

# Estudio preliminar de la citotoxicidad y la genotoxicidad de un extracto de origen vegetal conocido como palmo rosado en células meristemáticas de *Allium cepa*

## Preliminary study of the cytotoxicity and genotoxicity of a vegetable extract known as pink palm meristematic cells of *Allium cepa*

Sofía Freyre B.<sup>1</sup>

Martín Estrada V.<sup>2</sup>

Harold Bolaños B.<sup>3</sup>

### Resumen

Se determinó que el extracto vegetal comercializado en algunas plazas de mercado de la ciudad de Pasto con el nombre de palmo rosado o chuchuuasa presenta citotoxicidad y genotoxicidad en el modelo de células meristemáticas de *Allium cepa*. Variables como el crecimiento radicular, el índice mitótico, la morfología radicular y la aparición de aberraciones cromosómicas fueron evaluadas en función de la concentración. Se encontró que todas estas variables se ven afectadas al exponer los meristemas radiculares de cebolla a la fracción acuosa del palmo rosado.

**Palabras clave:** palmo rosado, chuchuuasa, *Allium cepa*, citotoxicidad, genotoxicidad, índice mitótico.

### Abstract

It was determined that the plant extract marketed in some marketplaces of Pasto city under the name of palmo rosado or chuchuuasa exerts cytotoxicity and genotoxicity in the model of meristematic cells of *Allium cepa*. Variables such as root growth, mitotic index, root morphology and the appearance of chromosomal aberrations, were evaluated in terms of the concentration. All these variables are affected by exposing the root meristem of onion to the aqueous fraction of the ethanol extract of palmo rosado.

**Keywords:** palmo rosado, chuchuuasa, *Allium cepa*, cytotoxicity, genotoxicity, mitotic index.

### Introducción

En nuestro país existe una larga tradición de uso de plantas medicinales para el tratamiento primario de muchas enfermedades. En la mayoría de los casos no existe un sustento científico que valide su uso terapéutico o que demuestre la toxicidad de las drogas vegetales que se comercializan en las plazas de mercado.

En la ciudad de Pasto, al igual que en muchas ciudades de Colombia, se comercializan no sólo plantas medicinales, sino también extractos alcohólicos de muchas de ellas, sin un debido control sanitario. Si bien algunas de dichas plantas podrían presentar un verdadero valor terapéutico, también es cierto que la manera como se

preparan, conservan y consumen dichos extractos no siempre es la más adecuada; por esto, la investigación científica que valide su uso terapéutico o que compruebe su toxicidad es estrictamente necesaria.

Uno de los extractos comercializados en esta ciudad con una supuesta aplicación en la terapéutica del cáncer se conoce con los nombres de palmo rosado o chuchuuasa, aunque este último se comercializa también como antiirreumático.

El interés de este trabajo investigativo es hacer una aproximación inicial a la citotoxicidad y genotoxicidad de este extracto en el modelo de células meristemáticas de *Allium cepa*, con

<sup>1</sup> Docente de la Universidad Cooperativa de Colombia. Magíster en Ciencias Bioquímicas. Correo electrónico: sifreyreb@unal.edu.co.

<sup>2</sup> Docente de la Universidad Cooperativa de Colombia. Magíster en Ciencias Farmacéuticas. Correo electrónico: mhestradav@unal.edu.co.

<sup>3</sup> Docente de la Universidad del Cauca. Médico patólogo. Correo electrónico: haroldbolanos@unicauca.edu.co

**Recibido** 20 de mayo de 2009 **Aceptado** 30 de julio de 2009

miras a un trabajo futuro que valide o descarte su uso terapéutico y que caracterice la especie vegetal que se utiliza en su preparación.

## **Materiales y métodos**

### **Preparación del extracto**

Las cortezas de palmo rosado fueron compradas en la plaza de mercado Potrerillo, de la ciudad de Pasto. Se lavaron, secaron y pulverizaron 500 g de esta materia vegetal. El polvo que se obtuvo fue sometido a maceración en etanol por un periodo de 72 horas, protegido de la luz y bajo condiciones normales de laboratorio. Transcurrido este tiempo se evaporó el solvente a presión reducida, con una temperatura aproximada de 40° C, hasta obtener una pasta manejable, la cual se secó completamente en baño María; formándose un sólido que necesitó ser pulverizado nuevamente para preparar las diferentes diluciones de fracción acuosa a evaluar.

### **Preparación de los ejemplares de *Allium cepa***

Se seleccionaron bulbos de cebolla de buenas condiciones macroscópicas y un tamaño uniforme, que permitiera su cultivo en vasos de precipitados. Se lavaron y ubicaron en los vasos con suficiente agua para cubrir la parte inferior, de la cual brotan las raíces. Se cultivaron a condiciones normales de laboratorio, con cambios de agua cada 24 horas. Una vez las raíces alcanzaron de 2 a 3 cm de longitud se seleccionaron de 3 a 5 meristemas radiculares por cada cebolla, para los ensayos posteriores (tiempo cero).

### **Exposición de meristemas radiculares a las concentraciones del extracto**

Con el fin de determinar un rango de concentraciones que permitiese valorar los efectos tóxicos de la fracción acuosa, se pesaron 3 g, 1,5 g, 0,75 g y 0,36 g del extracto etanólico y se agregaron a 100 ml de agua. Se trituraron los trozos de extracto con un agitador de vidrio, para lograr la máxima disolución; sin embargo, no todo el material se disolvió. Posteriormente se filtró y se secaron en estufa (40° C) los papeles filtro con los residuos no disueltos y se calculó por diferencia el peso del material disuelto, para determinar la

concentración de las soluciones obtenidas. Con ellas se realizaron los ensayos de citotoxicidad. Para tal efecto se expusieron durante 48 horas los meristemas radiculares en cada una de las concentraciones obtenidas (1,924 mg/ml, 3,19 mg/ml, 4,18 mg/ml, 7,13 mg/ml); cada una de las raíces se midió por periodos aproximados de 12 horas de exposición (siempre con el mismo observador), para determinar el efecto sobre el crecimiento radicular. Se determinó la diferencia entre el valor de crecimiento inicial (tiempo cero) y el valor de crecimiento al cabo de 48 horas de exposición para cada una de las réplicas y el blanco. Se llevó a cabo un diseño con un solo factor, que corresponde a la concentración del extracto, y a las cinco diferentes concentraciones; por tanto, se aplicaron cinco tratamientos con tres repeticiones en cada uno. El crecimiento radicular y el índice mitótico fueron las variables dependientes, y cada observación corresponde al promedio de las mediciones de tres raíces de una misma cebolla. Se realizó un cultivo blanco en agua libre de extracto y cada 24 horas se reemplazó cada una de las soluciones por soluciones recién preparadas.

Las determinaciones del índice mitótico se realizaron en un microscopio óptico común; las tinciones celulares se realizaron con orceína acética y las fotografías se obtuvieron con una cámara digital de 10 megapíxeles.

## **Fundamento teórico**

Citotoxicidad es un concepto que se puede aplicar en cualquiera de las siguientes situaciones: muerte celular o alteración de su metabolismo. Existen ensayos útiles para la determinación de la citotoxicidad, que son ampliamente empleados por su bajo costo, fácil cuantificación y reproducibilidad. Mediante este tipo de experimentos es posible determinar el potencial citotóxico de compuestos de interés, que podrían tener futuras aplicaciones terapéuticas (1).

Los modelos experimentales empleados para valorar la toxicidad de compuestos químicos se fundamentan en el sustrato biológico y en los indicadores de toxicidad. El sustrato es el material orgánico sobre el que se aplica un xenobiótico,

mientras que los indicadores de toxicidad son los parámetros que permiten determinar las alteraciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato de ensayo (2).

Las aberraciones cromosómicas se caracterizan por cambios en la estructura cromosómica o en el número total de cromosomas; esto puede ocurrir espontáneamente o como resultado de la exposición a agentes físicos o químicos (3). Dichas aberraciones se pueden producir a través de mecanismos clastogénicos y aneugénicos. Los primeros se caracterizan por la inducción de rupturas cromosómicas durante la división de la estructura celular, mientras que los segundos comprenden la alteración de estructuras celulares, tales como el huso mitótico, lo cual conlleva pérdidas cromosomales (4).

Algunas aberraciones cromosómicas derivadas de anomalías nucleares comprenden los brotes, micronúcleos, núcleos lobulados y células polinucleadas. Los micronúcleos pueden resultar de fragmentos acéntricos (agente aneugénico) o cromosomas totales (agentes clastogénicos); estos pueden incorporarse o no al núcleo principal durante el ciclo celular (4). Los brotes nucleares indican el inicio de la liberación del exceso de material nuclear, el cual será depositado en el citoplasma como minicélulas. Las células polinucleadas o con núcleos lobulares son resultado de aberraciones cromosómicas, como consecuencia de anafases multipolares, las cuales pueden estar asociadas a adherencia cromosomal; esto ocasiona, finalmente, células inviables (5).

Entre los organismos de prueba usados para estos ensayos se incluyen las plantas superiores como *Allium cepa*, la cual es reconocida como excelente bioindicador de genotoxicidad y efectos mutágenicos (6). Uno de los usos más difundidos de este modelo ha sido la determinación a corto plazo de contaminación ambiental (7; 8). Además de las ventajas en cuanto a costos, disponibilidad y sensibilidad, cabe mencionar que las características cromosomales de esta especie favorecen la evaluación de aberraciones cromosómicas, lo cual puede ser útil en una interpretación de los posibles mecanismos implicados en la genotoxicidad (9; 10).

## Resultados y discusión

### Crecimiento radicular. Hallazgos macroscópicos

La tabla 1 muestra los datos de crecimiento radicular después de 48 horas de exposición; cada uno corresponde al promedio de tres raíces en cada una de las tres cebollas (R1-R3). Los datos del blanco corresponden a cebollas no sometidas a ningún tratamiento.

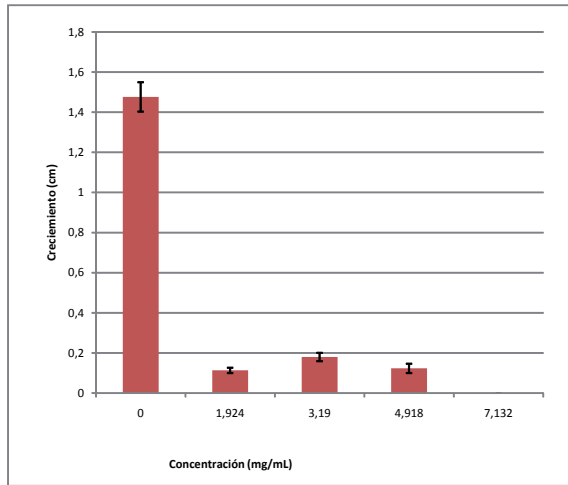
Tabla 1. Datos de crecimiento radicular

Concentración (mg/ml)	Crecimiento radicular (cm)		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Blanco	1,38	1,43	1,62
1,92	0,1	0,14	0,1
3,19	0,17	0,22	0,15
4,92	0,1	0,1	0,17
7,13	0	0	0

En la figura 1 se puede observar claramente el efecto de las diferentes concentraciones sobre el crecimiento radicular. Se concluye que los efectos de las concentraciones de 1,92 mg/ml, 3,19 mg/ml, y 4,91 mg/ml presentan diferencias significativas respecto al control, sin presentar diferencias entre sí ( $p < 0,01$ ). También se observa que una concentración de 7,13 mg/ml detiene completamente el crecimiento.

Sobre el rango de concentraciones estudiadas, cabe señalar que la concentración mínima evaluada es la única que inhibe el crecimiento radicular sin afectar la morfología ni la estructura de las raíces y que permite la recuperación del crecimiento al detener la exposición. Por su parte, las dos concentraciones intermedias ocasionan cambios en la forma (aparición de bulbos en las puntas) y en la estructura de las raíces (pérdida de la rigidez y de la consistencia).

La concentración más alta ocasiona los mismos efectos que las concentraciones intermedias a tiempos más cortos (6 horas), el crecimiento se detiene porque simplemente las células mueren, por lo cual evaluar una concentración mayor fue innecesario.

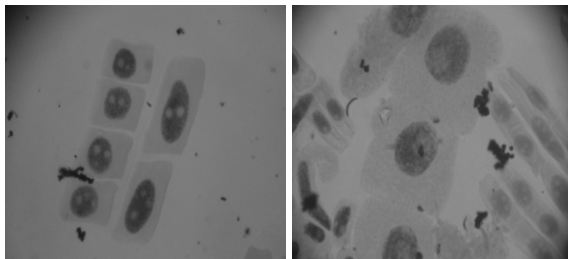


### Crecimiento radicular. Hallazgos microscópicos

Una vez determinados los efectos observables a simple vista, se procedió a determinar el efecto de cada tratamiento en el plano celular.

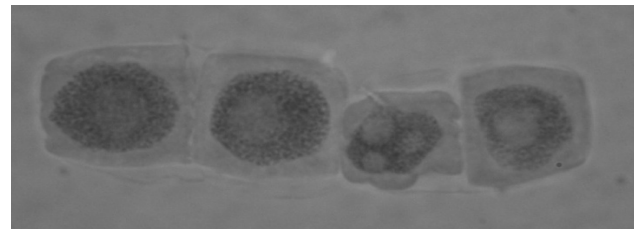
Si bien los cálculos estadísticos demuestran que no se puede afirmar que existen diferencias significativas entre los efectos de las concentraciones intermedias, los hallazgos microscópicos evidencian diferencias importantes. A continuación se exponen algunas fotografías que demuestran la citotoxicidad, evidente en la pérdida de la estructura celular y en la aparición de vacuolas (aparte de la muerte celular), así como la genotoxicidad, observada en la aparición de aberraciones cromosómicas en diferentes etapas de la mitosis y en la aparición de células multinucleadas.

La figura 2 muestra megacélulas como el único hallazgo encontrado en el ámbito microscópico sobre la estructura de las células en la mínima concentración evaluada (1,92 mg/ml).

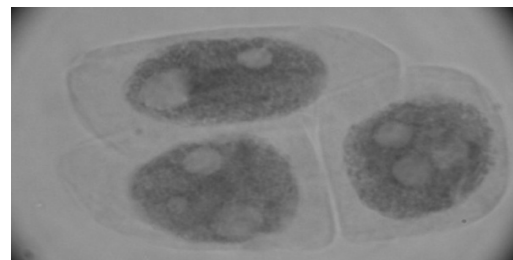


**Figura 2.** Megacélulas encontradas en el tratamiento de 0,192 mg/ml (40X)

En las raíces expuestas a 3,12 mg/ml de la fracción evaluada se observaron, además de megacélulas, como en el caso anterior, muchas células muertas y células que habían perdido su forma natural. Un ejemplo de ello se muestra en la figura 3.



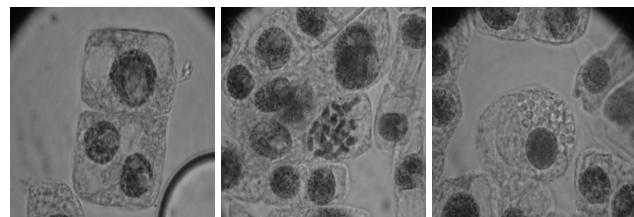
a



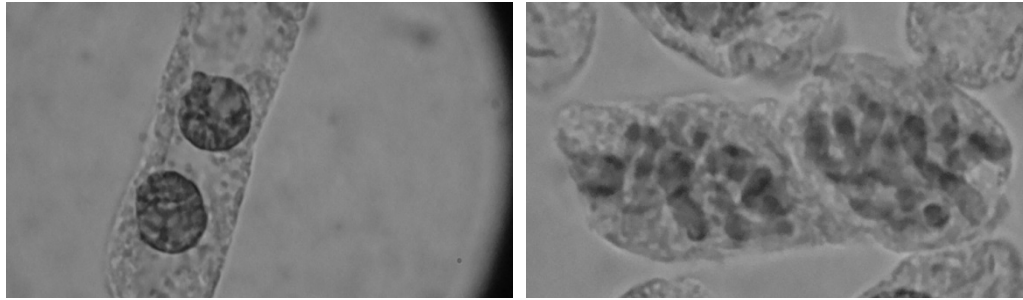
b

**Figura 3.** Formas celulares (a) irregulares y (b) megacélulas observadas en las raíces sometidas una concentración de 3,12 mg/ml (100X)

Las células expuestas a una concentración de 4,91 mg/ml muestran evidencias de citotoxicidad, como la aparición de una gran cantidad de vacuolas, pérdida de la estructura celular, y, además, permiten observar los primeros indicios de daño en las estructuras relacionadas con el material genético, núcleo y cromosomas; es decir, genotoxicidad (figura 4).



**Figura 4.** Evidencias de citotoxicidad y genotoxicidad en células expuestas a 4,91 mg/ml de extracto



**Figura 5.** Efectos genotóxicos de la disolución de 7,132 mg/ml de fracción de palmo rosado

### Índice mitótico

La tabla 2 resume los datos del índice mitótico obtenidos en cada uno de los ensayos.

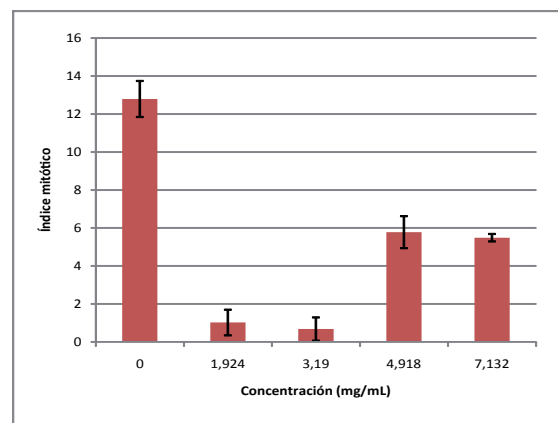
Estos valores fueron calculados con la ecuación 1.

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{Número de células en mitosis}}{\text{Número de células totales}} \quad (1)$$

**Tabla 2. Datos de índice mitótico**

Concentración (mg/ml)	Índice mitótico		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Blanco	11,25	12,61	14,52
1,92	2,3	0	0,77
3,19	0	1,9	0,14
4,92	4,55	7,39	5,4
7,13	5,83	5,15	5,49

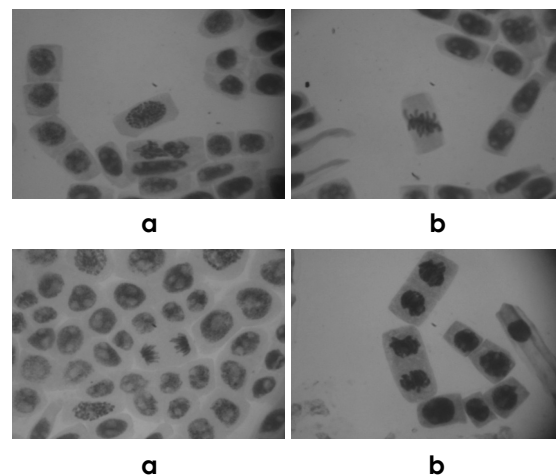
Por su parte, la figura 6 muestra una marcada disminución del índice mitótico de las células expuestas a los tratamientos, en comparación con el de las células control. Sin embargo, cabe resaltar que en las dos concentraciones superiores hay, aparentemente, una disminución menos notoria del índice mitótico que en las dos concentraciones inferiores; esto fue interpretado como una muestra de que una concentración elevada detiene los procesos celulares sin importar la fase en la que se encuentren, lo cual permite observar células en todas las fases del ciclo; por su parte, las concentraciones bajas permiten que continúe el ciclo celular, aparentemente, hasta la interfase, y así se produce un estancamiento en ella, lo cual es evidente en el hecho de que durante los ensayos con la menor concentración la mayoría de las células se encontró en interfase.



**Figura 6.** Efectos de los tratamientos sobre el índice mitótico. Media +/- EM

A continuación se muestra una serie de fotografías, que permite comparar las características de las células no sometidas a tratamiento con las observadas anteriormente (figura 7).

(a) Profase, (b) Metafase, (c) Anafase, (d) Telofase. (40X)



**Figura 7.** Fases mitóticas de células Meristemáticas de *Allium cepa* de la unidad experimental denominada blanco.

## Conclusiones

El extracto de palmo rosado muestra un evidente efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular y el índice mitótico en el modelo de *Allium cepa*.

Las concentraciones de 1,92 mg/ml, 3,19 mg/ml y 4,92 mg/ml de fracción acuosa de palmo rosado generan alteraciones celulares como binucleaciones, trinucleaciones, aberraciones cromosómicas, irregularidad de formas celulares y vacuolizaciones.

La única concentración que permitió la recuperación de crecimiento radicular después de un periodo de 48 horas de exposición fue la de 1,92 mg/ml, mientras que una concentración de 7,13 mg/ml ocasiona la muerte de las raíces completas, incluso desde las seis horas de tratamiento.

La forma y estructura de las raíces se ve afectada por la exposición a los tratamientos, excepto en la menor concentración evaluada. Lo anterior se concluye por la aparición de bulbos en los extremos de las raíces y por la pérdida de rigidez y consistencia de estas.

Debido a los resultados obtenidos, es posible que las personas que consuman extracto de palmo rosado estén expuestas a efectos citotóxicos y genotóxicos; sobre todo, si se tiene en cuenta que los extractos comercializados en las plazas de mercado tienen concentraciones mucho más elevadas que las evaluadas en el presente trabajo.

Este estudio demuestra que el extracto de palmo rosado tiene la propiedad de detener la proliferación celular en el modelo ensayado; ello conduce a que se piense en la necesidad de plantear futuros trabajos investigativos que determinen sus posibles efectos sobre cultivos celulares humanos y líneas celulares tumorales, búsqueda y elucidación estructural de metabolitos secundarios bioactivos causantes del efecto antiproliferativo. Por otra parte, se buscará caracterizar taxonómicamente la especie vegetal utilizada en su preparación.

## Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen al Comité Nacional de Investigaciones (CONADI) de la Universidad Cooperativa de Colombia.

## Referencias bibliográficas

1. Freshney RI. (2000). Culture of animal cell. A manual of basic technique. New York: Jhon Wiley and Sons Inc.
2. Reppeto GRM. (1995). *Métodos alternativos: Estudios toxicológicos in vitro*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
3. Russel PJ. (2002). Chromosomal mutation. In: Cummings B. (Ed.), *Genetics*. San Francisco: Pearson Education Inc.
4. Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455(1-2): 81-95.
5. Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marín-Morales MA. (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol* 88(3): 252-259.
6. Grant WF. (1999). Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutation-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res.* 426(2):107-112.
7. Fiskesjö G. (1988). The *Allium* test-an alternative in environmental studies: the toxicity of metal ions. *Mutat. Res.* 197(2): 243-260.
8. Fiskesjö G. (1993). The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. *Environ. Toxicol. Water Qual* 8(3): 291-298.
9. Fiskesjö G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102(1): 99-112.
10. Rank J, et ál. (2002). Genotoxicity of maleic hydrazide, acedine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. *Hereditas* 36(1): 13-18.