

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Evaluación genotóxica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet en el ensayo de micronúcleos en ratones Balb/c.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola,^{1*} Luis Alfredo Rosario Fernández,² Livan Delgado Roche,³ Adriana Alonso Laurencio,² Yolanda Emilia Suárez Fernández,⁴ Alexis Vidal Novoa.⁵

¹ Instituto Finlay. Habana, Cuba.

² Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL-U.H). Habana, Cuba.

³ Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CIEB). Habana, Cuba.

⁴ Universidad Agraria de La Habana (UNAH). Mayabeque, Cuba.

⁵ Facultad de Biología (U.H). Habana, Cuba.

* Correspondencia a: darencibia@cecmed.sld.cu

Resumen

El extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* fue evaluado recientemente manifestando grandes potencialidades como antioxidante en ensayos *in vivo*. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el potencial genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* en el ensayo de micronúcleos en células de la médula ósea de ratones Balb/c. Para ello se formaron 5 grupos experimentales. Un grupo placebo (Tween 65 al 2%), tres niveles de dosis del extracto (400, 1 000 y 2 000 mg/kg), administrados por vía oral durante 14 días. Por último un grupo control positivo tratado con ciclofosfamida (CF), en dosis de 50 mg/kg por vía intraperitoneal 48 y 24 h antes de la eutanasia. Se administraron 5 animales/sexo/grupo. Después de los 14 días de administración se eutanizaron por dislocación cervical y se extrajo la médula ósea del fémur para proceder a realizar la técnica citogenética de micronúcleos. Los resultados obtenidos entre controles y tratados con el extracto no difirieron para los dos sexos en las variables EP/EN como índice de citotoxicidad y el % de EP con micronúcleos como índice de daño genotóxico. Sin embargo si difirieron controles y tratados contra el grupo tratado con CF, validando nuestros resultados. Se concluye que el extracto oleoso de la semilla de la *Carapa guianensis* no posee potencialidades genotóxicas en la formación de micronúcleos en células de la médula ósea de ratones Balb/c de ambos sexos.

Palabras claves: Extracto oleoso, *Carapa guianensis*, micronúcleos, ratones Balb/c.

Abstract

Genotoxic assessment of the *Carapa guianensis* Aublet seed oleaginous extract in Balb/c mice micronucleus assay.

The seed oil extract of *Carapa guianensis* has various biomedical applications. Recently was evaluated expressing great potential as *in vivo* antioxidant assays. The aimed of this study was to evaluate the genotoxic potential of the seed oil *Carapa guianensis* extract in the micronucleus assay of bone marrow cells in Balb/c mice. We were formed 5 experimental groups. A placebo group (Tween 65, 2%), three dose levels of the extract (400, 1 000 and 2 000 mg/kg) administered orally for 14 days. Finally a positive control group treated with cyclophosphamide (CF), at a dose of 50 mg/kg intraperitoneally 48 and 24 h before euthanasia. Were administered 5 animals/sex/group. After 14 days of dosing the animals were euthanized by cervical dislocation and the bone marrow of femur was extracted to proceed with the micronucleus cytogenetic technique. The results between controls and treated with the extract did not differ for the two sexes in the cytotoxicity index (PE/NE) and the PE percent with micronucleus as genotoxicity index. However the controls and treated with the extract were differed from the group treated with CF, validating our results. We conclude that the oleaginous extract of the *Carapa guianensis* seeds has not genotoxic potential in the formation of micronucleus in Balb/c mice bone marrow of both sexes.

Key words: Oleaginous extract, *Carapa guianensis*, micronucleus, Balb/c mice.

Introducción

Carapa guianensis pertenece a la familia Meliaceae, es una planta medicinal muy popular en varios países del mundo; en Cuba es conocida como Cedro Macho.

La caracterización del aceite de la semilla de *Carapa guianensis* ha revelado la presencia de ácidos grasos mirístico, palmítico, oleico, linoleico,^{1,2} esteárico y ácido araquidónico.³ Algunos tetraterpenoides han sido aislados de la semilla de *Carapa guianensis*, nombrados como, 6-alfa-acetoxi-epoxiazadiradiona, 7-deacetoxina-7-oxogedunina, gedunina, andirobina, metil angolensatedina,³ 1,3-di-benceno carbo amino-2-octadecílico acil-glicérido, ácido hexacosanoico 2,3-dihidroxi-glicérido, ácido ursólico, naringenina, escopoletina, 3,4-dihidroximetilbenzoato, 2,6-dihidroximetilbenzoato, ácido tetratriacontanoico, ácido triacontanoico,⁴ epoxiazadiradiona, 6-alfahidroxigedunina.⁵

También se ha observado que los tetraterpenoides obtenidos de la semilla de la *Carapa guianensis* tienen una significativa actividad antialérgica, dado por la inhibición del factor nuclear kB y la supresión de la IL-5 y el CCL11/eotaxina.

Recientemente se ha descrito el potencial antioxidante, la capacidad como protector solar e insecticida del extracto oleoso de *Carapa guianensis*.⁶⁻¹⁰ Esta planta abunda en el Caribe especialmente en Belice, Trinidad y Tobago y Cuba.^{6,8,9} Los estudios fotoquímicos de los extractos obtenidos en estas regiones denotan la presencia mayoritaria de ácidos grasos poliinsaturados y de compuestos fenólicos tales como taninos y limonoides.

Una vez que ha sido demostrado su efecto antioxidante mediante la administración oral del extracto durante tres semanas en ratas Sprague Dawley de ambos sexos, co-administradas con una sustancia oxidante donde se demostró su efecto protector a la formación de especies reactivas del oxígeno,¹⁰ se hace necesaria la evaluación de su nivel de seguridad, al menos en los ensayos de toxicidad clásica de primera y segunda barrera.¹¹

Teniendo en cuenta estos antecedentes el objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* en

el ensayo de micronúcleos en células de la médula ósea de ratones Balb/c de ambos sexos.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratones Balb/c de ambos sexos adultos jóvenes (5-7 semanas), procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), cuyo peso corporal oscilaba entre 25-30 g al término de la cuarentena (7 días), durante la cual los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en $24 \pm 2^\circ \text{C}$, la humedad entre $55 \pm 10\%$ y los ciclos de luz- oscuridad fueron de 12 horas. El alimento administrado a los animales durante toda la experiencia fue pienso estándar para esta especie preparado en el CENPALAB. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum*.

Obtención del extracto oleoso

Se agregó N-Hexano a razón de 2 kg de semilla de *Carapa guianensis* previamente secado y triturado. Se dejó en reposo por 60 min y luego se filtró al vacío. El solvente se adicionó hasta que la muestra botánica del aceite se saturó y luego fue removido reduciendo presión. El rendimiento del extracto fue del 29 % (v/w). La densidad aparente del aceite fue calculado (0.81 g/mL) y este resultado fue utilizado para definir el volumen exacto que cada animal recibió. El aceite fue conservado a -20°C hasta su uso.

Administración y dosificación

El extracto oleoso se suspendió en Tween 65 (2 %), 2 h antes de la administración y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Se propuso emplear la vía oral por ser la que coincide con la propuesta en la terapéutica.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente (5 ratones/grupo/sexo), 5 grupos experimentales: un grupo control de vehículo (Tween 65 al 2 %), tres tratados con el extracto oleoso de *Carapa guianensis* (400, 1 000 y 2 000 mg/kg) y un control positivo tratado con ciclofosfamida (N,N-bis (cloruro de etilo)-N', O-esterdiamida del ácido fosfórico propinel) (CF) . Las emulsiones realizadas con el extracto y vehículo se administraron mediante entubación gástrica (2 mL/kg) durante 14 días, en el horario comprendido de 10:00 a 11:00 a.m. La CF se administró en dos dosis (50 mg/kg) por vía intraperitoneal 48 y 24 h previas a la eutanasia en el horario de 10:00 a 11:00 a.m., según se establece para el ensayo.^{12,13}

La dosis menor del extracto ha sido empleada en estudios farmacológicos preclínicos,^{3,7, 14, 15} la cual ha demostrado ser efectiva en lo modelos contra Leishmania, cáncer de útero y como antioxidante y 2 niveles superiores múltiples de este (1 000 y 2000 mg/kg).^{14,15}

Observaciones clínicas

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m. y en el horario de la tarde 3:00-4:30 p.m. Durante cada observación se tuvo en cuenta el estado clínico general del animal, lo cual incluyó la palpación para la detección de lesiones, posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos.

Ensayo de micronúcleos de médula ósea de ratón

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó por flujo con 3 ml de suero bovino fetal. La médula así obtenida se centrifugó a 1000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos.^{16,17} Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 5 minutos, para su posterior tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos.^{16,17} Las láminas fueron codificadas, el análisis se realizó por tres observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas". Se contabilizó la

presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2000 células/animal.^{16,17} Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN-EP) en 2000 EP/animal, según los requisitos establecidos.^{16,17} Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN en cada grupo.^{16,17}

Eutanasia

A todos los animales se les practicó la eutanasia por dislocación cervical teniendo en cuenta el tiempo de exposición a cada una de las sustancias evaluadas.¹⁸

Procedimientos éticos

Los autores declaramos que este trabajo fue confeccionado sobre la base de buenas prácticas de laboratorio preclínico presentes en el reglamento nacional de aprobación de protocolos de investigación de la República de Cuba. Además se declara por parte de los autores del artículo que al comenzar esta investigación se obtuvo por escrito el consentimiento de aprobación del protocolo e informe por el comité institucional de ética para la experimentación animal de nuestras instituciones.

Análisis estadístico: La frecuencia de EP portadores de micronúcleos y el índice de citotoxicidad (EP/EN), se realizó mediante el método de análisis de varianza (ANOVA).^{16,17} El número total de MN y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado.^{16,17} El nivel de significación establecido fue $\alpha = 0.05$. Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados

No ocurrieron muertes durante el estudio ni se detectaron signos clínicos de toxicidad. No hubo diferencias significativas entre grupos tratados y controles en cuanto al índice de citotoxicidad (EP/EN), frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (Tabla 1) y número de EP con 1, 2 o más MN (Tabla 2), no siendo así para los grupos tratados con CF para los cuales sí se encontró diferencia significativa.

Discusión

Los resultados que se aprecian en la Tabla 1 demuestran que el tratamiento con el extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* por vía oral durante 14 días en ratones Balb/c de ambos sexos mantuvo los índices espontáneos del número de micronúcleos en células de la médula ósea, de igual forma no interfirió en la división celular según el índice de citotoxicidad EP/EN.

El índice EP/EN, indicador de la proliferación celular en médula ósea, fue estadísticamente similar en los grupos tratados con el extracto y en el control, lo que indica ausencia de efecto citotóxico del tratamiento a todas las dosis.¹⁴ Sin embargo, los valores de este índice en los ratones tratados con CF fueron estadísticamente significativos al compararlo con los controles y tratados.^{19,20}

La frecuencia de aparición de EP con MN se comportó de forma similar para los grupos tratados con el extracto oleoso y para el control. En este último los valores son consistentes con lo reportado para esta especie y con nuestros datos históricos.^{20,21}

El grupo control positivo CF mostró una frecuencia de EP con MN alta y mayor que en los restantes grupos, lo que representa una evidencia de rupturas cromosómicas o daño en el aparato del huso mitótico.^{20,21}

El número de EP con 1, 2 o más MN también fue similar en los grupos tratados y control, y mayor en los animales tratados con CF. El aumento encontrado en el grupo tratado con CF evidencia la acción citotóxica y clastogénica de este mutágeno de referencia a la dosis y vía de administración empleada¹⁹⁻²² y la fiabilidad, sensibilidad de

este biomodelo.²¹ Resultados similares obtuvieron Carvalho y col., 2011 y Reddy y col., 2011, al utilizar dentro de sus estudios genotóxicos la CF como control positivo y evaluarlo como un potente agente en la formación de micronúcleos.^{23,24}

Es importante comentar que la ausencia de efecto mutagénico y citotóxico del extracto oleoso de *Carapa guianensis* observado en este estudio no se relaciona con una inadecuada exposición a la sustancia ensayo, ya que las dosis por vías orales de este producto entre 100 y 350 mg/kg, inferiores a las utilizadas en el presente estudio, han producido efectos farmacológicos importantes.^{6-10,14,15}

Además se utilizó la dosis máxima recomendada (2 000 mg/kg) para este ensayo tanto en esquemas de dosis única como repetidas durante 14 días.¹³ Esta dosis se recomienda para los ensayos de dosis únicas donde la toma de muestra se realiza entre las 24 y las 48 h postratamiento, al ser utilizada la médula ósea, con una población celular extremadamente proliferativa, de corto ciclo, además de ser un tejido muy vascularizado permitiendo el acceso rápido de las sustancias a evaluar.²⁵ Por tanto, el empleo de esta dosis administrada durante más tiempo descarta que la exposición a la sustancia haya sido insuficiente.

En conclusión, la administración por vía oral de dosis repetidas del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* (400, 1 000 y 2 000 mg/kg) durante 14 días no aumentó la frecuencia de células en médula ósea con micronúcleos ni modificó el índice de citotoxicidad (EP/EN), lo que indica que no presenta potencial genotóxico ni citotóxico sobre las células de la médula ósea de ratones Balb/c de ambos sexos.

Tabla 1. Efecto del extracto oleoso de la semilla de la *Carapa guianensis* en el número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c de ambos sexos.

Grupo Experimental	n	EP	EN	EP/EN	MN-EP (%)
Machos					
CN	5	1079 ± 10,1	921 ± 11,0	1,17 ± 0,02	0,18 ± 0,04
CF	5	925 ± 27,2*	1075 ± 26,2*	0,86 ± 0,02*	1,77 ± 0,93*
ECG (400 mg/kg)	5	1080 ± 13,3	920 ± 13,2	1,17 ± 0,03	0,22 ± 0,02
ECG (1 000 mg/kg)	5	1074 ± 14,8	926 ± 14,5	1,16 ± 0,03	0,23 ± 0,02
ECG (2 000 mg/kg)	5	1070 ± 17,0	930 ± 17,0	1,15 ± 0,05	0,19 ± 0,03
Hembras					
CN	5	1066 ± 16,9	934 ± 16,9	1,14 ± 0,05	0,15 ± 0,05
CF	5	918 ± 19,2*	1082 ± 19,2*	0,85 ± 0,01*	1,71 ± 0,84*
ECG (400 mg/kg)	5	1060 ± 17,0	940 ± 17,0	1,13 ± 0,03	0,18 ± 0,03
ECG (1 000 mg/kg)	5	1069 ± 15,1	931 ± 15,1	1,14 ± 0,03	0,15 ± 0,05
ECG (2 000 mg/kg)	5	1072 ± 17,6	928 ± 17,6	1,16 ± 0,02	0,16 ± 0,05

Determinaciones en 2 000 células/animal. *p<0.05 (comparación con el control, ANOVA). (X media; DE desviación estándar). CN= Control Negativo, CF= Control positivo, Ciclofosfamida 50 mg/kg i.p. ECG= Extracto oleoso de *Carapa guianensis* (administración por vía oral durante 14 días).

Tabla 2. Efecto del extracto oleoso de la semilla de la *Carapa guianensis* en el número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de dos micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c de ambos sexos.

Grupo Experimental	n	MN	PCE (1 MN)	PCE (2 MN)	PCE (+2 MN)
Machos					
CN	5	26	19	7	0
CF	5	253*	164*	72*	17*
ECG (400 mg/kg)	5	31	20	9	2
ECG (1 000 mg/kg)	5	33	22	10	1
ECG (2 000 mg/kg)	5	27	17	8	2
Hembras					
CN	5	21	14	5	2
CF	5	244*	158*	66*	20*
ECG (400 mg/kg)	5	25	16	8	1
ECG (1 000 mg/kg)	5	22	18	4	0
ECG (2 000 mg/kg)	5	23	15	7	1

Determinaciones en 2 000 EP/animal. *p<0.05 (comparación con el control, Prueba de χ^2). CN= Control Negativo, CF= Control positivo, Ciclofosfamida 50 mg/kg i.p. ECG= Extracto oleoso de *Carapa guianensis* (administración por vía oral durante 14 días).

Referencias

1. Pinto GP. Contribuicao ao estudo químico do óleo de Andiroba. Boletín Técnico do Instituto Agronómico do Norte. 1956; 31:195-206
2. Teske, M, Trentini AM. Herbarium: Compendio de Fitoterapia. Herbarium Laboratorio Botánico. Paraná; 1997.p.35.
3. Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MF, Pereira JF, Siani AC, et al. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergeninduced vascular permeability and hyperalgesia. Inflammation Research. 2005; 54:295-303.
4. Qi S, Wu D, Zhang S, Luo X. Constituent of *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae). Pharmazie. 2004; 59:488-90.
5. Penido C, Costa KA, Costa MF, Pereira JF, Siani AC, Henriques MG. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NF κ B activation. International Immunopharmacology. 2006; 6:109-21.
6. Ambrozin A, Leite A, Bueno F, Vieira P, Fernandes JB, Bueno O, et al. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. J Braz Chem Soc. 2006; 17(3):542-7.
7. Ferrari M, Oliveira M, Nakano A, Rocha-Filho P. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo* de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). Rev Bras Farmacogn. 2007; 17(4):626-30.
8. Gonçalves JF, Silva CE, Guimarães DG. Fotossíntese e potencial hídrico foliar de plantas jovens de andiroba submetidas à deficiência hídrica e à reidratação. Pesq Agropec Brás. 2009; 44(1): 8-14.
9. Tonini H, Arco M. Morfologia da copa para avaliar o espaço vital de quatro espécies nativas da Amazônia. Pesq Agropec Brás. 2005; 40(7):633-8.

- 10.**Alonso A. Evaluación pre-clínica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* como suplemento nutricional antioxidante. Tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. IFAL-U.H. Habana, Cuba; 2012.p.1-58.
- 11.**Gámez R, Más R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos más empleados. Revista CENIC. 2007; 38(3): 204-8.
- 12.**Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. Retel. 2009; 23(3):23-40.
- 13.**Organisation for Economic Co-operation and Development. Genetic Toxicology: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. In: OECD. Guideline for the testing of chemicals. TG 475. Paris: OECD Publishing; 1997. p. 1-10.
- 14.**Costa JH, Lyra M, Lima CR, Arruda VM, Araújo AV, Ribeiro A, et al. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats. Journal of Ethnopharmacology. 2007; 112:122-6.
- 15.**Costa JH, Lima CR, Silva EJ, Araújo AV, Fraga MC, Ribeiro A, et al. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. Journal of Ethnopharmacology. 2008; 116:495-500.
- 16.**Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. Retel. 2009; 25(3):22-38.
- 17.**Hayashi M, Tice R, MacGregor J.T, Anderson D, Blakey D, Kirsh-Volders M, et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutation Research. 1993;5: 120-134.
- 18.**Shayne CG. Animal Models in toxicology. Chapter 2: The Mouse. Toxicology. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007.p. 24-72.
- 19.**Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A. Comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. Química Viva 2011; 10(2):106-117.
- 20.**Arencibia DF, Vidal A, Rosario A, Suárez YE, Delgado L. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. VacciMonitor 2011; 20(1):28-33.

21. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE. Sensibilidad de distintas líneas murinas a la ciclofosfamida medida a través del ensayo de micronúcleos en células de la médula ósea. *Journal of Basic and Applied Genetics*. 2011; 22(2):125-32.
22. Arencibia DF, Rosario LA, Vidal A. Comparación entre líneas de ratones en el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea. *Revista MVZ Córdoba*. 2012; 17(2):2957-63.
23. Carvalho I, Melo A, Dantas A, Pereira D, Costa F, Andrade T, Da Silva J. Genotoxicity of sodium metabisulfite in mouse tissues evaluated by the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research*. 2011; 720:58-61.
24. Reddy G, Song J, Kirby P, Johnson M. Genotoxicity assessment of ethylenediamine dinitrate (EDDN) and diethylenetriamine trinitrate (DETN). *Mutation Research*. 2011; 726:169-174.
25. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Vidal A, Delgado L. Comparison in the efficiency of different murine lines for genotoxicity assays. *Interdisciplinary Toxicology*. 2012; 5(2):48-58.

Recibido: 09/10/12

Aceptado: 16/10/12