

Evaluación de la genotoxicidad y toxicidad general de extractos acuosos de *Acanthospermum australe* Loefl. Kuntze (Asteraceae) por medio del test de *Allium cepa*

Carlos G. Altamirano

Laboratorio de Farmacobotánica "Dr. Aníbal Amat", Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552 piso 5, Posadas, Misiones, República Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: carlos-altamirano@live.com

Resumen

Actualmente el uso corriente de plantas medicinales para el tratamiento de las diferentes afecciones se ha incrementado y en la mayoría de los casos se comercializan sin previos estudios de toxicidad, lo que pone en riesgo la salud de las personas que la utilizan. En el presente trabajo se propuso analizar la genotoxicidad y toxicidad general de extractos acuosos de *Acanthospermum australe* Loefl. (Asteraceae) por medio del test de *Allium cepa*. Se seleccionaron 5 bulbos por cada concentración a ensayar, y 5 para el control (utilizando agua mineral baja en sodio), en cada ensayo. Los extractos se prepararon por medio de infusiones, y luego se filtraron. En un primer ensayo se determinó la IC₅₀ y se analizaron las anomalías macroscópicas observadas: tumores 10 %, ganchos 13 % y necrosis 35 %. En un segundo ensayo se analizaron las anomalías microscópicas, los índices mitóticos y porcentajes de cada fase de la mitosis, para cada una de las concentraciones estudiadas de 150,0; 75,0 y 37,5 g/L. También aberraciones cromosómicas, principalmente micronúcleos, metafases pegajosas y puentes anafase/telofase, de un total de 2500 células contabilizadas por raíz, de cada concentración analizada. Las concentraciones más elevadas mostraron mayor inhibición de la mitosis (IM=11 % y 14 % respectivamente) con respecto a los controles (IM=20 %). Se fotografiaron los preparados con Moticam10, para el posterior conteo de fases. Si bien no son concentraciones usuales en las que se utiliza *A. australe*, se evidencia actividad genotóxica de los extractos acuosos en correlación con el aumento de la concentración.

Evaluation of genotoxicity and general toxicity of aqueous extracts of *Acanthospermum australe* Loefl. Kuntze (Asteraceae) through the *Allium cepa* test

Summary

Currently the current use of medicinal plants for the treatment of different conditions has increased and in most cases they are marketed without previous toxicity studies, which puts the health of the people who use it at risk. In the present work it was proposed to analyze the genotoxicity and general toxicity of aqueous extracts of *Acanthospermum australe* Loefl. (Asteraceae) by means of the *Allium cepa* test. Five bulbs were selected for each concentration to be tested, and 5 for the control (using mineral water low in sodium), in each test. The extracts were prepared by means of infusions, and then filtered. In a first trial the IC₅₀ was determined and the observed macroscopic anomalies were analyzed: tumors 10 %, hooks 13 % and necrosis 35 %. In a second trial, microscopic anomalies, mitotic index and percentages of each phase of mitosis were analyzed for each of the studied concentrations of 150.0, 75.0 and 37.5 g/L. Also chromosomal aberrations, mainly micro-cores, sticky metaphases and anaphase/telophase bridges, of a total of 2500 cells counted per root, of each concentration analyzed. The highest concentrations showed greater inhibition of mitosis (MI = 11 % and 14 % respectively) with respect to the controls (MI = 20 %). The preparations were photographed with moticam10, for the subsequent phase counting. Although they are not usual concentration in which *A. australe* is used, genotoxic activity of the aqueous extracts is correlated with the increase of the concentration.

Introducción

Acanthospermum australe (Loefl.) Kuntze, es una planta herbácea perteneciente a la familia Asteraceae, tribu Heliantheae, comúnmente conocida en la Argentina y Paraguay como "tapecué", en Brasil como "carrapichinho"

Palabras clave: genotoxicidad - toxicidad general - *Acanthospermum australe* - test de *Allium cepa*.

Key words: genotoxicity - general toxicity - *Acanthospermum australe* - *Allium cepa* test.

principalmente. Crece vigorosamente en suelos agrícolas, en campos y terrenos baldíos, siendo considerada muchas veces una planta dañina (Martins y col., 2006).

Presenta tallos ramosos, decumbentes, pubescentes, hojosos hasta el ápice. Hojas opuestas, rómbico-ovadas, agudas u obtusas en el ápice, dentado- aserradas en el margen, laxamente pubescentes y con pequeñas glándulas en ambas caras, especialmente en la inferior. Flores amarillentas, dimorfas. Aquenios completamente envueltos por las brácteas interiores del involucre, dando lugar a un fruto fusiforme, cubierto totalmente de cerdas ganchedas rígidas (Araújo y col., 2013).

Sus partes aéreas son utilizadas por medio de extractos acuosos en la medicina tradicional de Argentina y países limítrofes para el tratamiento de heridas cutáneas, como tónico, diaforético, eupéptico, vermífugo, antidiarreico, antimálarico, antigonorreico, febrífugo, antianémico, entre otros (Lorenzi y Matos, 2002; Arenas y Azorero, 1977).

A pesar de ser ampliamente utilizada en forma empírica, carece de estudios de toxicidad y genotoxicidad. Por lo que el objetivo principal del presente estudio es evaluar la genotoxicidad y toxicidad general de los extractos acuosos de partes las aéreas de *A. australe*, por medio del test de *Allium cepa*.

La aplicación del test de *A. cepa* en el análisis genotóxico de compuestos químicos y mezclas complejas es ampliamente utilizado desde su implementación (Andrioli y col, 2006). Corresponde un buen modelo biológico para el análisis de aberraciones cromosómicas inducidas luego de la exposición a un agente (Grant, 1982).

Materiales y Métodos

Recolección de *A. australe*

Partes aéreas de *A. australe* fueron recolectadas durante los meses de julio a septiembre de 2017 en Avenida 117 y calle 178 (27° 25' 26'' S 55° 56' 33.8'' O) situado en el barrio Itaembé Mini, zona ubicada al sur de la ciudad de Posadas Misiones, e identificado por medio de técnicas taxonómicas de rutina. El material de herbario (voucher) fue depositado en el Herbario del Departamento de Farmacia (MNESF) en el Laboratorio de Farmacobotánica "Dr. Aníbal Gumersindo Amat", de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones.

Acondicionamiento del material vegetal

Los bulbos de *A. cepa* fueron adquiridos en el comercio local, se seleccionaron unidades de un tamaño homogéneo, de buen aspecto e integridad. El material vegetal fue limpiado, y luego secado a estufa a 45 °C por 48h. Posteriormente se trituro en mortero manual, hasta obtener un tamaño de polvo homogéneo.

Preparación de los extractos de *A. australe*

El método extractivo seleccionado fue la infusión, según Farmacopea Nacional Argentina 6ta Edición, colocando agua mineral baja en sodio hirviendo, en contacto con la cantidad necesaria de droga vegetal previamente molida, por el transcurso de 20 minutos. Posteriormente se filtró y se lavó el residuo hasta completar el volumen necesario para cada experiencia (Farmacopea Nacional Argentina, 1978). El extracto se expresa en gramos de droga vegetal seca (partes aéreas de *A. australe*) por litro de infusión (g/L).

Pretratamiento de bulbos

Los bulbos fueron despojados de sus catáfilas más externas, se raspó el disco inferior con cuidado de no dañar la zona meristemática, y fueron lavados con agua corriente durante 2 horas, para eliminar cualquier residuo que pudieran contener provenientes de la actividad comercial (Fiskesjo, 1993).

Test de *A. cepa*

El test de *A. cepa* fue realizado por duplicado, utilizando para todas las diluciones y los controles agua mineral baja en sodio. Fue dividido en dos ensayos (Etapa 1 y Etapa 2), donde en cada experiencia se seleccionaron 5 bulbos de *A. cepa* por cada concentración a ensayar (ensayando 3 concentraciones diferentes en cada experiencia), y 5 bulbos para el control (considerando un total de 20 bulbos por experiencia) (Mudry y Carballo, 2006).

Tanto para la Etapa 1 y la Etapa 2, los bulbos fueron colocados en agua mineral baja en sodio durante 24 horas, a temperatura ambiente, al resguardo de la luz, hasta que liberasen raicillas y estas alcanzaran una longitud promedio de 1 cm.

Para los ensayos se utilizó un dispositivo diseñado para el experimento (Figura 1) con recipientes de vidrio fijos donde apoyar los bulbos, sumergiendo los discos, provistos de un suministro de aire constante por medio

Figura 1.- Diseño del experimento



de 2 aireadores impulsando el aire que fue distribuido por mangueras hacia cada uno de los recipientes.

Las distintas concentraciones probadas y el agua mineral baja en sodio fueron reemplazadas cada 24 h. Los extractos de *A. australe* se prepararon al momento de ser utilizados por medio de infusiones, utilizando también agua mineral baja en sodio.

Una vez transcurridas las 48 h y emergidas las raicillas, se procedió a realizar la Etapa 1. En esta instancia se probaron concentraciones de 12,5; 25,0; 50,0 y 100,0 g/L, y se fotografiaron las raíces de todos los bulbos para determinar las anomalías macroscópicas (tumores, ganchos y necrosis). Además, se midió la longitud de todas las raíces para construir la curva de toxicidad y determinar la IC_{50} .

En la Etapa 2 se probaron concentraciones de 37,5; 75,0 y 150,0 g/L. Para posteriormente obtener los biomarcadores de genotoxicidad.

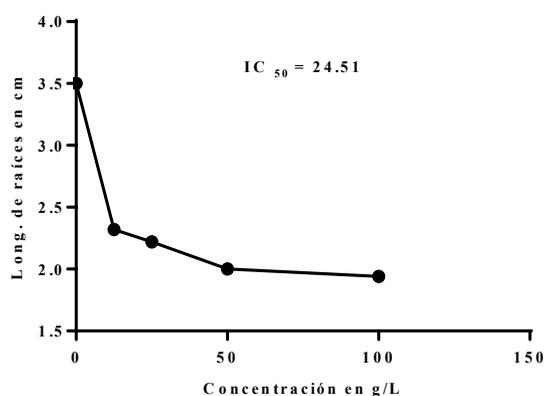
Tanto en la Etapa 1 como en la Etapa 2, los bulbos estuvieron en contacto con los extractos por 48 h (Mudry y Carballo, 2006).

Obtención de biomarcadores de genotoxicidad

Para observar el estado de las mitosis en los meristemas de las raicillas de *A. cepa* expuesta a los extractos, se realizaron preparados histológicos *in situ*. Para ello se cosecharon las raíces, que fueron fijadas en Farmer (Zarlavsky, 2014) por 24 h en heladera a $-3^{\circ}C$ y luego se trasladaron a alcohol 70° donde se mantuvieron hasta el momento de realizar los preparados (Mudry y Carballo, 2006).

Bajo la lupa se seccionó la zona meristemática y se la colocó en un portaobjeto con orceína acética al 2 % que fue llevado directo a la llama. Luego se colocó el cubreobjeto y se ejerció una leve presión sobre el preparado ("squash"). Posteriormente se observó en un microscopio óptico Motiic BA2000 y se tomaron fotografías con cámara Motiic para su posterior análisis (Mudry y Carballo, 2006).

Figura 2.- Cálculo de la IC_{50} de las infusiones de *A. australe*



Longitud promedio de las raíces en función de la concentración

Índices mitóticos

Los índices mitóticos se calcularon como la relación entre las células en división y el total de células. Se contabilizaron un total de 2500 células por cada raicilla, tomando 2 raicillas por cada bulbo de cada uno de los 20 bulbos en total, utilizados para cada experiencia (Mudry y Carballo, 2006).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado por medio de Statgraphic 6.0 (ANOVA y test de Tukey) y los gráficos se realizaron por medio de Graphpad Prism 6.0.

Resultados

IC_{50} de *A. australe*

Se obtuvo un promedio de 3,50 cm para las raíces control, 1,94 cm para 100 g/L, 2,00 cm para 50 g/L, 2,22 cm para 25 g/L y 2,32 cm para 12,5 g/L. Con los datos obtenidos se realizó un gráfico de longitud de las raíces en función de la concentración (Figura 2). Gráficamente se obtiene el valor de $IC_{50} = 24,51$ g/L con un $R^2 = 0,9672$. Por lo que se procederá a realizar el análisis de la genotoxicidad a dosis superiores a 24,51 g/L.

Toxicidad general de las infusiones de *A. australe*

Los datos de toxicidad general fueron obtenidos también durante la Etapa 1 y se observan en la figura 3. Fueron fotografiadas todas las raicillas, de todos los bulbos de todas las concentraciones probadas, contabilizando tumores 10 %, ganchos 13 % y necrosis 35 %.

Figura 3.- Anomalías macroscópicas relevadas



A y C: detalle de ganchos. **B y D:** tumores y necrosis.

Tabla 1.- Porcentajes de cada fase de la mitosis, en función de las concentraciones probadas de *A. australe*

Concentraciones [g/L]	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Citocinesis
150,0	89 %	7 %	1,5 %	1,0 %	1,0 %	0,5 %
75,0	86 %	10 %	1,0 %	1,5 %	1,0 %	0,5 %
37,5	84 %	12 %	2,0 %	1,0 %	0,5 %	0,5 %

Tabla 2.- Resumen de los resultados obtenidos para las infusiones de *A. australe*

Concentración [g/L]	% Anomalías Microscópicas	Índices Mitóticos	Tiempo de exposición [horas]	Células contabilizadas
0	0 %	20	48	2500
150,0	0,95 %	11	48	2500
75,0	0,68 %	14	48	2500
37,5	0,33 %	16	48	2500

Tabla 3.- ANOVA para las aberraciones por concentraciones

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Razón F	Valor de P
Entre grupos	6299,2	3	2099,73	271,81	0,0000
Intra grupos	123,6	16	7,73		
Total	6422,8	19			

Genotoxicidad de *A. australe*

En la Etapa 2 se analizaron los porcentajes de cada fase de la mitosis para cada una de las concentraciones estudiadas de 150,0; 75,0 y 37,5 g/L (Tabla 1), los índices mitóticos (Tabla 2) y finalmente los biomarcadores de genotoxicidad (anomalías microscópicas).

Índices mitóticos

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{Total de células en división}}{\text{Total de células contadas}} \times 100$$

Las concentraciones más elevadas mostraron mayor inhibición de la mitosis (IM igual a 11 % y 14 %, respectivamente) con respecto a los controles (IM= 20 %) (Tabla 2).

Biomarcadores de genotoxicidad

Se contabilizaron un total de 2500 células por raíz y por cada bulbo a cada concentración analizada. Las aberraciones cromosómicas se corresponden a un 1 % del total de células contabilizadas. Fueron encontrados micro

núcleos, metafases pegajosas y puentes anafase/telofase principalmente. Con los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software Statgraphics 6.0 (Tabla 3).

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Aberraciones entre un nivel de concentraciones y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Aberraciones por concentraciones

En la tabla 4, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. Las diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de concentración se muestran con las diferencias en las X's.

La tabla 5 se muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0 % al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla 4.- Test de Tukey HSD

Concentraciones [g/L]	Casos	Media	Grupos homogéneos
0	5	0,6	X
150,0	5	9,8	X
75,0	5	16,2	X
37,5	5	47,8	X

Tabla 5.- Diferencias estimadas entre las media

Contraste	Significativa	Diferencia	± Límites
0 - 37,5	*	- 9,2	5,03152
0 - 75,0	*	- 5,6	5,03152
0 - 150,0	*	- 47,2	5,03152
37,5 - 75,0	*	- 6,4	5,03152
37,5 - 150,0	*	- 38,0	5,03152
75,0 - 150,0	*	- 31,6	5,03152

* indica una diferencia significativa.

Finalmente, en el figura 4, se observan las medias y desvío estándar de las aberraciones cromosómicas obtenidas durante la Etapa 2, en función de las concentraciones de infusión de *A. australe*. En la figura 5, se observan los controles y en figura 6 las anomalías microscópicas relevadas.

Discusión

Las anomalías macroscópicas observadas en la Etapa 1, tumores en un 10 %, ganchos en un 13 % y necrosis un 35 % (considerando el total de las raíces analizadas), además de la variación de las longitudes de las raíces observadas, indican efectos de toxicidad a nivel general.

También se observa como varía el índice mitótico en función del aumento de la concentración del extracto de *A. australe*, así como también los porcentajes de cada fase de la mitosis.

La inducción de alteraciones del huso mitótico en la célula de *Allium cepa* por estos agentes genotóxicos puede conducir a aneuploidía o formación de micronúcleos en la siguiente etapa de la división celular. En general, esto ocurre cuando se produce una separación irregular de los cromosomas en la anafase, por lo tanto, algunos cromosomas llegan a los polos antes que los otros. Alrededor del o de los cromosomas rezagados se pueden formar una membrana nuclear generando los micronúcleos (Akinboro y Bakare, 2007), siendo las principales anomalías microscópicas observadas en el presente estudio.

A. australe ha sido fruto de numerosas investigaciones fitoquímicas donde se ha logrado el aislamiento de germacránolidos, melampólidos (Sánchez y col., 2009; Bohlmann y col., 1979), lactonas diterpénicas y 6-metoxiflavonoides (Bohlmann y col., 1981 y 1984; Matsunaga y col., 1996).

De las partes aéreas fue aislado el acanthostral, una lactona sesquiterpénica con actividad antitumoral (Matsunaga y col., 1996), además los extractos y las fracciones obtenidas poseen actividad antiviral *in vitro* (Rocha Martins y col., 2011). Probablemente los metabolitos secundarios asociados a esta especie, estén relacionados también con los efectos genotóxicos observados en el presente trabajo.

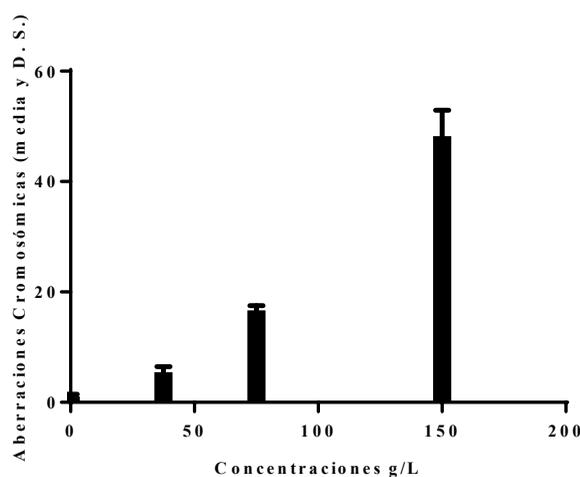
Los datos presentados en las tablas 4 y 5 muestran que hubo diferencias estadísticamente significativas de las aberraciones cromosómicas en todas las concentraciones probadas en comparación con los controles, con un 95 % de confianza, lo que podría servir de base para futuras investigaciones en la especie.

Conclusión

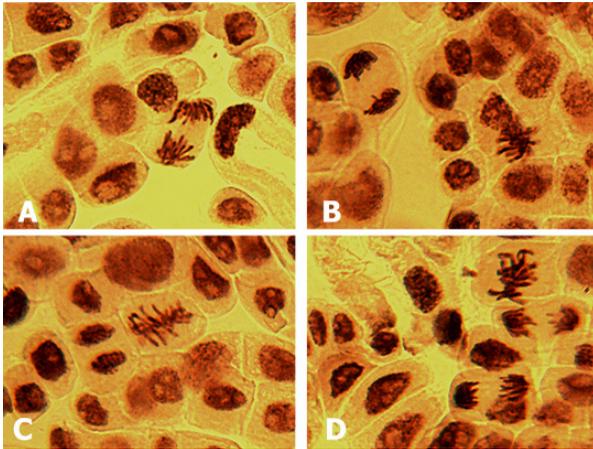
De los resultados obtenidos en Etapa 1, podemos considerar que las concentraciones utilizadas en el experimento (100,0; 50,0; 25,0 y 12,5 g/L) presentan toxicidad a nivel general, manifestadas por medio de las anomalías macroscópicas relevadas (tumores, ganchos y necrosis), determinándose una $IC_{50} = 24,51$ g/L.

Del segundo experimento (Etapa 2) podemos observar una variación porcentual de las diferentes fases de la mitosis, permaneciendo las células principalmente en interfase.

El índice mitótico fue disminuyendo a medida que aumentó la concentración, demostrando que la mitosis se ve afectada de alguna manera por la presencia del extracto de *A. australe*.

Figura 4.- Aberraciones cromosómicas producidas por las infusiones de *A. australe*

Medias y desvío estándar de aberraciones cromosómicas

Figura 5.- Resultados de Controles**A:** Anafase; **B:** Telofase y Metafase; **C y D:** Metafase y Telofase.

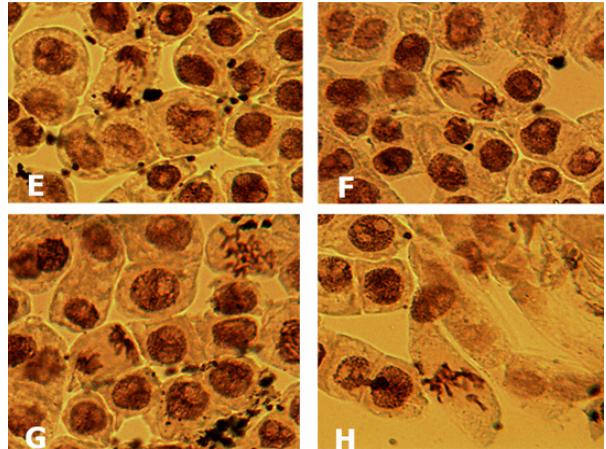
Podríamos concluir finalmente en base a los resultados obtenidos que las infusiones de *A. australe* presentan efectos genotóxicos. Las aberraciones cromosómicas encontradas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) conformando grupos homogéneos en todas las concentraciones de 37,5; 75,0 y 150,0 g/L (prueba de Tukey).

Cabe destacar que las concentraciones de infusiones de *A. australe* utilizadas en el presente estudio no son dosis usuales en las que se utiliza *A. australe* en la medicina tradicional.

Serían necesarias futuras investigaciones en diferentes modelos biológicos incluso modelos in vivo, en diferentes concentraciones a los fines de establecer los límites de seguridad de *A. australe*, incluso probando otras formas de extracción también utilizadas en la medicina tradicional, como decocciones o emplastos.

Referencias bibliográficas

- Akinboro, A.; Bakare, A.A. (2007). "Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn". *Journal of Ethnopharmacology* 112 (3): 470-475.
- Andrioli, N.B.; Wulff, A.F.; Mudry, M.D. (2006). "*Allium cepa* como monitor de toxicidad y genotoxicidad de metronidazol". *Theoria* 15 (2): 9-16.
- Araújo, E.D.L.; Xavier, H.S.; Ferreira, C.P.; Pimentel, R.D.M. (2013). "Macro and microscopical identification of two *Acanthospermum* medicinal plants". *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (35): 2606-2615.
- Arenas, P.; Azorero, R. (1977). "Plants of common use in Paraguayan folk medicine for regulating fertility". *Economic Botany* 31 (3): 298-300.
- Bohlmann, F.; Jakupovic, J.; Dhar, A.K.; King, R.M.; Robinson, H. (1981). "Two sesquiterpene and three diterpene lactones from *Acanthospermum australe*". *Phytochemistry* 20 (5): 1081-1083.

Figura 6.- Resultados de genotoxicidad**E y F:** Detalle de Anafase puente. **G y H:** Metafase anómala con cromosomas rezagados y desordenados.

- Bohlmann, F.; Jakupovic, J.; Zdero, C.; King, R.M.; Robinson, H. (1979). "Neue melampolide und cis, cis-germacranolide aus vertretern der subtribus Melampodiinae". *Phytochemistry* 18 (4): 625-630.
- Bohlmann, F., Schmeda-Hirschmann, G.; Jakupovic, J. (1984). "Neue melampolide aus *Acanthospermum australe*". *Planta medica* 50 (01): 37-39.
- Farmacopea Nacional Argentina (1978). Buenos Aires. (6° ed.)
- Fiskesjo, G (1993). The *Allium* test in wastewater monitorin. *Environmental Toxicology and Water Quality* 8 (3): 291-298.
- Grant, W.F. (1982). "Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the US Environmental Protection Agency gene-tox program". *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 99 (3): 273-291.
- Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. (2002). *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa Plantarum, Nova Odessa.
- Martins, L.R.R.; Mourão, K.S.M.; Albiero, A.L.M.; Cortez, D.A.G.; Dias-Filho, B. P.; Nakamura, C.V. (2006). "Estudo morfoanatómico preliminar do caule e da folha de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze (Asteraceae-Heliantheae)". *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 42-52.
- Matsunaga, K.; Saitoh, M.; Ohizumi, Y. (1996). "Acanthostrale, a novel antineoplastic cis, cis, cis-germacranolide from *Acanthospermum australe*". *Tetrahedron letters* 37 (9): 1455-1456.
- Mudry, M.D.; Carballo, M.A. (2006). *Genética Toxicológica*. De los Cuatro Vientos Editorial. Buenos Aires.
- Rocha Martins, L.R.; Brenzan, M.A.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, T.U.; Ranieri Cortez, L.E.; Garcia Cortez, D.A. (2011). "In vitro antiviral activity from *Acanthospermum australe* on herpesvirus and poliovirus". *Pharmaceutical biology* 49 (1): 26-31.
- Sánchez, M.; Kramer, F.; Bargardi, S.; Palermo, J.A. (2009). "Melampolides from Argentinean *Acanthospermum australe*". *Phytochemistry Letters* 2 (3): 93-95.
- Zarlavsky, G.E. (2014). *Histología Vegetal: Técnicas simples y complejas*. Sociedad Argentina de Botánica. Buenos Aires.