

DETERMINACIÓN GENOTÓXICA DEL EXTRACTO TOTAL DICLOROMETÁNICO DE CORTEZA DE *GALIPEA LONGIFLORA* KRAUSE, MEDIANTE EL TEST DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA (SMART)

*Pseidy L. Mamani, Mónica Gonzales, Araceli Pillco, Alberto Giménez, Eduardo L. Gonzales**

Área de Farmacología - Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas-IIFB, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Casilla 3239, La Paz, Bolivia.

Autor corresponsal eduardo.gonzales@gmail.com

Key words: Genotoxicidad, *Drosophila melanogaster*, SMART, *Galipea longiflora* K.

ABSTRACT

Genotoxic determination on the stem bark methylene chloride total extract from *Galipea longiflora* Krause through the mutation and recombination somatic test (SMART).

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la actividad genotóxica del extracto total diclorometánico de corteza de Evanta (*Galipea longiflora* Krause), mediante la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) versión alas, que emplea a *Drosophila melanogaster* como organismo experimental. Larvas de tercer instar procedentes de los cruces Estándar (con bioactivación normal) y Alta bioactivación (con incremento del citocromo P-450) fueron tratadas con concentraciones de 30, 60, 125, 250 y 500 ug/mL del extracto y un control negativo, que fue el diluyente. Los resultados obtenidos mediante el estadístico de Kastenbaum-Bowman ($\alpha=0,05$), sugieren que el extracto diclorometánico de Evanta no produce daño genotóxico, a las concentraciones evaluadas mediante la prueba SMART, en las condiciones experimentales empleadas en el presente trabajo.

INTRODUCCIÓN

Galipea longiflora K. de la familia Rutaceas es un árbol que crece en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos en los departamentos de Beni y La Paz en Bolivia^{3, 22}. En medicina tradicional esta especie se encuentra registrada en farmacopeas tradicionales, como planta medicinal antiparasitaria (leishmanicida) empleada por las etnias Tacana Mosekene y Tsimane¹⁶.

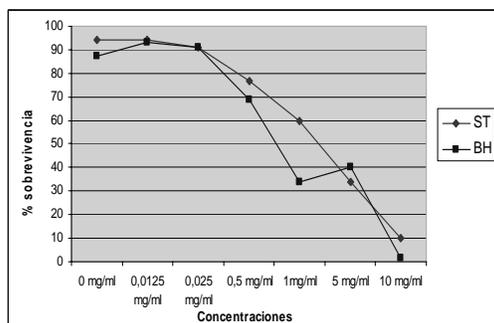
Debido a su potente actividad leishmanicida, en 1985-91 fue estudiada por un grupo de investigadores Franco – Boliviano que demostró su actividad antiparasitaria, aislando e identificando 12 alcaloides quinolínicos, presentes en las hojas, corteza y raíz de esta especie^{10, 11, 26}. El IIFB, dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, de la U.M.S.A, ha desarrollado estudios de especies vegetales con actividad antiparasitaria, entre ellas Evanta, la cual actualmente se encuentra en estudios de fase clínica. Para este fin se desarrollaron estudios farmacológicos pre-clínicos, de toxicidad aguda^{8, 9},¹⁴ y subcrónica, toxico-cinéticos, hematológicos e histopatológicos, entre otros¹⁶. Considerando que actualmente, no solo es necesario desarrollar estudios de toxicidad (aguda, sub-crónica y crónica)⁵ sino también estudios genotoxicológicos, en el presente trabajo se evaluó la actividad genotóxica de Evanta, a través de la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART), prueba *in vivo* que detecta no solo al mutágeno de acción directa e indirecta, sino también la actividad recombinogénica de los compuestos químicos¹⁷, este último mecanismo genotóxico es conocido por estar involucrado en el origen de ciertas enfermedades y algunos tipos de tumores humanos¹⁷. SMART está basada en la pérdida de heterozigocidad, detectada por dos marcadores genéticos *mwh* y *flr*, originados por mutaciones puntuales, deleciones, recombinaciones mitóticas, pérdida de cromosomas y no disyunción²⁹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la Toxicidad de Evanta mediante la Prueba SMART

En la evaluación de la toxicidad del extracto diclorometánico de Evanta, se observó que el porcentaje de mortalidad de los individuos tratados, es directamente proporcional a la dosis del extracto, como se observa en la Gráfica 1. A 10 mg/mL el porcentaje de sobrevivencia no supera el 10% en ambos cruces, a partir de 0.5 mg/mL el porcentaje de sobrevivencia de individuos es de 76.5% para el cruce ST y 69% para el de HB, manteniéndose la sobrevivencia por encima del 80% en las concentraciones inferiores a 0.5 mg/mL. El extracto de Evanta posee la capacidad de incrementar la mortalidad de individuos a las máximas concentraciones analizadas, presumiblemente debido a los componentes del extracto, que constan aproximadamente en un 50% de alcaloides quinolínicos y 25% de 2-fenilquinolina¹⁶. Se debe considerar que en general los alcaloides son sustancias altamente tóxicas, tal es el caso del alcaloide Cryptolepine presente en *Cryptolepis sanguinolenta*, donde el extracto acuoso de corteza posee una potente actividad tóxica frente a una variedad de células de mamíferos *in vitro*, e induce mutación en locus *hprt* y micronúcleos¹. Otro conocido alcaloide que reporta efectos tóxicos a altas concentraciones es la quinina, empleada como tratamiento de primera línea contra la malaria, considerada como veneno a altas dosis y con efectos tóxicos secundarios a dosis moderadamente elevadas²³. Es por todo ello que se plantea que el alto porcentaje de alcaloides en el extracto, podría ser responsable de los resultados obtenidos con las concentraciones mayores a 0.5 mg/mL del extracto de Evanta evaluadas mediante SMART. Debido a que las concentraciones inferiores a 0.5 mg/mL mantuvieron una sobrevivencia de individuos mayor al 80%, se considera a estas concentraciones del extracto de *Galipea longiflora* K. como sub tóxicas.

Gráfico 1: Comparación de la toxicidad del extracto de *Galipea longiflora* K. a concentraciones de 0.0125, 0.025, 0.5, 1, 5 y 10 mg/mL en los cruces ST y HB



Los resultados obtenidos de toxicidad, no limitan el empleo de *Galipea longiflora* K. o sus principios activos como alternativa terapéutica, debido a que las concentraciones del extracto que inhiben el 50% de los promastigotes de *Leishmania* (IC_{50}), oscilan entre 76.5 y 125 ug/ml para el extracto orgánico de corteza¹⁶, las cuales están dentro de las concentraciones sub tóxicas analizadas mediante SMART.

Evaluación del Potencial Genotóxico de Evanta mediante la Prueba SMART

Los resultados de la evaluación genotóxica del extracto diclorometánico de Evanta se muestran en la Tabla 1, donde para el cruce ST Tabla 1(A) se observa una frecuencia de 1.16 Mancha Simple Pequeña (MSP)/mosca en el control negativo (CN) y 1 MSP/mosca para la máxima concentración del extracto que es de 500 ug/mL. La observación de una baja frecuencia de MSP/mosca en las cinco concentraciones del extracto evaluadas, nos indica que los componentes del extracto no son de acción directa, puesto que cuando un compuesto actúa de manera directa normalmente se producen daños genéticos tardíos, esto debido a que los compuestos necesitan activarse para poseer actividad genotóxica, dando como expresión fenotípica la formación de mayor número de MSP en relación a las MSG, las cuales se presentan cuando el compuesto actúa en las etapas iniciales de división mitótica, por lo cual no pasa por activación para ejercer su efecto². Los resultados negativos en todas las series tratadas para el Total de manchas (TM) en el cruce ST, muestran que el extracto no es capaz de producir mutación puntual, no-disyunción, delección ni recombinación, sugiriendo así que el extracto no posee actividad mutágena directa mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática. Según los datos obtenidos en el cruce de HB mostrados en la Tabla 1(B), se observa que para el CN en un total de 30 individuos analizados se encontró una frecuencia de 1.40 MSP/mosca, la cual es superior a las frecuencias de MSP obtenidas en todas las series tratadas con el extracto, para MSG los resultados obtenidos en las concentraciones de 30, 125, 250 y 500 ug/mL son negativos y para 60 ug/mL inconcluso. Considerando que el cruce HB posee un nivel elevado del sistema citocromo P-450 en comparación al cruce ST, estos resultados sugieren que los compuestos presentes en el extracto al pasar por la ruta metabólica vía citocromo P-450 se convierten en metabolitos menos activos, que aquellos que no sufren metabolización, mostrando

así que el extracto no posee capacidad pro-mutágena.

Tabla I. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de *Galipea longiflora* K. mediante el cruce Estándar y Alta Bioactivación

Genotipos y Conc. (ug/ml)	N. de moscas (N)	Manchas por mosca (No. de manchas) diag. estadístico				Total Manchas mwh ^c (n)				
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2					
(A) Cruce Estándar:										
mwh/flr ^c										
Contr. Neg.	32	1,1 6	(3 7)	0,1 3	(0 4)	0,0 3	(0 1)	1,3 1	(4 2)	41
30	20	0,4 5	(0 9)	0,1 0	(0 2)	0,0 i	(0 0)	0,5 i	(1 1)	11
60	20	0,9 0	(1 8)	0,2 0	(0 4)	0,0 i	(0 0)	1,1 i	(2 2)	22
125	20	0,5 5	(1 7)	0,1 0	(0 2)	0,0 i	(0 0)	0,6 i	(1 3)	13
250	20	0,8 5	(1 7)	0,2 0	(0 5)	0,0 i	(0 0)	1,1 i	(2 2)	22
500	20	1,0 0	(2 0)	0,0 0	(0 1)	0,1 i	(0 2)	1,1 i	(2 3)	21
(B) Cruce Alta Bioactivación:										
mwh/flr ^c										
Contr. Neg.	30	1,4 0	(4 2)	0,2 3	(0 7)	0,0 0	(0 0)	1,6 3	(4 9)	49
30	20	0,5 5	(1 1)	0,0 0	(0 0)	0,0 i	(0 0)	0,5 i	(1 1)	11
60	20	1,3 5	(2 7)	0,3 0	(0 6)	0,0 i	(0 1)	1,7 i	(3 4)	30
125	20	1,1 5	(2 3)	0,1 0	(0 2)	0,0 i	(0 0)	1,2 i	(2 5)	25
250	20	0,3 0	(0 6)	0,0 0	(0 1)	0,0 i	(0 0)	0,3 i	(0 7)	7
500	20	0,6 5	(1 3)	0,1 0	(0 2)	0,0 i	(0 0)	0,7 i	(1 5)	15

^aDiagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia a = b = 0,05.
^bIncluso las manchas simples flr³ raras.
^cConsiderando los clones mwh para las manchas simples mwh y para las manchas gemelas.

Es importante esta observación pues existen compuestos que reportan resultados negativos en el cruce ST, detectándose su actividad mutágena solo mediante al cruce HB, tal es el caso de nitro derivados¹⁸, aceites esenciales como el Safrol y Eugenol, que son genotoxinas de acción indirecta²⁵. Un comportamiento similar al observado en el extracto de Evanta, es reportado por Perez- Chiesa (1993), quien evaluó el potencial genotóxico de indenoioquinolina análogo de clorhidrato de nitidina y el clorhidrato de faragonina, en *Drosophila melanogaster*, ambos compuestos presentan efectos tóxicos a concentraciones elevadas, pero no incrementos estadísticamente significativos en la frecuencia de manchas para el análogo de nitidina. Sugiriendo que estos compuestos no son mutágenos para larvas de *Drosophila melanogaster* a todas las concentraciones evaluadas, los resultados con los análogos de clorhidrato de faragonina fueron ambiguos, una baja mutagenicidad es detectada a 2 mM pero no a 5 mM o 10 Mm²⁷.

Debido a que la frecuencia de manchas gemelas tanto en el cruce ST como HB son escasas y en muchos casos nulas, se descarta la posibilidad de considerar al extracto de Evanta como agente recombinogénico, mediante la Prueba SMART.

Los componentes del extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* K. dan una respuesta negativa en las frecuencias para el TM en ambos cruces, debido a ello se considera a este extracto no genotóxico mediante la Prueba de Mutación y Recombinación Somática.

CONCLUSIONES

- Al determinar las concentraciones sub-tóxicas del extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* K. observamos que la sobrevivencia de individuos disminuye de forma proporcional al incremento de la concentración del extracto, dando un 10% de sobre vivencia a la máxima concentración para el cruce ST y un 1.5% de sobre vivencia a la misma concentración para el cruce HB. Sin embargo la sobre vivencia de individuos se mantiene entre el 80% al 95% a concentraciones de 30,60, 125, 250, 500 ug/mL del extracto.
- Mediante los cruces ST y HB, se observa que el extracto total de corteza diclorometánico de *Galipea longiflora* Krause, a las concentraciones de 30, 60, 125, 250, 500 ug/mL, no posee actividad genotóxica directa ni indirecta, por lo que sugerimos que el extracto no es genotóxico por si mismo, ni posee actividad pro-mutágena, mediante la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART). Por lo tanto no es capaz de producir daños mutagénicos, aneugénico, ni recombinogénicos en el material genético.

EXPERIMENTAL

Material vegetal

Se empleó el extracto total crudo diclorometánico de corteza de *Galipea longiflora* Krause, el cual se obtuvo mediante extracción continua (soxhlet), de 25 g. de corteza de Evanta finamente molida, con CH₂Cl₂ (250 mL) por 2.5hr. El extracto obtenido, mediante rota-evaporación (120rpm y 40 °C) fue secado con bomba de alto vacío, hasta peso constante. El rendimiento de la extracción fue de 3.7% (corteza), con relación al peso seco de la planta¹⁶. Este extracto fue proporcionado por el Área de fotoquímica del I.I.F.B.

SMART versión alas

Tres linajes de *Drosophila melanogaster* fueron empleadas: (1) flr³ /In (3LR) TM, .ri p⁹sepn

I(3)89Aabx^{34e} & Bd^s (2) ORR/ORR: flr³ /ln (3LR) TM, .ri p^psepn I(3)89Aabx^{34e} & Bd^s (3) mwh/mwh, para una información detallada de los linajes ver Lindsley and Zimm²⁴. Huevos derivados del cruce Estándar (ST), donde hembras vírgenes *flr³* se cruzaron con machos *mwh*; y Alta bioactivación (HB), donde hembras vírgenes del linaje ORR cruzaron con machos *mwh*, fueron colectados por 8 hrs. En medio de ovoposición²⁰, tres días después las larvas provenientes de ambos cruces fueron trasladadas a frascos que contenían 1.5 g de *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply Burlington, NC. U.S.A.) rehidratadas con 5 mL de la solución a evaluar. El control negativo fue el solvente. Las larvas se alimentaron de este medio hasta llegar a su fase de pupación (aproximadamente 48 Hrs.). Las moscas adultas que emergieron fueron colectadas y conservadas en etanol al 70%. Las alas de estas moscas fueron fijadas con solución de faure y analizadas (según técnica descrita por Graf) bajo magnificación microscópica de 460 X, donde se observaron el número, tipo y tamaño de las manchas mutantes. Se contó (1) Mancha pequeña: una o dos células afectadas, mancha simple; (2) Mancha grande: más de dos células afectadas, mancha simple; 1 y 2 pueden ser del fenotipo *mwh* o *flr* y (3) Mancha Gemela: fenotipos *mwh* y *flr* juntos en una misma mancha²¹.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del análisis de alas, se sometieron al test Binomial condicional de Kastenbaum – Bowman, el cual indica: una respuesta positiva, negativa e inconclusiva, según las hipótesis planteadas¹².

AGRADECIMIENTOS

A Intercampus por el proyecto “Controles de Identidad, Calidad y Seguridad de Plantas Medicinales y Fitomedicamentos en el Sistema de Salud Boliviano”, de la Agencia de Cooperación Española y a la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por el apoyo económico y asesoramiento brindado en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. ANSAH, C, KHAN, A. GOODERHAM, N.J. *Toxicology*, **2005**, 1; 208(1):141-7.

2. AZTURIZAGA VALDIVIA KAREN. Tesis de Licenciatura. Carrera de Biología. UMSA. **2005**
3. BOURDY, G., CONBES, I., VARIOS OTROS COAUTORES. Plantas del Chaco II. Usos tradicionales Izoceño-Guarani”. Editores: UMSA; Fundación KAA IYA; IRD; WCS Bolivia; HNB; CYTED; OEA; Ediciones SIRENA color, Santa Cruz, Bolivia, **2002**, 10-441.
4. DE LA PEÑA E. Y GÓMEZ E. Toxicología Ambiental: Seguridad Química. ed. Asociación Española de Toxicología. CD-ROM. Madrid, **2005**
5. DÍAZ GARCÍA GLADYS MARÍA Trabajo para optar por el Título de Master en Medicina Tradicional y Natural. Instituto Superior de Ciencias Médicas “Carlos J. Finlay” Camagüey, **2002**.
6. FOURNET, A, FERREIRA, M.E, ROJAS DE ARIAS, A, TORRES DE ORTIZ, S, FUENTES, S, NAKAYAMA, H, SCHININI, A, HOCQUEMILLER, R. *Antimicrob Agents Chemother*, **1996**, 40(11):2447-51.
7. FOURNET, A.; ANGELO, A.; MUÑOZ, V. *Journal of Ethnopharmacology*, **1994**, 41, 19-37
8. FOURNET, A.; ANGELO, A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLLOT, F.; CAVE, A.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J., *Phytotherapy Research*, **1994**, 8,174-178.
9. FOURNET, A.; GANTIER, J.C.; GAUTHERET, A.; LEYSALLES, L.; MUNOS M.H.; MAYRARGUE, J.; MOSKOWITZ, H.; CAVE, A.; HOCQUEMILLER, R.; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **1994**, 33,537-544.
10. FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLLOT, F.; CAVE, A.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. *Journal of Natural Products*, **1993**, 56, 1547 – 1552
11. FOURNET, A.; VAGNEUR, B.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. *Can. J. Chem.*, **1989**, 67, 2116 – 2118.
12. FREI, H. & WURGLER, F. *Mutat. Res*, **1988**, 203: 297-308.
13. FROLICH, A, WURGLER, FE. *Mutat Res.*, **1990**, 234(2): 71-80.
14. GANTIER, J.C, et al *Planta Medica*, **1996**, 62 3: 285-286
15. GIMÉNEZ TURBA ALBERTO. (2004) http://www.latinpharma.net/expo2004/documentos/gimenez_e.html.

16. **GIMÉNEZ**, A., AVILA, J. A., RUIZ, G., PAZ, M., UDAETA, E., TICONA, J.C., SALAMANCA, E., PAREDES, C., RODRÍGUEZ, N., QUINTS, K., FERAUDY, C., GUTIÉRREZ, I., CHUQUI, R., QUENEVO, C., DALENCE, M. F. Y BASCOPE, M. *Revista Boliviana de Química.*, **2005**, Vol.22. N°1. 94-107.
17. **GRAF**, U, ALONSO-MORAGA, A, CASTRO R, DÍAZ CARRILLO, E. *Fdn Chem Toxic*; **1994**, Vol 32. N° 5. 423-430.
18. **GRAF**, U., SPANÓ, M., GUZMÁN, J., ABRAHAM, S., ANDRADE, H. *African Newsletter*, **2000**.
19. **GRAF**, U., WILD, D., WURGLER, F.E. *Mutagenesis*, **1992**, 7(2):145-9.
20. **GRAF**, U., WÜRGLER, E., KATZ, J., FREI, H., JUON, H., MAY, B., AND KALE G. *Enviromental mutagenesis*, **1984**, 6. 153-188.
21. **IDAOMAR**, M., EL HAMSS, R., BAKKALI, F., MEZZOUG, N., ZHIRI, A, BAUDOUX, D., MUÑOZ-SERRANO, A., LIEMANS, V. AND A., ALONSO-MORAGA. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **2002**, Volume 513, Issues 1-2. 61-68.
22. **KILLEEN**, T., GARCIA, E., STEPAHN, B. Guía de Árboles de Bolivia Editorial Quipus S.R.L., La Paz, Bolivia, **1993**. 709-710.
23. **LANGFORD**, N.J., GOOD, A.M., LAING, W.J., BATEMAN, D.N. *Br J Clin Pharmacol.*, **2003**, 56(5):576-8.
24. **LINDSLEY**, D.L., ZIMM, G.G., *Academic Press, San Diego*, CA, 1992, p. 1133.
25. **MUNERATO**, M. C., SINIGAGLIA, M., REGULY M. L. AND RODRIGUES DE ANDRADE H. H., **2005**.
26. **MUNOS**, MH, MAYRARGUE, J, FOURNET, A, GANTIER, JC, HOCQUEMILLER, R, MOSKOWITZ, H. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 42(9):1914-6. *Erratum in: Chem Pharm Bull.*, **1994**, 42(12):2665.
27. **PEREZ-CHIESA**, Y, NARVAEZ, Z. *Mutat Res.*, **1993**. 301(4):207-12.
28. **PILLCO** ARACELI, Evaluación del Potencial Genotóxico de *Bacharis latifolia* (Especie vegetal empleada en la medicina tradicional boliviana). Tesis de licenciatura Facultad de Biología. UMSA., **2003**.
29. **VOGEL E.** & ZIJLTRA J. *Mutat. Res.*, **1987**, 182: 243-264.