

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
ÁREA DE FARMACOLOGÍA – INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
FARMACO BIOQUÍMICAS**



**DETERMINACIÓN GENOTÓXICA DEL EXTRACTO TOTAL  
DICLOROMETÁNICO DE CORTEZA DE *Galipea longiflora*  
Krause, MEDIANTE EL TEST DE MUTACIÓN Y  
RECOMBINACIÓN SOMÁTICA (SMART)**

**Tesis para optar Título de Lic. en Química Farmacéutica.**

**Postulante: Pseidy Luz Mamani Crispin.**

**LA PAZ – BOLIVIA  
2006**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
ÁREA DE FARMACOLOGÍA – INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
FARMACO BIOQUÍMICAS**



**DETERMINACIÓN GENOTÓXICA DEL EXTRACTO TOTAL  
DICLOROMETÁNICO DE CORTEZA DE Galipea longiflora  
Krause, MEDIANTE EL TEST DE MUTACIÓN Y  
RECOMBINACIÓN SOMÁTICA (SMART)**

**Tesis para optar Título de Lic. en Química Farmacéutica.**

**Postulante: Pseidy Luz Mamani Crispin.**

**Asesores: Eduardo Gonzales Dávalos Ph.D.**

**Araceli Pillco Tito MSc.**

**LA PAZ – BOLIVIA  
2006**

## **DEDICATORIA**

*PARA LA LUZ DEL CENTRO DE MI UNIVERSO, PARA TI MAMITA QUERIDA, PUES SIN LA LUZ DE TU GUÍA MI SER ANDARÍA PERDIDO Y PARA MIS DOS ESTRELLITAS, KATIA Y YESID, QUE SIEMPRE ILUMINARON CON SU BRILLO MIS DÍAS.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A MIS TUTORES, EDUARDO GONZALES Y ARACELLI PILLCO (CELITA), QUIENES CON SU APOYO, AMISTAD Y CONFIANZA, ME AYUDARON A CUMPLIR CON ESTE SUEÑO Y AMPLIAR MIS EXPECTATIVAS PROFESIONALES.*

*AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS, AL Dr. ALBERTO GIMÉNEZ, POR PROPORCIONARME EL EXTRACTO DE EVANTA Y FACILITARME LA BIBLIOGRAFÍA SOBRE ELLA.*

*AL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y A TODOS LOS COMPONENTES DEL MISMO, QUIENES DESDE EL PRINCIPIO ME BRINDARON COLABORACIÓN Y AMISTAD.*

*A TODOS LOS QUE FUERON MIS DOCENTES EN ESTOS CINCO AÑOS DE CARRERA, GRACIAS POR PROPORCIONARME LAS ARMAS NECESARIAS PARA EL DESEMPEÑO DE MI LABOR PROFESIONAL.*

*A PAULINA BERMEJO Y MARÍA DOLORES VEIGA, AMIGAS Y MAESTRAS QUE CONFIARON EN MI, ME BRINDARON COLABORACIÓN Y GUÍA PARA CONSEGUIR MIS OBJETIVOS.*

*A TODA MI FAMILIA, QUE ME APOYO INCONDICIONALMENTE Y SOBRE TODO A MI TÍA MARY CHUQUIMIA QUIEN EN ESTOS AÑOS FUE MI SEGUNDA MADRE, A MIS PRIMOS MAYRA, YAMIL Y MIRKO.*

*A MI PADRE, GRACIAS POR TODO VIEJITO.*

*A MIS AMIGAS MÓNICA Y ANGELITA, POR SU AMISTAD INCONDICIONAL, PUES EN ESTOS AÑOS SIEMPRE ESTUBIERON A MI LADO.*

*A TODOS AQUELLOS AMIGOS QUE EL DE ARRIBA ME REGALO, GRACIAS CHICOS Y CHICAS. Y COMO OLVIDARTE A VOS MAURI QUIEN SIN SABERLO ME APOYÓ CUANDO MÁS LO NECESITE.*

**S***i La Palabra Gracias Describe Todo Lo Que Siento, Pues Mil Gracias A Todos, Sobre Todo A Vos Diosito Querido, Gracias.....”.*

**S***ey.*

## RESUMEN

La especie vegetal *Galipea longiflora* Krause, conocida comúnmente como Evanta, es empleada por pobladores de las etnias Tsimane, Tacana y Mosekene de Bolivia como planta medicinal. Actualmente esta especie se encuentra siendo estudiada por sus propiedades leishmanicidas, es así que mediante diferentes evaluaciones se demostró su actividad farmacológica, la cual es atribuida a los alcaloides quinolínicos encontrados en los extractos de Evanta. En el presente trabajo se determinó la actividad genotóxica del extracto total diclorometánico de corteza de Evanta, mediante la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART), que emplea a *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) como organismo experimental. Donde dos tipos de cruce fueron empleados: Estándar (ST), en el cual hembras vírgenes de la cepa *flr*<sup>3</sup> fueron cruzadas con machos del linaje *mwh*, este cruce es capaz de detectar mutágenos de acción directa, y el cruce de Alta Bioactivación (HB), donde se cruzaron hembras vírgenes de la cepa *ORR* con machos del linaje *mwh*, este cruce posee la capacidad de detectar mutágenos de acción indirecta. Larvas de tercer instar procedentes de ambos cruces fueron tratadas con concentraciones sub-tóxicas de 30, 60, 125, 250 y 500 ug/mL del extracto orgánico y un control negativo, que fue el diluyente (Tween 80 1.3% y etanol 1.6%). Se empleó como control positivo datos históricos de Mitomicina C, los cuales garantizaron la actividad de las cepas. Los resultados obtenidos analizados mediante el estadístico de Kastenbaum-Bowman ( $\alpha = \beta = 0,05.$ ), sugieren que el extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* K. no produce daño genotóxico, a las concentraciones evaluadas mediante la prueba SMART, en las condiciones experimentales empleadas en el desarrollo del presente trabajo.

## ABSTRACT

The vegetal species *Galipea longiflora* Krause, well-known commonly like Evanta, is used by the people of the ethnic groups Tsimane, Tacana and Mosekene of Bolivia, and used as medicinal drug. At the moment it is being widely studied by its treatment of Leishmaniasis by means of different evaluations that had demonstrated its pharmacology activity, which is attributed to the present quinoline alkaloids in this species. In order to determine the genotoxic activity of the dichloromethane total extract of crust of Evanta, it was used the Test of Mutation and Recombination Somatic (SMART), which uses *Drosophila melanogaster* (fruit fly) as though an experimental organism. Two types of crossing were used: Standard (ST), where virgin females of the stock *flr*<sup>3</sup> were crossed with males of the lineage *mwh*, which are able to detect mutagens of direct action. And High Bioactivation crosses (HB); where a female of stock ORR crosses with male's *mwh*, this crossing has the capacity to detect indirect mutagens. Larvae of third instar, coming from these crossings were treated with 30, 60, 125, 250 and 500 µg/mL of the extract and a negative control (CN) which consisted a mixture of Tween 1, 3% and ethanol 1.6%. It was also used an historic positive control of mitomycin C which guaranteed the activity of the stocks. The results obtained analyzed with the statistical of Kastenbaum-Bowman, had suggested that the dichloromethane extract of *Galipea longiflora* K. does not produce genotoxic damage with the concentrations evaluated using SMART, in the experimental conditions.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo General	5
2.2. Objetivos Específicos	5
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Genética toxicológica	6
3.2. Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART)	11
3.3. Especies Vegetales Medicinales	18
3.3.1. <i>Galipea longiflora</i> Krause (Evanta)	19
4. METODOLOGÍA	25
4.1. Elección de la Especie	26
4.1.1. Extracción continua realizada por el I.I.F.B.	26
4.2. Evaluación de la Toxicidad del extracto diclorometánico de <i>Galipea longiflora</i> K. mediante la prueba SMART	27
<i>Disolución del extracto</i>	27
<i>Tratamiento de individuos</i>	27
4.3. Evaluación Genotóxica del extracto diclorometánico de <i>Galipea longiflora</i> K. mediante la prueba SMART	28
4.3.1. Análisis de alas	29
4.3.2. Clasificación de manchas	30
4.4. Análisis Estadístico	32

5. RESULTADOS	33
5.1. Evaluación de la Toxicidad del extracto diclorometánico de <i>Galipea longiflora</i> K. mediante la prueba SMART	33
5.2. Evaluación del Potencial Genotóxico de <i>Galipea longiflora</i> K. mediante Cruce Estándar	37
5.3. Evaluación del Potencial Genotóxico de <i>Galipea longiflora</i> K. mediante Cruce Alta Bioactivación	39
6. DISCUSIÓN	46
7. CONCLUSIONES	52
8. RECOMENDACIONES	54
9. BIBLIOGRAFÍA	55

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pag.</b>
<b><u>Tabla 1.</u></b>	34
Evaluación de la Toxicidad, mediante el Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar de los Cruces Estándar y Alta Bioactivación, sometidas a diferentes concentraciones del extracto diclorometánico de <i>Galipea longiflora</i> Krause.	
<b><u>Tabla 2.</u></b>	35
Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar sometidas a diferentes concentraciones del extracto diclorometánico de <i>Galipea longiflora</i> Krause.	
<b><u>Tabla 3.</u></b>	38
Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de <i>Galipea longiflora</i> K. Cruce Estándar.	
<b><u>Tabla 4.</u></b>	40
Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de <i>Galipea longiflora</i> K. mediante Cruce Alta Bioactivación.	
<b><u>Tabla 5.</u></b>	44
Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de Mitomicina C, mediante Cruce Estándar.	
<b><u>Tabla 6.</u></b>	45
Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de Mitomicina C, mediante Cruce Alta Bioactivación	

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	<b>Pag.</b>
<b><u>Gráfico N° 1</u></b>	34
Comparación de la Toxicidad del extracto de <i>Galipea longiflora</i> K. a concentraciones de 0.5, 1 ,5 y 10 mg/mL., en los cruces, ST y HB (Porcentaje de sobre-vivencia).	
<b><u>Gráfico N° 2:</u></b>	36
Comparación de la Toxicidad del extracto de <i>Galipea longiflora</i> K. a concentraciones de 30, 60, 125, 250 y 500 ug/mL, en los cruces, ST y HB	
<b><u>Gráfico N° 3:</u></b>	41
Comparación de la frecuencia del Total de manchas encontrada en el cruce Estándar y Alta Bioactivación, después del tratamiento con <i>Galipea longiflora</i> K.	
<b><u>Gráfico N° 4:</u></b>	42
Comparación de la frecuencia de manchas encontrada en el cruce Estándar de las diferentes concentraciones del extracto, el control negativo y el control positivo.	
<b><u>Gráfico N° 5:</u></b>	43
Comparación de la frecuencia de manchas encontrada en el cruce Alta Bioactivación, de las diferentes concentraciones del extracto el control negativo y el control positivo.	

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b><u>Figura 1.</u></b> Información – <i>Drosophila melanogaster</i> .	12
<b><u>Figura 2.</u></b> Esquemas de los diferentes eventos genéticos observados en SMART	14
<b><u>Figura 3.</u></b> Ciclo de vida – <i>Drosophila melanogaster</i> .	16
<b><u>Figura 4.</u></b> Distribución Geográfica de <i>Galipea longiflora</i> Krause.	21
<b><u>Figura 5.</u></b> Distribución geográfica en Bolivia de <i>Galipea longiflora</i> Krause.	22
<b><u>Figura 6.</u></b> Estructuras de los alcaloides quinolinicos encontrados en de <i>Galipea longiflora</i> Krause.	23
<b><u>Figura 7.</u></b> Ala de <i>Drosophila melanogaster</i> , donde se aprecia las áreas de lectura.	29

## ÍNDICE DE FOTOS

	<b>Pag.</b>
<b><u>Foto 1.</u></b> Fotografía de árboles de Evanta.	20
<b><u>Foto 2.</u></b> Fotografía de hojas de Evanta.	20
<b><u>Foto 3.</u></b> Fotografía de corteza de Evanta.	26
<b><u>Foto 4.</u></b> Larva de <i>Drosophila melanogaster</i> en su tercer estadio.	28
<b><u>Foto 5.</u></b> Observación de Mancha Simple Pequeña mediante microscopio, con aumento de 640 X.	30
<b><u>Foto 6.</u></b> Observación de Mancha Simple Grande mediante microscopio, con aumento de 640 X.	31
<b><u>Foto 7.</u></b> Observación de Mancha Gemela mediante microscopio, con aumento de 640 X.	31

**A**unque hable el idioma de los hombres y de los ángeles, aunque tenga el don de profetizar y tenga fe para mover montañas, si no tengo **A**MOR nada seré.

**Paulo Cohelo.**

## 7. INTRODUCCIÓN

Diversas plantas fueron empleadas en medicina desde el principio de los tiempos, es por ello que alrededor de 7 mil de los fármacos más empleados en el mundo, provienen de conocimientos botánicos y farmacéuticos de los pueblos indígenas (Betancourt A., 2002). En los últimos años el empleo de plantas medicinales ha logrado gran impacto, así lo confirma la OMS (Organización Mundial de la Salud) la cual en 1996 indica que el 80 % de la población mundial depende, para la atención primaria de su salud, de las plantas medicinales (<http://www.plantasmedicinales.org>).

Debido a lo anteriormente mencionado se observa que en los últimos años se ha incrementado el interés en estudiar las plantas, como fuente de compuestos novedosos y farmacológicamente activos (Ansah C., et al., 2005). Una clara demostración de este hecho es el descubrimiento de muchas drogas importantes, como los compuestos anticancerígenos, antimálaricos (*Chinchona spp.*) o cardiotónicos (*Strophanthus kombe*), para citar algunos a partir de plantas (Giménez A., 2004).

Recordemos que todas las plantas en estudio requieren de una estandarización farmacognósica, un tamizaje fitoquímico, estudios farmacológicos, así como de otros estudios preliminares necesarios (Díaz G., 2002). También se debe señalar que es importante la realización de estudios toxicológicos paralelamente a los estudios de actividad, los cuales no deben limitarse solamente a la realización de pruebas de toxicidad (aguda, sub-crónica o crónica) en animales, sino que en dependencia de sus resultados deben incluirse pruebas de genotoxicidad, carcinogénesis y teratogénesis, con vistas a detectar los posibles riesgos de daños genéticos, oncológicos o sobre la reproducción del hombre (Cassaret D. et al., 1996).

Es necesario mencionar que varios productos de uso cotidiano, como el locoto *capsicum annun* (cuyos principios activos y actividades farmacológicas fueron comprobados), (Proudlock R. et al., 2004), el vino, brandy, diversos tipos de café y té, fueron y se encuentran sometidos a estudios de mutagénesis y genotoxicidad para asegurar su uso ante la población consumidora (Graf U. et al., 2000).

Para la evaluación exhaustiva del potencial genotóxico de un compuesto, pueden emplearse numerosos ensayos de genotoxicidad, para citar algunos están el test de mutación génica en bacterias, test *in vitro* de Evaluación Citogenética de daño Cromosómico con células de mamífero, test *in vitro* de TK en células de linfoma de ratón, test *in vivo* de lesión cromosómica utilizando células hematopoiéticas de ratón (López de C. et al., 1998), test de Ames (*Salmonella typhimurium*), test de Micronucleos en Médula Ósea de Ratón, Intercambio de Cromátides hermanas, el test de Mutación y Recombinación Somática (SMART), entre otros.

La prueba elegida, para la evaluación genotóxica, debe poseer la capacidad de ser sensible al agente evaluado, es necesario que los conocimientos previos de genética puedan ser controlados y de ser posible realizar una relativa contribución entre la droga analizada y su metabolismo enzimático (Jowett T. et al., 1991). Una de las técnicas que es ampliamente aplicada a nivel mundial para la determinación de agentes genotóxicos, revelando así su acción como inductores de mutación puntual, no-disyunción, delección y recombinación (Graf U. et al., 1984; 1989) y la relación de la droga con su posterior metabolismo enzimático, es la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART). Con ella también se evalúa la capacidad genotóxica de un compuesto y se llega a conocer la capacidad anti-genotóxica del mismo (protectora del material genético) frente a conocidos pro-mutágenos como el Uretano (Idaomar M. et al., 2002).

Actualmente los investigadores bolivianos están centrando su interés en el estudio de las plantas medicinales. Entre las entidades abocadas a este trabajo en el departamento de La Paz, se hallan el Instituto de investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) y el Instituto de Genética (IG), todos pertenecientes a la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) (Asturizaga K., 2005); estos se encuentran desarrollando estudios de investigación, con el fin de explotar las propiedades curativas de las plantas y de esta manera extraer, aislar e identificar nuevas moléculas para emplearlas como drogas quimioterápicas de origen natural (Rodríguez M., 2001).

Dentro de las investigaciones, botánico-químico-biológicas, sobre usos etno-botánicos con los pueblos Tacana y Mosekene (asentados en la amazonía) y llevadas a cabo por el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, se reportó a Evanta (*Galipea longiflora*), como especie vegetal poseedora de actividad antiparasitaria y leishmanicida (Giménez A., 2004), el principio activo al cual se le atribuye esta propiedad son los alcaloides quinolínicos con sustituciones en la posición dos, encontrados en la planta (Fournet A. et al., 1996).

Debido a la importancia que posee esta especie vegetal en el ámbito nacional, el I.I.F.B. realizó y continúa realizando estudios complementarios a la actividad leishmanicida, todos ellos con el fin de lograr obtener un nuevo fármaco eficaz y de bajo costo; dando así una opción de tratamiento más económico para aquellos enfermos con leishmania en nuestro país.

Anteriormente se mencionó que dentro de los estudios toxicológicos aplicados a nuevos compuestos en desarrollo, es necesario incluir estudios genotoxicológicos. Y basándonos en la premisa de que diversos extractos de plantas medicinales han resultado positivos en estudios sobre la actividad embriotóxica y/o teratogénica, mutágena y carcinogénica (Díaz G., 2002), es

necesaria la evaluación de la actividad mutágena de nuevas especies en estudio.

Es por ello que el presente trabajo tiene la finalidad de evaluar la actividad genotóxica de *Galipea longiflora* K (Evanta) mediante la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART), tomando en cuenta la potente actividad que presenta esta especie como leishmanicida y el hecho de que posee en su composición alcaloides quinolínicos. Es necesario recordar que los alcaloides en general son quizá las toxinas vegetales naturales más potentes que se conocen desde el punto de vista genotóxico (Xue J. et al., 1991), como es el caso del alcaloide Pirrolizidina (Fu P. et al., 2004), 2 amino-3-metilimidazol 4,5-F-quinolina (IQ) (Adamson R. et al., 1990, Graf U. et al., 1992) los cuales son inductores de genotoxicidad y particularmente carcinogénesis en el caso del alcaloide Pirrolizidina. Estos datos son importantes, pues realzan la importancia de realizar estudios genotoxicológicos de la especie *Galipea longiflora* Krause.

## **2. .OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General:**

- Evaluar el potencial genotóxico del extracto total de corteza diclorometánico de *Galipea longiflora* Krause mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART).

### **2.2. Objetivos Específicos:**

- Determinar las concentraciones sub-tóxicas del extracto total diclorometánico de corteza de *Galipea longiflora* Krause, en *Drosophila melanogaster*.
- Evaluar el potencial genotóxico del extracto total diclorometánico de corteza de *Galipea longiflora* Krause, mediante el cruce Estándar del Test SMART.
- Evaluar el potencial genotóxico del extracto total diclorometánico de corteza de *Galipea longiflora* Krause, mediante el cruce Alta Bioactivación del Test SMART.

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Genética toxicológica

La genotoxicología es una disciplina toxicológica cuyo objetivo principal es salvaguardar lo máximo posible la reserva genética humana, de la acción de las distintas sustancias genotóxicas, incluyendo en esta categoría todas aquellas que tengan efectos mutagénicos, carcinogénicos y/o teratogénicos (Vamparys et al., 1996- cit en De la Peña E., 2005).

Los orígenes de la Genética Toxicológica se remontan a 1927, cuando Müller realizó experimentos de mutabilidad debida a la radiación. Ya en los años cuarenta las sustancias químicas empezaron a ser el blanco para determinar sus efectos a nivel del material genético a mediados de siglo la preocupación se volcó a la determinación del potencial impacto genético que podrían ocasionar los agentes químicos introducidos al ecosistema (Flanders, cit en Pillco A., 2003).

Debido a todo esto, en un corto tiempo se estableció que algunos agentes terapéuticos de uso común, tales como drogas y estimulantes, producen alteraciones en los cromosomas. Ya en 1962 Lederberg propuso que en las pruebas toxicológicas de rutina se incluyeran ensayos de mutagénesis, antes de que los productos salieran al mercado y se emplearan masivamente (<http://es.geocities.com>).

Así en los últimos años, varios productos de uso cotidiano en la alimentación como son los locotos *capsicum annun* (Proudlock R. et al., 2004), el tabaco (Sassen AW. et al., 2005), los productos naturales que contienen antioxidantes y radicales nitrogenados (Damiani E. et al., 2000), se encuentran siendo sometidos a estudios de mutagénesis y genotoxicidad con vistas a detectar los posibles riesgos para el hombre de daños

genéticos, oncológicos o sobre la reproducción y el desarrollo de su descendencia (Hoffmann G. et al., 1996).

Cabe remarcar que se considera como agente mutágeno a cualquier agente que induzca mutaciones génicas (cambio de uno o pocos pares de bases), aberraciones cromosómicas estructurales (cambios groseros en la estructura) o numéricas (aneuploidías y poliploidías por afectaciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico), alteraciones en el DNA (formación de adictos, alquilación de bases, intercalamiento de bases), alteraciones en los mecanismos de reparación (incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos), eventos de recombinación mitótica, etcétera (Tiburi M. et al., 1991).

Estos agentes son capaces de producir mutaciones tanto en las células germinales como en las células somáticas, en las primeras pueden provocar esterilidad en el individuo portador o bien fijarse en el material genético, lo cual se traduce en cambios heredables. En las células somáticas el individuo puede desarrollar enfermedades, o bien iniciar el proceso canceroso, los cambios genéticos también pueden provocarse durante el desarrollo embrionario alteraciones en el embrión (teratogénesis) (Guevara G., 2000).

La inducción de daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varios pasos. Durante el proceso, el agente xenobiótico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas. Una vez dentro de la célula, el agente químico puede ser reactivo por sí mismo (de acción directa), o bien puede ser activado por las enzimas metabólicas, en cuyo caso es de acción indirecta y se llama promutágeno. (Compuesto químico inerte que requiere ser metabolizado, transformándose así en un compuesto electrofílico y por lo tanto reactivo) (<http://es.geocities.com>).

Entre estos compuestos promutagénicos mencionaremos a las quinolonas, que encontramos actualmente en muchos alimentos (Brown J.P. cit en Chesis P. et al., 1980) y otros compuestos que contienen el núcleo quinolínico, como algunos antitumorígenos, los cuales al sufrir metabolismos por vía Citocromo P-450, son capaces de generar radicales oxigenados, que son capaces de causar mutación (Chesis P. et al., 1984). Las enzimas del Citocromo P-450 mamífero constituyen nuestra primera línea de defensa frente a los efectos tóxicos de químicos ambientales. Irónicamente estas enzimas también convierten algunos compuestos a sus derivados tóxicos o sus especies mutagénicas (Jowett T. et al., 1991).

Para recordar un poco, es necesario mencionar que el Citocromo P-450 es una súper familia de enzimas implicadas en la fase 1 del metabolismo de la mayoría de los químicos endógenos y exógenos (Parke V.D. et al., 1987, 1991). Está muy bien establecido que muchos carcinógenos actúan como sustrato y/o inductores para Citocromo P-450 1A (CYP1A) y P-450 02 (CYP2E), los cuales dan una elevada formación de metabolitos intermedios reactivos o especies oxigenadas reactivas, capaces de interactuar con el DNA, causando mutagénesis, proliferación de células y neoplasias (Lewis D. et al., 1996).

Anteriormente se mencionó que los agentes genotóxicos también son capaces de producir recombinación, este evento contribuye de manera significativa al origen de dolencias coronarias, diabetes, envejecimiento en general y principalmente el cáncer (Rodrigues cit en Pillco A., 2003). Hoy se conoce que el cáncer es una enfermedad que afecta los genes; principalmente aquellos que controlan las funciones de la replicación celular y de los programas de diferenciación, pero también aquellos encargados de prolongar el tiempo de vida y la reparación del ácido desoxirribonucleico o ADN (Guevara G., 2000).

Es por esto que en los últimos años las pruebas para medir el daño a nivel primario del DNA, han alcanzado importancia entre los análisis de genotoxicidad, debido a que ellos nos ayudan a comprender la significación que tienen en los procesos carcinogénicos o de transformación tumoral de las células (Díaz G., 2002).

La Genética Toxicológica, para determinar el grado de daño genético que pueda generar un agente xenobiótico, maneja criterios de valoración que permiten determinar su potencial genotóxico o capacidad genotóxica (La Fuente cit en Pillco A., 2003):

<b>Denominación</b>	<b>Definición</b>
<b>Genotóxico Potente</b>	<b>Cuando el agente es mutagénico y carcinogénico.</b>
<b>Genotóxico</b>	<b>Cuando la evaluación expresa resultados positivos pero debe realizarse otros ensayos in vivo para confirmar el riesgo.</b>
<b>Supuesto Genotóxico</b>	<b>Cuando solo algunos tratamientos expresaron una respuesta positiva, por lo tanto se requiere de pruebas adicionales.</b>
<b>Insuficiente respuesta Genotóxica</b>	<b>Cuando los datos no permiten sospechar de su genotoxicidad.</b>
<b>No Genotóxico</b>	<b>Cuando se observa suficiente respuesta negativa.</b>

Cuadro 1. Algunas definiciones en Genética Toxicológica, (Tomada de Pillco A., 2003)

La identificación del daño genético puede ser llevada a cabo mediante técnicas *in vitro* como *in vivo*, entre estas encontramos:

- Prueba de Ames (*Salmonella typhimurium*). Determina mutaciones génicas.
- Prueba de mutaciones puntuales en *Saccharomyces cerevisiae*. Determina mutaciones génicas.

- Prueba de letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila melanogaster*. Determina mutaciones génicas.
- Prueba de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster* (SMART). Determina mutaciones génicas, daño primario al DNA
- Prueba citogenética *in vitro* en células de mamíferos. Determina mutaciones cromosómicas.
- Prueba citogenética *in vivo* en ratones. Determina mutaciones cromosómicas.
- Prueba de micronúcleos (ratones y CHO). Determina mutaciones cromosómicas.
- Prueba de dominantes letales en ratones. Determina mutaciones cromosómicas.
- Prueba de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*. Determina daño primario al DNA
- Prueba de conversión génica y recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*. Determina daño primario al DNA
- Prueba de intercambio de cromátidas hermanas *in vitro* con células de mamíferos. Determina daño primario al DNA. (Sánchez A. et al., 2000).

### **3.2. Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART)**

Se ha podido establecer que las células somáticas normales, al transformarse en malignas, pasan por diferentes fases. Los agentes genotóxicos al llegar al órgano blanco pueden ocasionar una mutación, y la pérdida de la heterocigosis celular, producto de la recombinación mitótica inducida, o los cambios en el número y en la estructura de los cromosomas, estos son factores que inician el proceso canceroso (<http://es.geocities.com>).

Para evitar el desarrollo de estos procesos, una de las primeras estrategias depende de la evaluación genotóxica, en diferentes sistemas de ensayos, especialmente en células somáticas que son capaces de expresar potencialidades de agentes inductores de tumores malignos (Rodríguez cit en Pillco A., 2003).

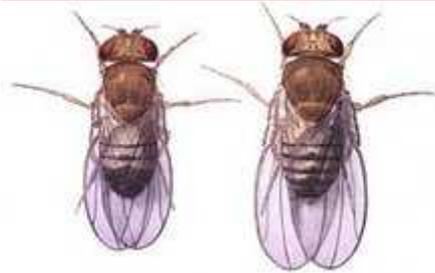
Numerosas pruebas genotoxicológicas se han planteado para la detección de agentes cancerígenos, las cuales deben ser sensibles, capaces de detectar el mayor número posible de lesiones, sean clásicas: mutaciones génicas y cromosómicas, o las que ocurren por recombinación mitótica (Sippel et al., 1998, cit. Pillco A., 2003).

La prueba de de Mutación y Recombinación Somática en la versión ojos o alas está bien establecida y tiene buena validación sobre 350 diferentes compuestos químicos (Graf U. et al., 1994). Estos sistemas de prueba son capaces de detectar no solo al mutágeno, sino también la actividad recombinogénica de los compuestos químicos (Frei et al., 1992; Graf U. et al., 1992; Vogel E., 1992 cit en Graf U. et al., 1994). Este último mecanismo genotóxico es conocido por estar involucrado en cada uno de los pasos en el origen de ciertos tipos de tumores humanos (Graf U. et al., 1994).

La prueba SMART versión ojos o alas es flexible y sensitiva para la detección de genotoxicidad de compuestos químicos individuales, mezclas complejas y mutágenos volátiles (Graf U. et al., 1984). Es de especial interés que larvas y adultos posean sistemas de activación citocromo P-450 capaces de metabolizar varios promutágenos (Frolich A. et al., 1990).

Emplea como organismo experimental a *Drosophila melanogaster*, caracterizada por ser de fácil manutención en laboratorio, poseer un corto tiempo de generación, morfología definida y amplio tamaño de progenie. (Graf U. et al., 1992) El uso de insectos, especialmente *Drosophila* para monitorear daños genéticos por agentes químicos tiene una tradición de más de 50 años.

#### Mosca común de la fruta



#### Clasificación científica

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Drosophilidae

Género: Drosophila

Especie: *D. melanogaster*

#### Nombre binomial

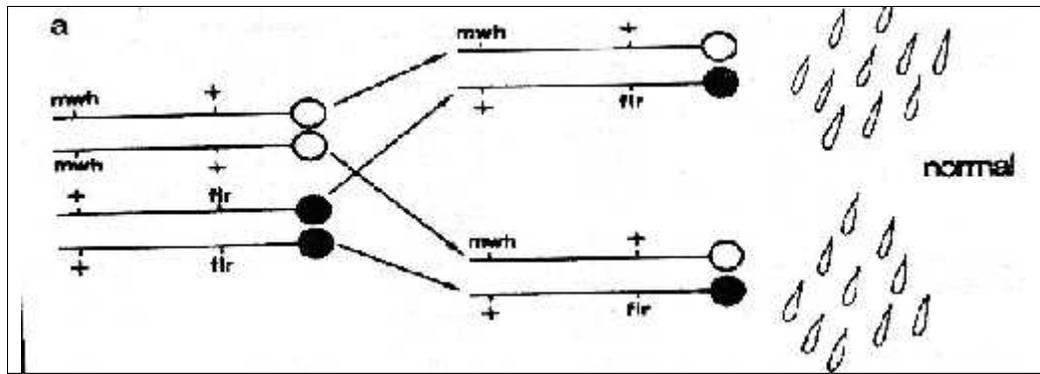
*Drosophila melanogaster*

**Figura 1.** Información – *Drosophila melanogaster* (Tomado de <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/Drosophila/Drosophila.htm>)

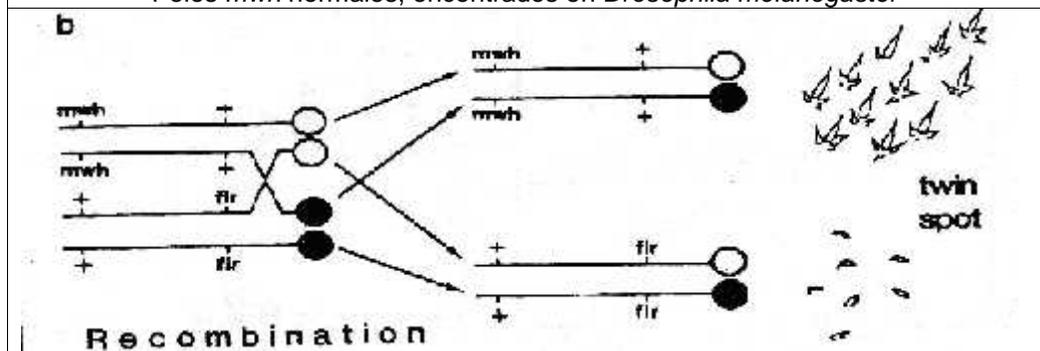
*Drosophila* tiene un amplio uso, específicamente para la búsqueda de mutación y también en pruebas a corto tiempo para identificar carcinógenos. Durante los años ochenta, experimentos con *Drosophila* fueron realizados para determinar la relación que existe entre la actividad y la estructura de diversos agentes genotóxicos. Así *Drosophila* lleva a cabo un doble rol en la campo de la búsqueda de mutágenos (Vogel E. et al., 1999).

Aunque *Drosophila melanogaster* presenta apenas aproximadamente 13.000 genes, comparados a los cerca de 30.000 de los humanos, la mayoría de estos son equivalentes y consecuentemente existe una alta conservación entre rutas bioquímicas y funciones reguladoras, de las dos especies. (Pillco A., 2003) En *Drosophila* los procesos de reparación del DNA son homólogos a los de bacterias y eucariotas superiores, se conocen al menos 30 mutantes sensibles a mutágenos y asociados a deficiencias en los mecanismos de reparación del DNA (López A., 1998).

La Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) versión alas de *Drosophila melanogaster* está entre las más empleadas, esta se basa en la pérdida de heterocigocidad por dos marcadores recesivos *mwh* y *flr* (Ildaomar M. et al., 2002). Esta prueba es capaz de detectar un amplio espectro de alteraciones, incluyendo las mutaciones puntuales, deleciones, recombinaciones mitóticas, perdida de cromosomas y no disyunción (Vogel E. et al., 1987). Estos eventos genotóxicos se dan en el cromosoma 3 de *Drosophila melanogaster*, por diversos mecanismos que se observan en la siguiente figura:

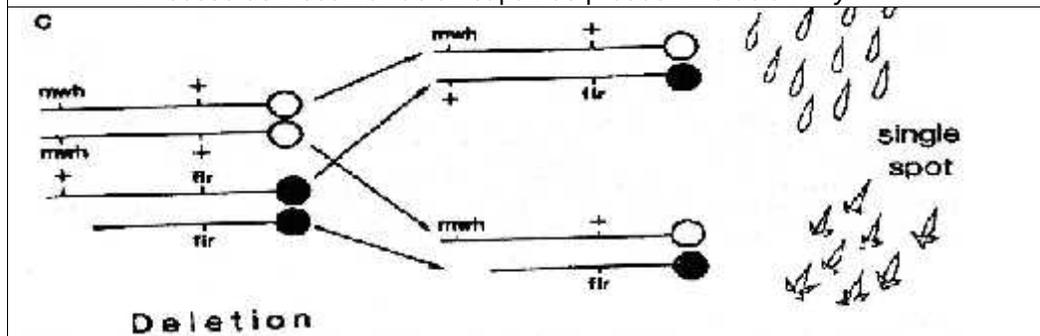


Pelos *mwh* normales, encontrados en *Drosophila melanogaster*



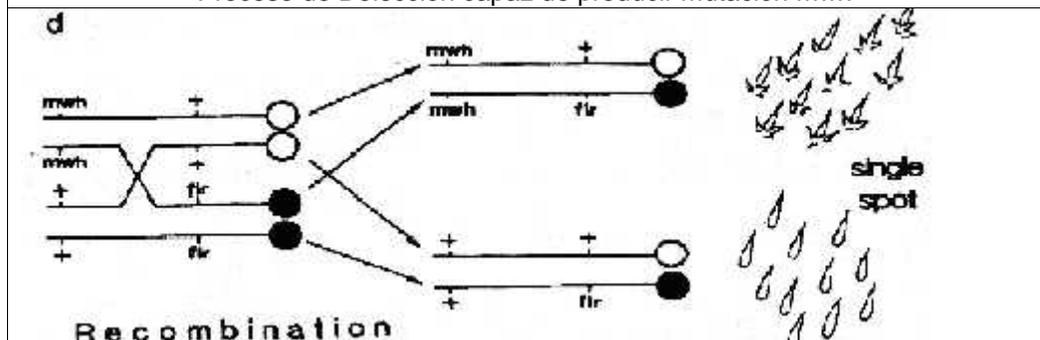
**Recombination**

Proceso de Recombinación capaz de producir mutación *fir* y *mwh*



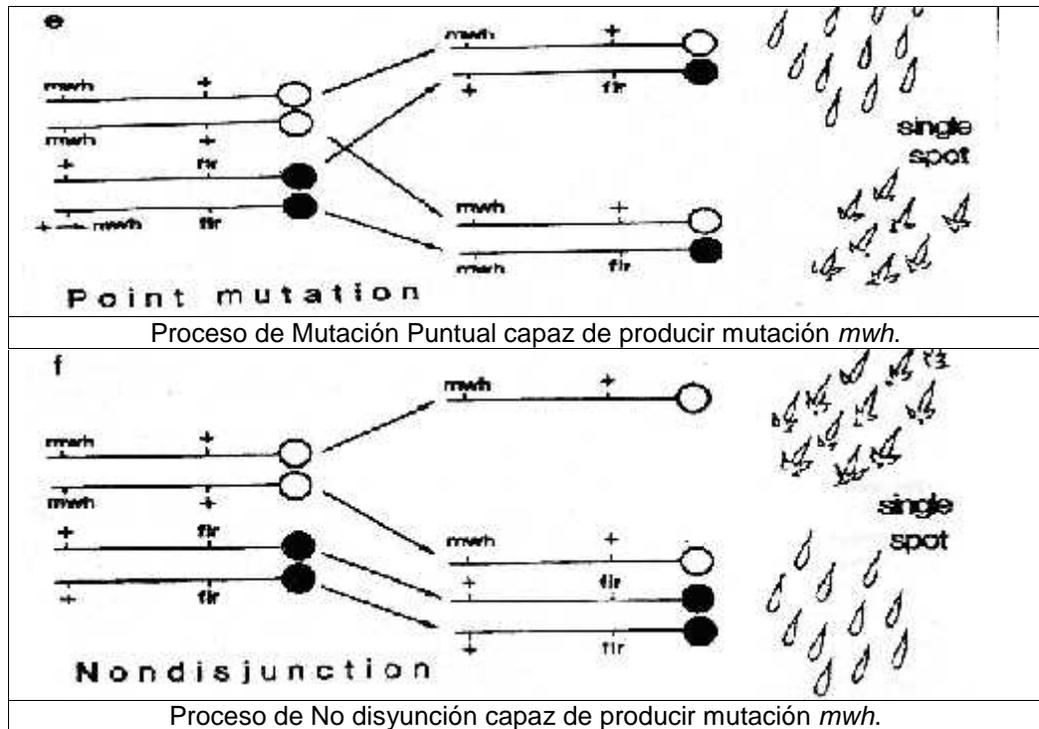
**Deletion**

Proceso de Delección capaz de producir mutación *mwh*



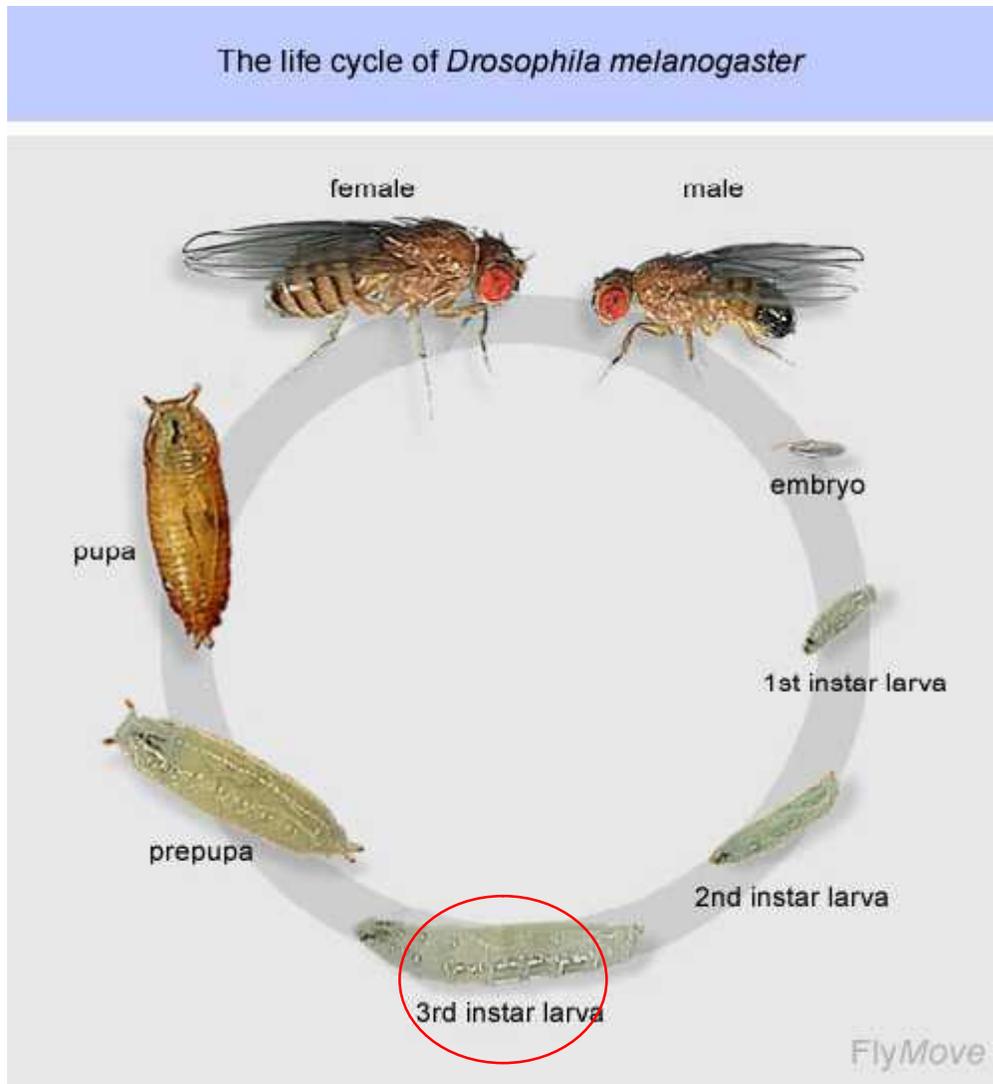
**Recombination**

Proceso de Recombinación capaz de producir mutación *mwh*.



**Figura 2.-** Esquemas de los diferentes eventos genéticos observados en SMART (tomados de Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*, Graf et al, 1984)

Durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*, grupos de células (discos imaginales) proliferan mitóticamente hasta el punto en que se diferencian durante la metamorfosis en estructuras que originan las alas de las moscas adultas. Pero durante ese proceso, debido a una inducción de alteraciones genéticas se origina la pérdida de heterocigocidad de los grupos celulares, de este modo fenotípicamente dichas alteraciones pueden ser observadas, mediante marcadores genéticos, en la superficie del ala de *Drosophila melanogaster* (Graf U. et al., 1992).



**Figura 3.** Ciclo de vida – *Drosophila melanogaster* (Tomado de [www.anatomy.unimelb.edu.au](http://www.anatomy.unimelb.edu.au))

Estas estructuras fenotípicamente expresadas son los denominados marcadores genéticos: *mwh* (se observa como el crecimiento de tres o más tricomas en lugar de uno), el otro marcador es *flr* que posee la característica de presentar una base ensanchada respecto a la delgada que presentan los pelos normales (Graf U. et al., 1984) denominadas manchas mutantes, los cuales se clasifican en:

Mancha Simple Pequeña (MSP) y Mancha Simple Grande (MSG): ambas expresan el marcador genético  $Flr^3$  o  $mwh$  e indican la ocurrencia de mutación puntual, delección, no disyunción o recombinación entre el gen  $Flr^3$  y  $mwh$  (Graf U. et al., 1984).

Mancha Gemela (MG): expresa ambos marcadores genéticos, ofrece la información de que aconteció un evento recombinogénico entre el gen  $Flr^3$  y el centrómero ocasionado por el agente evaluado (Graf U. et al., 1984).

Vale la pena resaltar que esta prueba se ha empleado en el análisis de aproximadamente 400 compuestos, entre compuestos puros y mezclas complejas, así como también en la investigación del potencial de partículas aéreas y efectos asociados a la mutagénesis ambiental (Graf & Singer, 1989 cit en Pillco A., 2003).

### 3.3. Especies Vegetales Medicinales

El hombre ha mantenido a través de los tiempos una relación muy estrecha con el mundo que lo rodea, por ello es que a pesar de los adelantos científicos en el campo de los medicamentos, gracias a los progresos de la síntesis química, conservó aquellos aportes que la naturaleza, específicamente las plantas, nos pueden aportar para atender las necesidades de la salud. (Tirado N., 1995) Actualmente existe un impresionante incremento de la demanda de alternativas terapéuticas ajenas en conceptos y prácticas al modelo científico biomédico (Nigenda G. et al., 2001).

Debido a esto son aún mayores los estudios farmacológicos realizados para comprobar la actividad de numerosas plantas medicinales, tomando como consideraciones que hoy el 75 % de la población mundial utiliza las plantas medicinales (Sánchez A. et al., 2000) y que un 74 % de los principios activos fueron derivados de plantas medicinales, citando algunas están la quina derivado de la *chinchona spp*, droga de elección de *Artemisa annua* (Comley, 1990 cit en Tirado, 1995), la vincristina y vinblastina obtenidas de la *Vinca rosea* utilizada por su actividad antitumoral en ciertas leucemias, la digitoxina, reserpina, tubercularina (Tirado N., 1995).

Bolivia presenta una flora cuya riqueza es una de las mayores del mundo, 6.000 especies vegetales por 10.000 km<sup>2</sup>, pero no sólo es rica en flora nativa, también por la existencia de etnias, las que son poseedoras de un conocimiento original del medio natural (Balanza E. et al., 1993). Es por ello que en nuestro país la llamada medicina tradicional es uno pilares fundamentales que utiliza la población para combatir las diversas patologías que la aquejan.

Numerosas entidades bolivianas se dedican en la actualidad al estudio de plantas medicinales, entre estas encontramos a aquellas que se encargan de la determinación y aislamiento de compuestos y moléculas, en la ciudad de La Paz encontramos al Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas (IIFB), donde actualmente, las investigaciones sobre *Galipea* o *Angostura longiflora*, son las mas importantes.

### **3.3.1. Galipea longiflora Krause (Evanta)**

*Galipea longiflora* Krause pertenece a la familia de las Rutáceas, género Galipea, que cuenta con unas cuarenta especies distribuidas desde Guatemala, Cuba, hasta Bolivia y el sur de Brasil (Killeen T. et al., 1993).

Dentro del género Galipea se encuentran diversas especies poseedoras de actividad farmacológica, tal es el caso de *Galipea carinata*, que muestra actividad contra el *trypnosoma cruzi* y un 100 % de lisis del parásito (Ambrozin A.R. et al., 2004), numerosos estudios reportan a *Galipea officinalis* (Jacquemond-Collet I. et al., 2001; Houghton P.J. et al., 1999) como especie con una excelente actividad antimalarica, atribuida a cuatro de sus alcaloides (tetrahidroquinolonas), los cuales mostraron actividad frente a cepas cloroquina resistentes. (Jacquemond-Collet I. et al., 2002) y cierta actividad contra *M. tuberculosis* (Houghton P.J. et al., 1999).

Otra de las especies con excelente actividad antiparasitaria es *Galipea longiflora* K. (sinónimo *Angostura longiflora* Krause kallunki), tiene diversos nombres comunes, pero es conocida ampliamente por el nombre vernacular de Evanta. Es un árbol de hasta 12 metros de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama, sus flores aparecen en forma de racimos (Killeen T. et al., 1993).



**Foto 1.** Fotografía de árboles de Evanta (Proporcionado por el I.I.F.B.-F.C.F.B.– U.M.S.A.)

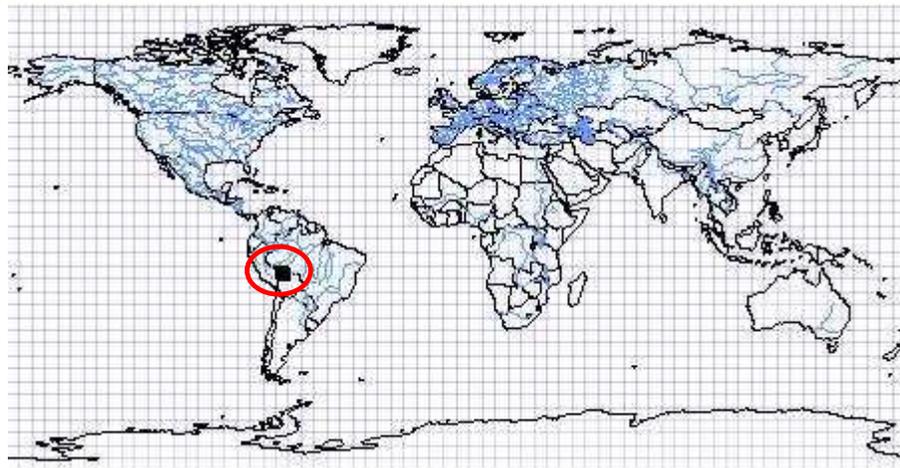


**Foto 2.** Fotografía de hojas de Evanta (Proporcionado por el I.I.F.B.-F.C.F.B.– U.M.S.A.)

*Clasificación:*

- Orden : Sapindales
- Familia: Rutaceas
- Género: Galipea
- Especie: *Galipea longiflora* Krause
- Nombre común: Evanta
- Nombre mosetene: Ji" pantyae
- Usos tradicionales: Leishmanicida, antianémico, vermífugo y amebicida.

En Bolivia se encuentra en bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos en los departamentos del Beni (Ballivián, Misión Fátima) y La Paz (Sud Yungas, alto Beni y Popoy) (Figura 4).



**Figura 4.** Distribución Geográfica de *Galipea longiflora* Krause. (Tomado de [http://mobot1.mobot.org/website/map\\_post.asp](http://mobot1.mobot.org/website/map_post.asp))

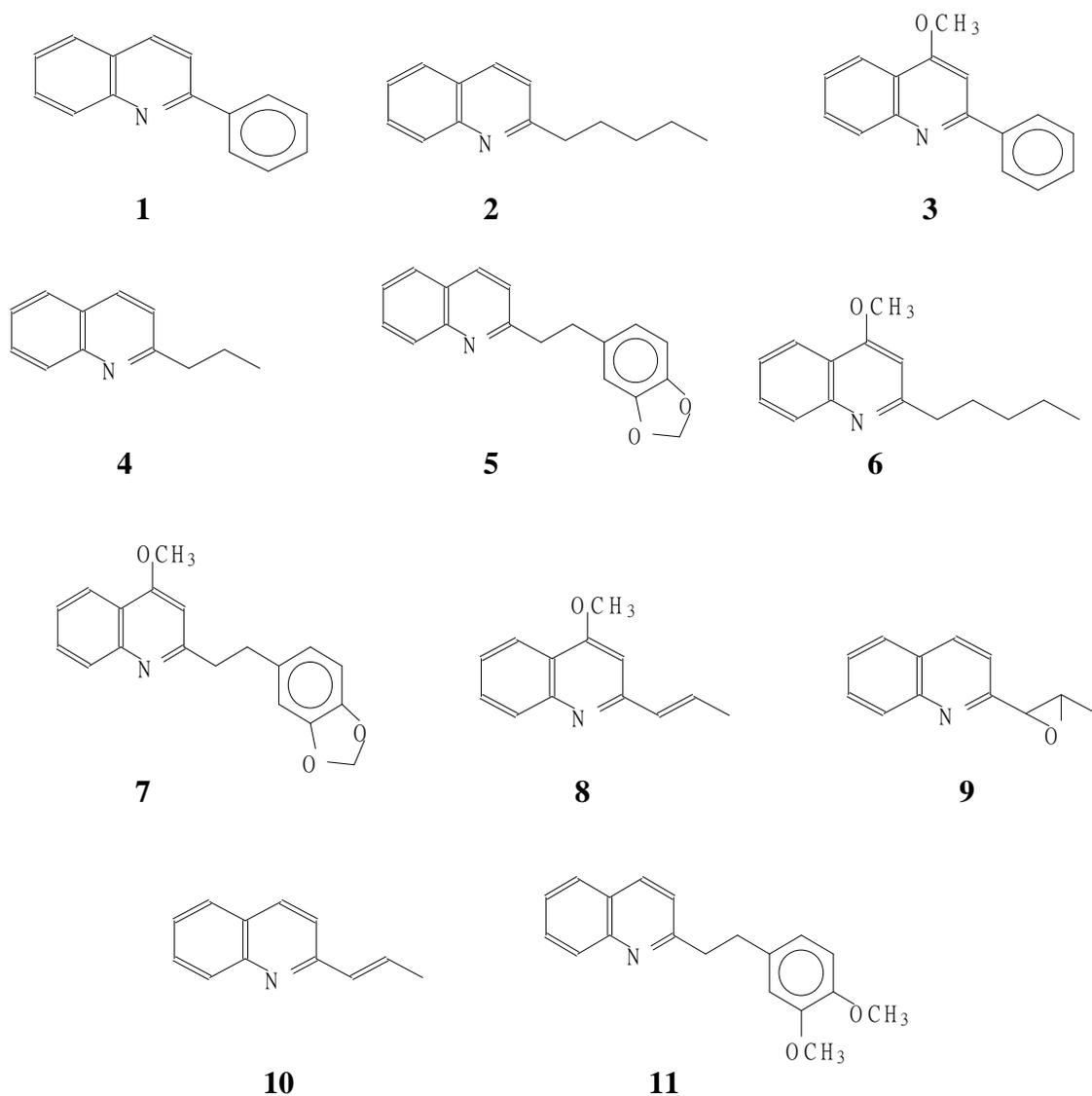


**Figura 5.** Distribución geográfica en Bolivia de *Galipea longiflora* Krause (Tomado de [http://mobot1.mobot.org/website/map\\_post.asp](http://mobot1.mobot.org/website/map_post.asp))

Evanta se encuentra reportada como especie antiparasitaria empleada por las etnias Chimane, Tacana y Mosekene asentadas en la Amazonía, su empleo es a nivel dérmico como cataplasma, el cual es cambiado dos veces al día en casos de leishmaniasis, para el tratamiento de enfermedades parasitarias intestinales (amebiasis) su uso es mediante la ingestión de el sancochado (preparado a base de pedazos de corteza en agua, dos vasos al día, uno en la mañana y otro por la tarde, por tres días consecutivos) (Bourdy G. et al., 2002).

Esta especie vegetal que comenzó a ser estudiada por un grupo de investigación Franco-Boliviano, que trabajo en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA), de la Facultad de Medicina de la UMSA (1985-91) los cuales determinaron su actividad Leishmanicida (Fournet A., 1996. Gantier J.C., 1996, Munos M.H. et al., 1994), provocando una patente internacional Chimaninas A, B, C y D, US4209519/15/04/93 (Giménez A.,

2004). En estos estudios se lograron identificar 13 alcaloides quinólicos con sustituciones en la posición 2, mediante técnicas espectroscópicas (H-C), de todos estos cuatro han sido llamadas chimaninas (A, B, C, D) en homenaje a los Chimanes (Rodríguez M., 2000).



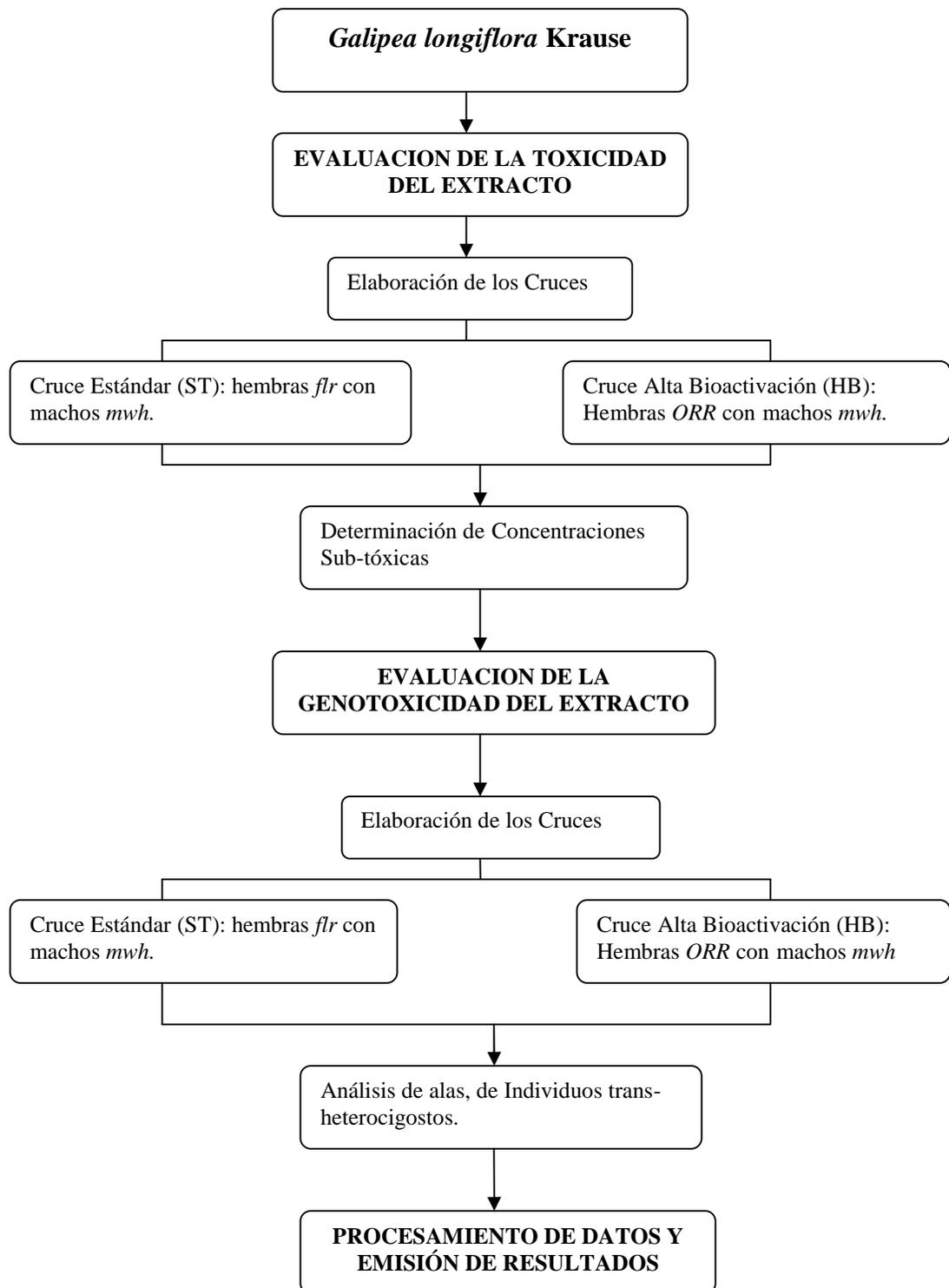
**Figura 6.** Estructuras de los alcaloides quinólicos encontrados en de *Galipea longiflora* Krause (Tomado de: ESTUDIOS QUÍMICOS, BIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS DE *Galipea longiflora*, Krause. Giménez A. et al., 2005)

En el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B.) dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA, desde 1993 se ha estado trabajando en la evaluación biológica de especies medicinales listadas en Farmacopeas Tradicionales, entre estas encontramos a *Galipea longiflora* krause, que por su potente actividad leishmanicida fue y es objeto de numerosos estudios, entre los cuales encontramos: actividad citotóxica/citostática, antifúngica y antibacteriana *in vitro* (Paz M., 1998), actividad antibacteriana *in vitro* y la evaluación de la toxicidad *in vivo* (Rodríguez M., 2001), estudios pre-clínicos mediante modelo toxico/cinético (Avila J. A., 2000), actividad biológica sobre epimastigotes de *Tripanosoma cruzi* y *Leishmania spp.* (Salamanca E., 2005), extracción de alcaloides totales con actividad biológica (Ticona J.C., 2005). Actualmente se están realizando estudios sobre estabilidad, de los extractos crudos y transformados, elaborando 2 formulaciones tópicas y 2 sistémicas, paralelamente llevando a cabo estudios de sensibilidad en la piel de humanos y conejos (Rodríguez M., 2005). Al igual que investigaciones para establecer un sistema de cultivo semi continuo de células de Evanta, a partir de callos de hojas y raíces, para entender mas sobre la producción, biosíntesis e inducción de alcaloides quinolínicos en sistemas controlados (Paz M., 2004).

Estos estudios se realizaron debido a que el I.I.F.B. pretende promover el aprovechamiento sostenible de esta planta y sus derivados antiparasitarios a nivel regional involucrando en el proceso a comunidades Tsimane, Tacana, Mosekene, Colonos y la empresa privada, por su uso tradicional, la elevada actividad y bajos niveles de toxicidad en roedores (Giménez A. et al., 2005).

#### 4. METODOLOGÍA

##### Esquema de Trabajo



#### 4.1. Elección de la Especie

La especie *Galipea longiflora* Krause (sinónimo *Angostura longiflora* Krause kallunki), fue elegida tomando en cuenta:

- Sus propiedades terapéuticas ya comprobadas mediante numerosos ensayos farmacológicos.
- La importancia de esta especie vegetal para la población boliviana, como tratamiento contra la leishmaniasis.

El extracto total crudo diclorometánico de corteza de *Galipea longiflora* Krause fue proporcionado por el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B.) dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, de la U.M.S.A.

##### 4.1.1. Extracción continua realizada por el I.I.F.B.

En un equipo de extracción continua (soxhlet), 25 g. de corteza de *Galipea longiflora* Krause finamente molida fue sometida a extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (250 mL) por 2.5hr. El extracto obtenido, por 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 planta (Giménez A., 2005).



**Foto 3.** Fotografía de corteza de Evanta. (Proporcionada por el I.I.F.B.-F.C.F.B. – U.M.S.A.)

#### 4.2. Evaluación de la Toxicidad del extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* K. mediante la Prueba SMART

La evaluación de la toxicidad del extracto se realizó en dos etapas. En la primera se evaluaron cuatro concentraciones de 10, 5, 1, 0.5 mg/mL de extracto y un control negativo (Tween 80 y Etanol Absoluto). Se sometió un número total de 200 larvas de tercer instar por concentración evaluada, en ambos cruces: Estándar y Alta Bioactivación.

- Cruce Estándar (ST): Este cruce fue realizado con hembras del linaje *flr<sup>3</sup>/ln (3LR) TM, .ri p<sup>o</sup>sepn 1(3)89Aabx<sup>34e</sup> & Bd<sup>s</sup>* y machos del linaje *mwh*.
- Cruce Alta-Bioactivación (HB): Para este cruce se emplearon hembras del linaje *ORR/ORR: flr<sup>3</sup>/ln (3LR) TM, .ri p<sup>o</sup>sepn 1(3)89Aabx<sup>34e</sup> & Bd<sup>s</sup>* que fueron cruzadas con machos del linaje *mwh*.

**Disolución del extracto:** El extracto seco diclorometánico de *Galipea longiflora* K. fue disuelto en una mezcla de Tween 1.3% y etanol absoluto 1.6%.

**Tratamiento de individuos:** Las larvas de tercer instar (Foto4) fueron tratadas por 48 hrs. mediante contacto directo de las mismas con el extracto, en frascos de vidrio que contenían 1.5 g. de *Drosophila* Instant Medium Carolina y 5 mL de la solución del extracto.



**Foto 4.** Larva de *Drosophila melanogaster* en su tercer estadio.

Una vez completado su desarrollo los ímagos maduros que sobrevivieron fueron recontados y recolectados en alcohol al 70% para su mantenimiento.

En la segunda etapa, bajo el mismo procedimiento se procedió a evaluar cinco concentraciones de 500, 250, 125, 60, 30 ug/mL. Y un control negativo (Tween 80 y Etanol Absoluto). Estas concentraciones son las que posteriormente serán empleadas para la evaluación de la actividad genotóxica. Ambas etapas se realizaron bajo condiciones de 25 °C de temperatura y 60% de Humedad relativa.

#### **4.3. Evaluación Genotóxica del extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* K. mediante la Prueba SMART**

Para la evaluación genotóxica del extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* K. fueron empleados los cruces Estándar y Alta Bioactivación, ya anteriormente explicados. Las concentraciones evaluadas del extracto en esta segunda fase fueron de 500, 250, 125, 60 y 30 ug/mL.

Se sometió un número aproximado de 200 larvas de tercer instar, mediante contacto directo con el extracto, por 48 hrs. (tratamiento

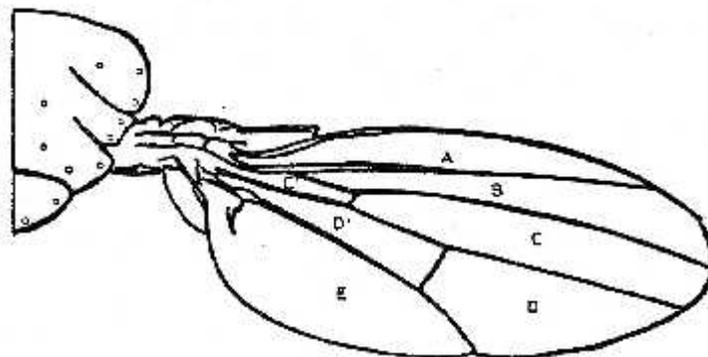
crónico), en frascos de vidrio que contenían 1.5 g. de *Drosophila* Instant Medium Carolina y 5 mL de la solución de la solución del extracto.

Una vez completado su desarrollo los ímagos maduros fueron recolectados en alcohol al 70%, para posteriormente proceder al análisis de alas. Ambos experimentos se realizaron en las mismas condiciones, 25 °C y 60% de Humedad relativa.

#### 4.3.1. Análisis de alas

Para el análisis las alas fueron fijadas en porta objetos con solución de Faure según técnica descrita en Graf U. 1984 (ver anexos), un total de 10 individuos por placa, de los cuales 5 fueron hembras y 5 machos del genotipo trans-heterocigoto.

Una vez fijadas las alas, el análisis fue realizado según técnica descrita por Graf U. 1984 (ver anexos), tomando en cuenta las áreas de lectura (Fig. 6). Con la ayuda de un microscopio con aumento de 640 X se busca células que expresen el marcador genético *Flr<sup>3</sup>* o *mwh* en ambos lados del ala.



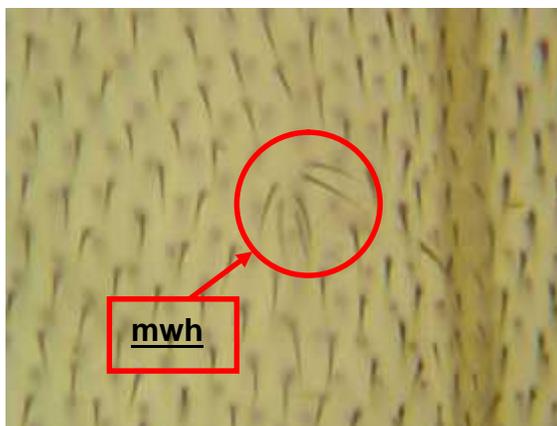
**Figura 7.** Ala de *Drosophila melanogaster*, donde se aprecia las áreas de lectura. (Tomado de Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*, Graf U. et al, 1984)

- Marcador genético *mwh*: Se observa como el crecimiento de tres o más tricomas en lugar de uno. (Foto 5 y 6)
- Marcador genético *flr*: Que posee la característica de presentar una base ensanchada respecto a la delgada que presentan los pelos normales (Graf U. et al., 1984). (Foto 7)

#### 4.3.2. Clasificación de manchas

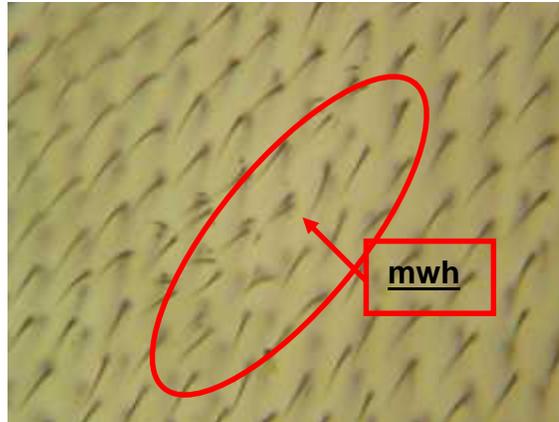
La clasificación de manchas se realiza mediante el método descrito por Graf U. 1984, tomando en cuenta el tipo y tamaño de la misma:

Mancha Simple Pequeña (MSP): Se consideran como Manchas Simple Pequeña a una o dos células afectadas, sean estas *mwh* o *flr*<sup>3</sup> (Graf U. et al, 1984).



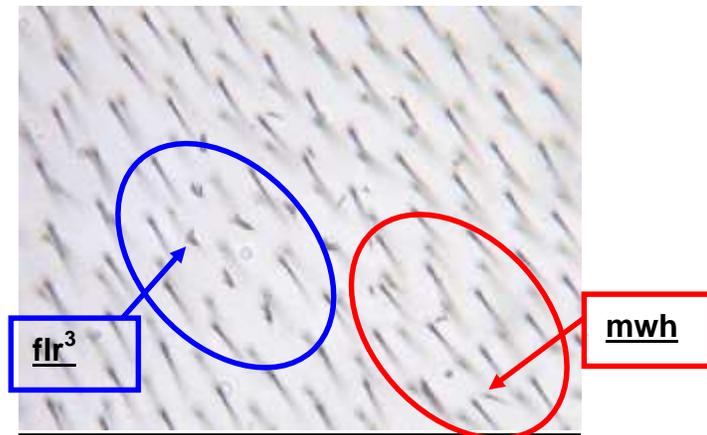
**Foto 5.** Observación de Mancha Simple Pequeña mediante microscopio, aumento 640 X (Tomada en el Laboratorio de Farmacología I.I.F.B. en fecha: 18/06/06)

Mancha Simple Grande (MSG): Son aquellas manchas en las cuales el número de células afectadas es mayor a dos.



**Foto 6.** Observación de Mancha Simple Grande mediante microscopio aumento 640 X (Tomada en el Laboratorio de Farmacología I.I.F.B. en fecha: 18/06/06)

Mancha Gemela (MG): En estas se expresa juntos en la misma mancha ambos tipos de marcadores *mwh* y *flr*<sup>3</sup>.



**Foto 7.** Observación de Mancha Gemela mediante microscopio aumento 640 X (Tomada en el Laboratorio de Farmacología I.I.F.B. en fecha: 18/06/06)

#### 4.4. Análisis Estadístico

Según explicación de Graf para en análisis estadístico de la prueba SMART, se tienen dos hipótesis formuladas:

**(Ho) Hipótesis Nula:** La frecuencia de manchas halladas en los tratamientos **no es mayor** a la frecuencia de manchas halladas en el control negativo.

**(Hi) Hipótesis Alternativa:** La frecuencia de manchas halladas en los tratamientos **es mayor** a la frecuencia de manchas halladas en el control negativo. (Frei & Würgle, 1988)

A partir las hipótesis planteadas se aplicó el test Binomial condicional de Kastenbaum – Bowman, el cual indica:

**Respuesta Positiva:** Cuando la frecuencia de manchas de los tratamientos es 2 veces mayor ( $m=2$ ) a la frecuencia encontrada en el control negativo. Se rechaza la hipótesis nula (Ho).

**Respuesta Negativa:** Cuando la frecuencia de manchas de los tratamientos es menor a las halladas en el control negativo. Se rechaza la hipótesis Alternativa (Hi).

**Respuesta Inconclusiva:** Cuando ambas hipótesis son excluyentes (Frei & Würgler, 1988)

## RESULTADOS

Para la Evaluación de la Tóxicidad del extracto diclorometánico de *Evanta*, se evaluaron cuatro concentraciones: 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL y 0.5 mg/mL, en una primera etapa y 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 60 µg/mL y 30 µg/mL en la segunda, estas últimas fueron las empleadas para la evaluación del potencial genotóxico del extracto. Los resultados obtenidos fueron realizados mediante el análisis estadístico de datos de acuerdo con el Diagnóstico Estadístico de Frei y Würigler 1988.

Se empleó como control positivo datos históricos de Mitomicina C (Gonzales M. 2006), conocido agente mutágeno, estos datos confirmaron la actividad de *Drosophila melanogaster* para detectar mutágenos de acción directa como indirecta, debido a la frecuencia elevada de manchas encontradas en ambos cruces como se observa en los gráficos y tablas 4 y 5.

### **Evaluación de la Toxicidad del extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* K. mediante la Prueba SMART**

En la primera etapa de la evaluación de la toxicidad del extracto, el porcentaje de sobrevivencia de ímagos fue empleado para evaluar la toxicidad de cuatro concentraciones (0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL) del extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* K., sobre las larvas de tercer instar de *Drosophila melanogaster*, de los cruces Estándar y Alta Bioactivación. Donde un número de 200 larvas fueron empleadas para cada concentración del extracto, al igual que para el control negativo (CN) que fue el diluyente del extracto (Tween 80/Etanol absoluto).

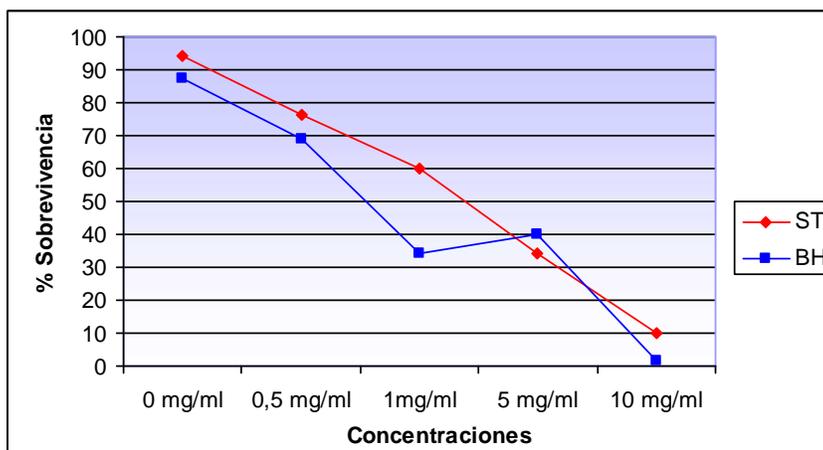
Los resultados obtenidos en esta primera etapa se muestran en la Tabla 1 y Gráfico 1, donde se observa que el porcentaje de mortalidad de los individuos tratados, es directamente proporcional a la dosis del extracto. A la mínima concentración (0.5 mg/mL) el porcentaje de sobrevivientes en el cruce

Estándar (ST) es de 76.5% y en el de Alta Bioactivación (HB) de 69%. Observando que a 10 mg/mL el porcentaje de sobrevivencia no supera el 10% en ambos cruces (Tabla 1, Grafico 1). Para el control negativo el porcentaje de individuos sobrevivientes en el cruce ST llega a 94%, observándose un porcentaje de 87.5% para HB (Gráfico 1).

**Tabla N° 1:** Evaluación de la Toxicidad, mediante el Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar de los Cruces Estándar y Alta Bioactivación, sometidas a diferentes concentraciones del extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* Krause.

Concentraciones Evaluadas	% de sobrevivencia ST	% de sobrevivencia BH
0 mg/ml	94	87,5
0,5 mg/ml	76,5	69
1mg/ml	60	34
5 mg/ml	34	40
10 mg/ml	10	1,5

**Gráfico N° 1:** Comparación de la Toxicidad del extracto de *Galipea longiflora* K. a concentraciones de 0.5, 1 ,5 y 10 mg/mL., en los cruces, ST y HB (Porcentaje de sobrevivencia).



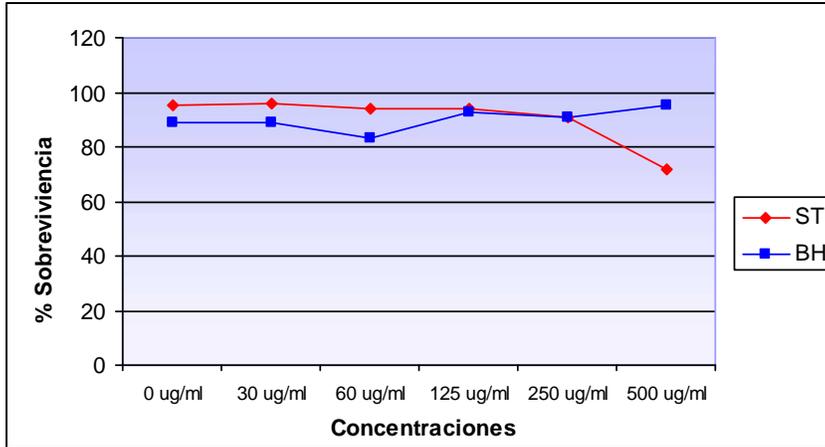
Se realizó una segunda etapa del experimento de sobre vivencia con concentraciones inferiores a 0.5 mg/mL, debido a que esta fue la concentración que presentó mayor número de sobrevivientes en la primera evaluación, empleando en esta etapa concentraciones de 500, 250, 125, 60 y 30 ug/mL, obteniéndose los resultados reportados en la Tabla 2 y Gráfica 2, donde se puede observar que el 72% de los ímagos sobrevivieron a concentración de 500 ug/mL (máxima concentración) en el cruce ST y 95% de sobrevivencia para el HB.

Porcentajes mayores a 80 fueron reportados en las demás series tratadas, así a 30 ug/mL, la sobrevivencia llegó a 96% para el cruce ST y 89% para el HB (Tabla 2 y Gráfico 2). Debido a los resultados reportados se considera a las concentraciones de 500, 250, 125, 60 y 30 ug/mL como las concentraciones sub tóxicas del extracto de *Galipea longiflora* K. en *Drosophila melanogaster*.

**Tabla N° 2:** Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar sometidas a diferentes concentraciones del extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* Krause.

Concentraciones Evaluadas	% de Sobrevivencia ST	% de Sobrevivencia BH
CN	95	88,7
30 ug/ml	96	89
60 ug/ml	94	83
125 ug/ml	94	93
250 ug/ml	91	91
500 ug/ml	72	95

**Gráfico N° 2:** Comparación de la Toxicidad del extracto de *Galipea longiflora* K. a concentraciones de 30, 60, 125, 250 y 500 ug/mL, en los cruces, ST y HB



## **5.2. Evaluación del Potencial Genotóxico de *Galipea longiflora* K. mediante Cruce Estándar**

Se sometió a larvas de tercer instar del cruce ST a tratamiento crónico de 48 hrs. con las concentraciones sub-tóxicas halladas, de este cruce se analizó el genotipo trans-heterocigoto. En el CN se observó una frecuencia de 1.16 Mancha Simple Pequeña (MSP)/mosca, para la máxima concentración que es de 500 ug/mL la frecuencia reportada fue de 1 MSP/mosca. En el caso del CN para Mancha Simple Grande (MSG) la frecuencia encontrada fue de 0.13 MSG/mosca, la frecuencia más alta encontrada para este marcador en las series tratadas con el extracto fue de 0.25 MSG/mosca, correspondiente a la concentración de 250 ug/mL. (Tabla 3)

En este cruce la mayor frecuencia observada corresponde al CN, observándose un incremento relativamente proporcional en la frecuencia de manchas con relación a la concentración para los grupos con tratamiento, esto para MSP. Los valores obtenidos mediante el paquete estadístico, muestran resultados negativos para la actividad genotóxica del extracto en las cinco concentraciones evaluadas.

No se observó el marcador Mancha Gemela (MG) en la mayoría de los tratamientos, excluyendo el de 500 ug/ml y el CN, dando inconclusivo (Tabla 3) para la actividad genotóxica del extracto según el paquete estadístico aplicado.

**Tabla 3. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de *Galipea longiflora* Cruce Estándar**

Genotipos y Conc. ( ug/ml )	N. de mos cas ( N )	Manchas por mosca ( No. de manchas ) diag. estadístico <sup>a</sup>										Total manchas mwh <sup>c</sup> ( n )	
		MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2		MSG (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5			MG m = 5		TM m = 2				
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>													
Contr. Neg.	32	1, (3 16 7)	-	0, (0 13 4)	0, (0 03 1)	0, (0 00 0)	0, (0 00 0)	1, (4 31 2)	-				41
30	20	0, (0 45 9)	-	0, (0 10 2)	i	0, (0 00 0)	i	0, (1 55 1)	-				11
60	20	0, (1 90 8)	-	0, (0 20 4)	i	0, (0 00 0)	i	1, (2 10 2)	-				22
125	20	0, (1 55 1)	-	0, (0 10 2)	i	0, (0 00 0)	i	0, (1 65 3)	-				13
250	20	0, (1 85 7)	-	0, (0 25 5)	i	0, (0 00 0)	i	1, (2 10 2)	-				22
500	20	1, (2 00 0)	-	0, (0 05 1)	i	0, (0 10 2)	i	1, (2 15 3)	-				21

<sup>a</sup>Diagnóstico 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  $\alpha = \beta = 0,05$ .

<sup>b</sup>Incluso las manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup>Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

### **5.3. Evaluación del Potencial Genotóxico de *Galipea longiflora* K. mediante Cruce Alta Bioactivación**

Según los datos obtenidos en el cruce de HB, reportados en la Tabla 4, se observó 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 obtenidas en los tratamientos con el extracto. Mostrando en estos un rango que varía de 0.3 a 1.35 MSP/individuo, llegando a reportar un resultado negativo para la actividad genotóxica del extracto, según el estadístico aplicado.

Para el marcador MSG la frecuencia encontrada en el CN corresponde a 0.23 MSG/mosca, en los grupos con tratamiento la frecuencia máxima observada fue de 0.30 MSG/ mosca, dando un resultado negativo para la actividad genotóxica del extracto para este marcador en todas las concentraciones evaluadas, a excepción de la correspondiente a 60 ug/mL.

Para el total de manchas *f1r<sup>3</sup>* los resultados son negativos para la actividad genotóxica en las cinco concentraciones del extracto evaluadas.

**Tabla 4. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de *Galipea longiflora* mediante Cruce Alta Bioactivación**

Genotipos y Conc. ( mg/ml )	N. de mos cas ( N )	Manchas por mosca ( No. de manchas ) diag. estadístico <sup>a</sup>										Total manc has mwh <sup>c</sup> ( n )
		MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2		MSG (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5		MG m = 5		TM m = 2				
<i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>												
Contr. Neg.	30	1, (4 40 2)		0, (0 23 7)		0, (0 00 0)		0, (0 00 0)	i	1, (4 63 9)		49
30	20	0, (1 55 1)	-	0, (0 00 0)	-	0, (0 00 0)		0, (0 00 0)	i	0, (1 55 1)	-	11
60	20	1, (2 35 7)	-	0, (0 30 6)	i	0, (0 05 1)		0, (0 01 1)	i	1, (3 70 4)	-	30
125	20	1, (2 15 3)	-	0, (0 10 2)	-	0, (0 00 0)		0, (0 00 0)	i	1, (2 25 5)	-	25
250	20	0, (0 30 6)	-	0, (0 05 1)	-	0, (0 00 0)		0, (0 00 0)	i	0, (0 35 7)	-	7
500	20	0, (1 65 3)	-	0, (0 10 2)	-	0, (0 00 0)		0, (0 00 0)	i	0, (1 75 5)	-	15

<sup>a</sup>Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de

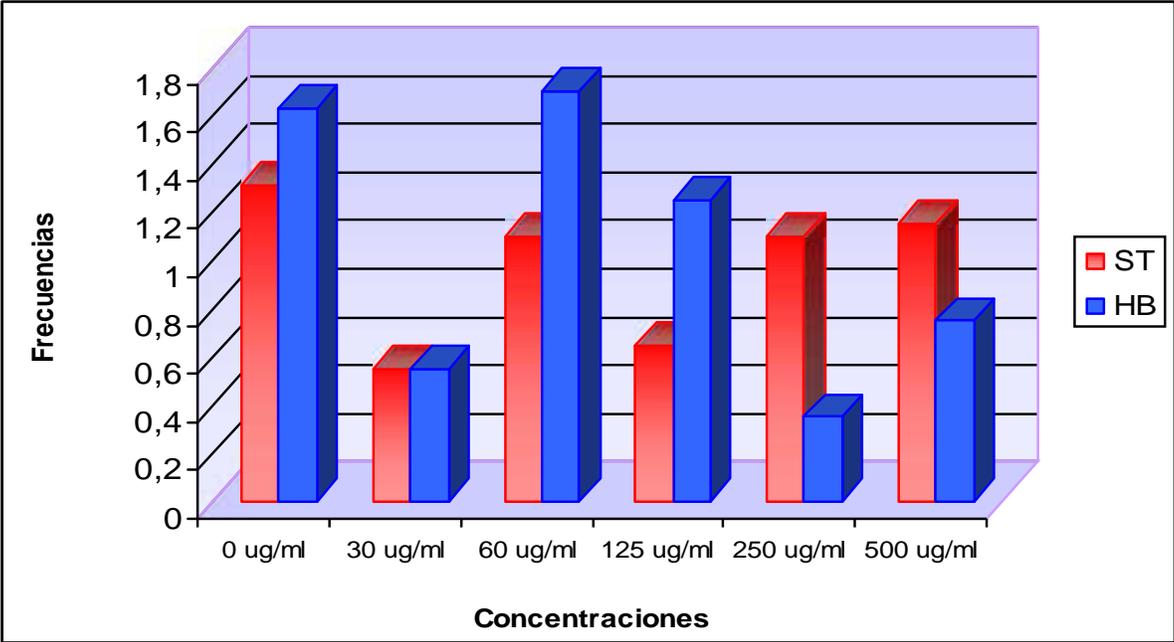
multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$ .

<sup>b</sup>Incluso las manchas simples *flr*<sup>3</sup> raras.

<sup>c</sup>Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

**Gráfico N° 3:**

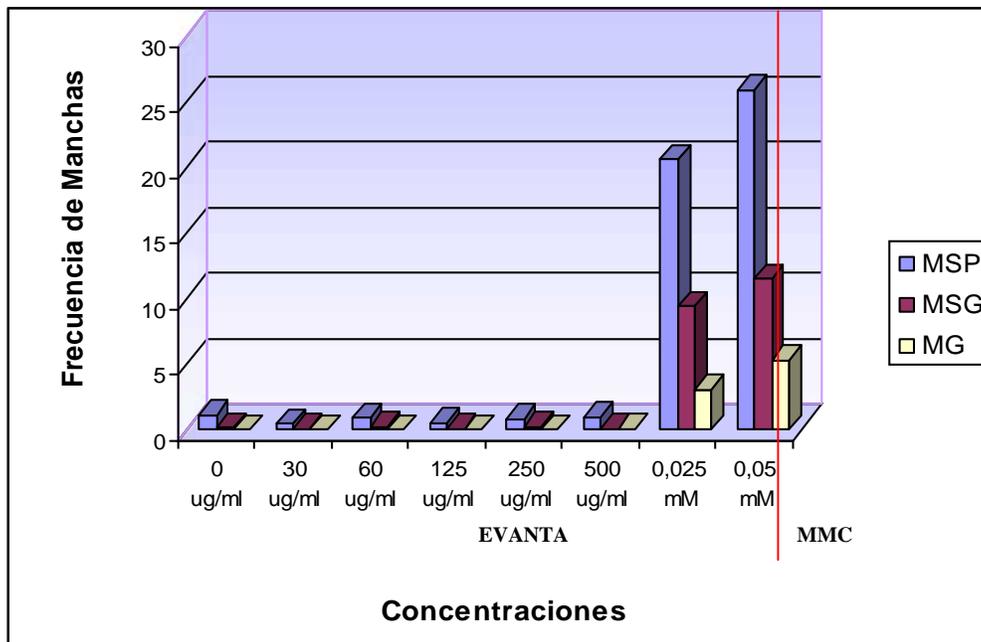
Comparación de la frecuencia del Total de Manchas encontrada en el cruce Estándar y Alta Bioactivación, después del tratamiento con *Galipea longiflora* K.



Realizando una comparación entre las frecuencias encontradas en ambos cruces ST, HB y las frecuencias encontradas en MMC (control positivo), se observa que las cinco concentraciones evaluadas del extracto presentan una frecuencia máxima de 1.10 Total de Manchas (TM)/mosca para el cruce ST y 1.70 TM/mosca para el cruce HB (Tablas 3 y 4), frecuencias considerablemente inferiores a las encontradas con tratamiento 0.025 y 0.05 mM de MMC, donde la máxima frecuencia encontrada en para el cruce ST es de 42.7 TM/mosca, y para el HB es de 46.7 TM/mosca (Tablas 5 y 6).

**Gráfico N° 4:**

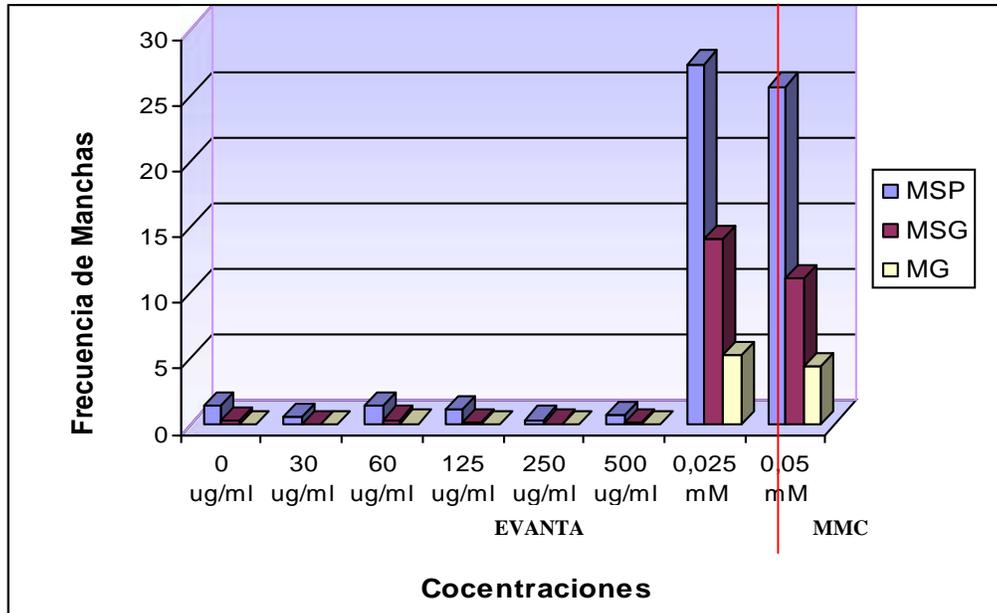
Comparación de la frecuencia de manchas encontrada en el cruce Estándar de las diferentes concentraciones del extracto, el control negativo y el control positivo.



Marcadores genéticos: MSP (Mancha Simple Pequeña), MSG (Mancha Simple Grande) y MG (Mancha Gemela).

### Gráfico N° 5:

Comparación de la frecuencia de manchas encontrada en el cruce Alta Bioactivación, de las diferentes concentraciones del extracto el control negativo y el control positivo.



Marcadores genéticos: MSP (Mancha Simple Pequeña), MSG (Mancha Simple Grande) y MG (Mancha Gemela).

**Tabla 5.** Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de Mitomicina C, mediante Cruce Estándar.

Tabla 2. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de MMC mediante Cruce Estándar						
Genot/pos y Conc. (mM)	N. de muestras (N)	MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2	MSC (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5	MC	TM	Total manchas mwh <sup>c</sup> (n)
<i>mwh/jr</i> <sup>a</sup>						
Contr. Neg.	20	1,00 (20)	0,05 (01)	1,20 (04)	1,25 (25)	2
0.025	10	20,60 (206) +	9,40 (94) +	3,10 (31) +	33,10 (331) +	2
0.05	10	25,90 (259) +	11,50 (115) +	5,30 (53) +	42,70 (427) +	366
<i>mwh/TM3</i>						
Contr. Neg.	20	0,75 (15)	0,00 (00)	<sup>d</sup>	0,75 (15)	15
0.025	10	6,30 (63) +	1,00 (10) +		7,30 (73) +	73
0.05	10	7,90 (79) +	1,10 (11) +		9,00 (90) +	90

<sup>a</sup> Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frey y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$ .

<sup>b</sup> Incluso las manchas simples *flr*<sup>3</sup> raras.

<sup>c</sup> Considerando los clones *mwh* para las manchas simple *mwh* y para las manchas gemelas.

<sup>d</sup> Apenas manchas simple: *mwh* pueden ser observadas en los individuos heterocigotos *mwh/TM3*, ya que el cromosoma balanceador *TM3* no contiene el gen mutante *flr*<sup>3</sup>.

**Tabla 6.** Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de Mitomicina C,

Tabla 3. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de MMC mediante Cruce Alta Bioactivación						
Genotipos y Conc. (mM)	N. de moscas (N)	Manchas por mosca (No. de manchas) diag. estadístico <sup>a</sup>			TM	Total manchas mwh <sup>c</sup> (n)
		MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2	MSG (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5	MG		
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>						
Contr. Neg.	20	1,35 (27)	0,10 (02)	0,15 (03)	1,60 (32)	27
0.025	10	27,40 (274) +	14,10 (141) +	5,20 (52) +	46,70 (467) +	398
0.05	10	25,70 (257) +	11,10 (111) +	4,40 (44) +	41,20 (412) +	324
<i>mwh/TM3</i>						
Contr. Neg.	20	1,35 (27)	0,05 (01)	d	1,40 (28)	28
0.025	10	13,80 (138) +	3,10 (31) +		16,90 (169) +	169
0.05	10	11,60 (116) i	4,10 (41) i		15,70 (157) i	157

<sup>a</sup> Diagnóstico 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  $\alpha = \beta = 0,05$ .

<sup>b</sup> Incluso las manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup> Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

<sup>d</sup> 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*.

Tabla Extraída de Gonzales M., 2006

## 6. DISCUSIÓN

Actualmente son imprescindibles los estudios toxicológicos que deben incluir los estudios genotoxicológicos, debido a que es importante salvaguardar al máximo posible la reserva genética humana de la acción de las distintas sustancias genotóxicas, incluyendo en esta categoría todas aquellas que tengan efectos mutagénicos, carcinogénicos y/o teratogénicos (De la Peña E., 2005).

Es por ello que en el presente trabajo se evaluó la actividad genotóxica y pro-mutágena del extracto total diclorometánico de corteza de *Galipea longiflora* K. (Evanta), mediante la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART), que emplea a *Drosophila melanogaster* como organismo experimental, por muchas razones es uno de los organismos superiores más extensamente estudiados, particularmente a nivel genético y a nivel genómico, las principales ventajas como organismo modelo se centran fundamentalmente en un tiempo de generación corto, una abundante descendencia y un fácil mantenimiento debido a sus reducidas dimensiones (Montserrat G., 2001).

Se eligió el extracto total diclorometánico de corteza de Evanta, debido a su potente actividad leishmanicida, la cual fue ampliamente demostrada por investigadores Franceses (Alain Fournet y su equipo) e investigadores del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB).

En la primera etapa del análisis toxicológico se evaluaron las concentraciones de 0.5, 1, 5, 10 mg/mL mediante cruce ST y HB, en ambos cruces se observa un comportamiento similar, debido a que la mortalidad de individuos aumenta en relación al incremento de la dosis, llegando a 10 y 1.5% de sobrevivencia respectivamente para la máxima concentración, este comportamiento sugiere que los compuestos presentes en el extracto de

Evanta poseen la capacidad de incrementar la mortalidad de individuos a las máximas concentraciones analizadas. Esto podría deberse a los componentes del extracto, que constan aproximadamente en un 50% de alcaloides quinolínicos y un 25% de 2-fenil-quinolina (estructuras confirmadas por espectros de masas de alta resolución) (Giménez A. et al., 2005). Debido a que el extracto en su mayor porcentaje está compuesto por alcaloides 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 micronúcleos (Ansah C. et al., 2005). 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 elevadas (Langford N.J. et al., 2003). Es por todo ello que se plantea que el contenido de alcaloides en el extracto, podría ser responsable de los resultados obtenidos con estas primeras concentraciones del extracto de Evanta evaluadas mediante SMART.

Sin embargo estos resultados no limitan el empleo de *Galipea longiflora* K. o sus principios activos como alternativa terapéutica, debido a que las concentraciones del extracto que inhiben al 50% de los promastigotes de *Leishmania* (IC<sub>50</sub>) oscilan entre 76.5 y 125 ug/ml para el extracto orgánico de corteza (Salamanca E., 2005). Concentraciones contempladas entre los rangos de concentraciones sub tóxicas del extracto de Evanta mediante SMART.

Para la evaluación de la toxicidad del extracto en la segunda etapa, se partió de la concentración mínima anteriormente evaluada, las concentraciones empleadas en esta segunda etapa fueron de 500, 250, 125, 60 y 30 ug/mL, mostrando que la sobrevivencia de individuos se mantiene

por encima del 72%, en las cinco concentraciones evaluadas llegando a un 94% en la mínima concentración. Resultados que sugieren que los compuestos presentes en el extracto no poseen actividad tóxica para *Drosophila melanogaster* a estas concentraciones. Un comportamiento similar se observó en la determinación de Toxicidad aguda del extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* K. en modelo murino, observando ausencia de letalidad hasta 5 g/kg peso corporal de ratón (Rodríguez M., 2001). Se debe considerar que el modelo empleado por Rodríguez evalúa dosis y no concentraciones, como el modelo empleado en el presente trabajo, ya que no se puede calcular la dosis ingerida por *Drosophila melanogaster*.

Las concentraciones evaluadas en la segunda etapa de la determinación tóxica se consideran sub-tóxicas para *Drosophila*, por lo cual con ellas se procedió a la evaluación del potencial genotóxico, debido a que la Genética toxicológica exige que las concentraciones evaluadas sean sub-tóxicas. (Brusick, 1980 cit en Tirado N., 1995)

Los resultados obtenidos en la evaluación genotóxica del extracto muestran que el mismo no es genotóxico, mediante el cruce ST de *Drosophila melanogaster*, debido a que la frecuencia total de manchas (TM) encontradas en las cinco concentraciones evaluadas son inferiores a las del CN. Si comparamos las frecuencias del extracto de Evanta con las de un conocido potente genotóxico como la Mitomicina C (MMC), se observa que las frecuencias encontradas en Evanta son significativamente inferiores, a las frecuencias reportadas con MMC (control positivo), a concentraciones de 0.025 y 0.05 mM.

La observación de una baja frecuencia de MSP/mosca en las cinco concentraciones evaluadas, nos indica que los componentes del extracto no son de acción directa, pues cuando un compuesto actúa de manera directa

normalmente se producen daños genéticos tardíos, esto debido a que los compuestos necesitan activarse para poseer actividad, 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 efecto (Asturizaga K., 2005).

La frecuencia de TM en las moscas trans-hetrocigotas no posee un incremento estadísticamente significativo, dando un resultado negativo para el cruce ST, lo que significa 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.

Un comportamiento similar se observó en las moscas provenientes del cruce HB, dando un resultado de actividad genotóxica negativa para todas las concentraciones evaluadas, tanto para el marcador MSP como MSG. 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, considerando que el cruce HB posee un nivel elevado del sistema citocromo P-450 en comparación al cruce ST, sugiriendo así que el extracto no posee capacidad pro-mutágena o sus compuestos no sufren un metabolismo por la vía Citocromo P-450, mediante la Prueba de Mutación y Recombinación Somática.

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 derivados (Graf U. et al., 2000), aceites esenciales como el Safrol y Eugenol, que son genotoxinas de acción indirecta (Munerato M.C., 2005).

Un comportamiento similar al observado con 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 fagaronina, 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 son ambiguos, una baja mutagenicidad es detectada a 2 mM pero no a 5 mM o 10 mM (Perez-Chiesa Y. et al., 1993).

Contradictoriamente a los resultados obtenidos en el presente estudio, observamos que ciertos alcaloides como el 2-amino-3-metilimidazol 4,5-F-quinolina (IQ) poseen un potente potencial carcinogénico a dosis de 10 o 20 mg/kg (Adamson R.H., 1990), llegando a mostrar una clara actividad mutagénica en la Prueba de letalidad recesiva ligada al sexo en *Drosophila melanogaster* (SLRL) y en la Prueba de SMART, observándose resultados negativos en ambas pruebas para dimetil IQ análogo del anterior (Graf U. et al., 1992). Demostrando de esta forma la importancia de la estructura y la vía metabólica del compuesto en análisis, para poseer o no actividad mutágena. Por lo cual se sugiere que los compuestos presentes en el extracto de *Galipea longiflora* K. poseen una estructura no capaz de producir mutación, pese a poseer en su un anillo quinolínic, al igual que el 2-amino-3-metilimidazol 4,5-F-quinolina (IQ), compuesto genotóxico. Comprobándose de esta manera que la estructura completa o parte de ella son las responsables de cierta actividad atribuida al mismo.

Los componentes del extracto diclorometánico de *Galipea longiflora* K. dan una respuesta genotóxica negativa, en el presente estudio, tanto para mutágenos directos como indirectos. Es por ello que se descarta la

posibilidad de considerar al extracto de Evanta como agente recombinogénico, mediante la Prueba de Mutación y Recombinación Somática, debido a que la frecuencia de manchas gemelas tanto en el cruce ST como HB son escasas y en muchos casos nulas. Por los resultados obtenidos en el presente estudio se sugiere que el extracto de Evanta no posee la capacidad de promover el desarrollo de posibles procesos cancerígenos, debido a que el proceso de recombinación mitótica, inhibe la acción de genes supresores de tumores, siendo uno de los factores que puede iniciar un proceso canceroso o activar promutágenos en muchos casos.

## 7. CONCLUSIONES

Mediante el desarrollo de este trabajo, fue posible evaluar la capacidad genotóxica del extracto total de corteza diclorometánico de *Galipea longiflora* Krause, potente leishmanicida, mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART), llegando así a las siguientes 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 sobrevivencia a la máxima concentración para el cruce ST y un 1.5% de sobrevivencia a la misma concentración para el cruce HB. Comportamiento presumiblemente atribuido a la alta concentración de alcaloides. Sin embargo la sobrevivencia de individuos se mantiene entre el 80% al 95% a concentraciones de 30,60, 125, 250, 500 ug/mL del extracto.
- Mediante el cruce ST 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, por lo que sugerimos que el extracto no es genotóxico por si mismo mediante la prueba SMART.
- Al evaluar el potencial genotóxico del extracto total de corteza diclorometánico de *Galipea longiflora* Krause, mediante HB, se observa que el resultado es negativo para la actividad genotóxica de las cinco concentraciones evaluadas, por lo tanto se sugiere que el extracto al pasar por una activación metabólica vía Citocromo P-450, no se metaboliza en compuestos genotóxicamente activos, es decir el compuesto no posee actividad pro-mutágena demostrada mediante la prueba SMART,

- El extracto total de corteza diclorometánico de *Galipera longiflora* Krause, no demuestra actividad genotóxica a las concentraciones de 30, 60, 125, 250 y 500 ug/mL, 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.

## 8. RECOMENDACIONES

Numerosos estudios se han realizando y continúan realizándose con la Prueba de Mutación y Recombinación Somática SMART tanto a nivel mundial como en nuestro país. A estos se suma el presente trabajo, que aporta valiosa información complementaria de la especie vegetal *Galipea longiflora* Krause.

Con respecto a los resultados obtenidos mediante el presente trabajo se recomienda la evaluación del extracto mediante una prueba de mutagenicidad *in vitro*, para cumplir con las normas internacionales de la genética toxicológica, las cuales exigen que un compuesto para ser declarado no genotóxico debe dar resultados negativos por lo menos en dos pruebas una *in vitro* y la otra *in vivo*, las cuales aporten información sobre mutaciones puntuales en el organismos complejos (no bacterias) y la capacidad para producir aberraciones cromosómicas (Herrero F. – De la Peña, 2005) También se recomienda la evaluación genotóxica de los alcaloides totales aislados, la comparación del efecto mutágeno de el extracto de Evanta con los fármacos vigentes en el mercado, debido a que entre ellos encontramos al Glucantime y la Anfotericina B, encontrándose en el caso del Glucantime, estudios en los cuales se reporta que pacientes tratados con esta droga no responden favorablemente al tratamiento, debido a una posible resistencia desarrollada por el parásito (Croft S. et al., 2006). Y otro estudio reporta actividad embriotóxica del Glucantime en ratas (Paumgarten F.J., 2001).

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. **ADAMSON R. H., THORGEIRSSON U. P., SNYDERWINE E. G., THORGEIRSSON S. S., REEVES J. DALGARD D. W., TAKAYAMA S., SUGIMURA T.** (1990) Carcinogenicity of 2-amino-3methylimidazol(4,5-f)quinoline in nonhuman primates induction of tumors in three macaques. *Jpn J Caucer Res.* 81(1):10-4.
2. **AMBROZIN AR., VIEIRA PC, KUBO I, KUJIME H, YAMAGIWA Y, KAMIKAWA T.** (1992) Molluscicidal acridone alkaloids from *Angostura paniculata*: isolation, Structures, and Synthesis. [J Nat Prod.](#) 55(8):1112-7.
3. **ANSAH C, KHAN A. GOODERHAM N.J.** (2005) In vitro genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. *Toxicology* 1; 208(1):141-7.
4. **AVILA ILLANES JUAN ANTONIO.** (2000) Estudio Preclínico de *Galipea longiflora* Krause-Evanta Mediante Modelo Tóxico/Cinético. Tesis de Maestría en Farmacia Clínica y Fármaco Terapia. Universidad Andina Simón Bolívar.
5. **AZTURIZAGA VALDIVIA KAREN.** (2005) Evaluación de la actividad Genotóxica del Extracto de *Mutisia acuminata* (Chinchircuma) en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Carrera de Biología. UMSA.
6. **BALANZA E., MUÑOZ V., ANGELO A., RUIZ E., DEHARO E., FOURNET A., MORETTI C., SAUVAIN ORSTOM M.** (1993) ESTUDIO DE PLANTAS MEDICINALES, DE DISTINTAS REGIONES DE BOLIVIA, CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA LA PAZ, BOLIVIA [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_veterinarias\\_y\\_pecuarias/simposio1993/05areaflora/33c.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_veterinarias_y_pecuarias/simposio1993/05areaflora/33c.html).
7. **BETANCOURT POSADA ALBERTO.** (2002) Ganan 40 mmdd al año por venta de fármacos basados en medicina tradicional Explotan laboratorios el conocimiento indígena. La Jornada, Lunes en la Ciencia, México <http://www.jornada.unam.mx/cien-indigena.html>.
8. **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.
9. **CASSARETT AND DOULL´S; HOFFMANN G.** (1996) Genetic toxicology. En: *Toxicology: the basic science of poisons*". 5 ed. New York: 1996: 269-300.

10. **CHESIS PAUL L., LEVIN DAVID E., SMITHT MARTYN T., ERNSTERT LARS, AND AMES BRUCE N.** (1984). Mutagenicity of quinones: Pathways of metabolic activation and detoxification (benzola]pyrene quinones/oxygen radicals/NADPH-cytochrome P-450 reductase). Proc. Nati. Acad. Sci. USA. Biochemistry. Vol. 81, 1696-1700.
11. **COMUNIDAD ANDINA DE NACIONES ESTRATEGIA REGIONAL DE BIODIVERSIDAD DISTRIBUCIÓN DE BENEFICIOS** Documento preliminar para revisión por países Preparado por: Consorcio GTZ/FUNDECO/IE La Paz – Bolivia 2 de julio de 2001.
12. **CROFT SIMON L., SUNDAR SHYAM, FAIRLAMB ALAN H.** (2006) Drug Resistance in Leishmaniasis Clin Microbiol Rev. 19(1): 111–126. doi: 10.1128/CMR.19.1.111-126.
13. **DAMIANI E, GRECI L, HRELIA P.**(2000) Cyto- and genotoxic effects of novel aromatic nitroxide radicals in vitro; [Free Radic Biol. Med.](#) 1;28(3):330-6.
14. **DE LA PEÑA E. Y GÓMEZ E.** (2005) Toxicología Ambiental: Seguridad Química. ed. Asociación Española de Toxicología. CD-ROM. Madrid.
15. **DÍAZ GARCÍA GLADYS MARÍA** (2002) Evaluación del Efecto Genotóxico del *Xhantium Strumarium L.* (Guisazo de caballo). Trabajo para optar por el Título de Master en Medicina Tradicional y Natural. Instituto Superior de Ciencias Médicas “Carlos J. Finlay” Camagüey.
16. **FOURNET A, FERREIRA M.E, ROJAS DE ARIAS A, TORRES DE ORTIZ S, FUENTES S, NAKAYAMA H, SCHININI A, HOCQUEMILLER R.** (1996) In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis* Antimicrob Agents Chemother. 40(11):2447-51.
17. **FOURNET ALAIN.** (1993) Les chimanines, nouvelles quinoleines en 2 isoles de une plante bolivienne antiparrasitaire: *Galipea longiflora*. Journal of National Products. Vol. 56. N<sup>a</sup> 9.
18. **FOURNET, MUNOS, GANTIER, HOCQUEMILLER.** (1996). The effect of some 2-substituted quinolines isolated from *Galipea longiflora* on plasmodium vinckei petteri infected mice. <http://www.cnbi.nlm.nih.gov>.
19. **FREI, H. & WURGLER, F.** (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. Mutat. REs. 203: 297-308.

20. [FROLICH A, WURGLER FE.](#) (1990) Drosophila wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* 234(2): 71-80.
21. **FU PP., XIA Q. LIN G. CHOU MV.** (2004) Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. National Center for Toxicological Research, Jefferson, Arkansas-USA. 36(1):1-55.
22. [GANTIER JC, FOURNET A, MUNOS MH, HOCQUEMILLER R.](#) (1996) The effect of some 2-substituted quinolines isolated from *Galipea longiflora* on Plasmodium vinckei petteri infected mice. *Planta Med.* 62(3):285-6.
23. **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.** (2005) Estudios Químicos, Biológicos y Farmacológicos de *Galipea longiflora*, Krause. *Revista Boliviana de Química.* Vol.22. Nº1. 94-107.
24. **GIMÉNEZ TURBA ALBERTO.** (2004) Diagnostico sobre la información de plantas medicinales y de los pueblos que las manejan, Ministerio de Salud.
25. **GIMÉNEZ TURBA ALBERTO.** (2004) Experiencias del IIFB-UMSA en el Estudio de Productos Naturales Bioactivos: Estudios Clínicos Evanta Vs. Leishmaniosis.  
[http://www.latinpharma.net/expo2004/documentos/gimenez\\_e.html](http://www.latinpharma.net/expo2004/documentos/gimenez_e.html).
26. **GRAF U, ALONSO-MORAGA A, CASTRO R, DÍAZ CARRILLO E.** (1994). Genotoxicity testing of different types of beverages in the Drosophila somatic mutation and recombination test. *Fdn Chem Toxic;* Vol 32. Nº 5. 423-430.
27. **GRAF U., WILD D., WURGLER F.E.** (1992) Genotoxicity of 2-amino-3methylimidazo (4, 5-f) quinoline (IQ) and related compounds in Drosophila. *Mutagenesis.* 7(2):145-9.
28. **GRAF U., SPANÓ M., GUZMÁN J., ABRAHAM S., ANDRADE H.** (2000). An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *African Newsletter.*

29. **GRAF, U. & SINGER, D.** (1989) Somatic Mutation and Recombination Test of *Drosophila melanogaster*. Chemosphere 19: 104-117.
30. **GRAF, U., WÜRGLER E., KATZ, J., FREI, H., JUON, H., MAY, B., AND KALE G.** (1984) Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. Environmental mutagenesis 6. 153-188.
31. **GUEVARA PARDO GONZALO** (2000) Cáncer y evolución. Revista del centro de Estudios del Trabajo Cedetrabajo.
32. **HOFFMANN G.** (1996) Genetic toxicology. En: Toxicology: the basic science of poisons. 5 ed. New York: Cassarett and Doull's. 269-300.
33. [HOUGHTON PJ, WOLDEMARIAM TZ, WATANABE Y, YATES M.](#) (1999) Activity against Mycobacterium tuberculosis of alkaloid constituents of *Angostura bark*, *Galipea officinalis*. Planta Med. 65(3):250-4.
34. **IDAOMAR M., EL HAMSS R., BAKKALI F., MEZZOUG N., ZHIRI A, BAUDOUX D., MUÑOZ-SERRANO A., LIEMANS V. AND A. ALONSO-MORAGA.** (2002) Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster* ;Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Volume 513, Issues 1-2. 61-68.
35. [JACQUEMOND-COLLET I, BENOIT-VICAL F, VALENTIN A, STANISLAS E, MALLIE M, FOURASTE I.](#) (2002) Antiplasmodial and cytotoxic activity of galipinine and other tetrahydroquinolines from *Galipea officinalis*. Planta Med. 68(1):68-9.
36. [JACQUEMOND-COLLET I, BESSIERE JM, HANNEDOUCHE S, BERTRAND C, FOURASTE I, MOULIS C.](#) (2001) Identification of the alkaloids of *Galipea officinalis* by gas chromatography-mass spectrometry. Phytochem Anal. 12(5):312-9.
37. **JOWETT T., MUSTAFA FADZIL F. W., OXTOBY E. AND WOLF C.R.** (1991). Mammalian genes expressed in *Drosophila*: a transgenic model for the study of mechanisms of chemical mutagenesis and metabolism. The EMBO Journal vol. 10 N° 5. 1075 – 1081.
38. **KILLEEN T., GARCIA E., STEPAHN, B.** Guía de Árboles de Bolivia Editorial Quipus S.R.L., La Paz, Bolivia, 1993. 709-710.
39. [LANGFORD N.J., GOOD A.M., LAING W.J., BATEMAN D.N.](#) (2003) Quinine intoxications reported to the Scottish Poisons Information Bureau 1997-2002: a continuing problem. [Br J Clin Pharmacol.](#) 56(5):576-8.

40. **LEWIS** DAVID F.V., **IOANNIDES** C., AND **PARKE** D.V. (1996) COMPACT and Molecular Structure in Toxicity Assessment: A Prospective Evaluation of 30 Chemicals Currently Being Tested for Rodent Carcinogenicity by the NCI/NTP. Environmental Health Perspectives - Vol 104, Supplement 5.
41. **LÓPEZ DE CERAIN**, A.; **PÉREZ**, C.; **JIMÉNEZ**, A.; **EZPELETA**, O.; **BELLO**, J.; **MONGE**, A. (1998) Evaluación mutagénica de medicamentos; Evaluación Mutagénica y Genotóxica. Evaluación Mutagénica y Genotóxica, Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, 263-270.
42. **LÓPEZ**, A., **MARCOS**, R., **VELÁSQUEZ**, A. (1998) Estudio de la Inestabilidad Genética en Mutantes deficientes en la reparación del DNA de *Drosophila melanogaster* PCR con cebadores arbitrarios (AP.PCR). Evaluación Mutagénica y Genotóxica, Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, 85-101.
43. **MONTSERRAT** AMORÓS GIBAJA. (2001) Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*: el gen *ash-2* como regulador de diferenciación celular Tesis Doctoral Departamento de Genética Facultad de Biología Universidad de Barcelona.
44. **MUNERATO** M. C., **SINIGAGLIA** M., **REGULY** M. L. AND **RODRIGUES DE ANDRADE** H. H. (2005) Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*
45. [MUNOS MH, MAYRARGUE J, FOURNET A, GANTIER JC, HOCQUEMILLER R, MOSKOWITZ H.](#) (1994) Synthesis of an antileishmanial alkaloid isolated from *Galipea longiflora* and of related compounds. Chem Pharm Bull (Tokyo). 42(9):1914-6. Erratum in: Chem Pharm Bull. 42(12):2665.
46. **NIGENDA** GUSTAVO, **MORA-FLORES** GERARDO, **ALDAMA-LÓPEZ** SALVADOR, **OROZCO-NÚÑEZ** EMANUEL, (2001) La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia. Salud Pública Mex; 43: 41-51. <http://www.insp.mx/salud/index.html>.
47. **PARKE** D.V., **LEWIS** DAVID F.V. AND **LOANNIDES** C. (1996). COMPACT and Molecular Structure in Toxicity Assessment: A Prospective Evaluation of 30 Chemicals Currently Being Tested for Rodent Carcinogenicity by the NCI/NTP. Environmental Health Perspectives - Vol 104, Supplement 5.

48. **PARKE D.V., LOANNIDES C, LEWIS D.F.V.** (1991). The role of cytochromes P450 in the detoxication and activation of drugs and other chemicals. *Can J Physiol Pharmacol* 69: 537-549.
49. **PAUMGARTTEN F.J., CHAHOUD I.** (2001). Embryotoxicity of meglumina antimoniate in the rat. *Reprod Toxicol.* 15(3):327-31.
50. **PAZ MAGALI** (2004) Establecimiento de sistemas de cultivo semicontinuo de *Galipea longiflora*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas. Mención Biotecnología. UMSA.
51. **PEREZ-CHIESA Y, NARVAEZ Z.** (1993) Evaluation of genotoxicity of the indenoisoquinoline analogues of fagaronine and nitidine in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* 301(4):207-12.
52. **PILLCO ARACELI,** (2003) Evaluación del Potencial Genotóxico de *Bacharis latifolia* (Especie vegetal empleada en la medicina tradicional boliviana). Tesis de licenciatura Facultad de Biología. UMSA.
53. **PRODUCTOS QUÍMICOS.** Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas Real Decreto 363/1995, de 10 marzo MINISTERIO PRESIDENCIA BOE 5 junio 1995, núm. 133, 16544.
54. **[PROUDLOCK R.](#), [THOMPSON C.](#), [LONGSTAFF E.](#)** (2004) Examination of the potential genotoxicity of pure capsaicin in bacterial mutation, chromosome aberration, and rodent micronucleus tests. [Environ Mol Mutagen.](#) 44(5):441-7.
55. **RIBEIRO V., GRAF U., REGULY M., RODRIGUES DE ANDRADE H.** (1997) Recombinagenic Activity of Integerrimine, a Pyrrolizidine Alkaloid from *Senecio brasiliensis*, in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 29:91-97.
56. **RODRIGUEZ MANRIQUE MIRTHA NORCA** (2000) Determinación de la Actividad Antibacteriana de Especies Guaranies y Evaluación de la Toxicidad in vivo de la *Angostura longiflora* (Krause) Kaliunki. Tesina de Grado de Licenciatura en Química Farmacéutica. UMSA.
57. **RODRIGUEZ MANRIQUE MIRTHA NORCA** (2001) Evaluación de la Actividad Biológica de Plantines de la *Angostura longiflora* (Krause) Kallunki. Tesina de Grado de Licenciatura en Bioquímica. UMSA.
58. **SALAMANCA EFRAÍN** (2005) Evaluación de la Actividad Biológica *in Vitro* sobre Formas Parasitarias de Tripanosoma Cruzi y Leishmania de *Angostura longiflora* (Krause) (Kallunki). Tesina para optar al Título de Licenciatura. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. UMSA.

59. **SÁNCHEZ Á.**, FONSECA LÓPEZ L., G., CAPIRO TRUJILLO N. Y FERNÁNDEZ FUENTES D. (2000) Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba, *Rev Cubana Farm*; 34(1): 34-43.
60. **SASSEN A.W.**, **RICHTER E.**, **SEMMLER M.P.**, **HARREUS U.A.**, **GAMARRA F.**, **KLEINSASSER N.H.** (2005) (2005) Genotoxicity of nicotine in mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia; *Toxicol Sci*. Epub. 88(1):134-41.
61. **TIBURI M.** REGULY M.I., SCHWARTSMANN G., CUNHA K. S., LEHMANN M., RODRIGUES DE ANDRADE H.H. (2002) Comparative genotoxic effect of vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. 26; 519(1-2):141-9.
62. **TICONA JUAN CARLOS** (2005). Optimización del proceso de extracción de Alcaloides con actividad biológica de la *Angostura longiflora* Krause. Tesina de Grado de Licenciatura en Química Farmacéutica. UMSA.
63. **TIRADO BUSTILLOS NOEMÍ S.** (1995) Genotoxicidad in vitro de *Musa paradisiacal* y *Croton draconoides*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. UMSA.
64. **VOGEL E.W.**, GRAF U., FREI H.-J. AND NIRVARD M.M.J. (1999) The results of Assays in *Drosophila* as Indicators of Exposure to Carcinogens; IARC Scientific Publication No. 146 International Agency for Reserch on Cancer, Lyon.
65. **VOGEL E.** & ZIJILTRA J. (1987) Mechanistic and methodological aspect of chemically induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 182: 243-264.
66. **XUE JUN Y.**, DE XIANG L., HECHUAN W., YO Z.. (1991) A study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceutical used in Chinese traditional medicine. *Mutat. Res.*; 260: 73-82.
67. **<http://es.geocities.com>**.  
**[http://64.233.161.104/search?q=cache:MCFyRDjr5pkJ:es.geocities.com/ecored2000/coctel.html+genetica+toxicologica,+historia&hl=es&lr=lang\\_es&ie=UTF-8](http://64.233.161.104/search?q=cache:MCFyRDjr5pkJ:es.geocities.com/ecored2000/coctel.html+genetica+toxicologica,+historia&hl=es&lr=lang_es&ie=UTF-8)**
68. **<http://www.plantasmedicinales.org/historia.htm>**
69. **[www.anatomy.unimelb.edu.au](http://www.anatomy.unimelb.edu.au)**
70. **<http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/Drosophila/Drosophila.htm>**

**ANEXOS**

## ANEXO 1.

### **Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, organismo experimental de la Prueba de Mutación y Recombinación Somática SMART.**



*Drosophila melanogaster* Fotografía tomada en el laboratorio de Farmacología- IIFB (Junio, 2006)

*Drosophila melanogaster* conocida como mosca común de la fruta es uno de los organismos más usados en los estudios genéticos. Se cultiva fácilmente y su tiempo de generación es de solo de 10 días a 25 °C. Una hembra puede colocar como 500 huevos en 10 días. Por que la mosca es pequeña, los cultivos ocupan poco espacio; sin embargo la mosca es suficientemente grande para la observación rápida de caracteres mutantes.

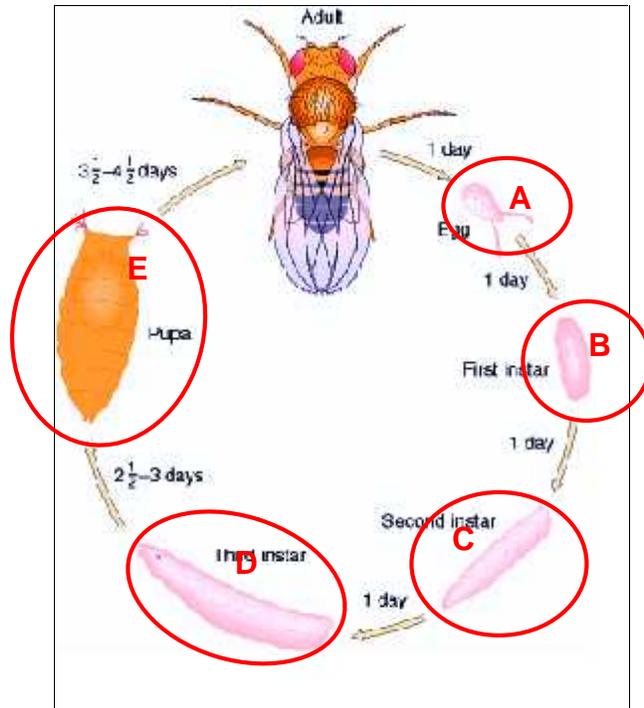
*Drosophila* sufre metamorfosis completa, los estadios de su ciclo de vida son: huevo, larva, pupa y adulto.

Huevo: tiene alrededor de 0.5 mm de longitud, tiene forma elipsoidal y en su parte anterior lleva dos filamentos que se proyectan hacia adelante y que impiden que el huevo se hunda en el medio de cultivo, la cubierta externa es el corion. Duración 1 día.

Larvas: es una criatura vermiforme blanca y segmentada, que tiene forma de gusano, la parte de la boca es negra con ganchos bucales en la región angosta de la cabeza. Para la respiración tiene un par de espiráculos tanto en la región anterior y posterior. Duración: larva de primer instar 1 día; larva de segundo instar 1 día y larva de tercer instar 3 días.

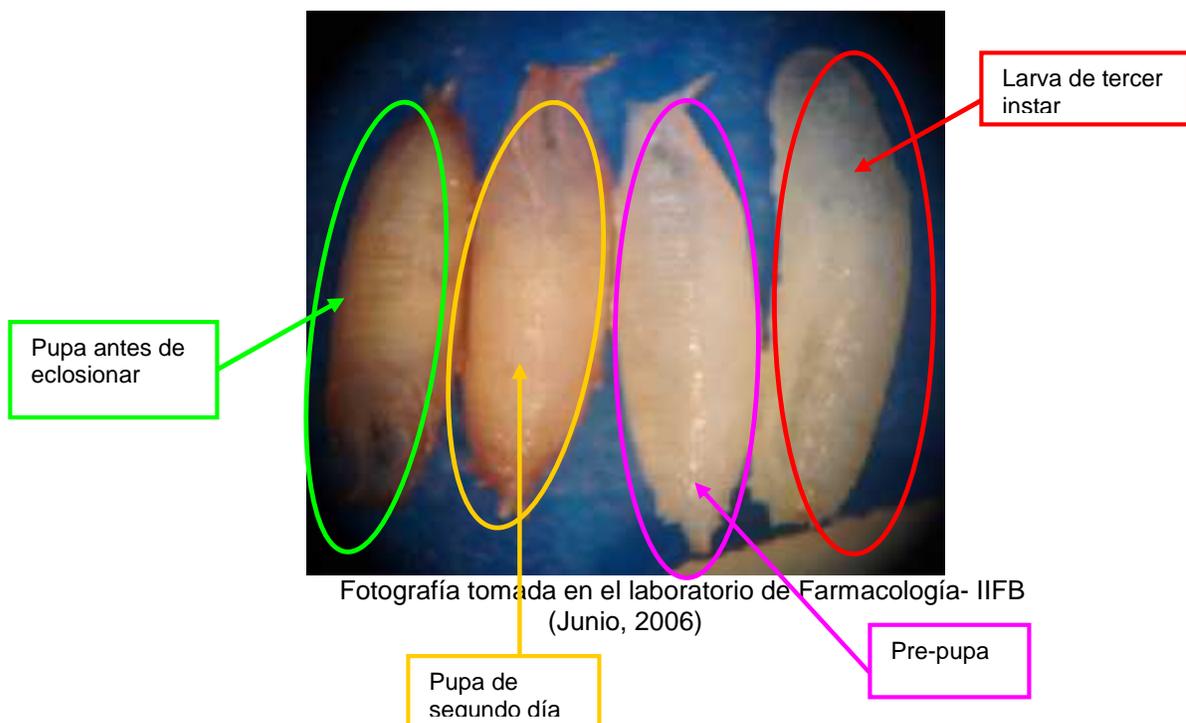
Pupa: último estadio de la mosca, la larva se aparta reptando del medio de comida a un lugar relativamente seco, adhiriéndose a la pared del medio con la ayuda de su jugo digestivo, inmediatamente después de la pupación todos los tejidos larvarios sufren una histólisis y son destruidos por fagocitos. Los discos imaginales crecen más o menos

simultáneamente y producen sectores del organismo adulto que se ensambla como un mosaico. Al finalizar este estadio la mosca eclosiona saliendo de la pupa.



(A) estadio de huevo, (B) larva de primer instar, (C) larva de segundo instar, (D) larva de tercer instar y (E) pupa.

Diferencias morfológicas entre los diferentes estadios que atraviesa *Drosophila melanogaster* en su ciclo de vida.



Fotografía tomada en el laboratorio de Farmacología- IIFB (Junio, 2006)

## **ANEXO 2.**

### **Preparación de la solución de Faure, descrita por Graf 1984**

- Goma arabiga 30 mg
- Glicerol 20 ml
- Hidrato de Cloral 50 mg.
- Agua 50 ml

Se pasa cada uno de los componentes por separado, primero se añade el glicerol a la goma arábica, se mezcla bien estos componentes, sin dejar de mezclar se agrega a esta mezcla en los 50 mL de agua, por ultimo se añade el hidrato de cloral, se continúa mezclando hasta llegar a un compuesto homogéneo.

### ANEXO 3.

#### Alas analizadas - Técnica descrita por Graf.

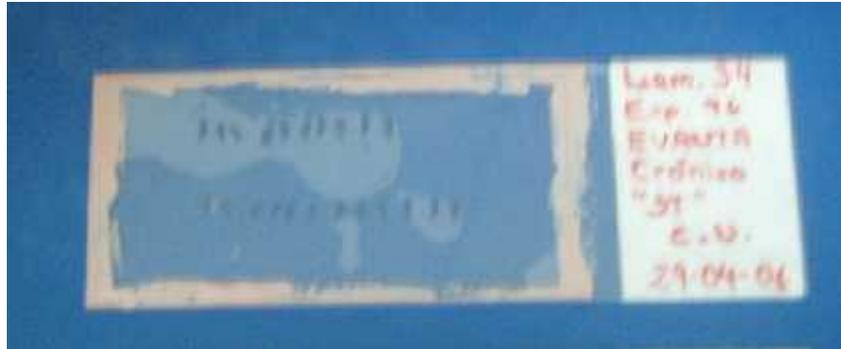
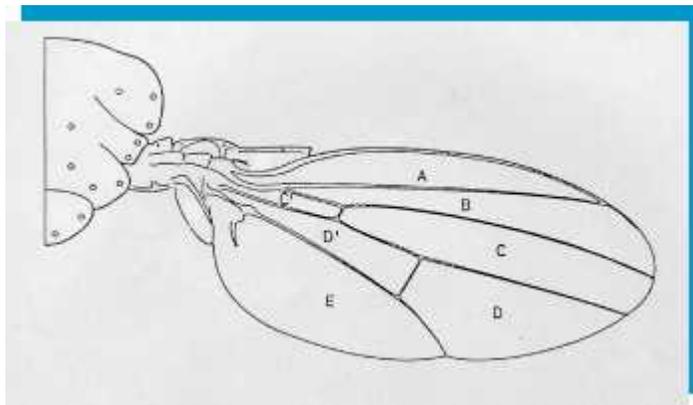


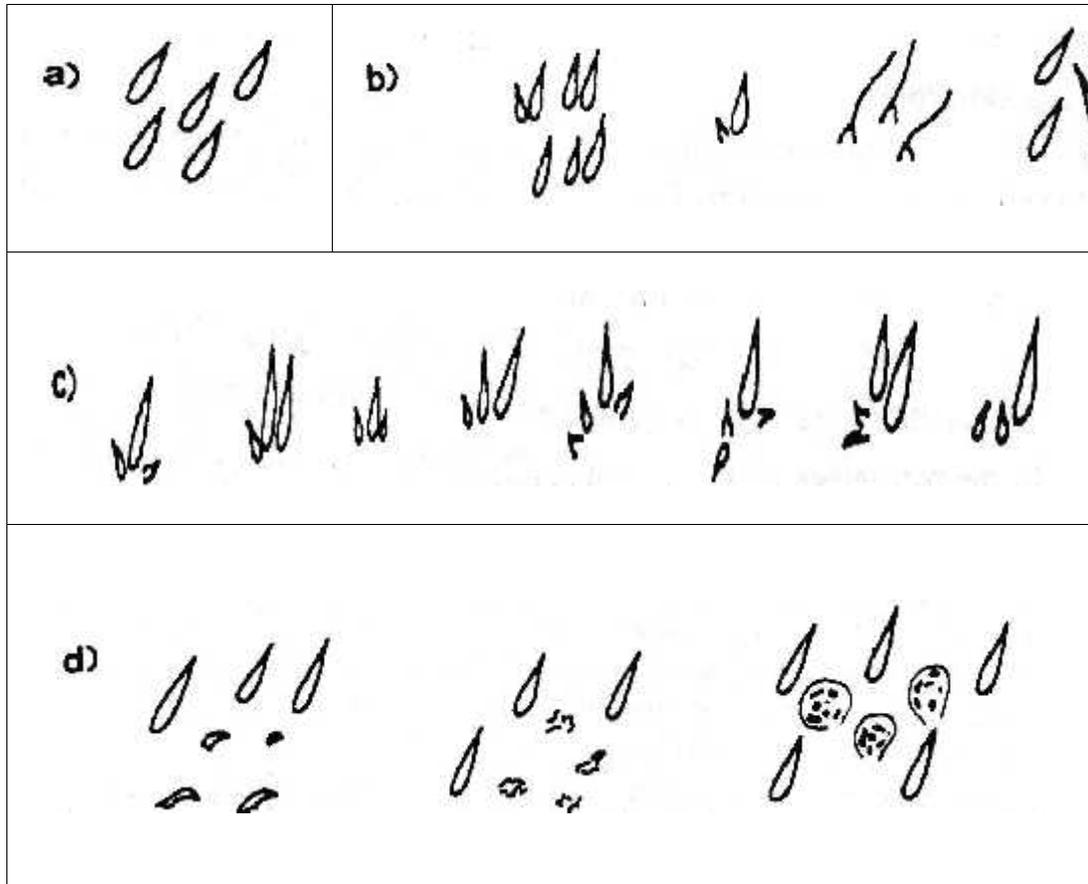
Lámina con alas provenientes del cruce Estándar. Fotografía tomada en el laboratorio de Farmacología- IIFB (Junio, 2006)

Una vez fijadas las alas con solución de Faure en los portaobjetos, se procede al análisis de las mismas, para ellos se toman en cuenta las secciones en las cuales está dividida el ala, como muestra la siguiente figura:



Secciones de lectura del ala de *Drosophila melanogaster*. (Extraído de Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*, Graf et al, 1984)

En orden iniciando por el sector A del ala se comienza con la observación de los marcadores genéticos, los cuales pueden expresarse en forma de pelo triple (*mwh*) o con la base ensanchada (*flr<sup>3</sup>*) como se observa en la siguiente figura:



a) normal, b) desviación de tricolams mwh y flr, c) variedad de tricomas mwh, d) variedad de tricomas Flr. (Extraído de Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*, Graf et al, 1984)

Si se observa la presencia de alguno de los marcadores genéticos se registra en las plantillas de lectura, tomando en cuenta el sector en el cual se encontró el marcador genético, a que tipo de mancha corresponde.

**ANEXO 4.**

**Plantilla de lectura, empleada en el análisis de alas**

<b>Compuesto</b>		<b>Exp. N.</b>
<b>Concentración</b>		<b>Lamina N.</b>
<b>Solvente</b>		<b>Nombre Exp.</b>
<b>Tratamiento</b>		<b>Fecha Exp.</b>
<b>N. Hembras</b>	<b>CRUZAMIENTO</b>	<b>Fecha Lect.</b>
<b>N. Machos</b>	<b>PROGENIE</b>	<b>Nombre</b>
<b>N. Alas</b>	<b>mwh-flr3</b>	
<b>1.</b>	A (1-0); C (5-1)	
<b>2.</b>		
<b>3.</b>		
<b>4.</b>		
<b>5.</b>		
<b>6.</b>		
<b>7.</b>		
<b>8.</b>		
<b>9.</b>		
<b>10.</b>		
<b>11.</b>		
<b>12.</b>		
<b>13.</b>		
<b>14.</b>		
<b>15.</b>		
<b>16.</b>		
<b>17.</b>		
<b>18.</b>		
<b>19.</b>		
<b>20.</b>		

# GLOSARIO

- **Cáncer** El cáncer es responsable de más de trescientas mil muertes anuales en los Estados Unidos y, durante su vida, más de cincuenta millones de personas serán tratadas por esta enfermedad. Dado que la enfermedad es generalmente agresiva, es a menudo mortal. Afecta a personas de cualquier edad y su costo tanto, en términos económicos como humanos, es enorme. No es sorprendente entonces que se haya dedicado un gran esfuerzo al estudio del cáncer. Desafortunadamente, existen muchos problemas asociados a la enfermedad que complican su estudio. Por ejemplo, existen muchos tipos de cáncer y diferencias en su incidencia que están determinadas por el sexo, la edad, la raza, la situación geográfica y otros factores. Adicionalmente, los tumores pueden presentarse casi en cualquier parte del cuerpo y con diferentes manifestaciones clínicas. Por esta razón, es casi imposible hacer una definición unificada del cáncer. En esencia, el cáncer es el resultado de la pérdida del control del proceso de división celular como consecuencia de una alteración genética.
  
- **Carcinogenicidad**: capacidad de un material o agente de causar cáncer.
  
- **Carcinogénicos**: las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan producir cáncer o aumentar su frecuencia.
  
- **Delección** Existen muchos tipos de mutaciones que pueden ocasionar enfermedades genéticas. Una de ellas es la delección, que consiste en la pérdida de un fragmento del genoma, bien sea por exposición a mutágenos químicos o radioactivos o simplemente por un error durante la división celular. Como resultado, un cromosoma pierde un fragmento de ADN. A menudo, si la delección incluye un gen o algún fragmento del ADN requerido para el funcionamiento normal de la célula va a carecer

de la función de ese gen y se presenta una situación anormal. Básicamente así es como una delección produce una enfermedad.

- **Efecto tóxico crónico**: manifestación que acontece como consecuencia de una exposición prolongada a un tóxico.
  
- **Hereditario** Heredado es una palabra que describe los rasgos o las características que se transmiten a través de los genes de los padres a los hijos. Sin embargo, no todas las características que son determinadas por los genes son heredadas de los padres. Por ejemplo, las formas más comunes de cáncer son causadas por alteraciones en uno o varios genes pero en la gran mayoría de los casos el cáncer no es heredado; lo que se hereda es la predisposición a padecerlo. Por otra parte, algunos rasgos presentes en una familia pueden ser debido al impacto del medio ambiente donde la familia se desenvuelve, por ejemplo, la obesidad puede ser el resultado de los hábitos alimenticios en una familia y no necesariamente debido a un gen que se está segregando dentro de la misma familia.
  
- **Monosomía** Normalmente una célula tiene dos copias de cada cromosoma. Se habla de monosomía cuando la célula tiene una sola copia de un determinado cromosoma. Ésta pérdida de un cromosoma puede llevar a la alteración de la expresión de sus genes.
  
- **Mutación** El término mutación se refiere a un cambio o alteración en el ADN. Cuando la gente oye la palabra mutación, generalmente piensa en un evento negativo, algo que es nocivo. Sin embargo, hay algunos cambios o alteraciones en el ADN que pueden ser beneficiosos. Las mutaciones pueden no tener ningún impacto sobre la función de un órgano o sistema o pueden en cambio causar problemas.

- **Mutación puntual o génica:** Mutación en la cual se sustituyen un par de bases del DNA.
- **Mutación somática:** Cambio súbito en el material cromosómico de los núcleos de las células somáticas que afecta a las células que de ellas deriven, pero no a la descendencia.
- **Mutagénica/o:** relativa/o a la capacidad de un material o agente de alterar material genético de una célula de manera tal que la alteración resultante se manifieste en las células ulteriormente generadas.
- **Recombinación:** Proceso que lleva a la obtención de un nuevo genotipo a través del intercambio del material genético entre secuencias homólogas de DNA de dos orígenes diferentes.
- **Teratogénica/o:** relativa/o a la capacidad de un material o agente de provocar malformaciones durante la gestación de un ser vivo.
- **Toxicidad:** capacidad de un material o agente de causar efectos adversos en un ser vivo.
- **Tóxicos:** las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea en pequeñas cantidades puedan provocar efectos agudos o crónicos e incluso la muerte.

