

**ESTUDIOS DEL POTENCIAL
TÓXICO *IN VIVO* DE
Luehea divaricata
(*Ka'á Ovetî O Ka'á Ovetî Pytâ*)¹**

***IN VIVO STUDIES OF TOXIC POTENTIAL
OF *Luehea divaricata* (*Ka'á Ovetî O Ka'á
Ovetî Pytâ*)***

*Edith Alba Luz Segovia Corrales*²
*Héctor David Nakayama*³
*Rubén Darío Duré*³
*Pablo Alejandro Ibarra*³

¹ Trabajo presentado por el Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas y Financiado con rubros del Rectorado durante el año 2012.

² Investigadora principal

³ Co-investigadores

RESUMEN

En el Paraguay el consumo de plantas medicinales y aromáticas es tradicional y generalizado. La *Luehea divaricata* Mart., conocida popularmente en el Paraguay como ka' a ovetí o ka' a ovetí pytâ se utiliza popularmente como anticoqueluche, antitusígeno, antiasmático, antidiabético, carmitivo, y para el tratamiento de ácido úrico, disentería, leucorrea, reumatismo, blenorrea y tumores. Infusiones del tallo y flores se utilizan como antidiarreico bronquitis y de las hojas como antiinflamatorio, diurético, mientras que la raíz tiene acción depurativa. También presenta cierta actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, y antiproliferativa en líneas celulares tumorales. El extracto de *L. divaricata* ha mostrado tener efecto genotóxico en una cepa de *Salmonella typhimurium*, pero no tiene efecto genotóxico en cepas de *Drosophila melanogaster*, y presentó un efecto protector cuando estas fueron tratadas con un genotóxico conocido. En este trabajo analizamos si el extracto acuoso de *L. divaricata* tiene efectos genotóxicos en la médula ósea de ratones tratados analizando el aumento de la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en los mismos. Después de un tratamiento agudo de 48 hs con el extracto acuoso de hojas trituradas de *L. divaricata* las frecuencias de EPCMN en células de médula ósea de ratones tratados con tres volúmenes diferentes del extracto acuoso no fueron estadísticamente significativas, cuando comparadas con la frecuencia encontrada en el grupo de tratamiento control negativo. Estos resultados indican que el extracto acuoso de *L. divaricata* no induce un daño citogenético significativo en células de médula ósea de ratones tratados con el mismo durante 48 horas.

ABSTRACT

In Paraguay, the consumption of medicinal and aromatic plants is traditional and widespread. *Luehea divaricata* Mart., popularly known as ka' a ovetí or ka' a ovetí pytâ is commonly used as anticoagulant, antitussive, antidiabetic, for the treatment of uric acid, dysentery, leucorrhoea, rheumatism, blenorrea and tumors. Infusions of the stem and flowers are used to treat diarrhea and bronchitis, leaf infusion is used as antiinflammatory and diuretic while the root is depurative. It also presents certain antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, and antiproliferative activity in tumor cell lines. The extract of *L. divaricata* has been shown to have genotoxic effects in a strain of *Salmonella typhimurium*, no genotoxic effect in strains of *Drosophila melanogaster*, and presented a protective effect when they were treated with a known genotoxic. In this work we analyzed whether the aqueous extract of *L. divaricata* has genotoxic effects in the cells of the bone marrow of treated mice by analyzing the increase in frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMN). After an acute treatment of 48 hours with the aqueous extract of ground *L. divaricata* leaves, the frequencies of PCEMN in bone marrow cells of mice treated with three different volumes of water extract were not statistically significant, when compared to the frequency found in the negative control treatment group. These results show that the aqueous extract of *L. divaricata* induces no cytogenetic damage in bone marrow cells of mice treated with the same extract for 48 hours.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son utilizadas en muchos países del mundo. En el Paraguay el consumo de plantas me-

dicinales y aromáticas estradicional y generalizado, una costumbre que se hereda desde los tiempos de los guaraníes (Paraguay; Informe de la FAO 1995; GONZÁLEZ TORRES, 2005). Entre estas plantas tenemos la *Luehea divaricata* Mart., conocida popularmente en el Paraguay como ka'a ovetí o ka'a ovetí pytã; es un árbol nativo, de entre 15 y 25 metros de altura, con hojas simples, flores bisexuales, frutos cápsulas y se encuentra distribuido en parte de la Región Oriental del Paraguay; a nivel de regional tiene una distribución que abarca Brasil, Uruguay y Argentina (MOLFINO, 1923, in DI SAPIO Y GATUSO, 1996). En el Paraguay se utiliza popularmente la flor como anticoqueluche (tos ferina) (BASUALDO *et al.*, 2004), antitusígeno, antiasmático, antidiabético, carmitivo y para el tratamiento de ácido úrico (SUAREZ Y MERELES, 2006; PIN *et al.*, 2009) y como preventivo o en el tratamiento del cáncer (información verbal popular). En Argentina se utilizan infusiones del tallo como antidiarreico y de las hojas como antiinflamatorio (SAGGESE, 1959; TOURSARKISIAN, in DI SAPIO Y GATUSO, 1996). En Brasil, donde es conocido como açoítacavalo, açoítacavalo miúdo, ibatingui, ivatingui, paudecanga e caiboti de utilizan extractos del tallo como antiinflamatorio y de las hojas como diurético, que presentan entre sus componentes flavonoides, taninos y saponinas (ALICE *et al.*, 1985, in Vargas y col., 1991), las hojas también se utilizan como fitoterápicos para la disentería, leucorrea, reumatismo, blenorrea y tumores, y la infusión de las flores es utilizada para curar la bronquitis mientras que la raíz tiene acción depurativa (TANAKA *et al.*, 2005). En ensayos realizados con los extractos metanólico de hojas y corteza de *L. divaricata*, fueron moderadamente activos contra *Staphylococcus aureus*, no fueron activos contra hongos en

el ensayo utilizado y tuvieron un efecto citostático o citocida en líneas celulares tumorales (TANAKA *et al.*, 2005). A pesar de su amplia utilización en la medicina popular, son pocos los estudios sobre los posibles efectos secundarios de los extractos de esta especie. Entre los análisis realizados encontramos un estudio del extracto acuoso de las hojas de *L. divaricata* en *Salmonella typhimurium*, donde se ha observado que tiene un efecto mutagénico en la cepa TA 98, al ser activada con la fracción microsomal S9 (VARGAS *et al.*, 1991). Estudios del potencial mutagénico en *Drosophila melanogaster* han mostrado que el extracto acuoso de la corteza de *L. divaricata* fue negativo en los cruzamientos Standard y de alta bioactivación; al combinarse el extracto acuoso de la corteza con un mutágeno conocido, la Doxorubicina (DRX), se ha observado un efecto reductor de la acción mutagénica de manera significativa, al reducir significativamente las frecuencias de manchas de pelos mutantes en las alas de *D. melanogaster*, al ser comparadas con los datos obtenidos en el tratamiento de DXR solo (FELICIO *et al.*, 2011), lo que indicaría un posible efecto protector del extracto de *L. divaricata* frente a agentes mutagénicos. Considerando el aumento del uso de plantas medicinales se hace necesario más evidencias científicas de sus posibles efectos inocuos. En estudios previos se ha visto que la planta *L. divaricata* presenta tanto efectos tóxicos como protectores, por lo tanto es importante aplicar estudios citogénicos que nos ayuden a conocer el potencial de la misma. Esto se puede realizar mediante el análisis de las modificaciones de las frecuencias de Micronúcleos (MNs) (SCHIMD, 1975) en células de médula ósea de ratones, tratados con el extracto acuoso de *L. divaricata*. Objetivo. El objetivo de este trabajo fue el

analizar los efectos genotóxicos del extracto acuoso de *L. divaricata* en células de médula ósea de ratones tratados por 48 hs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de *L. divaricata* fueron colectadas en la ciudad de San Lorenzo e identificadas por la Lic. Biol. Bonifacia de Bertoni. El “voucher” de la especie fue depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FaCEN) de la Universidad Nacional de Asunción. Para obtener el extracto acuoso de las hojas de *L. divaricata*, se colocaron 10gr en de hojas maceradas, previamente deshidratadas a 40°C en estufa, en 100mL de agua destilada, a 80°C, que se mantuvo por 10 minutos, se dejó enfriar y se filtró con dos sistemas de filtros, filtro común además de filtro de 0,45µm. El trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biotecnología (CEMIT-DGICT- UNA). Para este estudio se utilizaron ratones Swiss albinos sanos, hembras, de 20 a 30 grs. de peso y entre 6 a 12 semanas de vida. Los animales fueron mantenidos en el laboratorio de Biotecnología por una semana para su aclimatación con comida y agua ad libitum. Teniendo en cuenta los códigos de ética para trabajos de experimentación con animales de laboratorio, se ha evitado todo sufrimiento innecesario del animal y se ha empleado el mínimo número requerido con valor estadísticamente aceptable.

Técnica para análisis de Micronúcleos in vivo

Se realizó el tratamiento de los animales, vía oral (v.o.), con tres volúmenes de 100, 200 y 300µL del extracto acuoso de la planta.

Luehea *divaricata*, por 48 hs. Como control negativo se trataron a los animales con 300 µL de agua, (v.o) y

como control positivo se utilizó Ciclofosfamida (CAS N°:6055-19-2, Sigma) 50mg/kg. de peso del animal, vía intraperitoneal. Los tratamientos de control negativo y positivo fueron de 24hs de exposición. Se sacrificaron los animales por dislocación cervical, se retiraron los fémures y se removió la médula ósea con suero fetal bovino (FBS), mantenido a 37°C. Se homogenizó el material y se transfirió a un tubo cónico, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante dejando un pequeño volumen para resuspender las células. Se resuspendieron las células restantes, se colocó 1-2 gotas sobre una lámina de cristal limpia, seca y se realizó el extendido. Se dejaron secar las muestras y se fijaron las mismas en metanol absoluto. Se tiñeron las muestras con Giemsa al 4%. Se analizaron las muestras al microscopio óptico con aumento de inmersión y se contaron los Eritrocitos Policromáticos (EPCs) incluyendo los que presentaron Micronúcleos (EPCMN). Se utilizaron 5 animales por volumen de extracto analizado, así como en los controles del ensayo. Todos los datos fueron estadísticamente analizados por el Test de Dunnett's (post-test) para un nivel de significancia de $p < 0.05$, usando el programa de GraphPadPrism software.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de inducción de micronúcleos (MNs) en médula ósea de ratones se muestran en la tabla 1. Las frecuencias de MNs encontrados en los ratones Swiss albinos hembras tratados con 3 volúmenes del extracto acuoso de *L. divaricata* y de Ciclofosfamida, (control positivo), son comparadas con el control negativo. Los porcentajes de EPCMN en el control negativo fueron de 0.32%, en el grupo de animales tratados con 100µL de *L. divaricata* fue de 0.58%, en el grupo tratado con 200µL fue de

0.46% y en el grupo tratado con 300µL del mismo extracto fue de 0.44%; mientras que el grupo de animales tratados con 50 mg de Ciclofosfamida por cada 1000g de peso de animal fue de 1,34%. En este estudio, hemos encontrado que la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en las células de médula ósea de los ratones tratados con los 3 volúmenes de *L. di-*

varicata no ha mostrado un aumento significativo, mientras que la Ciclofosfamida induce un aumento significativo ($P < 0.05$) de la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en células de médula ósea de los ratones tratados con el mismo, cuando comparadas con la frecuencia encontrada en las células de médula ósea de los ratones del control negativo del ensayo.

Tabla 1: Frecuencia total de Eritrocitos policromáticos Micronucleados.

Tratamientos	Total ECMNs	Total cels. Anl.	% EPCMN (± S.D.)	Tiempo de trat/o
CTL-	16	5000	0.32 (1,30)	24hs
Luehea 100µL	29	5000	0.58 (1,64)	48hs
Luehea 200µL	23	5000	0.46 (3,29)	48hs
Luehea 300µL	22	5000	0.44 (1,52)	48hs
CP 50 mg/ Kg	67	5000	1.34 (3,21) *	24hs

CTL-: control negativo; Luehea: *Luehea divaricata*; CP: Ciclofosfamida; * Estadísticamente significativo $p < 0.05$ comparado con los datos del control negativo

En este estudio, evaluamos los efectos mutagénicos del extracto acuoso de *L. divaricata*, planta utilizada en la etnofarmacología regional. Se ha utilizado un extracto acuoso concentrado, considerando que no se conoce la Dosis Letal 50, ni la concentración de uso popular. Hemos visto que a esta concentración, el extracto acuoso de hojas maceradas de *L. divaricata* no presentó un efecto genotóxico significativo en células de médula ósea de los animales tratados. Los Micronúcleos se forman en eritrocitos jóvenes de fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros que no son incorporados en el núcleo de las células hijas después de la división celular y se considera que variaciones en la incidencia de EPCMN reflejan daño cromosómico (Vallarino-Kelly & Morales Ramírez,

2001). En nuestro estudio, no hemos encontrado una variación significativa de esa incidencia, lo que indica que el tratamiento con el extracto acuoso de *L. divaricata* no induce daño al genoma de ratones tratados con el extracto.

CONCLUSIÓN

El extracto acuoso de *L. divaricata* no induce variaciones en la frecuencia de Micronúcleos en células de médula ósea de ratones tratados por 48 hs. Para determinar si esta planta de uso medicinal tiene efectos a largo plazo, deben realizarse otros estudios que impliquen exposiciones a la misma de más largo plazo o realizar tratamientos previos con genotóxicos conocidos para determinar su potencial efecto protector.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing.Ftal. César Cardozo Román, Director General de la DGICT-UNA y la Dra. Inocencia Peralta, Directora del CEMIT-DGICT-UNA, por el apoyo constante en todos los proyectos ejecutados. A la FaCEN-UNA, en las personas de la Lic. Bonifacia de Bertoni, por la identificación de la especie estudiada y los estudiantes de la carrera de Biología Romina Arrúa, Natalia Barrozo y Oscar Salvioni, por la colaboración en la obtención del material de estudio.

REFERENCIAS**BIBLIOGRAFICAS**

GONZALEZ-TORRES, D. 2005. Catálogo de plantas medicinales (y alimenticias y útiles) usadas en Paraguay. 2005. Editorial Servilibro, Asunción-Paraguay.

MOLFINO, J.F. Nota sobre las especies argentinas de Género *Luehea*. Com. Museo nacional de historia natural de Buenos Aires, 1923 2(5):53-60 in: Di Sapiro O.A. y Gattuso M.A. Análisis micrográfico para la identificación de la corteza de *Luehea divaricata* Mart. (“sota caballo, Arbol de San Francisco”) (Tiliaceae). 1996. ROJASIANA 3 (2):177-185.

BASUALDO, I.; SORIA, N.; ORTÍZ M.; DEGENER. “Plantas medicinales comercializadas en los mercados de Asunción y Gran Asunción. Parte I”. 2004 Revista Rojasiana. Vol 6 (1): 95– 114.

SUAREZ M.O.; Y MERELES M. F. “Los árboles medicinales utilizados en la comunidad de Paso Jovái, Departamento de Guairá, Paraguay”. 2006. Revista Rojasiana. Vol 7 (2): 91 - 115.

PIN, A.; GONZÁLEZ, G.; MARÍN G.; CÉSPEDES, G.; CRETTON S.; CHRISTEN, P.; ROUGUET D. Plantas medicinales del jardín Botánico de Asunción. 2009. Asociación Etnobotánica paraguaya 441.

SAGGESE D. Yerbas Medicinales Argentinas. 1959 Rosario. Santa Fé, Arg. In: Di Sapiro O.A. y Gattuso M.A. Análisis micrográfico para la identificación de la corteza de *Luehea divaricata* Mart. (“sota caballo, Arbol de San Francisco”) (Tiliaceae). 1976. ROJASIANA 3 (2):177-185.

HEMISFERIO SUR. 1980. BUENOS AIRES. IN: DI SAPIO O.A. Y GATTUSO M.A. Análisis micrográfico para la identificación de la corteza de *Luehea divaricata* Mart. (“sota caballo, Arbol de San Francisco”) (Tiliaceae). 1976. ROJASIANA 3 (2):177-185.

ALICE C. B.; SILVA G. A. A. B.; SIQUEIRA N. C. S.; MENTZ L. A. Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul (parte 1). 1895 Cad. Farm. 1: 83-94. In: Vargas VM, Guidobono RR, Henriques JA. Genotoxicity of plant extracts. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991;86 Suppl 2:67-70.

TANAKA J. L. A Y DA SILVA C. C. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* MART. (TILIACEAE). *Quim. Nova*, 2005 Vol. 28, No. 5, 834-837.

VARGAS VM.; GUIDOBONO RR, HENRIQUES JA. Genotoxicity of plant extracts. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991;86 Suppl 2:67-70.

FELÍCIO, LP.; SILVAEM, RIBEIRO V, MIRANDA CT, VIEIRA IL, PASSOS DC, FERREIRA AK, VALE CR, LIMA DC, CARVALHO S, NUNES WB. Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant *Luehea divaricata* (Malvaceae) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*: SMART/wing. Genet Mol Res. 2011 Jan 4;10(1):16-24.

TOURSAKISSIAN M. Plantas medicinales de la Argentina.

PATLOLLAA. K., H U S S A I N S.M., SCHLAGER J.J., PATLOLLA S, TCHOUNWOU P.B. Comparative Study of the Clastogenicity of Functionalized and Non-functionalized Multi-walled Carbon Nanotubes in Bone Marrow Cells of Swiss-Webster Mice. Environ Toxicol. 2010 25(6): 608–621.

SCHMID, W. The micronuclei test. Mutat Res. 1975; 31:9-15.

VALLARINO-KELLY, T., MORALES-RAMÍREZ, P. (2001) Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast *in vivo*. Mutation Research 495 : 51–59.