

ARTÍCULO ORIGINAL

**EVALUACIÓN DEL EFECTO
GENOTÓXICO DEL EXTRACTO
ACUOSO DE *Maytenus ilicifolia* en
Drosophila melanogaster UTILIZANDO
LA TÉCNICA DE SMART¹**

*EVALUATION OF GENOTOXIT EFFECTS OF
Maytenus ilicifolia in Drosophila melanogaster
USING SMART MODEL.¹*

Luís Francisco Marín Insfran²

Tomás López Arias²

Rodrigo Cabral Vera²

Cinthia Rivarola²

Elvio Gayozo²

1 Trabajo presentado por la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y financiado con rubros del Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción durante el año 2012.

2 Docentes. Laboratorio de Mutagénesis Ambiental- Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

RESUMEN

Las plantas medicinales son ampliamente utilizadas para el tratamiento de diversas afecciones, en el Paraguay, especialmente en zonas rurales, las mujeres utilizan el *Maytenus ilicifolia* (Cangorosa) como un método de control de la fertilidad, además se mencionan sus efectos antiinflamatorios, entre otros. Sin embargo estudios anteriores demuestran que la planta posee un gran número de compuestos que pueden producir alteraciones en el material genético, en consecuencia el objetivo de estudio es evaluar el efecto mutagénico de infusiones de hojas de *M. ilicifolia*.

Para ello se siguió un modelo in vivo, mediante la prueba de SMART, (Graf et al. en 1984) el cual consiste en analizar manchas que aparecen en las alas de las cepas mwh/flr3 de *Drosophila melanogaster*, las mismas se clasifican en tres grupos, manchas simples pequeñas (SSS), manchas simples grandes (LSS) y manchas gemelas (TS) que fueron analizadas por tablas estándar de la distribución Binomial para determinar la significación estadística de las frecuencias de mutación. Las infusiones se prepararon con hojas secas, para tres concentraciones, una de las cuales es 10 veces superior a la que normalmente se utiliza en la medicina popular.

Los resultados del estudio indican que las infusiones de *M. ilicifolia*, no poseen actividad mutagénica, detectable con la técnica SMART.

PALABRAS CLAVE: *Drosophila*, SMART, *Maytenusilicifolia*.

ABSTRACT

The medicinal plants are amply used for the treatment of so many affections, in Paraguay, especially in rural zones, women use *Maytenusilicifolia* (Cangorosa) as fertility control method, also is mentioning too this anti-inflammatory effects, and another more effects. However previous studies showed that this plant has a great number of compounds that can cause alterations in the genetic material, accordingly to this study, to evaluate the mutagenic effect of the *M. ilicifolia* leaves infusions.

For it we followed an in vivo model the SMART test, (Graf et al. in 1984) which consist in analyzing spots that appear on the wings mwh/flr3 strains of *Drosophila melanogaster*, they are classified into three groups, small single spots (SSS), large single spots (LSS) and twin spots (TS) were analyzed by standard tables of the binomial distribution to determine the statistical significance of mutation frequencies. The infusions were prepared with dry leaves for three concentrations, of which one is 10 times higher than that typically used in folk medicine. The results indicate that infusions of *M. ilicifolia* don't have a significant mutagenic activity in respect of the control group detectable with the SMART test.

KEY WORDS: *Drosophila*, SMART, *Maytenusilicifolia*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son ampliamente utilizadas en la farmacopea paraguaya, su diversidad y abundancia, tanto en plantas nativas como en las introducidas, posiblemente sea única en nuestro planeta. Más de 94 familias botánicas están representadas como medicinales, de las 172 familias inventariadas para el Paraguay. Así, 510 especies medicinales fueron registradas en los mercados de Asunción, el registro más alto del mundo, para una localidad (Pin y Roguet, 2009). En vista a lo anterior, se constituye de vital importancia la determinación de la acción biológica de estas plantas de importancia etnobotánica, así se sugiere determinar la toxicidad, genotoxicidad, a fin de obtener la mayor información posible y validar su uso de manera segura. En este sentido se estudia la posible acción genotóxica del extracto acuoso de *Maytenus illicifolia*, mediante la técnica SMART.

La técnica se fundamenta en la premisa de que, durante el desenvolvimiento embrionario, grupos de células (en los discos imaginales de las alas) proliferan mitóticamente hasta el punto en que se diferencian, durante la metamorfosis, en estructuras que originan las alas de las moscas adultas.

Trabajos como los de Palermo, Rodrigues de Andrade, Mudry, Ribiera, han demostrado la sensibilidad de esta técnica para cuantificar efectos genotóxicos, y han sido ensayadas con más de 400 químicos, además esta técnica es aceptada por su alta

sensibilidad y bajo costo, permitiendo varios protocolos, dosis múltiples, y cepas con heterogeneidad para la activación de pro-mutágenos y pro-carcinógenos, también para estudiar efectos de modulación y/o antimutagénesis.

La especie estudiada, *Maytenus illicifolia* (Cangorosa), es un arbusto o árbol de más de 5 metros de altura que crece en las cercanías de los arroyos, de hojas persistentes, duras de color verde oscuro de forma ovalada, dentados y espinosos. Las flores son pequeñas amarillentos de 7 mm de diámetro dispuesto en folículos axilares, sus frutos, a modo de cápsula ovoide rojiza de un cm. de diámetro.

Es un excelente anti-inflamatorio, controla la hipertensión, se lo utiliza extensamente en contra de mareos nocturnos e impotencia masculina. Combate cólicos hepáticos, inflamación de los riñones, fiebres intestinales, úlceras de estómago, resfríos mal curados y gripe. Para lavados vaginales, úlceras, heridas y llagas. También como té, tereré y con mate.

Las hojas de la planta, se encuentran constituidas principalmente por compuestos terpénicos, fenólicos, fitoesteroles y alcaloides. Entre los compuestos terpénicos (terpenos, diterpenos, triterpenos y terpenoides) destacan: maitenina, isotenginona III, congrosina A y B, 20- α -hidroximaitenina, 22- β -hidroximaitenina, celastrol, pristimerina, ácido maitenoico, ácido salasperónico, friedelina y friedelan-3-ol, α -tocoferol, δ -tocoferol, simiarenol, lupeol, lupenona, maitenoquinona, α -amirina y β -amirina,

cangoronina e ilicifolina, maitefolinas A, B y C y eritrodíol.

Entre los compuestos polifenólicos predominan los derivados de la queretina y kaempferol, leucoantocianidinas, taninos hidrolizables (ácido tánico), taninos condensados en las hojas (catequina, epicatequina, 4-O-metilepialocatequina y su epímero 4'-O-metil-entgalocatequina).

Entre los fitoesteroles destacan: campesterol, brassicasterol, β -sitosterol, ergosterol, escualeno, estigmasterol y fitol. Respecto a los alcaloides se han identificado los maitenoides: maitanina, maitanprina, maitanbutina y cafeína (dudoso en las hojas, probablemente en las semillas). La presencia de estos maitenoides no es constante e incluso existen ejemplares que no los contienen. En cuanto a la cafeína, existe solo el mencionado reporte de Pereira, no siendo confirmada en trabajos posteriores.

Otros componentes hallados en las hojas: poliésteres de sesquiterpeno-oligonicotinado (cangorinas F, G, H, I, J), ilicifolinosidos A, B y C, ácido clorogénico, compuestos volátiles en las hojas: ácido dodecanoico y geranil-acetato (Mossi et al., 2004), aceite fijo (semillas), trazas de minerales y oligoelementos: hierro (21,32%), potasio (17,50%), magnesio (12,67%), azufre, sodio y calcio, arabinogalactano en las hojas (compuesto por arabinosa, galactosa, ácido galacturónico y ramnosa).

El presente trabajo se realizó con infusiones de hojas secas de la espe-

cie indicada, colectada en la Ciudad de San Lorenzo. Las moscas fueron expuestas a tres concentraciones diferentes, siguiendo la metodología propuesta por Graf et al. en 1984. El objetivo principal del proyecto fue el de evaluar la actividad genotóxica de *Maytenus ilicifolia* sobre eucariotas mediante la técnica de SMART.

En el Paraguay existen un considerable número de personas que consumen el *Maytenus ilicifolia* (Cangorosa), cuya infusión es utilizada como un método de control de la fertilidad en zonas rurales del país. La obtención de la medicación de origen natural, con fuertes bases en la cultura popular es de relativa facilidad en dichas zonas, no así de los fármacos que tienen efectos anticonceptivos, esto por la dificultad para acceder a los servicios en los centros de salud o ciudades que cuentan con farmacias con los medicamentos adecuados para la situación mencionada. Nuestra hipótesis se centra en que la frecuencia de aparición de las manchas en las alas de las cepas de mwh y flr3 de *Drosophila melanogaster* tendrá una correlación significativa a la exposición y dosificación del extracto acuoso de la especie comercializada como cangorosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de *Maytenus ilicifolia* fueron colectadas, de una propiedad privada ubicada en la Ciudad de San Lorenzo, Paraguay, en el mes de Junio, en época de floración de la especie. Se colectaron muestras de las partes aéreas, incluyendo hojas, tallos y

flores. Estas fueron trasladadas hasta el Laboratorio de Mutagénesis Ambiental, de la FaCEN. Posteriormente se procedió al secado del espécimen, previo separado de la parte vegetativa y parte la floral, las condiciones de secado fueron a 25 ° C y humedad natural, durante 30 días. Se depositó un ejemplar en el Herbario del Laboratorio de Recursos Vegetales, del Departamento de Biología de la FaCEN. La identificación taxonómica, se realizó utilizando claves de identificación taxonómica, comparando con material de herbario y base de datos disponible en la web (TROPICOS).

Para la caracterización morfológica se siguió la metodología estándar, basados en observaciones directas y al microscopio estereoscópico de partes vegetativas y reproductivas.

Para la descripción morfoanatómica, se realizaron cortes transversales a mano alzada de hojas y tallos, se diafanizaron con hipoclorito de sodio (2,5%), posteriormente se aplicó tinción directa con safranina (1%). Para la detección de almidones se tiñó el material fresco con lugol (D'Ambrogio, 1986).

Las microfotografías fueron tomadas con cámara digital MOTICAM 352 incorporada al microscopio óptico Binocular Marca Olympus editadas con el software Motic Images Plus 2.0 (2006).

Se procedió al pulverizado de las hojas secas utilizando un molino manual de granos, se pesó 100 gramos del material y se lo mezcló con 900

ml de aguas destilada. Posteriormente se calentó hasta ebullición, por 5 minutos. Se dejó enfriar la muestra, y se dejó reposar por 24 horas a 4 ° C. Se utilizó el sobrenadante obtenido tras ese tiempo.

Para el estudio de la actividad genotóxica se siguió la metodología propuesta por Graf et al., (1984). Se realizaron cruces Standard, que cuantifican la acción de genotoxinas de acción directa, para ello se cruzaron 30 hembras vírgenes flr3 con 15 machos mwh. Las larvas de tercer estadio obtenidas tras los cruces, fueron expuestas durante 72 horas a 3 concentraciones diferentes del extracto acuoso, 10 %, 1 % y 0.1 % respectivamente. Se recolectaron 50 adultos de cada cruce y se prepararon placas de alas trans-heterocigotas y heterocigotas.

Se evaluaron por lo menos 10 individuos por descendencia, manteniendo los criterios sugeridos por Graf et al., en (1984) para la clasificación de las manchas, para ello se procedió a analizar el genotipo de las larvas tratadas mediante el montaje de las alas en solución de Faure para el diagnóstico microscópico de las mismas y se clasificaron los clones de acuerdo a las manchas que aparecen en las alas.

Para el control positivo se utilizó una solución de 8-hidroxiquinoleína al 0,002M, y como control negativo, individuos expuestos a agua destilada.

Procedimientos para el análisis de las muestras: La evaluación de los datos obtenidos luego del ensayo de manchas en ala se realizó clasificando

las manchas según su clase y tamaño: 1. Manchas pequeñas simples (MSP) que incluyen 1 o dos células (mwh o flr); 2. Manchas simples grandes (MSG) de más de 3 células (mwho flr); y 3. Manchas gemelas (MG) con un área mwhy otra flr adyacentes, que se analizan mediante tablas estándar de la Distribución Binomial para que las frecuencias de mutaciones puedan ser utilizadas directamente en la determinación del valor mínimo de mutaciones, para así, comparar entre los tratados y no tratados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Test de mutación y recombinación somática

Los resultados de los ensayos se resumen en la tabla 1, la cantidad y frecuencia de mutaciones, fue baja en todos los tratamientos.

En la tabla 2, se indican los análisis estadísticos de acuerdo lo propuesto por Frei y Würigler (1988).

Tabla 1. Número de manchas por mosca y concentración

| Dosis | N | MSP | MSG | MG | TM | Total de manchas mwh |
|-----------------------------|----|-----|-----|----|----|----------------------|
| Control negativo | 10 | 2 | 1 | 0 | 3 | 3 |
| 0,1% | 10 | 4 | 1 | 0 | 5 | 5 |
| 1% | 10 | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 10% | 10 | 2 | 1 | | 3 | 3 |
| 0,002 M 8-hidroxiquinoleina | 10 | 5 | 0 | 0 | 5 | 5 |

En todos los tratamientos se detectaron mutaciones del tipo *mwh*, en ningún caso se evidenciaron mutaciones *flr*³. Solo de detectaron manchas

simples grandes (MSG), en el control negativo y en el tratamiento a 10 % (como se aprecia en la figura 1. B), el resto de manchas simples pequeñas

Tabla 2. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico del extracto acuoso de *Milicifolia*

| Genotipos y Conc. % <i>mwh/flr3</i> | N. de moscas (N) | Manchas por mosca (N° de manchas) diag. Estadístico | | | | | | | | | | Total manchas <i>mwhc</i> (n) | |
|-------------------------------------|------------------|---|------|------------------------|------|-------------|---|-------------|------|---|------|-------------------------------|---|
| | | MSP (1-2 céls) m = 2 | | MSG (>2 céls) m = 5 | | MG m = 5 | | TM m = 2 | | | | | |
| Contr. Neg. | 10 | 0,20 | (02) | | 0,10 | (01) | | 0,00 | (00) | | 0,30 | (03) | 3 |
| 0,1 | 10 | 0,40 | (04) | i | 0,10 | (01) | i | 0,00 | (00) | i | 0,50 | (05) | 5 |
| 1 | 10 | 0,20 | (02) | i | 0,00 | (00) | i | 0,00 | (00) | i | 0,20 | (02) | 2 |
| 10 | 10 | 0,20 | (02) | i | 0,10 | (01) | i | 0,00 | (00) | i | 0,30 | (03) | 3 |
| 0,002 M 8-hidroxiquinoleina | 10 | 0,50 | (05) | i | 0,00 | (00) | i | 0,00 | (00) | i | 0,50 | (05) | 5 |

a. Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia a = b = 0,05

b. Incluso las manchas simples *flr3* raras.

c. Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

d. Apenas manchas simples *mwh* pueden ser observadas en los individuos heterocigotos *mwh/TM3*, ya que el cromosoma balanceador *TM3* no contiene el gen mutante *flr3*.

(MSP), no se observó marcador de manchas gemelas (MG) en ninguno de los tratamientos. Al realizar los análisis estadísticos, se comprueba que no existen diferencias significativas, entre el grupo control y los tratamientos a las tres concentraciones, tanto a 0.1 %, 1 % y 10% los resultados no son conclusivos.

Los datos obtenidos en los ensayos indican que la infusión acuosa presenta escasa actividad genotóxica, no detectable por esta técnica. Es posible que la presencia de flavonoides y taninos (Leiva et al., 2002), sea la razón por la que *M. ilicifolia* no posea efectos mutagénicos detectables con el ensayo SMART.

Figura 1: A. Alas enteras (primer par) de *Drosophila melanogaster*(40X). B. Manchas simples grandes (MSG) en el tratamiento a 10%(400X).



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los datos obtenidos en el análisis estadístico del potencial genotóxico mediante el cruce estándar, demuestran que la infusión de *M. ilicifolia* a diferentes concentraciones, no induce a daño genotóxico significativo en cepas mutantes de *Drosophila melanogaster*, respecto al tratamiento control. La baja actividad mutagénica del extracto a modo de infusión de hojas provenientes de *Maytenus ilicifolia*, en el presente trabajo, confirma los resultados mencionados por Fernandez, et al, 1999 y Leiva et al., 2002, en los que demuestran mediante el Allium test, que el extracto acuoso de *M. ilicifolia*, no posee actividad genotóxica

El presente estudio muestra que el consumo tradicional de hojas de *M. ilicifolia*, en infusiones en bajas cantidades, no posee actividad mutagénica, por lo que se puede validar su uso, tal como se lo consume en la farmacopea paraguaya.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento al Decano de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Lic. Constantino Gueffos Kapsalis, MAE, y la Directora de Investigación de la FaCEN, Lic. Deidamia Franco de Diana, por sus gestiones que permitieron realizar el viaje para el entrenamiento.

Especial agradecimiento a Gloria Rodrigo, MsC., de la Universidad Mayor

de San Andrés, Bolivia, por el entrenamiento en la Técnica SMART, y por donar gentilmente las cepas mwh y la flr3, utilizadas en los ensayos.

BIBLIOGRAFÍA

ALONSO PAZ, E; BASSAGODA, M J; FERREIRA, F. 1999. La Cangorosa. *Maytenusilicifolia*. Grupo Guayubira.

http://www.uv.es/prietojm/BLACP-MA/ArchivoSep/ALONSO_BLACP-MA_V6_N1.pdf. 20 de Mayo.

ALQUINI, Y.; TAKEMORI, N.K. 2000. Organização estrutural de espécies vegetais de interesse farmacológico. Curitiba, Herbarium Laboratório Botânico. **CAMPAROTO, Marjori Leiva; TEIXEIRA, R; MANTOVANI, M S and VICENTINI, V E. 2002.** Effects of *Maytenusilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genet. Mol. Biol.* [online]. vol.25, n.1, pp. 85-89. ISSN 1415-4757. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572002000100016>.

CIQIU, Z.; YANHUI, L.; SHIWANG, Z.; SHENJI, P. 1986. Anatomy of leaves on 17 species and one variety of *Maytenus* in relation to classification. *Acta Botanica Yunnanica*. 8 (1): 53 - 59.

DUEÑAS, I.E; GRAF, U.; FREI H.; HERES, M.E. y CASTAÑEDA, L. 2000. Genotoxicidad de componentes de un tinte para cabello mediante la prueba SMART del ala en *D. melanogaster* cruzas E y Be. *Salud Pública y Nutrición*. vol. N° 2-2000. <http://>

www.respyn.uanl.mx/especiales/genetica/toxicologia_y_farmacologia.html. 18 de Septiembre.

D'AMBROGIO, A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur. 84p.

FERNÁNDEZ, V.; et al. 1999. Acción de algunas plantas medicinales paraguayas sobre el ciclo replicativo celular. *Revista Nacional de Ciencia y Tecnología*. N°1. Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo-Paraguay.

GRAF U., WÜRGLER F.E., KATZ A.J., FREI H., JUON H., HALL C.B. Kale P.G. (1984) Somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen*. 6: 153-188.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. 1950. Anatomy of the Dicotyledons. Oxford, Clarendon Press. v.2, 1500 p.

MOTIC CHINA GROUP. 2006. Motic Images Plus versión 2.0. Software de computadora para microscopía digital.

MUDRY, M.D. Y CARBALLO, M.A. 2006. Genética Toxicológica. Ed. De los Cuatro Vientos. Argentina. Cap. 13 (Ana Maria Palermo).

RIBEIRO, L.; SALVADORI, D.M. Y KANAN MARQUES, E. 2003. Mutagênese Ambiental. Teste para detecção e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Editora Da ULBRA. Brasil. Cap.

11 (Rodríguez de Andrade, H.H. y Lehmann. M.).

RODRIGO, Gloria. 2007. Actividad Genotóxica de *Opuntia soehrensii*, evaluada por el Test de Mutación y Recombinación Somática en *D. melanogaster*. *BIOFARBO*, vol.15, no.1, p.61-66. ISSN 1813-5363.

SHARAPIN, N.; ALONSO, J.; HENRIQUES, A.; ZUANAZZI, J.; MENTZ, L.; NUNES, E.; APEL, M.; CAÑIGUERAL, S. 2006. Hoja de cangorosa (*Maytenifolium*). *Revista de Fitoterapia*. 6 (1): 29 - 43.

SOLEREDER, H. 1908. Systematic Anatomy of the Dicotyledons. Oxford: Claredon Press. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org>. Octubre 2012

VIEIRA, A.; SANTOS, M. 2004. Morfo-anatomía foliar comparativa de especies conocidas como espinheira-santa: *Maytenus illicifolia* (Celastraceae), *Soroceabonplandii* (Moraceae) e

