

Toxicidad del extracto acuoso de *Sida cordifolia* L. mediante el ensayo de micronúcleo en ratones

Caballero, H.¹; Paredes, K.¹; Torres, E.²; Segovia, E.^{1*}

¹Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Laboratorio de Biotecnología

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental

E-mail del autor: edith.segovia@cemit.una.py; edaluz@gmail.com

Toxicidad del extracto acuoso de *Sida cordifolia* L. mediante el ensayo de micronúcleo en ratones. Las plantas medicinales son de amplio uso en el Paraguay, la mayoría de las especies carecen de información científica sobre su uso, es por ello necesario estudiar sus efectos sobre la fisiología general, a fin de determinar sus posibles efectos secundarios. La planta *Sida cordifolia* (Malva blanca), hierba perenne de la familia Malvaceae, se utiliza popularmente para tratar la gripe, infecciones urinarias, inflamaciones del ovario, como emoliente, contra el enfriamiento y también se describe una actividad antiinflamatoria. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del extracto acuoso de la Malva blanca en eritrocitos de médula ósea de *Mus musculus*. Se realizó el recuento de 2.000 eritrocitos por animal para la evaluación de genotoxicidad y 500 eritrocitos por animal para la evaluación de citotoxicidad. En la evaluación de genotoxicidad del extracto acuoso de *Sida cordifolia* en eritrocitos de médula ósea de *Mus musculus* (ratones), a las concentraciones 0,01% y 0,02% no se observaron resultados significativos, en cuanto a la concentración del 0,04% se registró un nivel de significancia en comparación al control negativo. En la evaluación de citotoxicidad, se observó que todas las concentraciones utilizadas no registraron resultados significativos. El extracto acuoso de *S. cordifolia* resultó genotóxica en la concentración de 0,04% pero no fue citotóxica en todas las concentraciones evaluadas.

Palabras clave: plantas medicinales, genotoxicidad, citotoxicidad

Oxicity of the aqueous extract of *Sida cordifolia* L. by the micronucleus test in mice. Medicinal plants are widely used in Paraguay, however most species lack scientific information on their use. It is therefore necessary to study their effects on general physiology in order to determine their possible side effects. *Sida cordifolia* (flannel weed), a perennial herb of the Malvaceae family, is popularly used to treat influenza, urinary infections, ovarian inflammation, as an emollient, against cooling, and anti-inflammatory activity is also described. The objective of this work was to determine the effects of the flannel weed aqueous extract on erythrocytes of the bone marrow of *Mus musculus*. For the genotoxicity evaluation, 2.000 erythrocytes per animal were counted; while 500 erythrocytes per animal were counted for the cytotoxicity evaluation. In the genotoxicity evaluation, at concentrations 0.01% and 0.02%, no significant results were observed; regarding the concentration of 0.04 % a level of significance was recorded compared to the negative control. In the cytotoxicity evaluation, it was observed that all the concentrations used did not register significant results. the aqueous extract of *S. cordifolia* was genotoxic at a concentration of 0.04%, but it was not cytotoxic at any of the concentrations evaluated.

Key words: medicinal plants, genotoxicity, cytotoxicity

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales en la salud es muy popular en muchas partes del mundo y este conocimiento es transmitido de generación a generación (Muñoz, 2001). En el Paraguay esta tradición es frecuente y el uso de plantas medicinales se ha ido incrementando como resultado de la unión de varias culturas (Soria y Ramos, 2015), en nuestro país han sido reconocidas alrededor de 296 especies de uso medicinal preventivo, curativo o paliativo (Basualdo *et al.*, 2004), entre las cuales las nativas son las menos estudiadas, y cuya eficacia carece de un control de respaldo (Soria y Ramos, 2015). El uso de plantas medicinales o partes de estas, como antiinflamatorios, es una práctica que se realiza desde la antigüe-

dad (Thi Tran *et al.*, 2019) y entre estas especies, encontramos a la *Sida cordifolia*. La *Sida cordifolia* L. conocida como Malva Blanca (**Figura 1**), es una hierba perenne con tallo erecto, ramificado, cubierto de pelos blancos, las flores con coloración salmón o amarillas, dispuestas en inflorescencias axilares y terminales, con frutos (Pin *et al.*, 2009). Se cita el uso de las hojas, tallos y flores contra el catarro (Degen de Arrúa *et al.*, 2011). También se utiliza popularmente para tratar la gripe, como expectorante, las infecciones urinarias, inflamaciones del ovario, como emoliente, y el extracto de la raíz, en el mate, se utiliza contra el enfriamiento (Pin *et al.*, 2009; Degen de Arrúa *et al.*, 2011; Degen de Arrúa y González, 2014).



Figura 1. *Sida cordifolia* L. (Jardín Botánico de Asunción-foto del autor)

Por otro lado, también se han evaluado el potencial farmacológico del extracto de la *S. cordifolia*. En el 2005, Dhawal *et al.*, estudiaron el potencial antioxidante comparativo de extractos etanólicos de *Sida cordifolia* y demostraron que el extracto de la raíz de esta planta posee una propiedad antioxidante significativa. Se ha observado además que presenta actividades analgésicas y antiinflamatorias en extractos acuosos de la parte aérea, mientras que extractos etanólicos han mostrado ser hipoglucemiante (Ravi Kanth, V. y Diwan, P. V., 1999). Se ha descrito que el extracto metanólico de raíces de *S. cordifolia* presentaron alta actividad antioxidante (Subramanya *et al.*, 2015), actividad antimicrobiana y actividad contra células tumorales *in vitro*, entre otras varias actividades (Dinda *et al.*, 2015).

El ensayo de micronúcleos se evalúa en los eritrocitos de la médula ósea de roedores y fue incluido en la batería de ensayos para evaluación de genotoxicidad de productos químicos (Hayashi, 2016). La médula ósea de los roedores adultos jóvenes es el tejido diana del daño genético en esta prueba (OECD, 2016). Los micronúcleos se forman a partir de fragmentos de cromosomas o cromosomas rezagados en la división celular, como consecuencia de un efecto tóxico de un agente físico o químico (Sommer *et al.*, 2020). Un aumento en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en los animales tratados es una indicación de genotoxicidad (Dhawan y Bajpayee, 2019). El objetivo de este trabajo fue evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad del extracto acuoso de *Sida cordifolia* en células de médula

ósea de ratones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracto acuoso: La planta se colectó de la colección del Jardín Botánico de Asunción (JBA) y su posterior identificación se realizó en el herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN). Depósito de planta identificado como *Voucher* número 01 de Hernán Caballero. Se seleccionó toda la planta y se procedió al lavado de las mismas con agua potable para remover residuos y luego se dejó secar por lo menos una semana a temperatura ambiente, en el laboratorio, donde se mantuvo la circulación de aire constante. Luego se procedió a triturar y pesar el material vegetal, se llevó a ebullición 20 gramos en 500 mL de agua destilada para la obtención del extracto, posteriormente se efectuó el proceso de filtración, con algodón y con papel de filtro *Whatman*, se congeló el extracto en balones para su posterior liofilización y se prepararon las distintas concentraciones de uso.

Animales: Para el ensayo de micronúcleos en médula ósea se utilizaron ratones de la cepa swiss albino, de 6 a 12 semanas de vida, que se adquirieron del Bioterio del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS). Fueron aclimatados por una semana en la Sala de Mantenimiento de Animales del laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT). Los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 12h luz/12 h oscuridad, con dieta de balanceado y agua *ad libitum*. Se siguie-

ron las recomendaciones de la Guía de Principios Internacionales para Investigaciones Biomédicas que envuelven animales, elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS, 2007). Se utilizó la cantidad mínima posible de animales y se tomaron todas las precauciones para evitarles sufrimientos innecesarios.

Tratamiento: Se prepararon concentraciones del extracto acuoso del 0,01%; 0,02% y 0,04%, para su posterior uso en el tratamiento. Los ratones se agruparon conforme a su peso y se los distribuyó en cinco grupos, cada grupo con cinco individuos. El primer grupo se identificó como el control negativo en el cual los ratones fueron tratados con agua potable. El segundo, tercero y cuarto grupos fueron tratados con tres concentraciones de: 0,01%; 0,02% y 0,04% del extracto acuoso de *Sida cordifolia*. El quinto grupo correspondió al control positivo en el cual los ratones fueron tratados con ciclofosfamida (CP), 50mg/1.000g animal.

Test de micronúcleo: Se realizaron administraciones consecutivas de los extractos y el control negativo, con intervalos de 24 hs por 14 días (lunes a viernes) durante dos semanas, por vía oral, y por vía intraperitoneal el control positivo 24 hs antes del sacrificio. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical en el día 15 del tratamiento. El procedimiento empleado para la obtención de las preparaciones de la médula ósea, fue realizado de acuerdo a la metodología propuesta por Schmid (1975) y el número de células analizadas fue de acuerdo a la guía de procedimientos de la OECD (2016). Se cortaron las epífisis de cada

fémur con tijeras quirúrgicas para obtener la médula ósea. Se tomó 1,5 ml de suero fetal bovino (SFB) previamente calentado a 37° C, en una jeringa de 5 ml. Se insertó la aguja en canal medular y se enjuagó la médula ósea mediante lavados suaves y se transfirió todo el material a un tubo de ensayo. Luego se centrifugó la suspensión celular resultante a 1000 rpm durante 10 min. Después de la centrifugación, se desechó el exceso de sobrenadante. Se resuspendió el botón de células con suero y se prepararon las muestras. Se colocó una gota de la muestra en un portaobjetos limpio y seco, se realizó el frotis y se dejó secar. A continuación, las células se fijaron en metanol 100% durante 10 minutos. La tinción de las muestras se realizó con Giemsa al 4%. Se realizó el recuento de 2.000 eritrocitos por animal para el análisis genotóxico, incluido los que presentaron micronúcleos. Para el análisis citotóxico, se contaron 500 eritrocitos por animal y se determinaron las ratios entre Eritrocitos Policromáticos (EPC) y Eritrocitos Normocromáticos (ENC) de cada grupo. Diferencias significativas de las *ratios* de los grupos de tratamiento con la ratio del control indican toxicidad.

Análisis estadístico: Los Análisis estadísticos realizados fueron Anova y test de Tukey, utilizando el programa SPSS (21).

RESULTADOS

Para evaluar los posibles efectos genotóxicos y citotóxicos de la plantas de uso medicinal *Sida cordifolia* se trataron ratones con tres concentraciones del extracto acuoso de la misma. Las concen-

traciones utilizadas se eligieron tomando como referencia al uso de la planta por una persona de 60 Kg y se trataron los ratones en proporción al peso. Los resultados obtenidos en la evaluación del potencial genotóxico y citotóxico se muestran en la **Tabla 1**. Se contaron 2000 eritrocitos policromáticos por animal tratado, en donde se observó la cantidad de eritrocitos policromáticos con y sin micronúcleos (**Figura 2**); también se muestra la ratio obtenida entre el total de eritrocitos policromáticos y normocromáticos en el análisis de citotoxicidad. Los resultados obtenidos con el extrac-

to acuoso de malva blanca fueron dosis dependiente, siendo la dosis mayor evaluada, estadísticamente significativa, cuando comparada las frecuencias con el control negativo. Con relación al análisis del potencial citotóxico, se observó que los tratamientos realizados con malva blanca no fueron citotóxicos en las concentraciones evaluadas en este estudio. El control positivo, ciclofosfamida, resultó significativo, al compararse con la frecuencia de eritrocitos micronucleados y con la ratio encontradas en el control negativo, lo que valida el ensayo.

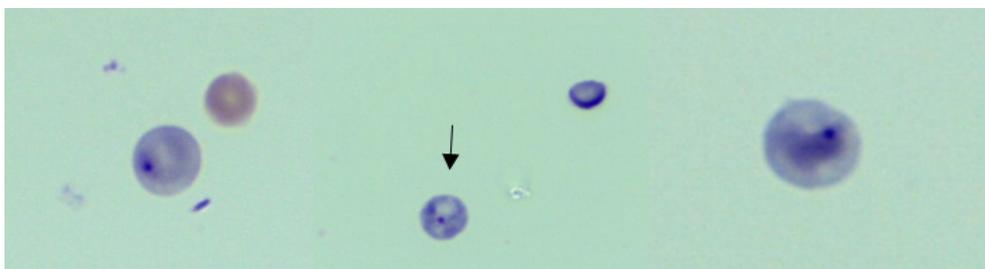


Figura 2. Eritrocitos policromáticos micronucleados observados en el control positivo (flecha)

Tabla 1. eritrocitos policromáticos micronucleados y la *ratio* entre eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocromáticos

Tratamientos	Total de células		
	EPC	EPCMN	Ratio EPC/ENC
Control negativo	9996	04	1,495
Control positivo	9948	52*	1,142*
0,01%	9991	09	1,535
0,02%	9987	13	1,485
0,04%	9981	19*	1,487

EPC: Eritrocitos policromáticos, EPCMN: eritrocitos policromáticos con micronúcleo. ENC: eritrocitos normocromáticos. %: concentración utilizada. * $p < 0,05$

DISCUSIÓN

La toxicidad de las medicinas tradicionales a base de hierbas no se ha evaluado por completo en la mayoría de los casos y las plantas medicinales pueden ser extremadamente dañinas para la salud humana (Sponchiado *et al.*, 2016). Para el uso seguro de las plantas de las plantas de uso medicinal, las validaciones científicas son obligatorias (Mehreen *et al.*, 2016). Se recomienda una batería de ensayos para detectar posibles agentes genotóxicos, y entre estos se encuentra el ensayo de micronúcleos in vivo (Kramer, 1997). En este estudio se investigó el potencial genotóxico del extracto acuoso de *S. cordifolia*, utilizando como biomarcador la formación de micronúcleo en eritrocitos de médula ósea de ratones. Los micronúcleos se forman como resultado al daño estructural en los cromosomas y/o el retraso del cromosoma entero durante la anafase (Doherty *et al.*, 2012). Esta técnica es una de más utilizadas para evaluar extractos de plantas de uso medicinal (Sponchiado *et al.*, 2016). Las dosis utilizadas en este ensayo se referenciaron en las cantidades utilizadas por un ser humano de 60 kg de peso corporal. En la evaluación realizada en este trabajo de investigación, se observó que la concentración de 0,01% no fue significativa, así como la concentración de 0,02%, que se seleccionó de acuerdo al uso en humanos. La respuesta obtenida en este trabajo fue de tipo dosis dependiente. Otros autores como Montero *et al.*, (2001), han reportado que seis plantas medicinales analizadas por esta técnica, no mostraron un efecto genotóxico, a pesar de haber evaluado

dosis de 2.000g/peso del animal, a pesar de las bajas concentraciones evaluadas en este trabajo, nuestro extracto resultó genotóxico en la concentración más alta analizada, esto podría indicar, que, esta planta puede ser genotóxica para el uso humano. Otros estudios realizados, utilizando la técnica de evaluación de MN en ratones, en plantas de uso medicinal como la *Luehea divaricata*, se observó que el extracto de la misma no presentó actividad mutagénica al ser comparada con su control negativo (Segovia *et al.*, 2016). Además de los usos que se le da al extracto de esta planta, se describen otras, como en el tratamiento de disentería crónica, asma, gonorrea, blenorrea, desordenes nerviosos y otros (Dinda *et al.*, 2015). Este trabajo tuvo como resultado la obtención de información sobre los efectos secundarios del extracto acuoso de *S. cordifolia*, y se ha observado que presenta un potencial genotóxico, por lo que se debe considerar su uso con precaución. En el control positivo se registró un valor significativo al igual que Fernández *et al.*, (2005), que también utilizaron Ciclofosfamida para dicho control.

En la evaluación del efecto citotóxico del extracto de *S. cordifolia* en células de médula ósea. Los resultados registrados con el extracto acuoso no demuestran valores significativos, de igual manera con los valores de Mella-García *et al.*, (2016), donde evaluaron una especie comercial de *Allium* sp. mediante el ensayo de MN en células de ratones, ensayo en el cual tampoco registraron valores significativos en cuanto a la disminución de *ratio* EPC/ENC. Una disminución en la *ratio* EPC/

ENC, de los grupos tratados comparados con el control negativo, indica toxicidad para la médula ósea (Suzuki *et al.*, 1989, Rabello-Gay *et al.*, 1991). Las *ratios* de los tratamientos con *S. cordifolia* fueron iguales al control negativo, por lo que podemos sostener que esta planta, en estas condiciones experimentales, tiene un potencial genotóxico pero no citotóxico.

CONCLUSIÓN

Se evaluó el efecto genotóxico y citotóxico del extracto acuoso de *Sida cordifolia* en eritrocitos de médula ósea de *Mus musculus*. Para el control genotóxico las concentraciones del 0,01% y 0,02% no presentaron significancia, en cuanto a la concentración del 0,04% se registró un nivel significativo en comparación al control negativo. El extracto acuoso no registró un nivel significativo en la evaluación de su efecto citotóxico, en las concentraciones evaluadas. Considerando el efecto observado, se hace necesario realizar otras evaluaciones del extracto de *Sida cordifolia*, en células humanas y/o en hepatocitos de modelos murinos, con el objetivo de establecer el nivel de toxicidad de esta planta de uso medicinal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Basualdo I., Soria, N. Ortíz M. & Degen R. (2004). Plantas comercializadas en los mercados de Asunción y Gran Asunción. *Rojasiana* 6 (1): 95 - 114.
- Degen de Arrúa R. L., Céspedes de Zárate C. I., González Y.P., Delmás de Rojas G.E., & González de García M.G. (2011). Catálogo Ilustrado de 80 plantas medicinales del Paraguay. FCQ-UNA, JICA (Editores).
- Degen de Arrúa R.L. & González Y. (2014). Plantas utilizadas en la medicina popular paraguaya como antiinflamatorias. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 13 (3): 213 – 231.
- Dhalwal K., Deshpande Y. S., Purohit A. P., & Kadam, S. S. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of *Sida cordifolia*. *Pharmaceutical Biology*, 43(9), 754–761. <https://doi.org/10.1080/138802005004064385>.
- Dhawan, A. & Bajpayee M. (2019). Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 2031, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9_7, © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature
- Dinda B., Das N., Dinda S., Dinda M., & Silsarma I. (2015). The genus *Sida* L. - A traditional medicine: Its ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological data for commercial exploitation in herbal drugs industry. *J Ethnopharmacol. Dec 24;176:135-76*. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.027. Epub 2015 Oct 21. PMID: 26497766 Review.
- Doherty A. T., Baumgartner A., & Anderson D. (2012). Cytogenetic In Vivo Assays in Somatic Cells. *Genetic Toxicology: principles and Methods*. Parry JM y Parry EM. Editors. Humana press.
- Fernández, I., Menéndez, R. G., Martínez, A. G., & Cambián, H. G. (2005). Evaluación Genotóxica in vivo del D-004 en el Ensayo de

- Micronúcleos en Médula Ósea en Ratones. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 36
- Hayashi, M. (2016). The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes and Environment*, 38(1). doi:10.1186/s41021-016-0044-x.
- Kramer P.J. (1999) *Genetic toxicology. J-Pharm-Pharmacol* 4. 395-405.
- Mehreen A., Waheed M., Liaqat I., & Arshad N. (2016). Phytochemical, Antimicrobial, and Toxicological Evaluation of Traditional Herbs Used to Treat Sore Throat. *Biomed Res Int.* :8503426. doi:10.1155/2016/8503426. Epub 2016 Jun 26.
- Mellado-García P., Puerto M., Prieto A. I., Pichardo S., Martín-Cameán A., Moyano, R & Cameán, A. M. (2016). Genotoxicity of a thiosulfonate compound derived from *Allium* sp. intended to be used in active food packaging: In vivo comet assay and micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 800, 1-11.
- Montero A. R., Arnáez G. P., Esperón N. F., Barro A. B., Pérez M. A., & Rodríguez A. M. (2001). Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Revista de Toxicología*, 18(2), 75-78.
- Muñoz, O. (2001). Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. Santiago, Chile: Universitaria.
- OECD (2016). Test No. 474: mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD Publishing
- Pin A., González G., Marín G., Céspedes G., Cretton S., Christen P., & Roguet D. (2009). Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. Asunción, PY: Asociación Et-nobotánica Paraguaya
- Rabello-Gay M. N., Rodrigues M. A. L. R., & Monteleone-Neto R. (Eds.). (1991). Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avalizacão. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- Ravi kanth V., & Diwan, P. V. (1999). Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic activities of *Sida cordifolia*. *Phytotherapy Research*, 13(1), 75–77. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199902\)13:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199902)13:1).
- Schmid W. (1975). The micronucleus test for cytogenetic analysis. *Chemical Mutagens* 4.31.
- Segovia E.A., Arrúa R.A., Barrozo N.C., Duré R.D., Nakayama H.D. & Peralta I. (2016). Evaluación de los efectos mutagénicos/antimutagénicos de *Luehea divaricata* en ratones. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(3).
- Sommer S., Buraczewska I., & Kruszewski M. (2020). Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 24;21(4):1534. doi:10.3390/ijms21041534.
- Sponchiado G., Adam M. L., Silva C.D., Soley B. S., de Mello-Sampayo C., Cabrini D. A., Correr C.J., & Otuki MF. (2016). Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J Eth-*

- nopharmacol. 2016 Feb 3;178:289-96. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.026. Epub 2015 Dec 8. PMID: 26680588.
- Soria, N. & Ramos, P. (2015). Uso de plantas medicinales en la atención primaria de salud en Paraguay: algunas consideraciones para su uso seguro y eficaz. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (PY)*. 13 (2): 8 - 17.
- Subramanya M. D., Pai S. R., Upadhya V., Ankad G. M., Bhagwat S. S. & Hegde H. V. (2015). Total polyphenolic contents and in vitro antioxidant properties of eight *Sida* species from Western Ghats, India. *J Ayurveda Integr Med. Jan-Mar;6(1):24-8*. doi: 10.4103/0975-9476.146544.
- Thi Tran H., Gao X., Kretschmer N., Pferschy-Wenzig E. M., Raab P., Pirker T., Temml V., Schuster D., Kunert O., Huynh L., & Bauer R. (2019). Anti-inflammatory and antiproliferative compounds from *Sphaeranthus africanus*, Phytomedicine. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152951>
- Suzuki Y., Nagae Y., Li J., Sakaba H., Mozawa K., Takahashi A., & Shimizu, H. (1989). The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio). *Mutagenesis*, 4(6), 420-424. doi:10.1093/mutage/4.6.420.