

Efecto antimicronucleogénico y citoprotector del extracto acuoso de Romero (*Rosmarinus officinalis*) en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2

Blanca Patricia Lazalde-Ramos ¹, Sol María Quirarte Báez ², Ana Lourdes Zamora-Perez ³, Bertha Raquel Báez Lozano ⁴, Rosalinda Gutiérrez-Hernández ²

¹Unidad Académica de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas-México.

²Unidad Académica de Medicina Humana, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas-México.

³Instituto de Investigación en Odontología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

⁴Programa Internacional de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México.

CIMEL 2016; 21(2) 10-13

RESUMEN

Introducción: La diabetes mellitus (DM) es un problema de salud pública. La DM se asocia al incremento en la producción de radicales libres, los cuales pueden inducir el daño oxidativo al ADN. En los últimos años se ha incrementado el uso de las plantas medicinales como terapias alternativas; dentro de las plantas con efecto antioxidante se encuentra el Romero (*Rosmarinus officinalis* L.). El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la ingesta del extracto acuoso de Romero sobre el daño al ADN en pacientes DM tipo 2 (DM2). **Materiales y Métodos:** Se estudiaron 16 individuos con DM2 de la comunidad de San Pedro, Zacatecas, los cuales dieron su autorización mediante consentimiento informado. Se tomaron muestras de mucosa bucal a los 0, 15, 30 días del tratamiento con el extracto acuoso de Romero (5g de hojas de Romero en 1L de agua por día). Se determinó el número de micronúcleos (MN) y anomalías nucleares mediante microscopía de fluorescencia. **Resultados:** El daño al ADN disminuyó conforme aumentó el tiempo de consumo del Romero (1.19 ± 0.65 MN al tiempo cero, 0.33 ± 0.48 MN a los 15 días y 0 MN a los 30 días de tratamiento), también se presentó disminución en los marcadores de citotoxicidad específicamente cromatina condensada y kariorexis. **Conclusiones:** De acuerdo a los resultados, el extracto acuoso de Romero presenta efecto antimicronucleogénico y citoprotector en pacientes con DM2.

PALABRAS CLAVE: *Rosmarinus officinalis*; diabetes mellitus tipo 2, micronúcleos; citotoxicidad.

ANTI-MICRONUCLEOGENIC AND CYTOPROTECTIVE EFFECT OF ROSEMARY (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) AQUEOUS EXTRACT IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE II

ABSTRACT

Introduction: Diabetes Mellitus (DM) is a public health problem. DM has been associated with increased production of free radicals, which can induce oxidative DNA damage. Recently the use of medicinal plants has increased for their potential as alternative therapies, within plants with antioxidant effect it is noteworthy the Rosemary (*Rosmarinus officinalis*). The objective of this study was to determine the effect of Rosemary aqueous extract intake on the DNA damage in patients with Diabetes Mellitus Type II (DM2). **Methodology:** 16 individuals with DM2 from the community of San Pedro, Zacatecas were studied, they gave their authorization by informed consent. Buccal mucosa samples were taken at 0, 15, and 30 days of treatment with the rosemary aqueous extract (5g of Rosemary leaves in 1L of water per day). The number of micronucleus (MN) and nuclear abnormalities were determined via fluorescence microscopy. **Results:** DNA damage decreased as the time of consumption of Rosemary extract increased (1.19 ± 0.65 MN at zero days, 0.33 ± 0.48 MN at 15 days, and 0 MN at 30 days of treatment). Additionally a decrease also occurs in cytotoxicity markers, specifically condensed chromatin and kariorexis. **Conclusions:** According to the results, the Rosemary aqueous extract presents anti-micronucleogenic and cytoprotective effect in patients with DM2.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, Type II Diabetes mellitus, micronuclei, cytotoxicity.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es considerada un problema mundial de salud, debido al incremento en su incidencia y prevalencia. En México la prevalencia de la DM es del 9,2%. (1) La DM se caracteriza por niveles elevados de glucosa en sangre, resultado de una disminución en la producción de insulina o resistencia de la misma. (2,3)

La hiperglucemia generada en la diabetes favorece el incremento de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la autooxidación de la glucosa, la vía de los polioles, la glicación no enzimática de proteínas, la vía de las pentosas fosfato, la generación de productos de glicación avanzada (AGE), niveles eleva-

dos de ácidos grasos y la reducción de las defensas antioxidantes, lo que conlleva al incremento del estrés oxidativo (EOx). (4) Un estado de EOx, induce en la célula efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, citotoxicidad y apoptosis. Las ERO están implicadas en varias etapas del proceso carcinogénico. Los radicales peroxilo y la peroxidación lipídica pueden causar mutaciones sobre el ADN de forma independiente, dando inicio el proceso carcinogénico. Los fitoquímicos con propiedades antioxidantes pueden modular la iniciación de proceso de carcinogénesis mediante la protección contra el daño del ADN. (5)

Dentro de las plantas a las cuales se les ha adjudicado efecto antioxidante se encuentra el Romero (*Rosmarinus officinalis*). El

Romero es una planta aromática, empleada como condimento y medicinal originaria del Mediterráneo, llegando a crecer hasta 5 pies de altura. Existen reportes del efecto antiproliferativo del Romero en células de cáncer de ovario, colón, próstata y mama. (6-9) El efecto antiproliferativo del Romero se le atribuye a sus componentes terpenoides (carnosol, ácido carnósico, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol y 7-metil-epirosmanoque). (10)

Existen diferentes ensayos para determinar el daño al ADN, dentro de los cuales se encuentra el ensayo de micronúcleos (MN) y anomalías nucleares (AN) en mucosa bucal. Las alteraciones más sugestivas en la morfología de las células neoplásicas son modificaciones en el tamaño, densidad y distribución de la cromatina. Entre las AN que se pueden distinguir de células normales se encuentran la cromatina condensada (CC), cariorrexis (CR), núcleo picnótico (NP), cariólisis (CL), núcleo lobulado o también llamado prolongación nuclear (PNL), y la presencia de células con dos núcleos, llamadas células binucleadas (BN). (11-13)

En base a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la ingesta del extracto acuoso de Romero sobre el número de MN y AN en pacientes con DM tipo 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio cuasi-experimental de series temporales en el centro de salud de Ciudad Cuauhtémoc, Zacatecas, México. Se seleccionaron 30 individuos con diagnóstico de DM tipo 2 de acuerdo a los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA). (14) De los 30 individuos seleccionados solo 16 individuos concluyeron el estudio. Todos los participantes pertenecen al centro de salud de Ciudad Cuauhtémoc, Zacatecas, México, los cuales dieron su autorización bajo consentimiento informado. Los criterios de inclusión fueron: pacientes con diagnóstico de DM tipo 2 de acuerdo a la ADA, con cifras de glucosa capilar en ayunas superiores a 250 mg/dL y con más de 5 años de evolución de la enfermedad. Los criterios de exclusión fueron: pacientes que decidieran no continuar en el estudio y que no firmaran el consentimiento informado.

A todos los participantes se les realizó una historia clínica que contempló una ficha de identificación, antecedentes familiares, personales patológicos y no patológicos. A los participantes se les adicionó terapia alternativa con té de hojas de Romero a razón de 5g de hojas en un litro por día durante 30 días y se realizaron tomas de muestras de mucosa bucal para la cuantificación del número de MN y AN a los 0, 15 y 30 días de iniciar la terapia alternativa. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Etnofarmacología de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. El trabajo fue realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital General de Salud del estado de Zaca-

tecas con registro 003/CEB2015. A todos los participantes se les entregó una caja con 30 bolsas de hojas de Romero (5g por bolsa) y se les indicó que deberían adicionar una bolsa en un litro de agua hirviendo (hervir 3 minutos) y posteriormente pasarlo por un colador para eliminar las hojas de Romero. También, se les indicó que el té lo podrían consumir como agua de uso durante el día, ya sea fría o caliente. Antes de la toma de muestra de mucosa bucal, se solicitó a los participantes que se enjuagaran la boca con agua, posteriormente con un portaobjetos se hizo un raspado de la mucosa bucal de ambas mejillas y se realizó el extendido de la muestra. Las muestras se dejaron secar al aire, se fijaron en metanol absoluto durante 48 h, y se tiñeron con naranja de acridina (CAS no. 10127023 Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Las muestras fueron observadas con el objetivo 100x en un microscopio marca Olympus modelo CX40, con sistema iluminador de fluorescencia OLYMPUS modelo CX-RFLT50 (lámpara de mercurio 50W y filtro de fluorescencia azul DMB-2 OLYMPUS). Se contaron las células con MN y AN incluyendo células con CC, CR, NP, CL, PNL en 2,000 células por muestra. Los criterios utilizados para la identificación de las células con MN, así como AN fueron de acuerdo a los descritos por Bolognesi y col. en el 2013. (13) Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de rangos de Wilcoxon, empleando el paquete estadístico SPSS (v.20) para Windows®; los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

La edad promedio de los participantes fue de 45 ± 8 años, de los cuales 13 pertenecían al sexo femenino y 3 al sexo masculino. Los 16 participantes manifestaron el consumo de café y solo dos participantes declararon consumir tabaco y alcohol. Once de los participantes manifestaron problemas visuales previos al estudio, siendo los más frecuentes la miopía y el astigmatismo (43,75%).

Los resultados obtenidos del número de MN y AN a los diferentes tiempos se muestran en el cuadro 1. El número de células con MN en los pacientes antes de iniciar la terapia con el extracto acuoso de Romero fue de 1.18 ± 0.65 células con MN, este número disminuyó significativamente de forma tiempo dependiente hasta llegar a cero a los 30 días del consumo del extracto acuoso de las hojas de Romero (Tabla 1).

También el número de células BN, CR y CC disminuyeron estadísticamente con respecto al número basal (antes de iniciar la terapia con el extracto acuoso de Romero), siendo esta disminución tiempo dependiente (Gráfico 1).

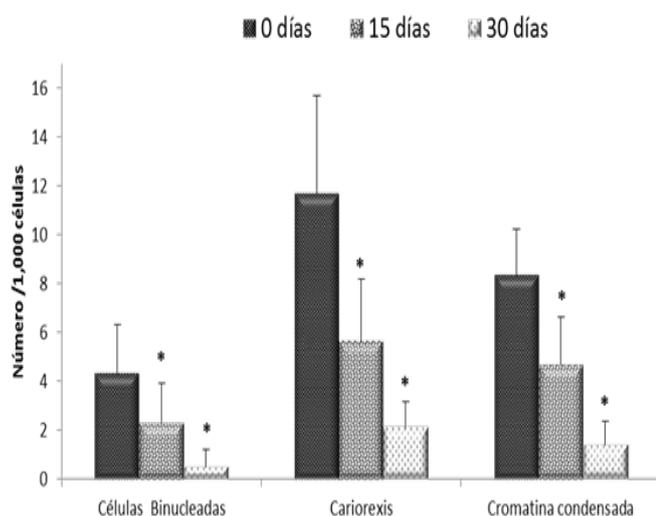
Tabla 1. Micronúcleos y anomalías nucleares en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 a los 0, 15 y 30 días de la ingesta del extracto acuoso de Romero.

	Tiempo de la ingesta del extracto acuoso de Romero.			Valor de p
	0 días	15 días	30 días	
Células con MN	1.18 ± 0.65	0.33 ± 0.48	0	^a 0.005, ^b 0.004
Células con PNL	0.125 ± 0.35	0	0	NS
células con BN	4.31 ± 1.99	2.26 ± 1.66	0.5 ± 0.7	^a 0.004, ^b 0.005
Células con CL	1.75 ± 2.14	3.73 ± 2.54	3.3 ± 2.6	NS
Células con CR	11.68 ± 4.01	5.6 ± 2.58	2.11 ± 1.05	^a 0.001, ^b 0.008
Células con NP	0.125 ± 0.5	0	0	NS
Células con CC	8.31 ± 1.92	4.66 ± 1.98	1.4 ± 0.96	^a 0.001, ^b 0.005

Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar/1000 células. MN: micronúcleos; PN: prolongación nuclear; BN: binucleada; CL: cariólisis; CR: cariorrexis; CC: cromatina condensada; PIC: picnosis. Las comparaciones fueron: a0 días vs 15 días; b0 días vs 30 días. NS: no significativo

Las AN, PNL y NP, sólo se observaron antes de iniciar la terapia con el extracto acuoso de Romero (0.125 ± 0.35, 0.125 ± 0.5 respectivamente), después de iniciar la fitoterapia (15 y 30 días), no se observó la presencia de estas anomalías en ninguno de los participantes (Cuadro 1).

Gráfico 1. Número de células binucleadas, cariorrexis y cromatina condensada a los diferentes tipos de muestreo.



DISCUSIÓN

En el presente estudio se evidenció una disminución estadísticamente significativa, tiempo dependiente, en el número de MN y AN (células con CR, CC, NP, BN y PN) después de la ingesta del extracto acuoso de las hojas de Romero. Esta disminución en el número de MN y AN se puede deber al efecto antioxidante del Romero. En los pacientes con DM hay un incremento del EOX, lo que coloca a la célula en riesgo de iniciar

un proceso carcinogénico debido a eventos mutagénicos; los metabolitos antioxidantes del Romero (ácidos fenólicos, flavonoides, pigmentos naturales y terpenos), pueden contrarrestar los efectos oxidantes de los radicales libres en las células, disminuyendo el riesgo de daño. (15)

Existen reportes que demuestran la implicación de los terpenos en la prevención y tratamiento de diferentes tipos de cáncer. (16-20) Los diterpenos más comunes presentes en el Romero son carnosol, ácido carnósico, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol y 7-metil-epirosmanol; sin embargo, más del 90% de la actividad antioxidante del romero se atribuye al ácido carnósico y carnosol. (21) Estudios in vitro, así como experimentos en modelos animales han puesto de manifiesto que el carnosol inhibe la carcinogénesis inducida experimentalmente y exhibe potencial anti-oxidante, anti-inflamatorio, antiproliferativo y propiedades de inducción de apoptosis. Por otra parte, el carnosol potencia la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos quimiorresistentes. (22) También, se ha descrito el efecto protector del ácido elágico sobre la formación de MN inducido por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en células de mamífero en ensayos in vitro e in vivo. (23)

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Franke y col, quienes estudiaron el efecto de la ingesta de ácido ascórbico sobre los niveles de glucosa, hemoglobina glucosilada, daño al ADN y citotoxicidad en sujetos pre diabéticos y con DM tipo 2. (24) Sus resultados mostraron reducción en la citotoxicidad asociada con hiperglucemia en los individuos de estudio. Por otro lado, Farghaly y Hassan describieron que el extracto metanólico de *Termis Lupinus* disminuye el daño al ADN, al disminuir la frecuencia de MN y aberraciones cromosómicas de forma dosis dependiente en ratones con diabetes inducida por alloxan. (25)

A su vez, en un estudio previo, se evaluó el efecto de la ingesta de ácido fólico sobre el daño al ADN y el estrés oxidativo en pacientes con DM tipo 2, mostrando decremento en el número de MN después de la ingesta del ácido fólico así como del estrés oxidativo. (26)

Dentro de nuestras limitaciones tenemos al escaso número de participantes; además, no se pudo evaluar otras dosis del extracto acuoso de Romero y no se precisó la terapia farmacológica de los participantes; sin embargo, ello nos da indicios de posibles efectos favorables en pacientes con diabetes para continuar realizando futuras investigaciones.

En conclusión, nuestro estudio demostró un efecto antimutageno y citoprotector de la ingesta del extracto acuoso de Romero en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2. Lo cual evidencia un efecto antioxidante; y por lo tanto protector, para las células de estos pacientes.

Correspondencia:

Dra en Ciencias. Blanca Patricia Lalalde Ramos
blancalalalde@gmail.com

Recibido: 04/07/16

Aprobado: 17/08/16

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ENSANUT 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 [online]. [Citado 9 mayo 2016]. Disponible en: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
2. Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, García E, Valles V, Ríos-Torres JM, et al. Prevalence and characteristics of early-onset type 2 diabetes in Mexico. *Am J Med.* 2013;113(7):569-574
3. Rochett L, Zelle M, Cottis Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(9):2709-2729.
4. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013; 93(1):137-188.
5. Zhang YJ, Gan RY, Li S, Zhou Y, Li AN, Xu DP, et al. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases *Molecules.* 2015;20(12):21138-56.
6. Tai J, Cheung S, Wu M, Hasman D. Antiproliferation effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine.* 2012;19:436-443.
7. Valdés A, García-Cañas V, Rocamora-Reverte L, Gómez-Martínez A, Ferragut JA, et al. Effect of rosemary polyphenols on human colon cancer cells: transcriptomic profiling and functional enrichment analysis. *Genes Nutr.* 2013;8:43-60.
8. Petiwala SM, Puthenveetil AG, Johnson JJ. Polyphenols from the Mediterranean herb rosemary (*Rosmarinus officinalis*) for prostate cancer *Front. Pharmacol.* 2013;4:29.
9. González-Vallinas M, Molina S, Vicente G, Sánchez-Martínez R, Vargas T, et al. Modulation of estrogen and epidermal growth factor receptors by rosemary extract in breast cancer cells *Electrophoresis.* 2014;35:1719-1727.

10. Parikh NR, Mandal A, Bhatia D, Siveen KS, Sethi G, et al. Oleane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. *Phytochem Rev.* 2014;13(4):793-810.
11. Tomas P, Halland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2009;4:825-837.
12. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, et al. The Human MicroNucleus project on eXfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res.* 2011;728(3):88-97.
13. Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res.* 2013;753(2):100-13.
14. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. In *Standards of Medical Care in Diabetes—2015.* *Diabetes Care.* 2015;38(Suppl. 1):S8-S16.
15. Arouma O. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Rad Biol Med.* 1996;20(5):675-705.
16. Rabi T, Bishayee A. Terpenoids and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115(2):223-239.
17. Thoppil RJ, Bishayee A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer *World J. Hepato.* 2011;3(9):228-49.
18. Shanmugam MK, Dai X, Kumar AP, Tan BK, Sethi G, Bishayee A. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(11):1579-87.
19. Parikh NR, Mandal A, Bhatia D, Siveen KS, Sethi G, et al. Oleane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. *Phytochem Rev.* 2014;13(4):793-810.
20. Petiwala SM, Johnson JJ. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer Lett.* 2015;367(2):93-102.
21. Aruoma OI, Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica.* 1992;22(2):257-68.
22. Chun KS, Kundu J, Chae IG, Kundu JK. Carnosol: a phenolic diterpene with cancer chemopreventive potential. *J Cancer Prev.* 2014;19(2):103-10.
23. Berni A, Grossi MR, Pepe G, Filippi S, Muthukumar S, et al. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in vitro assays and in vivo. *Mutat Res.* 2012;746(1):60-5.
24. Franke SI, Müller LL, Santos MC, Fishborn A, Hermes L, et al. Vitamin C intake reduces the cytotoxicity associated with hyperglycemia in prediabetes and type 2 diabetes. *Biomed Res Int.* 2013;2013:896536.
25. Farghaly AA, Hassan ZM. Methanolic extract of *Lupinus termis ameliorates* DNA damage in alloxan-induced diabetic mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16(3):126-32.
26. Lalalde-Ramos BP, Zamora-Perez AL, Sosa-Macias M, Guerrero-Velázquez C, Zúñiga-González GM. DNA and oxidative damages decrease after ingestion of folic acid in patients with type 2 diabetes. *Arch Med Res.* 2012;43(6):476-81.