

Efecto antimitótico y citotóxico del extracto etanólico de *Genipa americana* L. sobre tejido meristemático de *Allium cepa* L. y cultivo celular NCTC-929.

Fernandez, V.^{1*}; Franco de Diana, D.¹; Fernández, D.¹; Vega Gómez, M.C.²; Segovia Abreu, J.¹; Castiglioni, D.¹; Sales, L.¹; Martínez, M.³; López, D.⁴; Bobadilla, N.¹; Alfonso, J.¹; Mojoli Le Quesne, A.¹; Monges, D.¹; Vera, M.³

¹Laboratorio de Mutagénesis Ambiental, Departamento de Biología, FaCEN - UNA, Paraguay.

²Centro para el desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC)

³Laboratorio Análisis de Recursos Vegetales. Departamento de Biología. FaCEN - UNA, Paraguay

⁴ Departamento de Matemática, FaCEN - UNA, Paraguay

*e-mail: vfernandez@facen.una.py – virginiafernandezperalta@gmail.com

Efecto antimitótico y citotóxico del extracto etanólico de *Genipa americana* L. sobre tejido meristemático de *Allium cepa* L. y cultivo celular NCTC-929. Se evaluaron los efectos producidos por extractos etanólicos preparados con hojas de *Genipa americana* L. (Ñandypa) sobre el ciclo replicativo celular utilizando el *Allium* test y fibroblastos de la línea celular NCTC-929. Se midieron el índice mitótico, índice de fases, la duración del ciclo celular y la citotoxicidad metabólica respectivamente. Los análisis demostraron que las células tratadas presentan menor índice mitótico, produciéndose una alteración en el ciclo celular. Se registraron puentes intercromosómicos, fragmentos durante las anafases, y cromosomas adelantados y rezagados.

Palabras claves: *Genipa*, citotoxicidad, *Allium* test, línea celular NCTC-929.

Anti-mitotic and Cytotoxic effects of ethanolic extracts of *Genipa americana* L. on meristematic tissue of *Allium cepa* L. and NCTC-929 cell cultures. The effects of ethanolic extracts of *Genipa americana* L. (Ñandypa) on cell replication cycle were evaluated using the *Allium* test and NCTC-929 fibroblast cell cultures. The mitotic index, the mitosis phases index, the extent of the cell cycle and the metabolic cytotoxicity were measured respectively. The analysis verified that the cells under treatment had a lower mitotic index; thus altering the cell kinetics. Interchromosomal bridges in anaphase, as well as lagging chromosomes and chromosomal fragments were registred.

Keywords: *Genipa*, cytotoxicity, *Allium* test, NCTC-929 cell cultures.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la investigación y el desarrollo de drogas de origen vegetal ha cobrado especial importancia a través de la exhortación realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a que cada país utilice todos sus recursos en beneficio de la Atención Primaria de la salud (Saravia G, 2008).

Actualmente los productos de origen natural representan casi el 40% de los

medicamentos prescritos en la clínica (Newman, 2008) De esta manera los principios activos pueden ser aislados de manera directa a partir del material biológico, muchos de ellos constituyendo fuertes inhibidores de tumores (Suffness & Cordell, 1985), o bien pueden sufrir alguna modificación química con el objetivo de mejorar alguna propiedad farmacocinética o farmacodinámica.

Las drogas antitumorales frecuentemente actúan inhibiendo la mitosis en varias etapas

del proceso. Cualquier sustancia que afecte la síntesis de DNA, RNA o las proteínas, así como la formación del huso, deben inhibir la proliferación, recibiendo el nombre de agentes cicloactivos (Salvadori, Ribeiro, & Fenech, 2003). Entre las drogas ciclo activas se encuentra la colchicina y sus derivados, el Colcemid y la Vinblastina que impiden la polimerización de los microtúbulos del huso, deteniendo la mitosis en metafase, estado conocido como C-mitosis o C-metafase (Takahashi, 2003). Ambas drogas cicloactivas son utilizadas para tratamiento de diferentes tipos de cáncer y se clasifican dentro del grupo de drogas citotóxicas debido a que causan la detención o retardo del ciclo celular, e inclusive la muerte celular. (Cas-sady & Douros, 1980; Coufal & Farnaes, 2010; Jha, Bamberg, & Bedford, 1994; Jordan & Wilson, 2004). Otras investigaciones realizadas con *Maytenus ilicifolia* (Fam. Celastraceae) y especies relacionadas han determinado a la maitenina como principio activo de propiedades antitumorales (Alonso & Desmarchelier, 2007).

Previas evidencias sugieren efectos antitumorales de los iridoides producidos por *Genipa americana* L. (Ueda, Iwahashi, & Tokuda, 1991). En la presente investigación se evaluaron los efectos citotóxicos y sobre el ciclo celular del extracto etanólico producido a partir de las hojas de *Genipa americana* L., a través del *Allium* test y de líneas de cultivo celular de fibroblastos NCTC- 929

Genipa americana L. es un árbol pequeño a mediano de 4-20 metros de altura de la familia de las Rubiaceae, de flores blancas, fruto en baya y hojas de punta larga (Heyne, 1950; Kasahara, 1986) utilizadas en el tratamiento de la diabetes, disminución del colesterol y como adelgazante (Pin et al.,

2009). Se distribuye desde el Sur de México hasta Argentina, Brasil y Paraguay. Es una especie de la Región Oriental, encontrándose con mayor frecuencia en la Cuenca del Río Paraguay. Prefiere suelos arenosos, habitando más los sitios elevados y abiertos. A menudo también se lo encuentra a lo largo del Río Jejuí Guasu y otros ríos de la Región Oriental del Paraguay (Bernardi, 1985; Lopez, Little, & Ritz, 2002; Ortega Torres, Stutz de Ortega, & Spichiger, 1989).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron hojas de *G. americana* provenientes de la zona sur de la ciudad de Fernando de la Mora, Paraguay. El ejemplar testigo de la planta se encuentra depositado en el herbario Fa.C.E.N UNA. El extracto etanólico se preparó a una concentración 50:50 (solución madre).

Evaluación de efecto cicloactivo y determinación del índice mitótico (IM) y de fases (IF) en células meristemáticas de Allium cepa.

Del extracto de la planta se realizaron diluciones de 0,1% - 0,5% - 1% - 1,5% -5% y 10%. Para la evaluación fueron utilizadas raíces obtenidas de bulbos de *A. cepa* con oxigenación constante y a temperatura de 19-22 °C; de 1 a 5 centímetros (Roldán, Noriega, Wagner, Gurni, & Bassols, 2007) colocándolas en cajas de Petri y sometiéndolas a cuatro horas de tratamiento con el extracto preparado a las concentraciones citadas anteriormente y en condiciones de luz y temperatura controladas. Posteriormente las raíces fueron fijadas en solución Farmer (etanol/ácido acético 3:1, v:v) (Sass, 1958) durante una hora;

hidrolizadas en solución de ácido clorhídrico 5N por un periodo de 10 minutos y coloreadas con orceína acética. El preparado fue realizado practicando el *squash* (Macgregor, 1993). El tratamiento control fue realizado de la misma manera, utilizando agua potable (control negativo) y colchicina (control positivo).

Los preparados fueron observados a través de microscopia óptica, registrándose las fases y anormalidades presentes en el ciclo celular en un total de 1000 células por cada lámina. Se calcularon el índice mitótico (IM) y el índice de fases (IF) a partir de las siguientes fórmulas:

$$IM = \text{N}^{\circ} \text{ de células en mitosis} / \text{total de células}$$

$$IF = \text{N}^{\circ} \text{ de células en cada fase} / \text{total de células en mitosis}$$

Determinación de la citotoxicidad metabólica en fibroblastos de línea celular NCTC- 929.

Se utilizaron fibroblastos de la línea celular NCTC- 929. Se sembraron 30 x 104 fibroblastos por pocillo en placas de 96 pocillos con 100 µl de medio MEM, e incubados durante 8-24 horas a 37 °C, 5% CO₂, para que las células se adhieran a las placas. Transcurrido este tiempo se retiraron los medios y se añadieron 200 µl de medio fresco con el producto a ensayar a distintas concentraciones y cada una de ellas por triplicado, incubando las placas otras 48 horas. Terminado este plazo, se añadieron 20 µl de solución de resazurina 2 mM pH 7. A las tres horas de incubación con el sustrato se determinaron las absorbancias midiéndolas a 490 y 595 nm para calcular el porcentaje de citotoxicidad (%C) de cada concentración del extracto de *G. americana*.

El porcentaje de citotoxicidad se calculó dividiendo el porcentaje de reducción de las células en tratamiento y el porcentaje de reducción de las células control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos fitoquímicos preliminares delataron la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles, esteroides y metilesteroides, saponinas y coumarinas volátiles. En el análisis estadístico de *t-student* de los índices mitóticos y de fases a diferente dosis de tratamientos con un nivel de significancia del 0,05. Las raíces tratadas durante cuatro horas con extracto de *G. americana* demostraron una disminución considerable en cuanto a la proliferación celular con relación al control, disminuyendo el índice mitótico e índice de fases (Gráficos 1, 2, 3, 5 y 6), a excepción de aquellas bajo tratamiento de 1,5% (Gráfico 4); los cuales no arrojaron datos significativos.

La disminución del índice de fases indica que el ciclo se retrasa antes de pasar a la fase M, sin detener todo el ciclo, ya sea al final de G₂ o en el tránsito de G₂ a M. Esto se deduce por la poca cantidad de células en división. Sin embargo puede discutirse el bloqueo de la fase M al encontrar alto índice de metafases, anafase, y telofases. Estos datos se repiten para la concentración del 10% (Gráfico 6), ya que el nivel de toxicidad es mayor, observándose el bloqueo de la proliferación celular y el crecimiento radicular.

Del análisis estadístico se puede inferenciar que al someter células en proliferación a cuatro horas de tratamiento con las diferentes concentraciones, todas ellas han entrado a la fase M y continuaron normalmente hasta el final de la telofase,

pero aquellas que salieron de la fase S para entrar a la Fase G₂, fueron retenidas en esta etapa del ciclo, evidenciándose por la disminución de células en fase M. Resultados similares fueron reportados por Camargo *et al.* (1998). Cabe resaltar que fue registrada una gran cantidad de células con cromosomas pegajosos (Gráfico 7C y 7E), así como puentes intercromosómicos (Gráfico 7D).

En lo que respecta al bioensayo en el cultivo de la línea celular NCTC- 929 el porcentaje de fibroblastos muertos (%C) puestos en tratamiento durante 48 horas, han demostrado una alta tasa de mortalidad celular. Cabe resaltar que la mortalidad de los fibroblastos fue más pronunciada en aquellos tratados con soluciones preparadas

a base del extracto crudo que aquellos tratados con soluciones preparadas a base del extracto en suspensión (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de fibroblastos NCTC929 muertos

Extracto	Conc. %	%C	(%C)
Ñandypa	10	100	5,5
	5	100	2,7
	1,5	100	2,0
	1	100	0,3
	0,5	100	0,6
	0,1	0	0,4

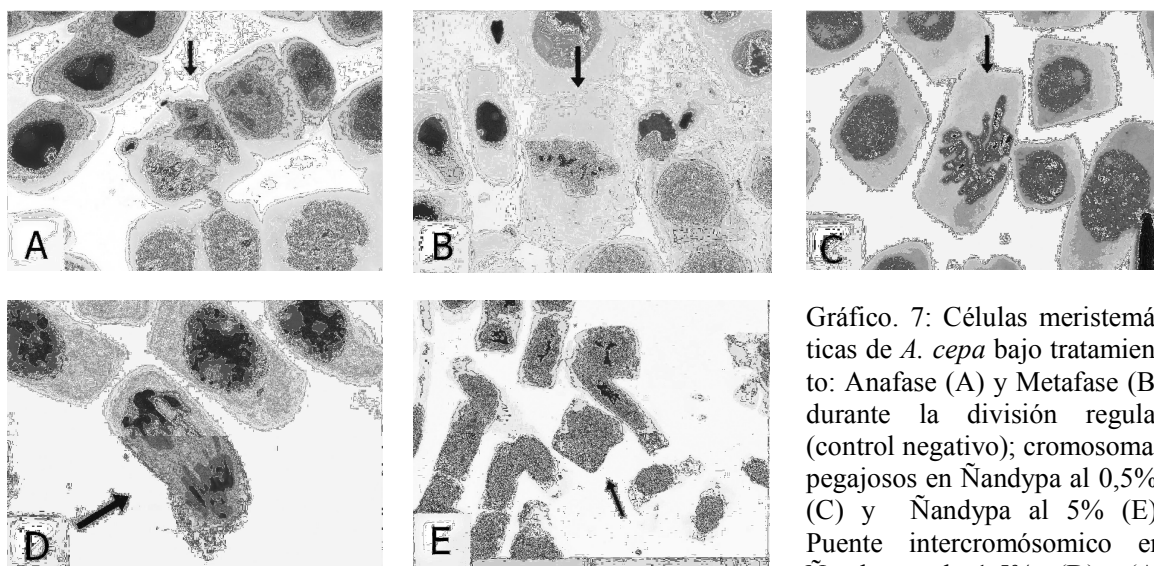


Gráfico. 7: Células meristemáticas de *A. cepa* bajo tratamiento: Anafase (A) y Metafase (B) durante la división regular (control negativo); cromosomas pegajosos en Ñandypa al 0,5% (C) y Ñandypa al 5% (E); Puente intercromosómico en Ñandypa al 1,5% (D); (A: 100X)

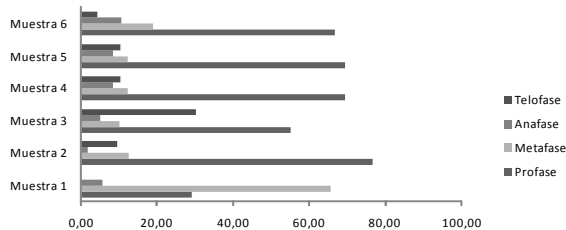


Gráfico 1: Índice de fases bajo tratamiento al 0,1%

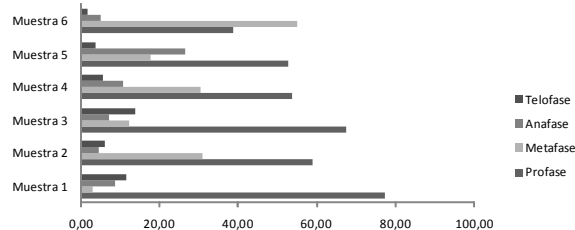


Gráfico 2: Índice de fases bajo tratamiento al 0,5%

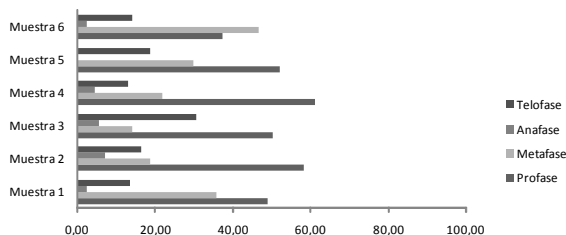


Gráfico 3: Índice de fases bajo tratamiento al 1%

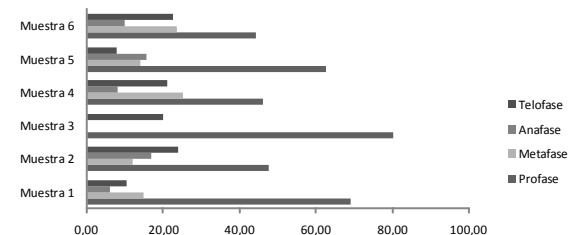


Gráfico 4: Índice de fases bajo tratamiento al 1,5%

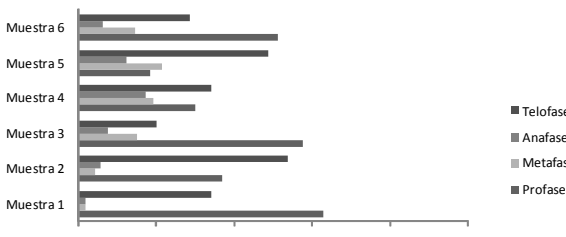


Gráfico 5: Índice de fases bajo tratamiento al 5%

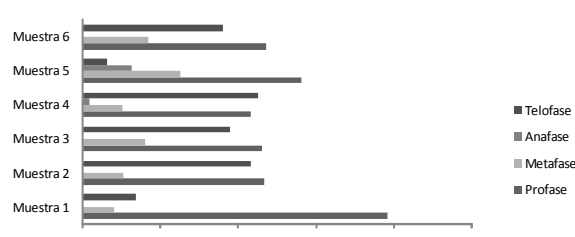


Gráfico 6: Índice de fases bajo tratamiento al 10%

CONCLUSIONES

El extracto preparado de hojas de *G. americana* posee un efecto ciclo activo significativo inhibiendo la entrada a la fase M del ciclo celular de las células meristemáticas de *A. cepa* y la inhibición del ciclo celular de los fibroblastos NCTC- 929.

Los resultados obtenidos con estos bioensayos son de carácter preliminar, constituyendo el punto de partida para la realización de análisis más específicos y sensibles como cultivo de linfocitos para la evaluación de biomarcadores con el test del cometa, intercambio de cromátidas hermanas. De este modo se podría evaluar a que dosis existe un posible riesgo genotóxico humano y abrir la posibilidad de estudios toxicológicos, fitoquímicos y sistemáticos

para detectar principios activos que puedan detener la proliferación de células tumorales.

AGRADECIMIENTOS

Al Decano Prof. Lic Nicolas Guefos Kapsalis.MAE y a los directivos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UNA. los estudiantes de Iniciación Científica: Natalia Zaracho, Daisy Alarcón, Cathia Coronel, Silvia Fernández, Mónica Benítez, Julieta Sánchez, Katherine Samudio, Sara Núñez.

BIBLIOGRAFIA

Alonso, J., & Desmarchelier, C. 2007. *Maytenus ilicifolia* Martius (Cangorosa). Boletín Latinoamericano y

- del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6(1), 11–22.
- Bernardi, L. 1985. Contribución a la Dendrología Paraguaya. Segunda Parte. Boissiera, 37, 281-320.
- Camargo, M., Ángel, G., Betancur, L., & Ossa, J. 1998. Cell cycle effects of *Euphorbia aphylla* extracts. Actual Biol, 20(69), 121-130.
- Cassady, J. M., & Douros, J. 1980. Anticancer agents based on natural product models. Academic Press.
- Coufal, N., & Farnaes, L. 2010. The Vinca Alkaloids. En B. R. Minev (Ed.), Cancer Management in Man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures. Springer.
- Heyne, K. 1950. De nuttige planten van Indonesië (Vol. 1). W. van Hoeve.
- Jha, M. N., Bamburg, J. R., & Bedford, J. S. 1994. Cell cycle arrest by Colcemid differs in human normal and tumor cells. Cancer research, 54(18), 5011.
- Jordan, M. A., & Wilson, L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. Nat Rev Cancer, 4(4), 253-265.
- Kasahara, Y. S. 1986. Medicinal herb index in Indonesia. PT Eisai Indonesia.
- López, J., Little, E., & Ritz, G. 2002. Árboles comunes del Paraguay: Ñande yvyra mata kuera.
- Macgregor, H. C. 1993. An introduction to animal cytogenetics. Chapman & Hall.
- Newman, D. J. 2008. Natural Products as Leads to Potential Drugs: An Old Process or the New Hope for Drug Discovery? J. Med. Chem., 51(9), 2589-2599.
- Ortega Torres, E. O., Stutz de Ortega, L. S. de, & Spichiger, R. 1989. Flora del Paraguay: Noventa especies forestales del Paraguay. Ginebra S.Louis (CHUS): Conservatoire et Jardin Botaniques de la Ville de Genève-Missouri Botanical Garden.
- Pin, A., González, G., Marín, G., Céspedes, G., Cretton, S., Christen, P., & Roguet, D. 2009. Plantas medicinales del Jardín Botánico de Asunción. Asunción: Asociación Etnobotánica Paraguaya.
- Roldán, R. M., Noriega, M. F., Wagner, M. L., Gurni, A. A., & Bassols, G. B. 2007. Estudio de genotoxicidad de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl.-Simaroubaceae. Acta toxicológica argentina, 15(2), 39–42.
- Salvadori, D., Ribeiro, L., & Fenech, M. 2003. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. En L. Ribeiro, D. Salvadori, & E. Marques (Eds.), Mutagênese ambiental (págs. 201-223). Canoas: ULBRA.
- Saravia G, A. 2008. Validación farmacológica de plantas medicinales de uso popular en Guatemala. C6 (págs. 1-6). Presentado en la III Conferencia Latinoamericana en las Ciencias Exactas y de la Vida «Ciencia Mujer 2008».
- Sass, J. E. 1958. Botanical microtechnique. Iowa State College Press.
- Suffness, M., & Cordell, G. A. 1985. Antitumor alkaloids. The alkaloids: chemistry and pharmacology (Vol. 25, págs. 1–355).
- Takahashi, C. 2003. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. En L. Ribeiro, D. Salvadori, & E. Marques (Eds.), Mutagênese ambiental (págs. 201-223). Canoas: ULBRA.
- Ueda, S., Iwahashi, Y., & Tokuda, H. 1991. Production of Anti-Tumor-Promoting Iridoid Glucosides in *Genipa americana* and Its Cell Cultures. J. Nat. Prod., 54(6), 1677-1680.