

Efecto genotóxico in vitro en Melaleuca leucadendron L.

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS "JUAN GUITERAS GENER" .MATANZAS.

Revista Médica Electrónica 2008;30(2)

Efecto genotóxico "in vitro" en Melaleuca leucadendron L .

In vitro" genotoxic effect in Melaleuca leucadendron L .

AUTORES

[MsC. Enma Guevara Pérez \(1\)](#)

Ing. Lázara González Landorán (2)

Tec. Raisa González Giralde (3)

Dra. Tamara Cabrera Dorta (4)

Dr. Rolando Medina Domínguez (5)

1. MsC. en Microbiología Clínica. Profesora Asistente. Facultad de Ciencias Médicas "Juan Guiteras Gener". Matanzas.

2. Ingeniera Industrial. Profesora Asistente. Facultad de Ciencias Médicas "Juan Guiteras Gener". Matanzas.

3. Téc. en Microbiología. 3er año en Tecnología de la Salud. Facultad de Ciencias Médicas "Juan Guiteras Gener". Matanzas.

4. Especialista de I Grado en Fisiología. Profesora Asistente. Facultad de Ciencias Médicas "Juan Guiteras Gener". Matanzas.

5. Especialista de I Grado en Pediatría. Profesor Asistente. Hospital Provincial Docente Pediátrico "Eliseo Noel Caamaño". Matanzas.

RESUMEN

Después de demostrar un potente efecto antibacteriano y antifúngico en las hojas de Melaleuca leucadendron L . y teniendo en cuenta otros efectos señalados como antihelmíntico, parasiticida en enfermedades de la piel e incluso insecticida, nos propusimos ampliar los estudios biológicos de esta planta en relación con posibles efectos perjudiciales. Se evaluó el extracto fluido obtenido de las hojas en un sistema de ensayo a corto plazo "in vitro" utilizando Aspergillus nidulans cepa UH-223 para conocer la potencialidad del extracto como reductor del crecimiento de las colonias e inductor de daño genético en este microorganismo. Los estudios se realizaron por el método de incorporación en placa y como resultado se obtuvo una disminución considerable del tamaño de las colonias del microorganismo a causa del efecto tóxico del extracto y a su vez aumentó el índice de segregación mitótica como expresión de genotoxicidad para el microorganismo de ensayo, se obtuvieron valores incluso superiores al control positivo utilizado. Recomendamos continuar profundizando los estudios empleando otros ensayos que amplíen la evaluación del potencial genotóxico del Cayeput como comúnmente se conoce esta planta frecuentemente usada por la población.

DeCS:

MELALEUCA/toxicidad

PLANTAS MEDICINALES/toxicidad

INTRODUCCIÓN

Los denominados compuestos genotóxicos producen efectos que pueden manifestarse en el propio individuo ocasionando transformaciones malignas o manifestarse en su descendencia y originar enfermedades genéticas. Tales razones justifican que las investigaciones de genotoxicidad sean tan necesarias y en este sentido se amplían los conocimientos de *Melaleuca leucadendron* L. respecto a los posibles efectos perjudiciales.

Esta planta pertenece a la Familia Myrtaceae y se conoce comúnmente como Cayepu o simplemente Melaleuca. Según Roig las partes empleadas son las hojas, ramas y el aceite esencial (1) y el uso como antiséptico para combatir enfermedades respiratorias se orienta a la población en la Guía Terapéutica de Fitofármacos y Apifármacos y en las Normas de Especialidades Médicas para la aplicación de éstos (2,3). Aparecen estudios de toxicidad aguda dérmica realizado a esta planta, donde una dosis de 2000mg/kg. no produjo toxicidad observable en los animales de experimentación. (4)

Como parte del estudio farmacológico y toxicológico de esta planta, en este trabajo se determina el posible efecto genotóxico que pueda causar la misma a la población. Se emplea un sistema de ensayo a corto plazo "in vitro" utilizando *Aspergillus nidulans* como organismo para detectar daño genético. Este ascomiceto es utilizado en diferentes laboratorios del mundo para la detección de tal actividad; ya que presenta numerosas ventajas experimentales sobre otros microorganismos eucariontes. (5,6)

MÉTODO

Compuestos utilizados: Se estudiaron dos extractos fluidos de hojas de *Melaleuca leucadendron* L., el A con un 21,6 % de sólidos totales y el B con 6,2 % de sólidos totales, ambos preparados en el Instituto de Farmacia y Alimentos de Ciudad de La Habana, mediante un proceso de reperlación utilizando como disolvente alcohol al 80 %. Las muestras son procedentes del herbario 0023 de Topes de Collantes y después de procesadas se conservaron en frasco ámbar y a temperatura ambiente. Microorganismo de ensayo: *Aspergillus nidulans* cepa diploide UH-223 (D-30). Esta cepa es un diploide heterocigótico para marcadores del color de los conidios, lo que permite detectar visualmente la ocurrencia de segregantes mitóticos, de coloración diferente a la cepa diploide parental y que son originados por crossing-over mitótico o no disyunción cromosómica. (7,8)

Medio de cultivo: Se utilizó medio completo según Scott y Kafer. (8)

Concentraciones probadas y controles:

Extracto A: rangos entre 2,16 y 0,0108 mg de sólidos totales por mL de medio de cultivo.

Extracto B: rangos entre 1,24 y 0,0062 mg de sólidos totales por mL de medio de cultivo.

Control positivo: Hidrato de Cloral 0,6mM que posee un efecto altamente tóxico. (7)

Control negativo: Alcohol al 80 % en una concentración igual a la máxima concentración del extracto en el medio de cultivo para controlar los valores de

inducción de sectores segregantes en las colonias diploides causadas por el disolvente.

Metodología utilizada para determinar la actividad tóxica y genotóxica:

Las pruebas de toxicidad y genotoxicidad del extracto se realizaron por medio del método de incorporación en placa que consiste en probar el compuesto en estudio incluido en el medio de cultivo, y después de solidificado se procede a sembrar las colonias del microorganismo de ensayo en punto y a profundidad. (7,8) Para conocer de modo cuantitativo la toxicidad del compuesto se sembró a razón de una colonia por placa y se incubó por tres días a 37 ° C procediendo a medir el diámetro de las colonias. (9)

Para este tipo de estudio, el criterio de toxicidad para la cepa UH-223 de *Aspergillus nidulans* se considera como el porcentaje de la reducción significativa del diámetro de las colonias inoculadas en las placas con los tratamientos comparados con el control del disolvente (10). Se considera que cuando hay una reducción del diámetro de las colonias entre 1-15 %, la toxicidad es baja; 16-30 % la toxicidad es media y más de 30 % de reducción la toxicidad es alta. (5)

Para determinar genotoxicidad se sembró a razón de cinco colonias por placa, incubadas a 37 ° C por siete días, procediendo entonces a registrar los sectores de color indicadores de ocurrencia de eventos genéticos diversos (11). Para el cálculo del Índice de Segregación Mitótica Inducida (ISMI) se siguieron los criterios de Kappas y representa el número de sectores de color originados por dichos eventos genéticos en cada colonia tratada, dividido entre el número de sectores de color originado en el mismo número de colonias del control (disolvente). Se considera que un incremento de más de dos veces en el valor del índice es indicativo de actividad genotóxica. (5,6)

Análisis estadístico: Para el experimento de genotoxicidad los datos primarios se procesaron introduciendo la transformación de $x + 0,5$, donde x es el número de sectores coloreados observados en la colonia. A continuación con los valores de las variables ya corregidos se realizó un análisis de varianza simple de la frecuencia de los sectores por colonias obtenidas para las diferentes concentraciones ensayadas del extracto vegetal y los controles empleados. La significación de las diferencias encontradas respecto al control negativo se evaluó a través del Test de Dunnet de dos colas mediante un programa estadístico confeccionado al respecto. (12)

RESULTADOS

Como criterio de *toxicidad* para *Aspergillus nidulans* se tuvo en cuenta el valor del tamaño de las colonias. En las Tablas de toxicidad 1 y 2 se aprecia que a medida que aumenta la concentración de los extractos en el medio de cultivo, disminuye el diámetro de las colonias como consecuencia del efecto de los mismos sobre el microorganismo de ensayo. En el extracto A (Tabla No.1) los valores del Índice de Toxicidad (IT) para las concentraciones 2,16mg/mL y 1,08mg/mL, son indicadores de una toxicidad alta y concentraciones iguales o menores que 0,108mg/mL (Tabla No.2) no producen efecto tóxico para *Aspergillus nidulans*. Con respecto al extracto B muestran alta toxicidad concentraciones iguales o mayores que 0,62mg/mL y no se detectaron efectos tóxicos para *Aspergillus nidulans* en concentraciones menores o iguales a 0,062mg/mL. Se destaca que el efecto de ambos extractos en las dos concentraciones mayores probadas es similar al del control positivo empleado, lo que demuestra el daño causado al microorganismo de ensayo con respecto al diámetro normal de la colonia en presencia de los extractos evaluados y por tanto del efecto perjudicial en los mismos para la célula en cuestión.

Los datos de los ensayos de *genotoxicidad* se muestran en las Tablas No.3 y No.4 referidos al conteo de sectores segregantes de color originados en las colonias verdes creciendo en presencia de las diferentes concentraciones del extracto. Se observa que con el aumento de las concentraciones de ambos extractos se incrementa el número de sectores de color por colonia lo que demuestra ocurrencia de segregación mitótica como expresión de genotoxicidad. En concentraciones iguales o mayores que 1,08mg/mL del extracto A (Tabla No.3) se alcanzan valores del ISMI más de dos veces mayor que el valor del índice, muestra de actividad genotóxica según criterio de Kappas que se corrobora además según los resultados de los análisis estadísticos que expresan diferencias significativas entre las dos concentraciones mayores y el control negativo. El efecto genotóxico del extracto B para *Aspergillus nidulans* (Tabla No.4) es proporcional al aumento de la concentración, resultando dañino para el material genético de este microorganismo en concentraciones iguales o mayores de 0,62mg/mL donde, además, se señala significación estadística con respecto al control negativo. Concentraciones menores o iguales que 0,31mg/mL no muestran efectos que afecten la morfología de la cepa en cuestión. Es importante destacar el alto ISMI por las dos concentraciones mayores de los extractos estudiados capaz de superar los valores del Hidrato de Cloral utilizado como control positivo, lo que demuestra el potente efecto genotóxico encontrado en esta planta para el microorganismo de ensayo.

Tabla No. 1
Toxicidad del extracto fluido A de hojas de *Melaleuca leucadendron L* en *Aspergillus nidulans* cepa UH-223 .

Concentración mg de sol.tot/mL de MC	No. de colonias	Diámetro (mm) (a)	Ind. de Tox. (b) %	Toxicidad
Control +	35	16,2	55,49	Alta
2,16 mg/mL de MC	35	17,9	50,82	Alta
1,08 mg/mL de MC	35	18,3	49,72	Alta
0,108 mg/mL de MC	35	38,1	-	No Tox.
0,0108 mg/mL de MC	35	42,2	-	No Tox.
Control -	35	36,4	-	No Tox.
Control espontáneo	15	43,5	-	No Tox.

Tabla No. 2
Toxicidad del extracto fluido B de hojas de *Melaleuca leucadendron L* . en *Aspergillus nidulans* cepa UH-223.

Concentración mg de sol.tot/mL de MC	No. de colonias	Diámetro (mm) (a)	Ind. de Tox. (b) %	Toxicidad
Control +	30	11,1	69,9	Alta
1,24 mg/mL de MC	30	13,6	63,2	Alta
0,93 mg/mL de MC	30	14,5	60,8	Alta
0,62 mg/mL de MC	30	21,5	41,9	Alta
0,31 mg/mL de MC	30	27,0	27,0	Media
0,062 mg/mL de MC	30	39,2	-	No Tox.
0,031 mg/mL de MC	30	38,3	-	No Tox.

0,0062 mg/mL de MC	30	39,8	-	No Tox.
Control –	30	37,0	-	No Tox.
Control espontáneo	17	44,62	-	No Tox.

Legenda para las Tablas 1 y 2:

Control + Hidrato de Cloral

Control - Alcohol al 80 %

(a) Promedio del diámetro de las colonias a 37 ° C durante 72 horas

(b) IT (reducción del diámetro de las colonias con respecto al Control -

Extracto A: 21,6 % de sólidos totales. Extracto B: 6,2 % de sólidos totales.

Tabla No. 3

Genotoxicidad del extracto fluido A de hojas de Melaleuca leucadendron L . Índice de segregación mitótica en Aspergillus nidulans . cepa UH-223.

Concentración	Colonias	Sectores	FSC	ISMI
mg de sol.tot/ml de MC	analizadas	segregantes (a)	(b)	(c)
Control + (H.Cloral 0,6 mM)	35	70	2	12,50
2,16 mg/mL de MC	40	101	2,52	15,75 *
1,08 mg/mL de MC	40	35	0,87	5,43 *
0,108 mg/mL de MC	30	6	0,2	1,25
0,0108 mg/mL de MC	35	6	0,17	1,06
Control – (alcohol al 80%)	50	8	0,16	1,00

Tabla No.4

Genotoxicidad del extracto fluido B de hojas de Melaleuca leucadendron L . Índice de segregación mitótica en Aspergillus nidulans cepa UH-223.

Concentración	Colonias	Sectores	FSC	ISMI
mg de sol.tot/ml de MC	analizadas	segregantes (a)	(b)	(c)
Control +	108	221	2,09	6,83
1,24 mg/mL de MC	62	106	1,57	9,03 *
0,93 mg/mL de MC	13	17	1,30	6,50 *
0,62 mg/mL de MC	185	225	1,33	2,97 *
0,31 mg/mL de MC	148	67	0,45	1,05
0,062 mg/mL de MC	160	48	0,30	1,39
0,031 mg/mL de MC	30	17	0,56	0,93
0,0062 mg/mL de MC	77	28	0,35	0,86
Control– (alcohol al 80%)	153	95	0,78	1,00
Control espontáneo	72	25	0,35	-

Leyenda para las Tablas 3 y 4:

- (a) Número de sectores segregantes en las colonias (37 ° C durante 6 días)
- (b) FSC - Frecuencia de sectores por colonia
- (c) Índice de segregación mitótica inducida (proporción del incremento de la FSC con respecto a la del Control)
- * Diferencias significativas con respecto al Control - $p > 0,05$

Extracto A: 21,6 % de sólidos totales. Extracto B: 6,2 % de sólidos totales

DISCUSIÓN

En la bibliografía revisada no se informan estudios genotóxicos realizados en *Melaleuca leucadendron* L . y entre las reacciones indeseables se citan vómitos, provocados por la ingestión de cápsulas elaboradas a partir del Cayeput. Éstas son reacciones que la propia población puede observarlas con el uso frecuente de esta planta, pero efectos perjudiciales de aparición más tardía como los que pueden derivarse de los resultados aquí obtenidos podrían pasar inadvertidos para quienes la usen. En este sentido promover el uso de la Medicina Tradicional y Natural (MTN) implica también la evaluación de sus procederes mediante métodos adecuados que garanticen los principios de seguridad, efectividad y calidad (13). Los efectos referidos de esta planta como parasiticida, antihelmíntico, antimicótico e insecticida (1) apuntan a los efectos genotóxicos encontrados en este estudio. En consideración a los daños demostrados en *Melaleuca leucadendron* L . para *Aspergillus nidulans* y el frecuente uso de esta planta por sus múltiples propósitos medicinales, recomendamos continuar profundizando los estudios, pues el riesgo perjudicial al material hereditario demostrado en este trabajo puede traer a la célula expuesta o a su descendencia consecuencias que no compensarían a juicio nuestro los beneficios señalados, salvo se prueben compuestos que reparen el daño ocasionado. Por la variedad de daños que pueden inducir los compuestos genotóxicos y conociéndose que con un sólo sistema de ensayo no es posible evaluar el discutido potencial, (14) se sugieren realizar otros estudios utilizando un conjunto de sistemas de ensayos que permitan un conocimiento más aproximado de su potencial genotóxico. Sólo después de la evaluación riesgo-beneficio pudieran explotarse de forma razonable las propiedades farmacológicas de esta planta .

SUMMARY

After demonstrating a potent antifungal and antibacterial effect in *Melaleuca leucadendron* L. leaves, and having into account other described effects as antihelminthic, parasiticide in skin diseases and even insecticide, we wanted to widen the biologic studies of this plant to find its possible prejudicial effects. We evaluated the fluid extract of these leaves in a short-time "in vitro" assay, using *Aspergillus nidulans* strain UH-223 to know the extract potential as grow reductor of the colonies and inductor of genetic damages in this microorganism. The studies were carried out using the method of adding in plates; as a result we obtained a considerable reduction of the microorganism colonies dimension, caused by the toxic effect of the extract, and also a raise of the mitotic segregation index, as a expression of genotoxicity for the assayed microorganism; we obtained even higher values than in the positive control used. We recommend continuing this study, using other assays that may improve the evaluation of the genotoxic potential of Cayeput, as it is commonly known this plant, frequently used by people.

MeSH:

MELALEUCA/toxicity

PLANTS, MEDICINAL/toxicity

PLANT EXTRACTS/toxicity

PLANT EXTRACTS/therapeutic use

CAJUPUTUM/therapeutic use

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roig J T. Plantas medicinales aromáticas y venenosas de Cuba. La Habana: Ciencia y Técnica; 1988.
2. Ministerio de Salud Pública. Guía terapéutica dispensarial de fitofármacos y apifármacos. La Habana: MINSAP ; 1992.
3. Ministerio de Salud Pública. Normas de salud para la aplicación de Fitofármacos y Apifármacos. La Habana : MINSAP; 1993.
4. González M, García G, Piloto A, Oropeza D. Estudio toxicológico preclínico de Melaleuca leucodendron Lin . Correo Científico Médico de Holguín. 2000 ; 4(1)
5. Kappas A. Genotoxic activity of plant growth regulation hormones in Aspergillus nidulans. Carcinogenesis. 1983; 4: 1409.
6. Ramos A, De la Torre RA, Alonso N, Villaescusa A, Betancourt J, Vizoso A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in Aspergillus nidulans. J Ethnopharmacology. 1996; 52: 123-27.
7. Kafer E, Scott B R, Kappas A. Ssystems and results of test for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in Aspergillus nidulans . Mutation Research. 1986; 167: 9-64
8. Scott BR, Kafer E. Aspergillus nidulans an organism for detecting a range of genetic damage. In: Serres F, J Hollaender A . Chemical Mutagens. Principles and Methods for their detection. New York: Plenum; 1982.p. 447-9
9. Tsoneva M, Kappas A, Georgieva W, Veashkova R, Tziolas V. On the genotoxicity of the pesticides endodan and kilocar in 6 different test systems. Mutation Research. 1985; 175: 13
10. De la Torre RA, de la Rúa R, Hernández G, Espinosa J. Cortinas de Nava C. Genotoxic effects of niclosamide in Aspergillus nidulans. Mutation Research. 1989; 222: 337-41.
11. Gualandi G, Morpurgo G. Methods for detecting the induction of mitotic chromosomal mis-distribution in Aspergillus nidulans. En: Handbook of Mutagenicity test procedures. Netherlands : Board; 1984.
12. Sigarrosa A. Biometría y Diseño Experimental. La Habana: Pueblo y Educación ; 1985. p. 441-62.
13. Quiñones I. Dirección de Ciencia y Tecnología. Rev Cubana Plan Med. 2002; 7(3): 127-8.
14. Sánchez A, Fonseca G, Capiro N, Fernández D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. Rev Cubana Farm. 2000; 34(1): 34-43

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Guevara E, González L, González R, Cabrera T, Medina R. Efecto fenotóxico "in vitro" en Melaleuca leucadentron L. Rev méd electrón[Seriada en línea] 2008; 30(2). Disponible en

[URL: http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202008/vol2%202008/tema 05.htm](http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202008/vol2%202008/tema%2005.htm)[consulta: fecha de acceso]