

One cell test para el estudio *in vitro* de citotoxicidad del extracto de una planta de la flora colombiana

Cytotoxicity *in vitro* study of the extract of a Colombian flora plant using One cell test

Daniel Saúl, Afife Mrad de Osorio**, Constanza Martínez**,
Carmen Alicia Cardozo de Martínez***

RESUMEN

Este estudio se realizó con el fin de evaluar la toxicidad del extracto de *Abuta grandifolia* mediante la técnica de *One cell test*. El extracto etanólico se preparó mediante secado y pulverización del tallo de la *A. grandifolia*; la extracción se realizó con etanol al 96% y posteriormente se hizo una extracción ácido-base hasta obtener la fracción alcaloidal purificada. Los resultados revelaron que el extracto inhibió el crecimiento celular de modo dosis-dependiente en concentraciones de 0.01, 0.02, 0.1 y 0.4% en medio HTF.

Palabras clave: *One cell test*, citotoxicidad, alternativas, embrión.

ABSTRACT

This study was aimed at evaluating *Abuta grandifolia* plant extract toxicity using the *One cell test*. The ethanol extract was prepared by drying and grinding up *A. grandifolia* stems. Extraction was done with 96% ethanol, followed by further acid-base extraction to obtain a purified alkaloidal fraction. The results showed extract dose-dependent cell growth inhibition at concentrations ranging from 0.01%, 0.02%, 0.1% to 0.4% in HTF medium.

Key words: *One cell test*, cytotoxicity, alternatives, embryo.

INTRODUCCIÓN

Ciertas técnicas que aún se utilizan en los estudios de toxicidad y otros de tipo diagnóstico o terapéutico involucran metodologías traumáticas y dolorosas para los animales de experimentación y, en muchos de estos estudios, se hace uso indiscriminado y a veces excesivo de dichos animales.

En las últimas décadas se ha hecho énfasis en el uso de alternativas para reemplazar los modelos animales por modelos celulares y estudios *in vitro* en la investigación biológica y biomédica, por lo cual se han generado modelos de estudio diagnóstico y terapéutico tanto de patologías humanas como animales. Los países con alto desarrollo tecnológico inicia-

ron la utilización de diferentes líneas celulares evitando así el uso abusivo de especies de animales de laboratorio (ATLA, 2002).

Posteriormente, el advenimiento y evolución de los estudios *in vitro* con embriones permitieron la repetibilidad y frecuencia de los estudios mencionados con el requerimiento de condiciones estrictas para su cultivo. Se ha confirmado la alta sensibilidad de los embriones a agentes y materiales de diversos orígenes en los estudios y evaluación de toxicidad (Davidson *et al.*, 1988). El estudio en embriones animales es hoy aceptado y consagrado como metodología por la *Food & Drugs Administration* de Estados Unidos con el nombre de *One cell test* (FDA, 1995). Se ha continuado con el desarrollo de estos ensayos

* MV, Ph. D., Universidad Federal de Curitiba, Brasil.

** Investigadoras del Programa para la Infraestructura de la Investigación Biológica y Biomédica que Maneja Reactivos Biológicos. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Ciudad Universitaria, Edificio Manuel Ancizar, Bogotá. Correo electrónico: cdcardozor@unal.edu.co, camrado@unal.edu.co, cmartinezc@unal.edu.co

Recibido: junio 10 de 2003. **Aceptado:** febrero 19 de 2004.

para adaptar la metodología de la exposición de embriones a diferentes medios, entre ellos se encuentran los poco o no solubles en medios líquidos como los extractos vegetales (May, 1996).

En el presente estudio esta prueba fue utilizada para evaluar el extracto etanólico de *Abuta grandifolia*, el cual requería un análisis de su comportamiento citotóxico. La *A. grandifolia* es una planta medicinal originaria de la Amazonia que se caracteriza por ser una liana con tallo aplanado utilizada tradicionalmente como antimalárico (Steele *et al.*, 1999).

ANTECEDENTES

La criopreservación es la congelación de tejidos o células con el fin de guardarlos de manera adecuada para que, en un plazo corto, mediano o largo, su capacidad biológica primaria pueda ser reactivada. En la actualidad, la tecnología permite congelar bastante bien algunas células (como espermatozoides) y pequeños fragmentos de tejido, aunque aún no es posible congelar organismos vivos completos.

Probablemente fue Spallazani, en 1776, quien primero se preocupó por valorar cuantitativamente los efectos del frío sobre las células con sus estudios pioneros sobre la supervivencia de espermatozoides de caballo o de huevos de gusanos de seda expuestos al frío de la nieve. La era de la criopreservación de embriones se apoyó en el descubrimiento y desarrollo de componentes químicos crioprotectores. Pero fue hasta las postrimerías de los años treinta del siglo pasado que se iniciaron los estudios sistemáticos sobre el uso de agentes crioprotectores para la congelación de células y gametos (Luyet y Gehenio, 1940; Chang y Walton, 1940; Polgue *et al.*, 1949). Como dato interesante, el descubrimiento original del valor de los crioprotectores se logró por accidente: en 1949, Christopher Polge, en el Reino Unido, complementó inadvertidamente una solución de congelación experimental con glicerol, causando así la supervivencia inesperada de células congeladas experimentalmente. Los crioprotectores son útiles porque reducen el punto de congelación, pueden prevenir la formación de hielo intracelular hasta muy bajas temperaturas y protegen a las células interactuando con las membranas a medida que éstas cambian de un estado flexible a uno rígido. Quince años más tarde Mazur (1963) presentó un modelo teórico que re-

presentaba eficazmente el comportamiento hídrico de las células durante la criopreservación. Este modelo inicial, cuya base experimental se desarrolló en células sanguíneas, fue revisado posteriormente por Meryman en 1968.

Los pioneros en la congelación de embriones de mamífero fueron tres investigadores: Stanley Leibo, Peter Mazur y David Whittingham, quienes pudieron preservar con éxito óvulos en nitrógeno líquido a -196 °C, que luego descongelaron e implantaron en madres sustitutas. Esta técnica pionera se publicó por primera vez en la revista *Science* de octubre de 1972. El procedimiento incluía la sincronización exacta y la congelación y descongelación lenta y cuidadosamente controlada para asegurar la supervivencia de los embriones.

El nacimiento de los primeros ratones provenientes de embriones congelados ocurrió el 17 de junio de 1972. Desde entonces, cientos de miles de óvulos y embriones de mamíferos han sido criopreservados con éxito y se han desarrollado como seres vivos normales capaces de reproducirse (Nagata y Shirakawa, 1996).

Por más de 20 años los científicos han estado en la capacidad de congelar y recobrar exitosamente embriones viables de ratón, que se pueden almacenar por un periodo de tiempo prolongado y luego ser usados para restablecer una colonia de animales. Los embriones almacenados en nitrógeno líquido a temperatura de -196 °C son metabólicamente inactivos; existen evidencias de que las actividades moleculares, especialmente la función enzimática y la mutación de ADN, no ocurren en este estado, con lo cual no existe el riesgo de contaminación genética.

Aunque la criopreservación de embriones implica un serio riesgo para su integridad y su supervivencia, la mayoría de los especialistas implicados en la biología de la reproducción considera que son más las ventajas al utilizar esta técnica que los inconvenientes (Society for Assisted Reproductive Technology, The American Fertility Society, 1992).

El objetivo de este estudio fue un método alternativo (*One cell test*) para la evaluación de la toxicidad del extracto vegetal etanólico de *Abuta grandifolia* a diferentes concentraciones en cultivos de embriones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Material vegetal. El material vegetal fue recolectado en San José del Guaviare por el doctor Carlos Maldonado y clasificado como *Abuta grandifolia* por el Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia. Un ejemplar de esta planta reposa en el Herbario del ICN con el número 393710.

Preparación del extracto. El material vegetal se secó en estufa de aire circulante a una temperatura inferior a 45° C hasta lograr menos del 5% de humedad. Posteriormente se procedió a moler la muestra hasta obtener un polvo fino. El material vegetal molido se colocó en un precolador y se extrajo con etanol del 96%. Se utilizó un rotaevaporador para eliminar todo solvente de los extractos etanólicos. Al extracto etanólico se le hizo una extracción ácido-base utilizando cloroformo como solvente de extracción, el cual se evaporó a sequedad en rotaevaporador para obtener una fracción alcaloidal purificada que se caracterizó por cromatografía en capa delgada utilizando reactivo de Dragendorff como agente cromogénico.

Modelo animal. Los animales utilizados fueron ratones (*Mus musculus*) de las cepas C57BL y BALBc provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Salud, los cuales fueron mantenidos en fotoperiodicidad de 12 horas y temperatura ambiente de 21 °C ± 1 °C. Los experimentos se realizaron obedeciendo los criterios del Comité de Ética y dentro de la política mundial de alternativas al uso del animal experimental (principio de las tres R) (Russel y Burch, 1959).

Metodología

Los trabajos preliminares para la prueba de embriocitotoxicidad se iniciaron con la estimulación hormonal de hembras de 7 a 8 semanas de edad de las cepas C57BL y BALBc con dosis superovulatorias de gonadotrofinas: gonadotropina de yegua (PMSG) a las 15:00 horas y gonadotropina coriónica humana (HCG) 46 h después, es decir, a las 13:00 horas.

Luego, fueron apareadas con machos adultos de la misma cepa y a la mañana siguiente se verificó la cópula mediante la presencia de un tapón vaginal en dichas hembras.

Se obtuvieron los embriones en el estadio de una (1) célula de las hembras de la cepa C57BL; éstos fueron colectados inmediatamente utilizando estereoscopio rasgando la pared de la ampolla de las trompas uterinas. Un día después se colectaron los embriones en el estadio de 2 células de las hembras de la cepa BALBc, introduciendo una aguja No. 15 x 5" sin bisel a través de la ampolla de la trompa. Los dos procedimientos, la extracción de trompas y cuernos uterinos (de donde se realizan las colectas), se llevaron a cabo luego del sacrificio de las hembras mediante técnicas de eutanasia.

Los embriones colectados y seleccionados según su morfología fueron cultivados a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de aire durante 4 1/2 y 3 1/2 días, respectivamente, en soluciones preparadas con medio HTF y el extracto vegetal de *Abuta grandifolia* en las siguientes concentraciones: 0.01%, 0.02%, 0.1% y 0.4%. Posteriormente, fueron comparados con un patrón que no contenía el extracto.

La toxicidad de los cultivos fue evaluada en un periodo de 72 a 80 horas mediante la cuantificación de los embriones que llegaron a los estadios de mórula y blastocisto y la existencia de malformaciones embrionarias. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

RESULTADOS

La toxicidad de los cultivos se evaluó mediante la cuantificación de los embriones que llegaron a los estadios de mórula y blastocisto y la presencia de alteraciones embrionarias.

El contacto directo de los embriones con el extracto impidió el desarrollo embrionario hasta los estadios de mórula y blastocisto. Esto se observó con todas las concentraciones del extracto. En los cultivos control se presentó un desarrollo de los estadios de mórula y blastocisto del 82%. En las concentraciones del extracto de 0.01 y 0.02% en los dos grupos de embriones cultivados, a partir de los estadios de 1 y 2 células se observó citostasis embrionaria y fragmentación de los blastómeros. En las concentraciones de 0.1 y 0.4% se observó citostasis, pocos embriones íntegros y un número de embriones menor que la cantidad inicial cultivada; éstos se mostraron fuertemente pigmentados y algunas membranas pelucidas vacías (tabla 1).

Tabla 1. Embriocitotoxicidad

One Cell test	% de desarrollo embrionario	Rango de efectividad
Conc. de 0.01%	0	70 a 100%
Conc. de 0.02%	0	70 a 100%
Conc. de 0.1%	0	70 a 100%
Conc. de 0.4%	0	70 a 100%
Control	82	10%

DISCUSIÓN

La *Abuta grandifolia* pertenece a la familia *Menispermaceae* y se encuentra en la Amazonia y el Putumayo, donde es empleada por los indígenas para tratar las fiebres. De ella se han aislado alcaloides derivados de la isoquinolina (gradirubrine, imerubrine e isomerubrine) (Torres y Rico, 1994).

Algunos alcaloides de *A. grandifolia* (krukovina y limacrina), obtenidos de la corteza, han sido reportados como activos frente al cultivo *in vitro* de *P. falciparum* (cepas K1 cloroquina resistente y T9-96 cloroquina sensible) (Steele *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha reportado para esta especie actividad insecticida frente a larvas de *Aedes aegypti* (Ciccía *et al.*, 2000) y actividad antimicrobiana por interacción con el ADN (Mongelli *et al.*, 1995; Garavito, 2003).

En este estudio, paralelamente al *One Cell Test* o prueba de una célula, se realizó la colecta y el cultivo de embriones en el estadio de 2 células con la finalidad de comparar su comportamiento con las mismas concentraciones y teniendo en cuenta que, cuando menos primitivo es el estadio embrionario, mayor es su capacidad de desarrollo en condiciones adversas. A pesar de lo mencionado en ambos cultivos embrionarios de 1 y 2 células, no se observaron diferencias significativas en cuanto a su toxicidad.

En las soluciones preparadas con concentraciones de 0.01 y 0.02%, la solubilidad del extracto en el medio HTF fue total. No fue así en las otras dos concentraciones, de 0.1 y 0.4%, en las cuales se observó el precipitado de color naranja y el sobrenadante con un tinte color naranja mucho más intenso. A pesar de la solubilidad parcial, se observaron de igual manera los efectos descritos en los resultados.

CONCLUSIÓN

Los daños celulares y la citostasis embrionaria sugieren que el extracto *Abuta grandifolia* es citotóxico a las concentraciones referidas en la tabla 1, por lo cual cabe continuar las investigaciones con otras metodologías y cada una de ellas debe ser tomada como complementaria.

Para continuar el proyecto se recomienda realizar el fraccionamiento del extracto que permita el aislamiento del principio activo de la sustancia activa de otros componentes que puedan ser citotóxicos.

AGRADECIMIENTOS

Los investigadores agradecen a la doctora Lucía Arteaga de García el suministro del número del ejemplar de la *Abuta grandifolia* que se encuentra en el herbario del ICN y del extracto de esta planta, el cual se está utilizando dentro del programa Principios Bioactivos de la Plantas de la Flora Colombiana que se adelanta en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

- ATLA. 2002. Alternatives To Laboratory Animals, Alternative (Non-animal) methods for Chemicals Testing: Current Status and Future Prospects, A report prepared by ECVAM and the ECVAM Working Group on Chemicals. Edited by Andrew P. Worth and Michael Balls, published by Fund of Replacement of Animals in Medical Experiments, Russell & Burch House, 96-987 North Sherwood Street, Nottingham NG1 4EE, UK, Vol. 30, Supplement 1, July 2002, pp. 95-102.
- Chang, M. C.; Walton, A. 1940. The effects of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of rat spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. (Series B)*. 857(129):517-27.
- Ciccía, G.; Coussio, J.; Mongelli, E. 1995. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *J. Ethnopharmacol*, 72:185.
- Davidson, A.; Vermesh, M.; Lobo, R. A.; Paulson, R. J. 1988. Mouse embryo culture as quality control for human *in vitro* fertilization: the one-cell versus the two-cell model. *Fertility and Sterility*. 49(3): 516-521.
- FDA. 1995. Letter to Manufacturers of Medical Devices Used for IVF/ET, September.
- Garavito, G. 2003. Estandarización de dos modelos de actividad antimalárica como herramienta para la evaluación farmacológica de sustancias o extractos de origen vegetal. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.

- Luyet, B.J.; Gehenio, P.M. 1940. Life and Death at Low Temperatures, *Biodynamica*, Normandy, Missouri, pp. 142-145, Normandy, MO: Biodinámica.
- May, J. V. 1996. Recommendations to the FDA Ob/Gyn Devices Panel for Safety and Efficacy Parameters for Assisted Reproduction Labware and Reproductive Media. Personal communication to Mike Kuchinski (Entrusted by the FDA to receive comments). En: U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Devices and Radiological Health; Obstetrics and Gynecology Devices Branch Division of Abdominal, Reproductive and ENT Devices Office Evaluation. Guidance for Industry, FDA Reviewers/staff and Compliance: Devices used for *In vitro* Fertilization and Related Assisted Reproduction Procedures.
- Mazur, P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* 47:347-369.
- Meryman H.T. 1968. Modified Model for the Mechanism of Freezing Injury in Erythrocytes. *Nature.* 218: 333-336.
- Mongelli E., Desmarchelier C., Coussio J. y Ciccía G. 1995. Antimicrobial activity and interaction with DNA of medicinal plants from the Peruvian Amazon region. *J Rev. Argent. Microbiol.* 4:199.
- Nagata, Y.; Shirakawa, K. 1996. Setting standards for the levels of endotoxin in the embryo culture media of human *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertility and Sterility* 65(3): 614-619.
- Polge, C.; Smith, A. U.; Parkes, A. S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 164:666.
- Russell, W. M. S.; Burch, R. L. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique.* London: Methuen. Reprinted by UFAW, 1992: 8 Hamilton Close, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QD England.
- Society for Assisted Reproductive Technology, The American Fertility Society. 1992. Guidelines for human embryology and andrology laboratories. *Fertility and Sterility.* 58(4) Supplement 1: 1S-16S.
- Steele, J. C.; Simmonds, M. S.; Veich, N. C.; Warhurst, D. 1999. Evaluation of the antiplasmodial activity of Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Médica.* 5:413.
- Torres, A. G.; Rico, C. 1994. Estudio fitoquímico y bioensayos preliminares de *Abuta grandifolia*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.

X CONGRESO LATINOAMERICANO DE ESTUDIANTES DE INGENIERÍA QUÍMICA

Bogotá D. C; julio 26 al 31 de 2004

Conferencistas en BT:

P.h D. Enrique Galindo (IBT, UNAM)

P.h D. Dolly Montoya (IBUN. UN)



Informes: www.xcolaeiq.org x_colaeiq@yahoo.com
 Directora Académica: Liz A. Sánchez; lasanchezm@unal.edu.co

- 4 Biotecnología (BT)
- 4 Medio ambiente
- 4 Ingeniería de Alimentos
- 4 Petroquímica, catálisis e ingeniería de reacciones
- 4 Polímeros y materiales
- 4 Simulación, optimización y control de procesos
- 4 Gestión Industrial
- 4 Fundamentos de Ingeniería y operaciones unitarias
- 4 Actualidad y perspectiva de la Ingeniería química en América Latina