

Efecto quimiopreventivo de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) del daño genético inducido por ciclofosfamida en *Rattus norvegicus*

Chemopreventive effect of *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) against the genetic damage induced by cyclophosphamide in *Rattus norvegicus*

***Leticia Amésquita, María Nimia Cruz-Briceño, Judith Rodríguez, David
Salirrosas & Zulita Prieto***

Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ

mamesquita@unitru.edu.pe, mcruz@unitru.edu.pe, zprieto@unitru.edu.pe, just_rodri_cast_25@outlook.com, fersal_yaku@hotmail.com

Carmen Medina-Rodríguez

Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, PERÚ

carmenmed987@gmail.com



Resumen

La investigación tuvo por finalidad evaluar mediante el ensayo de micronúcleos (MN) el efecto quimiopreventivo de *Caesalpinia spinosa* frente al daño genético inducido por ciclofosfamida en eritrocitos policromáticos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman. Se trabajó con grupos de cinco individuos y de manera aleatoria se aplicaron los tratamientos: a) control negativo, agua; b) *C. spinosa*, extracto acuoso 20 mg/ml; c) *C. spinosa*-ciclofosfamida, 50 mg/kg/pc; d) control positivo: ciclofosfamida 50 mg/kg/pc. Los individuos fueron sacrificados y procesados para la obtención de los preparados citológicos. El análisis reveló que la frecuencia de MN en eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) tratados con ciclofosfamida fue $8,81 \pm 0,52$, mientras que la frecuencia de MN en el grupo *C. spinosa*-ciclofosfamida fue $5,53 \pm 0,78$. Se demostró que el extracto acuoso de *C. spinosa* presenta efecto preventivo al disminuir significativamente la frecuencia de MN en los individuos expuestos a ciclofosfamida.

Palabras clave: *Caesalpinia spinosa*, ciclofosfamida, quimiopreención, *Rattus norvegicus*.

Abstract

The aim of the research was to evaluate the chemopreventive effect of *Caesalpinia spinosa* against the genetic damage induced by cyclophosphamide in polychromatic erythrocytes of *Rattus norvegicus* Holtzman strain, using the micronucleus (MN) test. We worked with groups of five individuals and randomly applied the treatments: a) negative control, water; b) *C. spinosa*, aqueous extract 20 mg/ml; c) *C. spinosa*-cyclophosphamide, 50 mg/kg/bw; d) positive control: cyclophosphamide 50 mg/kg/bw. The individuals were sacrificed and processed to obtain the cytological preparations. The analysis revealed that the frequency of MN in micronucleated polychromatic erythrocytes treated with cyclophosphamide was 8.81 ± 0.52 , while the frequency of MN in the *C. spinosa*-cyclophosphamide group was 5.53 ± 0.78 . It was demonstrated that the aqueous extract of *C. spinosa* has a preventive effect by significantly decreasing the frequency of MN in individuals exposed to cyclophosphamide.

Keywords: *Caesalpinia spinosa*, cyclophosphamide, chemoprevention, *Rattus norvegicus*.

Citación: Amésquita, L.; M. Cruz-Briceño; J. Rodríguez; D. Salirrosas; Z. Prieto & C. Medina-Rodríguez. 2018. Efecto quimiopreventivo de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) del daño genético inducido por ciclofosfamida en *Rattus norvegicus*. *Arnaldoa* 25(3): 953-960. DOI: <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.253.25308>

Introducción

Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze (Fabaceae) "tara" es una planta originaria del Perú (Dostert *et al.*, 2009), utilizada desde la antigüedad, por sus propiedades, para aliviar malestares de garganta, sinusitis, infecciones vaginales, ojos inflamados, heridas crónicas, dientes cariados, dolor de estómago, diarreas, reumatismo, resfriados y como depurativo del colesterol (Kuklinski, 2000).

De las investigaciones realizadas en *C. spinosa* se reportan: efecto cicatrizante

(Abdo *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2014), actividad antimicrobiana (Guevara *et al.*, 2014; Montenegro, 2014; Aguilar Galvez *et al.*, 2014; Prieto *et al.*, 2018), actividad antioxidante, capacidad para inhibir a la enzima colagenasa (Doroteo *et al.*, 2012; Valachová *et al.*, 2014) citotoxicidad en líneas celulares tumorales, inducción de cambios en el potencial de la membrana mitocondrial y apoptosis (Ureña *et al.*, 2013), todo esto podría indicar alguna selectividad y beneficio en tratamiento para problemas de cáncer. Santander *et al.* (2011), reporta que los galactomananos

obtenidos de *C. spinosa* incrementa los niveles de proteínas y citoquinas pro-inflamatorias, mientras que Gali-Muhtasib *et al.* (2000), propone efecto fotoprotector *C. spinosa*, y Sandoval *et al.* (2016) afirma la propiedad citotóxica en células cancerosas y podría ser utilizado como adyuvante junto con la quimioterapia convencional para el tratamiento de tumores.

Para definir su utilidad en el tratamiento de enfermedades y en la quimiopreención, es indispensable incrementar la información en diferentes modelos experimentales, que permita determinar el efecto protector de sus compuestos al cuantificar el daño inducido al ADN, mediante biomarcadores, tales como el ensayo de micronúcleos.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto quimiopreventivo de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) frente al daño genético inducido por ciclofosfamida en eritrocitos policromáticos (EPC) en médula ósea de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman

Material y métodos

Material biológico:

Se utilizó especímenes machos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman, de 6-8 semanas de nacidos y con peso promedio de 150 g. Los individuos se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Salud y se aclimataron durante una semana en el bioterio de la Facultad de Medicina UNT, bajo condiciones de temperatura y humedad relativa ambiental, y con periodos de luz oscuridad. Se alimentaron con ratonina y agua sin restricción. Se trató de acuerdo a las normas éticas para el uso y manejo de animales de experimentación (Cardozo, 2007).

Material de estudio:

Se utilizó ciclofosfamida Korea United Pharm INC, como agente mutágeno, se diluyó en SSF y se administró 50 mg/kg pc, vía intraperitoneal.

Como agente quimiopreventivo se utilizó extracto acuoso de frutos de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (Fabaceae) "tara", adquiridas del cultivo existente en la Universidad Nacional de Trujillo, Perú e identificado y registrado con el depósito en HAO-20053 del Herbario Antenor Orrego (HAO) de la Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Perú.

Preparación del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa*

El extracto acuoso se preparó colocando las legumbres "vainas" de "tara", 10 gr en 500 ml de agua potable dejando hervir durante tres minutos, se retiraron las "vainas", se enfrió durante 10 minutos, se administró por vía oral a cada espécimen durante 10 días de tratamiento.

Tratamiento y vía de administración:

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo se siguieron en base en los lineamientos de Mavournin *et al.* (1990) modificados. Los especímenes de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman se distribuyeron en grupos de cinco individuos para ser tratados como sigue:

a) **Grupo control negativo:** se le permitió libre acceso al agua potable.

b) **Grupo *Caesalpinia spinosa* "tara":** libre acceso al extracto acuoso de tara durante 10 días.

c) **Grupo *Caesalpinia spinosa* "tara" -ciclofosfamida:** libre acceso al extracto de tara durante nueve días. Al décimo se administró ciclofosfamida 50 mg/kg/pc vía intraperitoneal.

d) Grupo control positivo: al décimo día se aplicó 50mg/kg/pc de ciclofosfamida por vía intraperitoneal.

Obtención de preparados citológicos

Al día siguiente de la última administración los especímenes fueron sacrificados, y procesados de acuerdo al protocolo de Arencibia *et al.* (2009) modificado. Se aislaron los fémures y se cortaron por su extremo distal y proximal. Se inyectó 2,5 ml de suero salino fisiológico (SSF) por el extremo distal y se recogió del otro extremo la suspensión celular en un tubo de centrifuga; se resuspendió con una pipeta Pasteur. Se centrifugó a 1000 r.p.m por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante, este paso se repitió por dos veces. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se agregó 0,5 ml de SSF para obtener una suspensión celular. A partir de la cual se realizó el goteo sobre una lámina portaobjeto, los que se fijaron en metanol por 5 minutos y se colorearon con Giemsa al 2% durante 20 minutos.

Análisis citológico Los preparados citológicos de cada uno de los tratamientos se evaluaron al microscopio óptico con objetivo 100X, con la finalidad de identificar los eritrocitos policromáticos (EPC) normales y micronucleados en un total de 2000 EPC (Mavourrnin *et al.*, 1990; Arencibia *et al.*, 2009) por cada individuo. Los datos se registraron en tablas de doble entrada y se fotografiaron las evidencias citológicas.

Análisis estadístico

Se determinaron las medias y desviación estándar para las frecuencias de los EPC micronucleados y se compararon mediante el análisis de varianza (ANOVA), se consideró el nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Aspectos éticos

Se tuvo en cuenta el cuidado y utilización apropiada de los especímenes en la investigación, además se utilizó un ambiente físico y espacio de acuerdo a la especie, según la Organización Panamericana de la Salud, respecto al animal como sujeto de experimentación (Mrad, 2006; Cardozo, 2007)

Resultados

Al exponer a *Rattus norvegicus* cepa Holtzman al extracto de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) "tara" se encontró ausencia de diferencias en la frecuencia de MN de ratas tratadas con "tara" comparadas con el control negativo ($p > 0,05$). Sin embargo, la frecuencia MN en ratas tratadas con 50mg/kg de ciclofosfamida (grupo control positivo) es elevada en comparación a la frecuencia de MN en el grupo control negativo ($p < 0,05$).

El tratamiento con "tara" y la posterior aplicación de ciclofosfamida condujo a una reducción en la frecuencia de MN ($5,53 \pm 0,78$) es significativamente diferente a la frecuencia de EPC micronucleados tratados solo con ciclofosfamida ($8,9 \pm 0,56$) ($p < 0,05$), estos resultados indican disminución del 37,7% en la frecuencia de MN, lo que refleja el efecto quimiopreventivo de *Caesalpinia spinosa* "tara" (Tabla. 1 y Fig. 1).

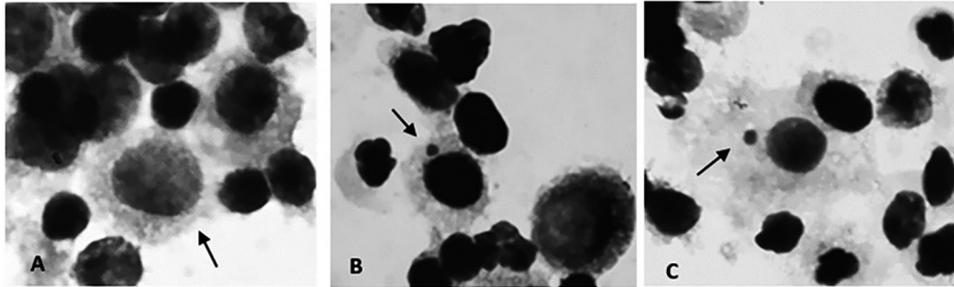


Fig. 1. Eritrocitos policromáticos (EPC) de *R. norvegicus* cepa Holtzman: A. EPC normales; B. y C. EPC micronucleados por efecto de *C. spinosa* "tara".

Tabla 1. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (EPC) en médula ósea de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman inducido con ciclofosfamida con y sin administración de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) "tara"

Grupos de trabajo	Frecuencia micronúcleos (%)
	(X ± DE)
Control negativo	1.5 ± 0.20
Grupo <i>Caesalpinia spinosa</i> "tara"	2.15 ± 0.36 c,d
Grupo <i>Caesalpinia spinosa</i> "tara" -ciclofosfamida	5.53 ± 0.78 a,b,d
Grupo Ciclofosfamida	8.9 ± 0.56 a,b,c

Los datos están expresados como el promedio y desviación estándar (DE), (n = 5).

a: significativamente diferente del grupo control negativo

b: significativamente diferente del grupo "tara"

c: significativamente diferente del grupo "tara"-ciclofosfamida

d: significativamente diferente del grupo ciclofosfamida

Discusión

Al evaluar el efecto de *Caesalpinia spinosa*, (Fabaceae) "tara" frente al daño genotóxico inducido con ciclofosfamida en eritrocitos policromáticos (EPC) en médula ósea de *Rattus norvegicus* cepa holtzman, se evidencia disminución en la frecuencia de micronúcleos. Los micronúcleos se originan por la ciclofosfamida; que al metabolizarse forma mostaza fosforamida, la cual produce aductos de ADN que conllevan al bloqueo de la replicación y roturas del ADN, lesiones del ADN que se evidencian por la presencia de micronúcleos (Johnson *et al.*, 2012; Suchitra *et al.*, 2011).

Aunque en el estudio es difícil dilucidar los mecanismos comprometidos en la disminución de la frecuencia de MN, se reporta que la ciclofosfamida además de ser un mutágeno alquilante, posee carácter pro-oxidante y luego de su administración genera estrés oxidativo que conduce a disminuir la depleción de las enzimas antioxidante, como es el caso del Glutacion reducido (GSH) (Jain *et al.*, 2012; Shruthi *et al.*, 2016). Esta actividad oxidante estaría de alguna manera neutralizada por los fitoconstituyentes de *C. spinosa*.

Entre los fitoconstituyentes de "tara" con propiedades antioxidantes, contenidos en los extractos acuosos de

las vainas de “tara”, son los taninos hidrolizables, polifenoles que tendría el efecto antioxidante (Doroteo *et al.*, 2012; Callohuari *et al.*, 2017), esta acción estaría mediada por elementos de respuesta antioxidante (ARE) localizada en la región promotora de genes de diversas enzimas antioxidantes y de metabolización de xenobióticos (Lee *et al.* (2005). Investigaciones recientes, citan seis nuevos diterpenos de tipo cassane existente en *C. spinosa* (He *et al.*, 2015) que podrían participar también como antioxidante. Por las propiedades que presenta *C. spinosa*, podría ser útil en la terapia del cáncer (Agyare *et al.*, 2018).

La investigación muestra evidencias del efecto quimiopreventivo de *C. spinosa*, “tara” ante las lesiones del ADN inducidas por la ciclofosfamida reveladas por la disminución de la frecuencia de micronúcleos en los individuos pre-tratados, con *C. spinosa* y ciclofosfamida. Se recomienda la demostración en otros bioensayos y células humanas a fin de determinar el beneficio quimiopreventivo y/o quimioterapéutico en el ser humano.

Conclusión

De los resultados se concluye que: el extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) “tara” presenta efecto quimiopreventivo al disminuir significativamente la frecuencia de MN en los individuos expuestos a ciclofosfamida.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Literatura citada

- Abdo, S.; M. Guaman & L. Flores.** 2014. Comparación del efecto cicatrizante de extractos de “guarango” (*Caesalpinia spinosa*) y “sangre de drago” (*Croton lechleri*) en heridas de castración de “lechones” (*Sus scrofa*). Vitae, Revista de La Facultad De Química Farmacéutica Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 21(1): 2145-2660
- Aguilar Galvez, A.; G. Norato; F. Chambí; F. Debaste & D. Campos.** 2014. Potential of “tara” (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds. Food chem. 1(156): 301-4.
- Agyare, C.; V. Spiegler; A. Asase; M. Scholz; G. Hempted & A. Hensel.** 2018. An ethnopharmacological survey of medicinal plants traditionally used for cancer treatment in the Ashanti region, Ghana J Ethnopharmacol. 12:137-152.
- Arencibia, D.; L. Rosario; J. Morffi & D. Curveco.** 2009. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. Retel. 25(3): 22-38.
- Callohuari, R.; V. Sandoval & G. Huamán.** 2017. Efecto gastroprotector y capacidad antioxidante del extracto acuoso de las vainas de *Caesalpinia spinosa* ‘tara’, en animales de experimentación. Anales de la Facultad de Medicina. 78: 61-66
- Cardozo, C.** 2007. El animal como sujeto experimental. Aspectos técnicos y éticos. Chile. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/BIO/libroanim.pdf>.
- Doroteo, V.; C. Terry; C. Díaz & A. Vaisberg & R. Rojas.** 2012. Compuestos fenólicos y actividades antioxidante, antielastasa, anticlagenasa y fotoprotectora *in vitro* de *Myrciaria dubia* (“camu camu”) y *Caesalpinia spinosa* (“tara”). Revista de la Sociedad Química del Perú. 78(4): 254-263.
- Dostert, N.; J. Roque; G. Brokamp; A. Cano; M. Weigend & M. La Torre.** 2009. Factsheet: datos botánicos de “tara”. *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Botconsult GMBH.
- Gali Muhtasib, H.; S. Z. Yamout & M. M. Sidani.** 2000. Tannins protect against skin tumor promotion induced by ultraviolet-B radiation in hairless mice. Nutr Cancer. 37(1): 73-7.
- Guevara, G. J.; G. J. Guevara; D. J. Guevara; V. Béjar; A. Huamán; E. Valencia & P. Abanto.**

2014. Evaluación del cocimiento de diferentes biovariedades de *Caesalpinia spinosa* ("tara") frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a oxacilina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima, Perú Anales de la Facultad de Medicina. 75 (2): 177-180.
- He, D., Y. Li; H. Tag; R. Ma; X. Li & L. Wang.** 2015. Six New cassane diterpenes from the twigs and leaves of "tara" (*Caesalpinia spinosa* Kuntze). Fitoterapia 105: 273-277
- Jain, R. & Sanmati Kumar Jain.** 2012. Effect of Buchanania lanzan Spreng. Bark extract on cyclophosphamide induced genotoxicity and oxidative stress in mice. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 187-191.
- Johnson, A.; B. Malayappan; N. Tretyakova; C. Campbell; M. L. MacMillan; J. E. Wagner & P. A. Jacobson.** 2012. Formation of Cyclophosphamide Specific DNA Adducts in Hematological Diseases. Pediatr Blood Cancer. 58(5): 708-714.
- Lee, J. S. & Y. J. Surh.** 2005. Nrf 2 as a novel molecular target for chemoprevention. Cancer Letters. 224: 171-184
- Kuklinski, C.** 2000. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega.112-114.
- Mavournin, K. H.; D. H. Blakey; M. C. Cimino; M. F. Salamone & J. A. Heddle.** 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 239: 29-80.
- Montenegro, C. J.** 2014. Actividad antibacteriana de *caesalpinia spinosa* ("tara") sobre *Porphyromonas gingivalis*. Universidad Nacional Mayor De San Marcos Facultad De Odontología. E.A.P. de Odontología TESIS Para optar el Título Profesional De Cirujano Dentista AUTOR Lima – Perú
- Mrad, A.** 2006. Ética de la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 Rs de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos: Revista Colombiana de Bioética. 1(1): 163-183.
- Prieto, Z.; D. Salirrosas; M. Arqueros & L. Sánchez Tuesta.** 2018. El extracto de *Caesalpinia spinosa* inhibe la infección *in vivo* de *Flavobacterium columnare* en "tilapia". Scientia Agropecuaria 9(2): 215-221.
- Rojas, N.; R. Avilés; E. Villacaqui; E. Neira; W. Ramos & J. Santiago.** 2011. Tratamiento de quemaduras con películas obtenidas por radiación gamma que contienen extracto hidroalcohólico de tara (*Caesalpinia spinosa*) en animales de experimentación. Dermatología Peruana. 21(1): 6-12
- Sandoval, T.A.; C. P. Uruña; M. Llano; A. Gómez Cadena; F.J. F1. Hernández; L. G. Sequeda; A. E. Loaiza; A. Barreto; S. Li & S. Fiorentino.** 2016. Standardized Extract from *Caesalpinia spinosa* is Cytotoxic Over Cancer Stem Cells and Enhance Anticancer Activity of Doxorubicin. Am J Chin Med. 16:1-25.
- Santander, S. P.; M. Aoki; J. F. Hernandez; M. Pombo; H. Moins Teisseren; N. Mooney & S. Fiorentino.** 2011. Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. In Immunopharmacol. 11(6): 652-60.
- Shruthi, S. & K. K. Vijayalaxmi.** 2016. Antigenotoxic effects of a polyherbal drug septilin against the genotoxicity of cyclophosphamide in mice. Toxicology Reports. 3: 563–571
- Suchitra, Ku Panigrahy, Suresh Jatawa, Archana Tiwari.** 2011. Therapeutic use of cyclophosphamide and its cytotoxic action: A challenge for researchers. Journal of Pharmacy Research. 4(8): 2755-2757
- Uruña, C.; J. Mancipe; J. Hernandez; D. Castañeda; L. Pombo; A. Gomez; A. Asea & S. Fiorentino.** 2013. Gallotannin-rich *Caesalpinia spinosa* fraction decreases the primary tumor and factors associated with poor prognosis in a murine breast cancer model. BMC Complement Altern Med. 13(74): 1-13
- Valachová, K.; D. Topolská; M. Nagy; C. Gaidau; M. Niculescu; J. Matyašovský; P. Jurkovič & L. Soltés.** 2014. Radical scavenging activity of *Caesalpinia spinosa*. Neuro Endocrinol Lett. 35(2): 197-200.

