

Efecto genotóxico del extracto etanólico de *Solanum sisymbriifolium* Lam. utilizando el análisis de alteraciones nucleolares en células meristemáticas de *Allium cepa* L.

Farez, D.¹; Gayozo, E.¹; Torres, E.¹; Notto, A.¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, Departamento de Biología, San Lorenzo - Paraguay.

E mail del autor: derlis462@gmail.com

Efecto genotóxico del extracto etanólico de *Solanum sisymbriifolium* Lam. utilizando análisis de alteraciones nucleolares en células meristemáticas de *Allium cepa*. Las plantas medicinales poseen gran importancia en Paraguay, debido a su amplio uso popular para el tratamiento de numerosas afecciones. Las hojas de *Solanum sisymbriifolium* es utilizada como analgésico y para tratamiento de afecciones renales, si bien se conocen las propiedades químicas y fisiológicas de la planta, hasta el momento no se ha descrito su actividad toxicológica. A consecuencia de esto, se propuso como objetivo principal determinar los efectos genotóxico del extracto etanólico de hojas de *Solanum sisymbriifolium* empleando el análisis de las alteraciones nucleolares. Para ello se realizó el extracto etanólico de hojas de *S. sisymbriifolium*, de los cuales se obtuvieron concentraciones de 0,1 mg.mL⁻¹, 1 mg.mL⁻¹ y 5 mg.mL⁻¹, y las mismas fueron expuestas a células meristemáticas de *Allium cepa* por 24, 48 y 72 horas. La observación de las células tratadas en el microscopio óptico compuesto se realizó mediante la técnica de impregnación argéntica nucleolar, se contabilizaron 800-840 células por tratamiento y se determinó la proporción nucleolar por tratamiento. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el Test T ($p < 0,05$), los cuales evidenciaron que a mayores dosis y tiempo de exposición del extracto etanólico la proporción de nucléolos al igual que su morfología se vieron modificadas, también se observaron partículas nucleolares en el citoplasma y nucleoplasma. Dichos resultados sugieren que el extracto etanólico de *S. sisymbriifolium* posee efectos genotóxicos sobre la organización nucleolar a concentraciones de 5 y 1 mg.mL⁻¹ con 48 y 72 horas de exposición.

Palabras clave: *Allium cepa*, células meristemáticas, genotoxicidad, hojas, nucléolo, *Solanum sisymbriifolium*

Genotoxic effect of ethanolic extract of *Solanum sisymbriifolium* Lam. using analysis of nucleolar alterations in *Allium cepa* L. meristematic cells. Medicinal plants have great importance in Paraguay, due to its wide popular use for numerous affections treatment. Leaves of *Solanum sisymbriifolium* is widely used as an analgesic and renal affections treatment, although the chemical and physiological properties of the plant are known, until now its toxicological activity has not been described. As a result of this, the main objective was to determine the genotoxic effects of the ethanolic extract of *Solanum sisymbriifolium* leaves using analysis of nucleolar alterations. For this, the ethanolic extract of *S. sisymbriifolium* leaves was obtained, from which concentrations of 0.1 mg.mL⁻¹, 1 mg.mL⁻¹ and 5 mg.mL⁻¹ were obtained, and then exposed to *Allium cepa* meristematic cells for 24, 48 and 72 hours. The observation of treated cells in optical microscope has been made by silver impregnation technique, 800-840 cells per treatment were counted and the nucleolar proportion was determined by treatment. The data obtained were analyzed statistically with the T test ($p < 0.05$), which showed that at higher doses and exposure time of the ethanolic extract the proportion of nucleoli as well as their morphology were modified, nucleolar particles were also observed in the cytoplasm and nucleoplasm. These results suggest that the ethanolic extract of *S.*

Steviana, Vol. 9(2), 2017 pp. 36 – 47.

Original recibido el 27 de septiembre de 2017.

Aceptado el 05 de diciembre de 2017.

sisymbriifolium has genotoxic effects on the nucleolar organization at concentrations of 5 mg.mL⁻¹ and 1 mg.mL⁻¹ with 48 and 72 hours of exposure.

Key words: *Allium cepa*, meristematic cells, genotoxicity, leaves, nucleolus, *Solanum sisymbriifolium*

INTRODUCCIÓN

Solanum sisymbriifolium Lam. es una especie nativa del Paraguay, ruderal y maleza de cultivos, tiene una amplia distribución en los departamentos de Alto Paraguay, Central, Cordillera, Ñeembucú, Paraguari, Presidente Hayes (Zuloaga, 2017). Es conocida comúnmente como “Ñuati pytã”, “Mboi rembi`u”, “tutiá,” “tutiá colorada”, es una hierba perenne con agujones amarillos o rojizos, tallos erectos, hojas alternas, decurrentes y profundamente pinnatipartidas o pinnatisectas, sus frutos son bayas de color anaranjado-rojizos (Hadid *et al.*, 2007).

Esta especie es utilizada principalmente en medicina tradicional como anti-inflamatorio para el tratamiento de enfermedades reumáticas y respiratorias (Degen de Arrúa y González, 2014). Las raíces se utilizan en tratamientos hipertensivos, diurético, analgésico, también se la utiliza como emenagogo y regulador de la fertilidad en la mujer (Vaghela *et al.*, 2009; Ibarrola y Degen de Arrúa, 2011). En Argentina, es muy utilizado como antisifilíticos y hepatoprotector, las partes aéreas se emplean para tratar afecciones como la diarrea, infecciones de vías respiratorias y urinarias (Vaghela *et al.*, 2009).

Las hojas en infusión se emplean como analgésico, para dolores de cintura y espalda, también como antifebril y el tratamiento de manchas en la piel, dichas propiedades son destacadas en reportes de

Degen de Arrúa y González (2014) y Cáceres y Machaín (2001).

A pesar de que los estudios citotóxicos y genotóxicos de esta especie son muy escasas. el estudio realizado por Apu y colaboradores (2013), donde se evaluó la toxicidad de hojas de *S. sisymbriifolium* utilizando camarones (*Artemiasalina*) como indicador de toxicidad, estos fueron expuestos a distintas concentraciones del extracto etanólico de las hojas de dicho vegetal, hallándose sus efectos citotóxicos sobre dicho organismo.

Algunos autores han propuesto el análisis de las anormalidades en los núcleos interfásicos como criterios para el estudio genotoxicológico de distintos xenobióticos y sustancias de origen vegetal, entre estas podemos citar la evaluación de las alteraciones nucleolares (Leme y Marin-Morales, 2009; Mazzeo y Marin-Morales, 2015).

El nucléolo consiste en componentes estructurales distinguibles por diferencias en las propiedades de tinción y características ultraestructurales, denominados cuerpos nucleolares, los cuales son regiones de transcripción de ARNr y el ensamblaje de subunidades ribosomales, por lo que son buenos biomarcadores de actividad genotóxica tanto en organismos vegetales como animales (Goessens, 1984; Martín, 2001; Çavas y Ergene-Gözükara, 2003b; Mazzeo y Marin-Morales, 2015).

Por estos motivos, se propone este estudio, determinar el potencial genotóxico del extracto etanólico de hojas de *S.*

sisymbriifolium sobre la organización nucleolar en células meristemáticas del *A. cepa*, a fin de evaluar los efectos de las exposiciones a diferentes concentraciones del extracto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta e identificación de muestras vegetales

La colecta se realizó en el mes de marzo del año 2017, en el campus de la Universidad Nacional de Asunción de la

ciudad de San Lorenzo, en los puntos de colecta representado en la Tabla 1.

Una vez colectadas fueron identificadas, basado en la descripción taxonómica de Burkart (1979) y Pin *et al.* (2009), luego las muestras fueron prensadas, y dejadas a temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$) hasta su secado total, en ausencia de radiaciones solares y corriente de oxígeno para evitar de esta manera la degradación de los compuestos (Hostettmann *et al.*, 2008).

Tabla 1. Sitios de colecta del material vegetal

Puntos de Colecta	Distrito y Lugar de Colecta	Coordenadas
Punto 1	San Lorenzo, Campus Universitario, UNA	-25.3347264,-57.5198006,21
Punto 2	San Lorenzo, Campus Universitario, UNA	-25.335476, -57.520137
Punto 3	San Lorenzo, Campus Universitario, UNA	-25.3381512,-57.5249444,21

Montaje de cultivo hidropónico de bulbos de Allium cepa

Se seleccionaron 9 bulbos *de Allium cepa*, los cuales fueron limpiados previamente y colocados en un recipiente de plástico (21x30x10 cm) a modo que el agua con oxigenación se encuentre en contacto con el anillo radicular de los mismos, posteriormente fueron llevadas a una incubadora (CHAMBER Ambi-Hi-Lo Lab.-line), a temperatura constante de $20^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ por 48 horas (oxigenación asistida del agua con un burbujeador SOBO Aquarium Air Pump SB-108), para la obtención uniforme de tejido radicular meristemático.

Preparación del extracto acuoso de hojas de S. sisymbriifolium

Las hojas secas fueron molidas con ayuda de un molino manual y guardado en sobres de polietileno de 21 cm x 30 cm. El

macerado de las hojas fue tamizado con ayuda de una malla de 0,05 mm a modo de obtener un triturado homogéneo. Una vez adquirido el material de interés, se pesó con ayuda de una balanza de precisión y se mezcló con el solvente (Etanol 98°) en una proporción de 3:50 (Singh *et al.*, 2011). La solución se dejó reposar por 20 días con agitación diaria, transcurrido este periodo, la solución se filtró con ayuda de un equipo filtrador a modo de separar los residuos del sobrenadante (Singh *et al.*, 2011). El filtrado fue sometido a calentamiento y agitación constante a temperatura de 80°C con el fin de evaporar el solvente empleado y obtener el extracto crudo. Se obtuvo 7,37 gramos del extracto crudo con la cual se realizaron las concentraciones finales de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, 1 mg.mL^{-1} y 5 mg.mL^{-1} según consumo popular.

Ensayo de evaluación de alteraciones nucleolares en células meristemáticas de *A. cepa*

Para este ensayo se emplearon como control negativo, agua destilada y control positivo 8-Hidroxiquinoleína a una dosis de $0,73 \text{ mg.mL}^{-1}$, y se precedió a la exposición a las tres diferentes concentraciones ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$; 1 mg.mL^{-1} y 5 mg.mL^{-1}) del extracto etanólico de *S. sisymbriifolium*. Para ello se tomaron 5 raíces de aproximadamente 1 cm de longitud, estas se seleccionaron aleatoriamente de 9 bulbos de *Allium cepa* en cultivo, y se realizaron las exposiciones a los tratamientos en tiempos de 24, 48 y 72 horas.

La tinción se realizó empleando una previa fijación de las raíces con una solución de Formaldehído 10% e Hidroquinona 1% en una mezcla de proporción (1:1) por 1 hora a temperatura ambiente ($25^\circ \pm 3^\circ \text{C}$), una vez transcurrido el tiempo se lavaron las raíces tres veces consecutivas durante 10 minutos en placas diferentes, luego las muestras fueron colocadas en un recipiente con solución de Nitrato de plata al 2%, cubiertas con papel aluminio a modo de mantener la ausencia de luz, colocadas en una estufa a 70°C durante 15 horas (Hizume y Tanaka, 1980).

Finalmente, trascurrido el tiempo se lavaron 3 veces las raíces en placas durante 10 minutos, posteriormente se llevó a cabo el aplastado de las raíces realizando finos con golpes (squash) con una a dos gotas de Ácido acético 50%.

Los preparados fueron observados al microscopio, en primer lugar se realizó el conteo del número de nucléolos presentes en cada una las células, en segundo lugar se observaron la morfología de los

nucléolos y finalmente se contaron un total de 800 a 840 células por tratamiento según Li *et al.* (2015) con modificaciones, las cuales se observaron con ayuda de un microscopio óptico (Boeco Germany).

Análisis estadístico de datos

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos fueron realizados empleando la Prueba T, con un 95% de nivel de confianza y previa comprobación de supuestos, para determinar diferencias entre medias de los tratamientos, para ello se utilizó el paquete estadístico Past versión 3.0 (Hammer *et al.*, 2001). Los gráficos estadísticos se realizaron empleado el programa GraphPad Prism 6.00, La Jolla California USA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación del índice de células se realizó considerando las distintas cantidades de corpúsculos nucleolares de acuerdo al tiempo de exposición; con exposición de 24 horas se observaron de 1 a 3 nucléolos en el 97,61% de las células del control negativo, en el 95,95% de las células con el control positivo, en el 97,38% de las células expuestas a $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$; en el 96,90% de las células expuestas a 1 mg.mL^{-1} y con la dosis 5 mg.mL^{-1} , se observaron en el 94,84% de las células analizadas. Los valores obtenidos con este tiempo de exposición, fueron ligeramente menores en comparación con la observada con el control negativo, sin embargo, las mismas no fueron significativas ($p > 0,05$). Considerando siempre el mismo tiempo de exposición y observados 4 nucléolos en las células, se observaron en el 3,57% de las células analizadas con el control positivo,

Farez, D. *et al.* Efecto genotóxico de *Solanum sisymbriifolium*

en el 4,92 % de las células expuestas a 5 mg.mL⁻¹, y en el 2,39% de las células expuestas al control negativo, concluyendo que este valor es mucho menor al observado con las células expuestas a 5 mg.mL⁻¹ ($p < 0,05$). En las células con 5

nucléolos, ocurrió lo mismo, se observaron en el 0,12% de las células analizadas con la dosis de 5 mg.mL⁻¹ y en el 0,24% con el control positivo con las dosis de 0,1 y 1 mg.mL⁻¹ no se han observado células ($p < 0,05$) (Tabla 2, Fig. 1).

Tabla 2. Porcentaje de variaciones nucleolares encontradas en células de *A. cepa* expuestas a las diluciones del extracto etanólico de *S. sisymbriifolium*

Tratamientos	1-3 Nucléolos	4 Nucléolos	5 Nucléolos	Partículas nucleolares en citoplasma	Partículas nucleolares en nucleoplasma
Tratamiento de 24 horas					
Control Negativo	97,61	2,39	0	0	0
0,73 mg.mL ⁻¹ 8-hidroxiquinoleína	95,95 ^{NS}	3,57 *	0,24 *	0,12 *	0,12 *
0,1 mg.mL ⁻¹	97,38 ^{NS}	2,62 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
1 mg.mL ⁻¹	96,90 ^{NS}	3,1 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
5 mg.mL ⁻¹	94,84 ^{NS}	4,92 **	0,12 *	0,12 *	0 ^{NS}
Tratamiento de 48 horas					
Control Negativo	97,86	2,14	0	0	0
0,73 mg.mL ⁻¹ 8-hidroxiquinoleína	88,70 ^{NS}	9,75 ***	0,59 *	0,71 *	0,24 *
0,1 mg.mL ⁻¹	93,10 *	6,89 **	0 ^{NS}	0 ^{NS}	0 ^{NS}
1 mg.mL ⁻¹	92,16 *	7,48 **	0,35*	0 ^{NS}	0 ^{NS}
5 mg.mL ⁻¹	90,14 ^{NS}	9,26 ***	0,35 *	0,24 *	0 ^{NS}
Tratamiento de 72 horas					
Control Negativo	97,61	2,38	0	0	0
0,73 mg.mL ⁻¹ 8-hidroxiquinoleína	90,71 ^{NS}	8,81 ***	0,12 *	0,24 *	0,12 *
0,1 mg.mL ⁻¹	93,16 ^{NS}	6,6 ***	0,12 *	0,12 *	0 ^{NS}
1 mg.mL ⁻¹	94,88 ^{NS}	5 **	0 ^{NS}	0,12 *	0 ^{NS}
5 mg.mL ⁻¹	87,92 ***	10,65 **	0,48 *	0,84 *	0,12 *

^{NS}: no significativo * $p < 0,05$ (significativo) ** $p < 0,01$ (considerablemente significativo) *** $p < 0,001$ (altamente significativo).

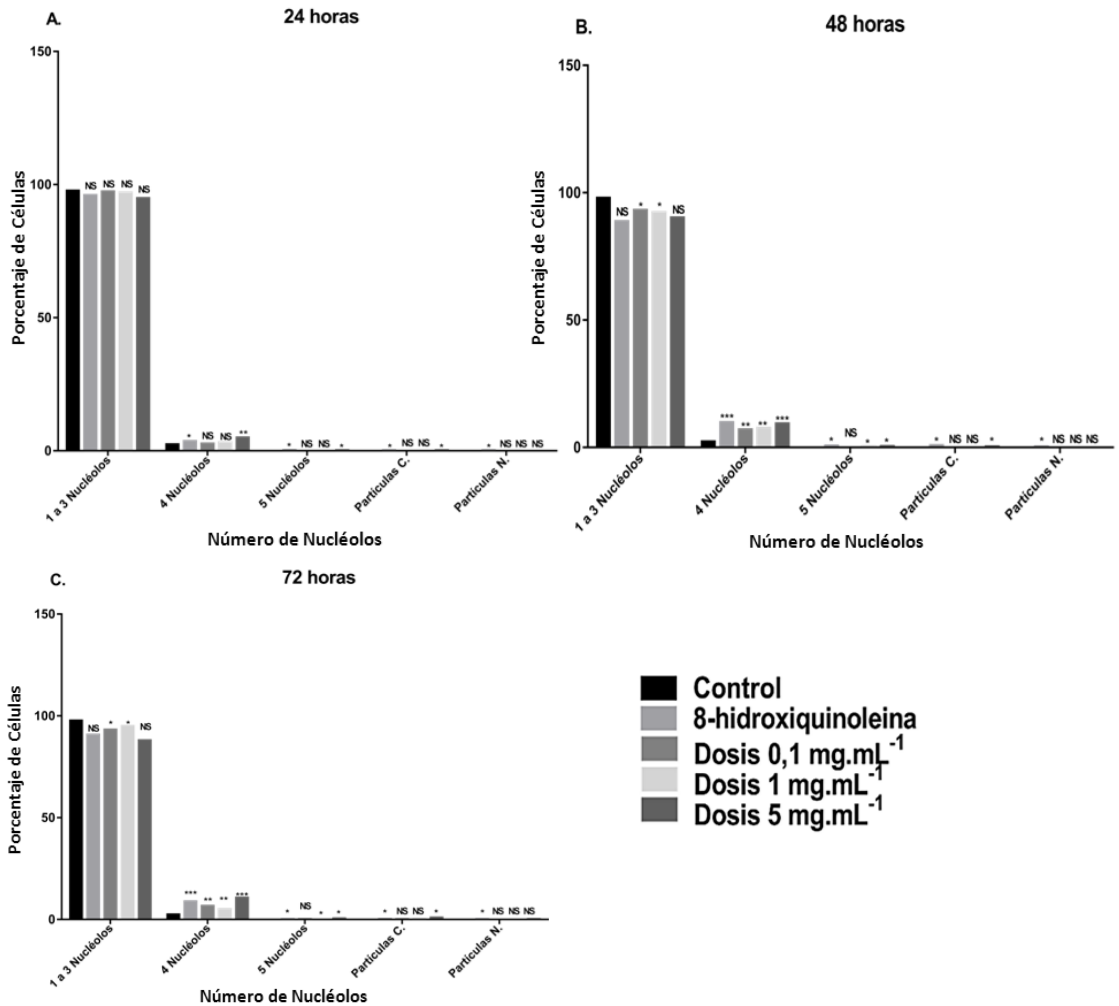


Fig. 1. Porcentaje de variaciones nucleolares encontrados en la exposición del extracto etanólico de *Solanum sisymbriifolium* en el índice de nucléolos de células meristemáticas de *A. cepa*.

Una característica importante de señalar, ha sido la presencia de partículas citoplasmáticas, con 24 horas de exposición, se observaron en el 0,12% de las células analizadas tanto para el control positivo como en la dosis de 5 mg.mL⁻¹. Otro grupo de partículas observadas, han sido las partículas nucleolares dentro del nucleoplasma y específicamente en el 0,12% de las células expuestas al control positivo.

Çavas y Ergene-Gözükara en el año 2003a, habían afirmado que la variación del número de nucléolos es un parámetro valioso que se puede emplear para estudios de genotoxicidad para distintos tipos de sustancias, observándose la presencia de 1 a 3 nucléolos en condiciones normales en las células meristemáticas de *A. cepa*, un número mayor a este nos indicaría efectos sobre la estructura de la región de organización nucleolar (Mazzeo y Marin-

Morales, 2015). Los mismos informaron también que el número de nucléolos y sus alteraciones morfológicas en células interfásicas son indicativos de parámetros funcionales de cambios en el genoma, siendo las regiones de organización nucleolar sensibles a dichos cambios (Çavas y Ergene-Gözükar, 2003b). Se destaca además que las alteraciones en el número y reducción en el tamaño de nucléolos en células de *A. cepa* expuestas a distintas concentraciones del extracto etanólico de *Solanum sisymbriifolium* son similares a los descritos por Arkhipchuk *et*

al. (2004), lo cual menciona que dicho eventos afectan las actividades funcionales del nucléolo, como ser la transcripción de genes ribosomales.

En cuanto a la morfología de los nucléolos, en las células con 1 a 3 nucléolos y expuestas al control negativo presentaron una forma esférica regular y, de tamaño similar, en aquellas células con 4 y 5 nucléolos y con las distintas dosis de exposición, presentaron una forma irregular, amorfa y densa y el tamaño entre las partículas variaba dentro del nucleoplasma celular (Fig. 2).

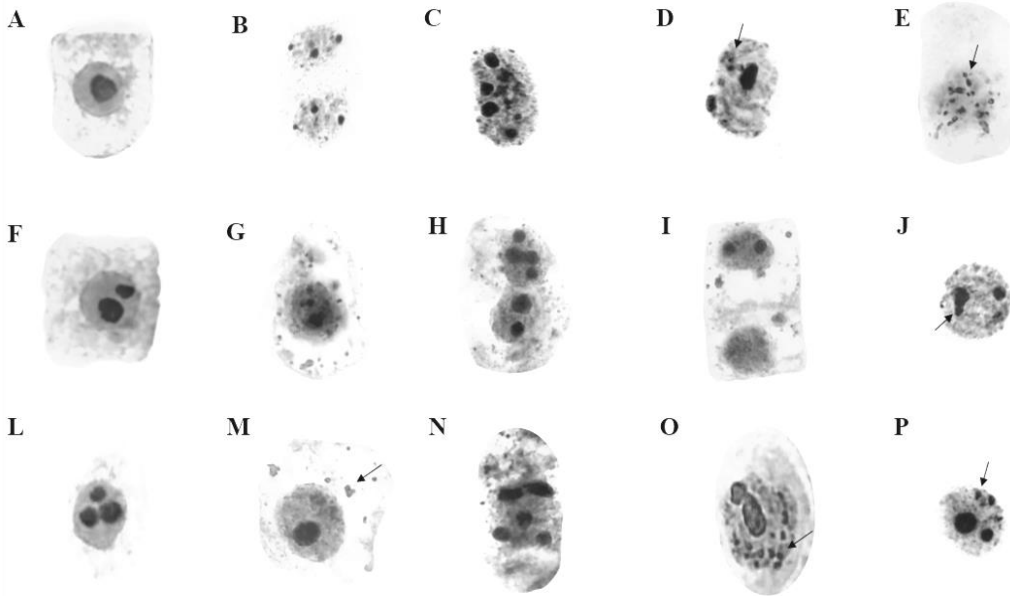


Fig. 2. Variaciones en el número de nucléolos en células meristemáticas de *A. cepa*. **A.** Célula normal 24 horas. **B.** Partículas en el núcleo, control positivo, 72 horas. **C.** Célula con 4 nucléolos 5 mg.mL⁻¹, 48 horas; **D-E.** Partículas en el núcleo (flecha) 1 y 5 mg.mL⁻¹, 72 horas. **F.** Célula normal de 2 nucléolos, 48 horas; **(G)** fragmento citoplasmático (flecha), control positivo, 48 horas. **H.** célula con 4 nucléolos 0,1 mg.mL⁻¹, 72 horas. **I.** Partículas citoplasmáticas 5 mg.mL⁻¹, 72 horas. **J.** nucléolo deforme 5 mg.mL⁻¹, 48 horas. **L.** célula normal con 3 nucléolos, 24 horas. **M.** fragmento citoplasmático (flecha) 5 mg.mL⁻¹, 24 horas. **N.** célula con 5 nucléolos, 5 mg.mL⁻¹, 72 horas. **O.** región de organización nuclear (flecha) control negativo, 24 horas. **P.** partículas en el nucleó (flecha), 5 mg.mL⁻¹, 48 horas.

En cuanto al tiempo de exposición por 48 horas, de 1 a 3 nucléolos por cada célula, se observaron en el 93,10% y 92,16% para las dosis de 0,1 y 1 mg.mL⁻¹ respectivamente, valores que no superaron al 97,86% de las células expuestas al control negativo, pero si se hallaron diferencias significativas esas dosis ($p < 0,05$), sin embargo, se observaron las dosis de 5 mg.mL⁻¹ y el control positivo valores que oscilaron entre 90,14% y 88,70%.

En las células con 4 nucléolos, se observaron en el 9,75% de las células expuestas al control positivo mayor respecto a los demás valores observados respecto al control negativo, el cual se observó en el 2,14%, lo mismo ocurrió para la dosis de 5 mg.mL⁻¹ con 9,26% de células ($p < 0,001$). Las dosis del extracto etanólico han demostrado resultados considerablemente significativos ($p < 0,01$) para 0,1 mg.mL⁻¹ en el 6,89% y 1 mg.mL⁻¹ en el 7,48% de células analizadas, ambos a 48 horas de exposición.

Con respecto a las células que han presentado 5 o más nucléolos, se han observado valores significativos ($p < 0,05$) debido a que con el control negativo no se observaron células con dicha cantidad de nucléolos, con el control positivo se observaron 0,59% de células con tales cantidades de nucléolos y para las dosis de 1 y 5 mg.mL⁻¹, se han obtenido valores similares, 0,35% de células analizadas.

En cuanto a los índices de partículas nucleolares dispersas en el citoplasma, con el tiempo de exposición de 48 horas se han observado en el 0,71% de las células analizadas con el control positivo y en el 0,24% con la dosis de 5 mg.mL⁻¹ ($p < 0,05$), con las demás dosis, 0,1 y 1 mg.mL⁻¹ y con el control negativo, no se han observado

células con partículas dispersas en el citoplasma, esto podría deberse a que las concentraciones de 0,1 y 1 mg.mL⁻¹ son bajas y no exhibieron efectos durante las 48 horas de exposición. Se enfatiza además que no se observaron células con las distintas dosis del extracto al buscar fragmentos nucleolares dentro del nucleoplasma, se observaron solamente con el control positivo, es decir, en el 0,24% de la células analizadas, debido posiblemente a que con ese tiempo de exposición y con las dosis utilizadas, aún no ocasionan efectos evidentes.

Çavas y Ergene-Gözükara en el año 2003a, informaron que el número y tamaño de los nucléolos están directamente relacionados con la proliferación y diferenciación celular, por lo tanto, las alteraciones en el número nucleolar y el tamaño estarían reflejando daños en la activación/inactivación de la síntesis de ARN ribosomal.

Los valores observados en células con 1 a 3 nucléolos y tratadas por 72 horas, se han observado en el 90,71% para el control positivo, en el 93,16% y 94,88% de las células con las dosis 0,1 y 1 mg.mL⁻¹, ambos valores no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$) respecto al control negativo, donde se observó en el 97,61% de las células analizadas, solamente con la dosis de 5 mg.mL⁻¹ en donde se observó un 87,92%, fue altamente significativo ($p < 0,001$).

En cuanto a las células con 4 nucléolos, se obtuvieron valores que superaron al control negativo, un 2,38% de células analizadas, un 8,81% para el control positivo, un 6,16% para la dosis de 0,1 mg.mL⁻¹, un 5% con dosis de 1 mg.mL⁻¹ y con la dosis de 5 mg.mL⁻¹ en el 10,65% de las células analizadas ($p < 0,01$).

En relación a las células con 5 nucléolos, se observaron que tanto en el control positivo como en las dosis de 0,1 mg.mL⁻¹ se observaron valores similares, en el 0,12% de las células analizadas. Cabe destacar que con la dosis de 5 mg.mL⁻¹ se observaron en el 0,48% de las células analizadas, las cuales fueron significativamente distintas al control negativo, pues no se han observado células con 5 nucléolos, como también con la dosis de 1 mg.mL⁻¹.

En cuanto a los cuerpos prenucleolares citoplasmáticos, con tiempo de exposición de 72 horas de tratamiento, se ha observado valores que superan al control negativo, donde no se han observado células, respecto a las dosis de 0,1 mg.mL⁻¹ y 1 mg.mL⁻¹, que se han observado en el 0,12% de las células analizadas, sin embargo, con la dosis de 5 mg.mL⁻¹, se obtuvo un valor de 0,84% de células, presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) en comparación con el control negativo.

Según Karpova *et al.* (2006), el aumento del tamaño del nucléolo, resultante de la exposición a sustancias, está íntimamente relacionado con alteraciones en el metabolismo nucleolar, dichas alteraciones conducen a una amplificación génica ribosomal y/o una actividad transcripcional alta, generando una acumulación de los productos de transcripción en el nucléolo.

En cuanto a las células con partículas nucleolares dentro del nucleoplasma, con 72 horas de exposición, se han obtenido valores similares para el control positivo y con la dosis de 5 mg.mL⁻¹, en ambos casos, se observaron 0,12% de las células analizadas, siendo estas significativamente mayor ($p < 0,05$) debido a que no se

observó células de *Allium cepa* con partículas dentro del nucleoplasma en el control negativo. Así mismo, es importante señalar que no se hallaron células con partículas de origen nucleolar en el nucleoplasma en los otros tiempos de exposición (24 horas y de 48 horas), lo cual podría deberse a que aún no se podrían manifestar efectos genotóxicos o citotóxicos con las dosis de 0,1 y 1 mg.mL⁻¹. El fenómeno observado también evidenciaría el hecho de que el extracto utilizado puede ser considerado genotóxico, esto podría deberse a la presencia de alcaloides como solacaproína, solanidina, cuscohigrina, solanina, de entre los cuales la solanina, se ha evidenciado en otro estudio que posee actividad genotóxica empleando tres líneas celulares tumorales humanas, TK-10 (adenocarcinoma renal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y UACC-62 (melanoma), esto porque la mayoría de los alcaloides interactúan con el ADN como agente intercalante (Cowan, 1999; Sáinz *et al.*, 2004; Ibarrola y Degen de Arrúa, 2011). El número de nucléolos en cada célula corresponde a los centros activos de la síntesis de ARNr en el núcleo interfásico de *Allium cepa*, según Mazzeo y Marin-Morales (2015) mencionan que los nucléolos pueden cambiar su número por anfiplastia, una expresión citológica que puede inducir cambios en la morfología cromosómica con la desaparición de alguna constricción secundaria (no actividad funcional de todos los NORs, presentes en la célula), ubicadas en el extremo de los brazos de los cromosomas, en algunos casos corresponden a las regiones de organización de nucléolos, por lo tanto, las alteraciones en el nucléolo en cuanto a número y tamaño estarían

reflejando daños en la activación/inactivación de la síntesis de ARN ribosómico (Leek *et al.*, 1991).

Finalmente resulta necesario realizar próximos estudios que permitan diferenciar y analizar los genes implicados en la síntesis de ARNr o en todo caso realizar pruebas más específicas que evidencien las alteraciones sobre el número y morfología de los nucléolos en células y su implicancia en la expresión de ARNr.

CONCLUSIONES

Los resultados encontrados sugieren que el extracto etanólico de *S. sisymbriifolium* podría tener efecto genotóxico sobre la actividad biosintética nucleolar, a distintas dosis en tiempos de exposición de 48 y 72 horas afectando específicamente la cantidad y la morfología de las regiones de organización nucleolar en células meristemáticas de *A. cepa*, también se han observado la presencia de una mayor cantidad de nucléolos en concentraciones de 1 mg.mL⁻¹ y 5 mg.mL⁻¹. Dichos eventos podrían estar alterando la transcripción de ARNr y a su vez generar algún efecto sobre la síntesis proteica en las células analizadas.

Se recomienda continuar la evaluación de las actividades tanto citotóxicas como genotóxicas del extracto etanólico de las hojas de *S. sisymbriifolium*, así como de otros órganos de la planta, empleando otros organismos modelos como *Drosophila melanogaster*, *Vicia faba*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*, así como también otros ensayos, como el ensayo cometa y el ensayo de alteraciones cromosómicas en sangre periférica.

AGRADECIMIENTOS

Destacamos el agradecimiento a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y al Departamento de Biología por la predisposición para el uso de los laboratorios y materiales que requería la investigación llevada a cabo. Así también agradecemos a la especialista botánica Prof. Lic. Gloria Delmás por la ayuda en la identificación botánica de los especímenes utilizados en este estudio.

REFERENCIAS

- Arkhipchuk, V.V.; Goncharuk, V.V.; Chernykh, V.P.; Maloshtan, L.N. y Gritsenko, I.S. 2004. Use of a complex approach for assessment of metamizole sodium and acetylsalicylic acid toxicity, genotoxicity and cytotoxicity. *J. Appl. Toxicol.* 24:401–407.
- Apu, A.S.; Bhuyan, S.H.; Matin, M.; Hossain, F.; Khatun, F. y Taiab, A. 2013. Analgesic, neuropharmacological, anti-diarrheal, and cytotoxic activities of the extract of *Solanum sisymbriifolium* (Lam.) leaves. *Avicenna journal of phytomedicine*, 3(4): 302-312.
- Burkart, A. 1979. Flora Ilustrada de Entre Ríos. Colecc. Cient. INTA 6(5): Dicotiledóneas Metaclamídeas. A: Primulales, Plumbaginales, Ebenales, Contortales, Tubiflorales, Callitrichales, Plantaginales.
- Cáceres, M. y Machaín, M. 2001. Manual de uso de hierbas medicinales del Paraguay. Proyecto Paraguay Farmacopea Tradicional, Patrimonio Cultural y Estrategia de

- Desarrollo. Fundación Celestina Pérez de Almada–Oficina Regional de Ciencias y Tecnología para América Latina y el Caribe *UNESCO*.
- Çavas, T. y Ergene-Gözükara, S. 2003a. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutat. Res.* 534:93–99.
- Çavas, T. y Ergene-Gözükara, S. 2003b. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538: 81–91.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12(4): 564–582.
- Degen De Arrúa, R. y González, Y. 2014. Plantas utilizadas en la medicina popular paraguaya como antiinflamatorias. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*.13(3): 213-231.
- Goessens, G. 1984. Nucleolar structure. *International review of cytology*. 87: 107-158.
- Hadid, M.; Cosa, M.T.; Dottori, N. y Liscovsky, I. J. 2007. Anatomía de la raíz de *Solanumsisymbriifolium* (Solanaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*. 26(1): 10-4.
- Hammer, Ř.; Harper, D.A.T. y Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica*. 4(1): 1-9.
- Hizume, M.; Sato, S. y Tanaka, A. 1980 A highly reproducible method of nucleolus organizing regions staining in plants. *Stain Technol.* 55:87–90.
- Hostettmann, K.; Gupta, M. P.; Marston, A. y Ferreira Quiroz, E. 2008. Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos. Secretaría Ejecutiva de la Organización del Convenio Andrés Bello. Colombia. 234 pp.
- Ibarrola, D.A. y Degen De Arrúa, R.L. 2011. Catálogo ilustrado de 80 plantas medicinales del Paraguay. Facultad de Ciencias Químicas-UNA y Agencia de Cooperación Internacional del Japón, Asunción, Paraguay.
- Karpova, S.S.; Kalaev, V.N.; Artyukhov, V.G.; Trofimova, V.A., Ostashkova, L.G. y Savko, A.D. 2006. The use of nucleolar morphological characteristics of birch seedlings for the assessment of environmental pollution. *Biol. Bull.* 33:73–80
- Leek, R.D.; Alison, M.R. y Sarraf, C.E. 1991. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. *J. Pathol.* 165:43–51.
- Leme, D.M., y Marin-Morales, M.A. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), 71-81.
- Li, M., Qin, R., Jiang, W. y Liu, D. 2015. Cytogenetical effects of aluminum on root meristem cells of *Helianthusannuus* L. *Botanical Sciences*, 93(1), 15-22.

- Martín, G.G. 2001. Reiniciación de la transcripción en el ciclo celular: Nucleogénesis. In Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 67(1):1-48.
- Mazzeo, D.E.C. y Marin-Morales, M.A. 2015. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. Environmental Science and Pollution Research. 22(13): 9796-9806.
- Pin, A.; González, G.; Marín, G.; Céspedes, G.; Cretton, S.; Christen, P. y Roguet, D. 2009. Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. Asociación Etnobotánica Paraguaya. 441p.
- Sáinz, M.T., Japón, J.B., Peralta, M.G. y Martín-Cordero, C. 2004. Actividad citotóxica de *Solanum melongena* L. Revista de Fitoterapia, 4(2), 149-151.
- Singh, K.P.; Dwevedi, A.K. y Dhakre, G. 2011. Evaluation of antibacterial activities of *Chenopodium album* L. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 2(3): 398-401.
- Vaghela, J.; Rana, M.; Savalia, V. y Sheth, N.R. 2009. Evaluation of antifungal activity of methanolic extract of leaves and stems of *Solanum sibiricum* Lam. Pharmacologyonline. 3: 1-5.
- Zuloaga, F.O. 2017. Flora del Conosur. Disponible en: <http://www2.darwin.edu.ar/proyectos/floraargentina/buscaespecies.asp>