

Actividad Genotóxica de *Opuntia soehrensii*, evaluada por el Test de Mutación y Recombinación Somática en *D. melanogaster*

RODRIGO Gloria¹

1 Unidad de Vigilancia
Ambiental y
Genotoxicología. Instituto de
Biología Molecular y
Biotecnología. Universidad
Mayor de San Andrés.
E-mail:gloryrodrigo@yahoo.es

Instituto de Biología Molecular
y Biotecnología. Campus
Universitario Cota Cota Calle
27 s/n. Universidad Mayor de
San Andrés.
La Paz – Bolivia

Palabras Clave:

Genotoxicidad, Antiviral, Planta medicinal,
Test de Mutación y Recombinación
Somática (SMART)

Key words:

Genotoxicity, Antiviral, medicinal Plants,
Somatic Recombination and Mutation Test
(SMART)

RESUMEN

El extracto acuoso de *Opuntia soehrensii*, planta medicinal utilizada como antiviral en la farmacopea boliviana fue evaluado en su capacidad genotóxica por el test SMART en alas de *D. melanogaster*. Por tratarse de un extracto entero se evaluó por dos cruces diferentes; el cruce Estándar y el cruce de Alta Bioactivación. Los resultados muestran que *Opuntia soehrensii* no es genotóxica en concentraciones de 3.57 mg/ml y 7.4 mg/ml para ninguno de los dos cruces, pero es promutagénica a 1.78 mg/ml.

ABSTRACT

Acuos extract from *Opuntia soehrensii*, it is utilized as antiviral activity in Bolivian traditional medicine, was assessed for genotoxic activity through SMART test on *D. melanogaster* using two crosses: standard and high activation. The results shown *Opuntia soehrensii* is not genotoxic from 3.57 mg/ml to 7.4 mg/ml for both crosses, but is promutagenic at 1.78 mg/ml.

INTRODUCCIÓN

Bolivia pluricultural esta caracterizada por sus variados arraigos culturales, dentro de los cuales se enmarca el conocimiento de la medicina tradicional o convencional definida como "aquella que es transmitida empíricamente de forma oral de generación en generación"¹. Este conocimiento se han visto favorecido por la variedad de géneros vegetales endémicos e introducidos, de las diferentes regiones ecológicas de nuestro país y que son utilizados para combatir enfermedades infecciosas, parasitarias, problemas crónico-degenerativos; y por los esfuerzos que se realizan para rescatar este conocimiento, prueba de ello es el reconocimiento de los Médicos kallawayas por la Organización de Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), como patrimonio Oral e Intangible de la Humanidad en noviembre del 2003.

El genero *Opuntia*, subfamilia *Opuntioideae*, familia *Cactaceae* se caracteriza por ser una fuente natural de vitaminas (Vit C)^{2,3}, minerales (K, Ca, Na, Fe, Mg, Mn, Zn), ácidos orgánicos

(málico, oxálico y otros), aminoácidos (Alanina, Arginina, Asparagina, Acido glutámico, glutamina, histidina, metionina, prolina, serina, valina y otros en menores cantidades)^{3,4}, antioxidantes como los flavonoides^{4,5,6}, polifenoles³, ácido ascórbico y carotenoides⁷, tiamina, riboflavina y niacina³, además de ser rico en azúcares.

Muchos de los compuestos presentes en frutos y plantas han mostrado ser protectores frente a enfermedades cardiovasculares^{8,9,10}, el cáncer¹¹, y otras, donde los polifenoles han mostrado ser compuestos con gran actividad biológica y farmacológica¹²⁻¹⁹.

Opuntia spp. se utiliza como alimento y en la cosmética. Como fármaco tradicional se usa para la gastritis, fatiga, daño al hígado, reumatismo, eritemas, infecciones de piel, como detoxificante, acidosis y arterioesclerosis, antiulceroso, diurético, antiviral^{4,20}, hipoglicemiante, antiinflamatorio^{21,22}.

Opuntia soehrensii es una planta que se utiliza tradicionalmente para procesos febriles-eruptivos, ulcero-pustulosos bucales y de la garganta, así como en el tratamiento de diarreas²³, en estudios del SELADIS se encontró actividad antiviral de un 55.5% contra Herpes simplex^{24,25}. No se encuentran datos sobre otros estudios de la actividad biológica de esta planta.

El test de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*, se fundamenta en que en el desarrollo embrionario, las células de los discos imaginales que se dividen por mitosis y se diferencian en alas adultas, si son expuestas a genotoxinas capaces de reaccionar con el material genético producen alteraciones genéticas por pérdida de heterocigocidad, en los marcadores para la forma de los pelos que son pelos múltiples (*mwh*, 3-0.3) y pelos de base ancha (*flr*³, 3-38.8) y que son genes recesivos²⁶. En este ensayo se puede establecer el mecanismo ocurrido en la alteración genética, mutaciones genicas y cromosómicas, no disyunciones y sobre todo recombinación somática. Es importante establecer este último evento ya que recientes estudios señalan que la mayoría de los procesos de cáncer, activación de protooncogenes o supresión de genes tumorales se originan por procesos de recombinación somática²⁷⁻³¹, por otro lado existe una homología genética de alrededor del 80% en genes y rutas bioquímicas entre *D. melanogaster* y los humanos^{32,33}. Adicionalmente, un gran número de genes de la mosca de la fruta probó ser homólogo de genes supresores de tumores y oncogenes humanos³⁴. En función de estas similitudes, *Drosophila* es considerada como un

excelente modelo para estudiar la genotoxicidad y sus mecanismos moleculares, pudiendo ofrecer respuestas relevantes, que pueden ser extrapoladas para humanos con un alto índice de acierto³⁵.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracto Vegetal

El extracto acuoso de *Opuntia soehrensii* fue facilitado por el Dr. Roger Carvajal del Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS). Este extracto se preparó al 4% a partir de semillas, en agua desionizada precalentada a 50°C y posterior incubación por 48 h a temperatura ambiente. Las sustancias insolubles se descartaron por filtración con papel Wattman No. 1; el extracto fue alícuotado y congelado a -20°C para posterior concentración por liofilización²⁴. Para nuestra evaluación el extracto fue diluido en agua destilada y esterilizado por filtración a través de una membrana con poro de 0.22µm de diámetro.

Test de Mutación y Recombinación Somática en alas de *Drosophila melanogaster*

El extracto de *Opuntia soehrensii* fue evaluado en tres concentraciones 7.4 mg/ml, 3.57 mg/ml y 1.78 mg/ml., como control negativo se utilizó el diluyente. En el cruce Estándar que mide genotoxinas de acción directa se utilizaron hembras vírgenes *flr*³/*ln* (*3LR*)*TM3*, *r* *p*^o *sep* *l*(*3*)*89Aabx*^{34e} & *Bd*^S cruzadas con machos *mwh/mwh*, y para el cruce de Alta Bioactivación que detecta genotoxinas de acción indirecta, se cruzaron hembras vírgenes de tipo *ORR; flr*³/*ln* (*3LR*)*TM3*, *r* *p*^o *sep* *l*(*3*)*89Aabx*^{34e} e *Bd*^S con machos *mwh/mwh*. Se obtuvieron larvas de tercer instar que fueron expuestas a los diferentes tratamientos por 48 horas, en todos los casos se realizó el ensayo por triplicado. Las alas de al menos 20 individuos adultos trans-heterocigotos y heterocigotos (descendientes de estos cruces) se analizaron por microscopía con un aumento de 40X, considerando las regiones de alas, tipos de mutaciones (manchas simples cuando uno de los marcadores está presente y manchas gemelas cuando ambos marcadores son observados formando parte de la misma mancha) y tamaño de las manchas generadas (manchas pequeñas entre 1 y 2 pelos, manchas grandes cuando están presentes más de 3 pelos)²⁶. Esta clasificación de manchas nos permite establecer si el efecto de las genotoxinas ha provocado mutaciones génicas por mutación del gen marcador *mwh*, mutaciones cromosómicas provocadas por la delección del gen,

eventos de no disyunción cromosómica o eventos de recombinación somática.

Análisis estadístico

El análisis estadístico para comparar los tratamientos con el control negativo se realiza con el test chi -cuadrado de proporciones, utilizando el método de doble decisión de Selby y Olso (L = B = 0,05), con factores de multiplicación de 2 y de 5 para manchas simples y dobles, respectivamente. De esta manera determinamos si las muestras son positivas, negativas o inconclusivas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Tablas No. 1 y No. 2 muestran el número de manchas contadas en el marcador transheterocigoto (mwh/flr3) y heterocigoto (mwh/TM³) del cruce estándar y de alta bioactivación respectivamente. La frecuencia de manchas totales por mosca en el control negativo fue de 0.30 y 0.35 en los marcadores trans y hetero del cruce estándar (ST), mientras que en el cruce de alta bioactivación (HB) la frecuencia de manchas totales en la descendencia trans fue de 0.50 y de 0.25 en la descendencia hetero.

La distribución por tipo de mancha, manchas simples pequeñas (MSP), manchas simples grandes (MSG) y manchas gemelas (MG) en el control y los tratamientos se observa en las Tablas No. 1 y No. 2. En ambos cruces no se observó MG. El número de MSP y MSG en todas las concentraciones de la descendencia trans

del cruce ST son similares a los del control negativo, no existiendo diferencia significativa entre estos, mientras que en la descendencia hetero el número de MSP es menor al control negativo, mostrando que todos los tratamientos son no genotóxicos para este marcador (Tabla No. 1).

En la Tabla No. 2 la frecuencia de MSP y MSG de la concentración 1.78 mg/ml es mayor a la frecuencia del control negativo, mostrando una diferencia significativa con este, constituyéndose en genotóxico. La frecuencia de MSP en la descendencia hetero de este cruce no muestra diferencia significativa con el control negativo.

Considerando que el extracto acuoso de *Opuntia soehrensii* es una mezcla compleja formada por diferentes compuestos, entre ellos los fenólicos, el extracto no es genotóxico para genotoxinas de acción directa.

Sin embargo la concentración 1.78 mg/ml muestra ser genotóxica para genotoxinas de acción indirecta, pudiendo deberse esta genotoxicidad a mutación somática quizás a nivel de quiebras cromosómicas, mutación puntual del gen mwh o no disyunción en la división celular. Estudios con flavonoides como el kaempferol que no es genotóxico en ausencia de sistema metabolizante, muestran que en presencia de sistemas como el S9, hacen de este genotóxico³⁶, el cruce de alta bioactivación presenta este sistema metabolizante, por lo que podríamos suponer que

TABLA No. 1
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CRUCE ESTANDAR: *OPUNTIA SOEHRENSII*

Genotipos y conc. (mg/ml)	N. de Moscas (N)	Manchas por mosca (No. De manchas) diag. estadístico ^a										Total manchas mwhc (n)		
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2		MSG (>2 céls) ^b m = 5		MG m = 5		TM m = 2						
mwh/flr3														
Contr. Neg.	20	0,25	(05)		0,05	(01)		0,00	(00)		0,30	(06)		6
1,78	20	0,25	(05)	i	0,05	(01)	i	0,00	(00)	i	0,30	(06)	i	6
3,57	20	0,20	(04)	i	0,05	(01)	i	0,00	(00)	i	0,25	(05)	i	5
7,4	20	0,40	(08)	i	0,10	(02)	i	0,00	(00)	i	0,50	(10)	i	10
mwh/TM3														
Contr. Neg.	20	0,30	(06)		0,05	(01)		d			0,35	(07)		7
1,78	20	0,15	(03)	-	0,00	(00)	i				0,15	(03)	-	3
3,57	20	0,10	(03)	-	0,00	(00)	i				0,15	(03)	-	3
7,4	20	0,20	(04)	i	0,00	(00)	i				0,20	(04)	-	4

^a 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 a = , b = 0,05. ^b Incluso las manchas simples flr3 raras.

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

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

TABLA No. 2
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CRUCE ALTA BIOACTIVACIÓN: *OPUNTIA SOEHRENSII*

Genotipos y conc. (mg/ml)	N. de Moscas (N)	Manchas por mosca (No. De manchas) diag. estadístico ^a										Total manchas mwhc (n)		
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2		MSG (>2 céls) ^b m = 5		MG m = 5		TM m = 2						
mwh/flr3														
Contr. Neg.	20	0,45	(09)		0,05	(01)		0,00	(00)		0,50	(10)	10	
1,78	20	0,70	(14)	i	0,40	(08)	+	0,00	(00)	i	1,10	(22)	+	21
3,57	20	0,15	(03)	-	0,15	(03)	i	0,00	(00)	i	0,30	(06)	-	5
7,4	20	0,15	(03)	-	0,05	(01)	i	0,00	(00)	i	0,20	(04)	-	4
mwh/TM3														
Contr. Neg.	20	0,25	(05)		0,00	(00)		d			0,25	(05)		5
1,78	20	0,20	(04)	i	0,05	(01)	i				0,25	(05)	i	5
3,57	20	0,15	(03)	i	0,00	(00)	i				0,15	(03)	i	3
7,4	20	0,20	(04)	i	0,00	(00)	i				0,20	(04)	i	4

a 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 a = b = 0,05.

b Incluso las manchas simples flr3 raras.

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

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

los compuestos fenólicos presentes en nuestro extracto se activan por el sistema de las monooxigenasas del citocromo P450 para ser genotóxicos y reaccionar con el DNA.

La formación de MG es típica de compuestos químicos que actúan provocando recombinación mitótica³⁷, en nuestro estudio no se observó este tipo de manchas por lo que podemos concluir que los compuestos presentes en el extracto acuoso de *Opuntia soehrensii* no inducen recombinación mitótica en forma directa sobre el DNA o de manera indirecta.

CONCLUSIONES

Nuestros datos muestran que bajo las condiciones experimentales del ensayo, este extracto no es genotóxico para mutágenos de acción directa e indirecta en concentraciones entre 3.57 mg/ml y 7.4 mg/ml. La concentración 1.74 mg/ml es genotóxica para compuestos de acción indirecta, quizás por el sinergismo que encuentran los compuestos que componen el extracto a esta concentración.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue auspiciado por la OEA a través del proyecto "Evaluación del Potencial Genotóxico/antigenotóxico de Plantas Medicinales de Uso Tradicional Boliviano".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gutierrez H. (1992) La situación de la medicina Tradicional y natural de Bolivia. Tesis de licenciatura. Carrera de Derecho. UMSA. Bolivia
- Sawaya W. N., Khatchadourin H., Safi W., Al-Muhammed H. M. (1983) Chemical characterization of prickly pear pulp, *Opuntia ficus-indica* and manufacturing of prickly pear jam. *Journal of Food Technology* 18: 183-193.
- Stintzing F.C., Schieber A., Carle R. (2001) Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *Eur Food Res Technol* 212: 396-407
- Stintzing F.C., Carle R. (2005) Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 175 - 194
- Stintzing F. C., Herbach K. M., Mosshammer M. R., Carle R., Yi W., Sellappan S., Akoh C. C., Bunch R., Felker P. (2005) Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Clones. *J. Agric. Food Chem.* 53: 442-451
- Siriwardhana N., Jeon Y-J. (2004) Antioxidative effect of cactus pear fruit (*Opuntia ficus-indica*) extract on lipid peroxidation inhibition in oils and emulsion model systems. *Eur Food Res Technol* 219: 369-376

7. Kuti J. (2004) Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chemistry* 85: 527-533
8. Huang Z., Wang B., Eaves D. H., Shikany J. M., Pace R. D. (2007) Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast United States. *Food Chemistry* 103: 1395-1402
9. Bazzano L. A., He J., Ogden L. G., Loria C. M., Vupputuri S., Myers, L. (2002). Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiological Follow-up Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 93-99.
10. Bazzano L.A. (2002) Higher dietary fiber intake may not directly lower cardiovascular disease risk in women. *Evidence-based Cardiovascular Medicine*. Vol 6: 87-88
11. Block, G., Patterson, B., y Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 18: 1-29.
12. Ninfali P, Bacchiocca M, Antonelli A, Biagiotti E, Di Gioacchino A.M, Piccoli G, Stocchi V, Brandi G. (2007) Characterization and biological activity of the main flavonoids from Swiss Chard (*Beta vulgaris* subspecies *cykla*) *Phytomedicine* 14: 216-221
13. Rigano D., Formisano C., Basile A., Lavitola A., Senatore F., Rosselli S., Bruno M. (2007) Antibacterial Activity of Flavonoids and Phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum*. *Phyther. Res.* 21: 395-397
14. Tripoli E., La Guardia M., Giammanco S., Di Majo D., Giammanco M. (2007) Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry* 104: 466-479
15. Ibrahim L. F., Kawashty S. A., Baiuomy AR., Shabana M. M., El-Eraky W. I., El-Negoumy S. I. (2007) A comparative study of the flavonoids and some biological activities of two *Chenopodium* species. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 43: No. 1,
16. Lameira J., Alves C. N., Moliner V., Silla E. (2006) A density functional study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 41: 616-623
17. Palombo E.A. (2006) Phytochemicals from Traditional Medicinal Plants used in the Treatment of Diarrhoea: Modes of Action and Effects on Intestinal Function. *Phyther. Res.* 20: 717-724
18. Jassbi A.R. (2006) Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry* 67: 1977-1984
19. Hodgson J. M., Croft K. D. (2006) Dietary flavonoids: effects on endothelial function and blood pressure. *J Sci Food Agric* 86: 2492-2498
20. Ahmad A., Davies J., Randall S., Skinner G.R.B. (1996) Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral research* 30: 75-85
21. Ahmed M. S., El Tanbouly N. D., Islam W. T., Sleem A. A., El Senousy A. S. (2005) Antiinflammatory Flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. Flowers growing in Egypt. *Phyther. Res.* 19: 807-809
22. Park E-H., Kahng J-H., Hyun S., Shin K-H. (2001) An anti-inflammatory principle from cactus. *Fitoterapia* 72: 288-290
23. Girault L (1987) KALLAWAYA: Curanderos itinerantes de los Andes. UNICEF-OPS-OMS. Impresores Quipus. La Paz
24. Mamani G., Zambrana S., Carvajal R., Terrazas K. (2004) Actividad Antiviral anti-Herpes simplex de *Opuntia* spp., un producto natural Andino. *BIOFARBO* XII: 21-26
25. Zambrana S., Terceros P., Terrazas K., Carvajal R. (2006) Estudios sobre la acción antiviral de *Opuntia soehrensii*. Actividad protectora de la infección por HSV? *BIOFARBO* XIV: 51-56
26. Graf U., Würgler F.E., Katz A.J., Frei H., Juon H., Hall C.B. Kale P.G. (1984) Somatic mutation and recombination test of

- Drosophila melanogaster*. Environ. Mol. Mutagen. 6: 153-188.
27. Young B.D., Debernardi S., Lillington D.M., Skoulakis S., Chaplin T., Foot N.J., Raghavan M. (2006) A role for mitotic recombination in leukemogenesis. Adv. Enzyme Regul. 46: 90-97.
28. Imreh S., Klein G., Zabarovskv E.R. (2003). Search for unknown tumor antagonizing genes. Gene. Chromosome. Canc. 38, 307-321.
29. Tischfield J.A. (1997). Loss of heterozygosity or: how I learned to stop worrying and love mitotic recombination. Am. J. Hum. Genet. 61, 995-999.
30. Moynahan M.E., Jasin M. (1997) Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break. Proc. Natl. acad. Sci. USA 94: 8988-8993.
31. Lasko D., Cavenee W., Nordenskjöld M. (1991) Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. Annu. Rev. Genet. 25, 281-314.
32. Artavanis-Tsakonas S., Matsumoto K., Fortini M.E. (1995) Genotoxic activity of different chromium compounds in larval cells of *Drosophila melanogaster*, as measured in the wing spot test. Environ. Mol. Mutagen. 34: 47-51.
33. St. John M. A. R., Xu T. (1997) Insights from model systems-Understanding human cancer in a fly? Am. J. Hum. Genet. 61: 1006-1010.
34. Miklos G.L.G., Rubin G.M. (1996) The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms. Cell 86: 521-529.
35. Rodríguez H., Lehmann M. (2003) Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. En Mutagenese Ambiental. L. Ribeiro, D Favero y E. Kanan. Editora da ULBRA 2003 pp 281-307
36. Silva I. D., Rodriguez A. S., Gaspar J., Maia R., Laires A., Rueff J. (1997) Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. Mutagenesis 12: 383-390
37. Chroust K., Pavlová M., Prokop Z., Mendel J., Bozková K., Kubát Z., Zajickova V., Damborsk_ J. (2007) Quantitative structure-activity relationships for toxicity and genotoxicity of halogenated aliphatic compounds: Wing spot test of *Drosophila melanogaster*. Chemosphere 67:152-159

IMPORT - EXPORT

San Martín de Porres

EQUIPAMIENTO DE LABORATORIO • MEDICO HOSPITALARIO
31 AÑOS AL SERVICIO DE LA SALUD

**EQUIPOS, INSUMOS Y REACTIVOS DE LABORATORIO
EQUIPOS E INSUMOS MEDICO-HOSPITALARIO**





NUESTRAS DIRECCIONES:

LA PAZ: Av. 6 de Agosto 2549
Edif. El Carmen 1 Mezzanine
Tel. 2430842 - 2430873 - 2126085
E-mail: smartin2@accelerate.com

SANTA CRUZ: Calle Cuéllar 222
Tel. 3350047 - Fax: 3339247

COCHABAMBA: Tel. 4227793

SUCRE: Tel. 6455221

