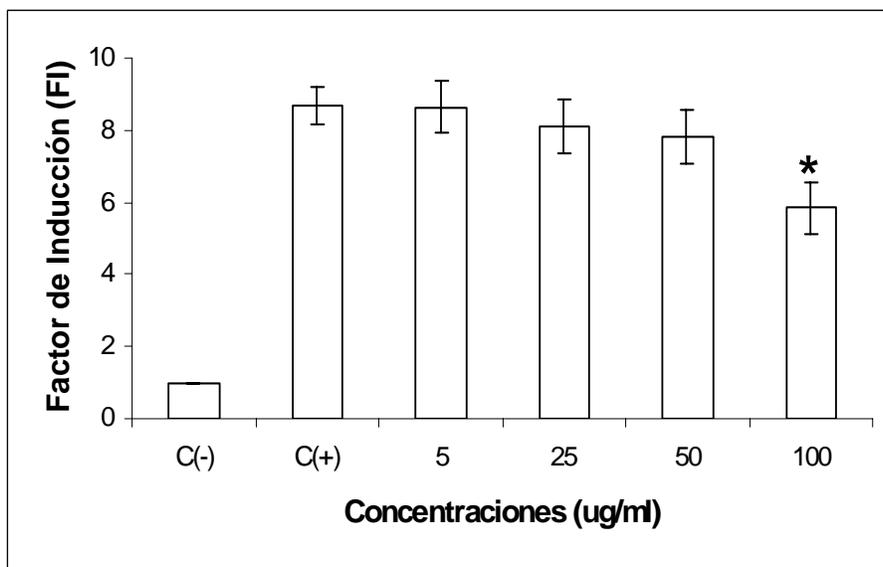
**Tabla I.** Procedimiento experimental usado para la evaluación de la antigenotoxicidad y/o radioprotección del extracto de *E. minutifolium*.

Pasos del esquema experimental	Posibles mecanismos implicados
- Pre-incubación a 8°C con el extracto durante 30 minutos.	Mecanismos intracelulares
- Irradiación en presencia del extracto.	que actúan antes, durante o después
- Incubación a 37°C con el extracto para del recuperación en medio LB durante 2 horas.	establecimiento del daño en el ADN.
- Ensayos enzimáticos para determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa y fosfatasa alcalina.	

**Figura I.** Cálculo del Factor de Inducción

$$FI = \frac{\frac{\beta\text{-galactosidasa (i)}}{\text{fosfatasa (i)}}}{\frac{\beta\text{-galactosidasa (c)}}{\text{fosfatasa (c)}}}$$

Figura II. Efecto radioprotector del extracto *Erythroxyllum minutifolium* frente a la radiación gamma. El control positivo utilizado fue de 150 Gy en ausencia del extracto. Son presentados los valores medios de factor de inducción y sus errores estándar correspondientes a dos experimentos independientes con dos réplicas cada uno. (\*): Significativo para  $p < 0.05$ , en un Test t de Student.



## Bibliografía

1. González JA, Prieto S, Garrido G, García M, González JL, González K, Monteagudo R, Rivas Y, Gordo O, Echemendía OA, Pino S. Antiviral activity of cuban vegetable species. *Pharmacologyonline* 2006; 3:527-530.
2. González JL, González JA, Pino S, García M, Carballo MT, Echemendia O, Molina J, Prieto S. Phytochemical screening and *in vitro* antiherpetic activity of four *Erythroxylum* species. *Acta Farm. Bonaerense* 2004; 23(4):506-509.
3. Bisset J. Árboles de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1988.p.5-6.
4. Álvarez A, González L, González J. Estudio de la actividad antimicrobiana de las hojas de cuatro especies del género *Erythroxylum* y la corteza de una especie de *Erythrina* al variar el régimen de secado. En: Memorias del XIV Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, Ciudad Mexico DF., 25-29 sept. Departamento de Desarrollo Tecnológico. Centro de Química Farmacéutica; 2005.p.9-13.
5. Cano JH, Volpato GJ. *Ethnopharmacol* 2004; 90:293-295.
6. Srinivasan P, Nathan S, Suresh T, Perumalsamy PL. Antimicrobial activity of certain indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Ethnopharmacol* 2001; 74:217-220.
7. Payo AL, Dominguez S, Suez O, Batista B, Velez M, Castro T. Tropane alkaloids from leaves and ítem bark of *Erythroxylum alaternifolium* and *Erythroxylum rotindifolium*. *Phytochem* 2000; 54(8):927-932.
8. Leyva O, Alonso A, Rodeiro I, Diaz A, Scarro S, Alvarez A, González JA. Evaluación genotóxica de un extracto etanólico de *E. minutifolium*. Tesis de Diploma. Fac. de Biología. Universidad de la Habana; 2007.p.1-56.
9. Jiménez N, González A, Prieto S, Molina J, Urquila A. Evaluación fitoquímica de tres especies de *Erythroxylum*. *Rev Cubana Plant Med* 2004; 9(2):1-8.
10. Pierce A, Preston L. Radiation-related cancer risk at low doses among atomic bomb survivors. *Radiat. Res* 2000; 154:178-186.
11. Littlefield LG, Joiner EE, Coiler SP, Sallam F, Frome EL. Concentration dependent protection against X-ray-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by aminothiols WR-1065. *Radiat. Res* 1993; 133:88-93.

12. Monroe E, Mansukh C. Antimutagenic agent from natural products of terrestrial and marine original. Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanism III. Plenum Press; 1993.p.87-97.
13. Arora R, Gupta D, Chawla R, Sagar R, Sharma A, Kumar R, Prasad J, Singh S, Samanta N. Radioprotection by Plant Products: Present Status and Future Prospects. *Phytother. Res* 2005; 19:1-22.
14. Huisman O, D'Ari R. An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *Escherichia coli*. *Nature* 1981, 290:797-799.
15. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning, cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 1982.p.67-81.
16. Prieto E, Cañet F. Aspectos a considerar en el dosímetro Fricke. *Tecnología Química* 1990; 2:19-21.
17. Quillardet P, Frelat G, Nguyen VD, Hofnung M. Detection of ionizing radiations with the SOS Chromotest, a bacterial short-term test for genotoxic agents. *Mutation Res* 1989; 216:251-257.
18. Tangvarasittichai S, Sriprang N, Harnroongroj T, Changbumrung S. Antimutagenic activity of *Sesbania javanica* Miq. flower DMSO extract and its major flavonoids glycoside. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36(6):1543-1551.
19. Lee NJ, Choi JH, Koo BS, Ryu SY, Han YH, Lee SI, Lee DU. Antimutagenicity and cytotoxicity of the constituents from the aerial parts of *Rumex acetosa*. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(11):2158-2161.
20. Von S. The chemical basis of radiation biology. Taylor & Francis (ed), London, New York, Philadelphia, USA; 1987.p.515-518.
21. Gandhi N, Nair M, Ch KK. Protection of DNA and membrane from gamma radiation induced damage by gallic acid. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005 ; 278:111-117.
22. Bobadilla L, Silva R, Contreras K, Ortega C, Ruvalcaba L, Vargas J, Montiel T, Sepúlveda H, Mendoza L, Corona JR, Corona A. Evaluación del daño genómico inducido por radiación en presencia de curcumina mediante prueba Cometa en un modelo murino. *Revista Salud Pública y Nutrición RESPYN* 2006; 5 Edición Especial: 13-15.

23. Corona A, Fletes A, Márquez A, Hernández M, García E, Ramírez M, Mendoza M, Díaz P, Urbina P, Troyo R, Bobadilla L. Evaluación de signos clínicos en ratones expuestos a radiación en presencia de amifostina y curcumina. *Revista Salud Pública y Nutrición RESPYN* 2006; 5 Edición Especial: 16-20.
24. Narang H, Krishna M, Inhibition of radiation induced nitration by curcumin and nicotinamide in mouse macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005; 276:7-13.
25. Nair K, Parida K, Nomura T. Radioprotectors in radiotherapy. *J. Radiat. Res* 2001; 42:21-37.
26. Kada T, Inoue T, Namiki, N. Environmental desmutagens and anti-mutagens. E.J. Klekowski (Ed.), *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger, New York; 1982.p.137-151.
27. Kada T. Environmental and biological factors suppressing induction of mutations (in Japanese). *Toxicology Forum* 1983; 6:580-589.
28. Laget M, de Meo M, Wallet JC, Gaydou EM, Guiraud H, Dumenil G. Antimutagenic activities of 24 synthetic flavones with the Salmonella microsomal assay. *Arch. Pharm. Res* 1995; 18:415-422.
29. Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research* 2001; 475: 89-111.
30. Glover DK, Fox R, Weiler C, Kligerman MM, Turrisi A, Glick JH. Clinical trials of WR-2721 prior to alkylating agent chemotherapy and radiotherapy. *Pharmacol. Ther* 1988; 39:3-7.
31. Alonso A, Fuentes JL, Prieto E, Sánchez A, Ferrer M, Barbe J, Llagostera M. Antigenotoxic effect of the aqueous extract of *Phyllanthus orbicularis* HBK in  $\gamma$ -irradiated *Escherichia coli* cells. *Recent Progress in Medicinal Plants. Phytotherapeutics* 2005; 10:15-23.
32. Cuétara E. Una variante fluorescente del SOS Chromotest para el estudio de radioprotectores naturales. Tesis en opción al título de Maestro en Bioquímica. Fac. de Biología. Universidad de la Habana; 2004.p.5-46.

**Recibido: 05/02/10**

**Aceptado: 22/02/10**