

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



“Tesis para optar al título de Licenciada en Bioquímica”

**EVALUACIÓN GENOTOXICA DEL ACEITE ESENCIAL Y EL EXTRACTO
ETANOLICO DE *Piper elongatum* Vahl**

Postulante:

ANA PAULA JIMÉNEZ DASILBA

**LA PAZ – BOLIVIA
2009**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



“Tesis para optar al título de Licenciada en Bioquímica”

**EVALUACIÓN GENOTOXICA DEL ACEITE ESENCIAL Y EL EXTRACTO
ETANOLICO DE *Piper elongatum* Vahl**

Postulante:

ANA PAULA JIMÉNEZ DASILBA

Asesores:

**EDUARDO GONZÁLES DÁVALOS *Ph. D.*
ARACELI PILLCO TITO *M.Sc*
ESTHER NINOSKA FLORES QUISBERT *Ph.D.***

**LA PAZ – BOLIVIA
2009**

Dedicatoria

A Dios por darme la fortaleza necesaria para afrontar la vida y juzgar entre el bien y el mal.

A mi Mama Lucia Quien cultivo en mi, la perseverancia, el respeto y cariño.

A mi hermano José Gabriel, por ser mi apoyo incondicional.

A Patricia, Fabiola, María Cristina y Daysi por brindarme una amistad sincera, apoyándome en los momentos más difíciles.

A mi gran y querida Asesora la Doctora Araceli Pillco, quien a lo largo de este trabajo me guio, aconsejo y sobre todo me brindo su valiosa amistad.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ *A Dios por darme la vida, salud, fe, esperanza y la fortaleza suficiente para poder culminar la primera esta primera etapa de estudios.*
- ❖ *A la Dra. Paulina Bernejo, a la Universidad Complutense de Madrid, al AECID, por el apoyo a través de la acción de integrada” Plantas medicinales en Bolivia como recurso terapéutico”, PCI D/020523/08.*
- ❖ *Al Dr. Eduardo de la Peña de Torres (Laboratorio de Mutagénesis – Centro de Ciencias Medioambientales – Consejo Superior de Investigaciones científicas. España) y al Dr. Ricardo Marcos Dauder (Universidad Autónoma de Barcelona - Facultad de Ciencias Genética y Microbiología) por la colaboración en la obtención de las cepas de *Drosophila melanogaster*.*
- ❖ *De todo corazón al Dr. Eduardo González, por la colaboración y hacer posible la realización de este trabajo.*
- ❖ *De todo corazón a la Dra. Ninoska Flores, por la paciencia, empeño guía que me dio en el transcurso de mi trabajo.*
- ❖ *A la Dra. Araceli Pillco, por ser más que una asesora, mi amiga y guía, por la confianza que siempre tuvo en mí.*
- ❖ *A Juan Carlos Ticona por colabórame en la etapa inicial de mi trabajo.*
- ❖ *A todas aquellas personas que confían en mí, y me impulsan a seguir, a mis padres, hermano, amigas Patricia, Fabiola, Daysi, Maria del Pilar, Giovana, Daly y Brenda así como a mis compañeras de trabajo.*
- ❖ *Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, área de Toxicología – Genotoxicidad, donde se realizo este trabajo y a sus integrantes.*
- ❖ *A todos los docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas por toda la enseñanza y apoyo en mi desenvolvimiento académico.*

RESUMEN

El presente trabajo se desarrollo en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, formo parte de la acción de integrada "Plantas medicinales en Bolivia como recurso terapéutico", PCI D/020523/08.

Estudios previos sobre el extracto etanólico de *Piper elongatum* Vahl (matico) demostraron la actividad antiinflamatoria, actividad diurética y cicatrizante, además del efecto anti-*Helicobacter pylori*. Así también otros estudios sobre los metabolitos secundarios de *P. elongatum*, demostraron tener actividad antifungica y efecto antiparasitario⁷.

Se realizo la evaluación genotóxica del aceite esencial y el extracto etanolico de *Piper elongatum* Vahl mediante la prueba *in vivo* de mutación y recombinación somática (SMART), que emplea a *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) como organismo experimental para determinar la actividad recombinogénica y mutagénica que poseen extractos de plantas y fármacos. Se emplearon dos tipos de cruces con los marcadores genéticos *flr*³ y *mwh*: El cruce Estándar (ST) y el cruce de Alta Bioactivación (HB). El cruce de HB debido a que posee niveles elevados de la enzima citocromo P-450, presenta una mayor sensibilidad hacia los promutágenos y procarcinógenos.

Larvas de tercer instar procedentes de ambos cruces fueron tratadas a concentraciones sub-tóxicas de 25, 50 y 75mg/ml para el extracto etanolico, en el aceite esencial se utilizaron concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5% (p/v), como control positivo se empleo Mitomicina C (MMC).

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el estadístico de *Kastenbaum-Bowman* ($\alpha = 0,05$), sugieren que el extracto etanolico de *Piper elongatum* Vahl a concentraciones por debajo de 100mg/ml, asi como el aceite esencial en concentraciones por debajo de 0.5% (p/v), no producen daño genotoxico detectado mediante la prueba de SMART

Palabras claves: *Piper elongatum* Vahl, aceite esencial, genotoxicidad, prueba de SMART y MMC.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. OBJETIVOS	7
4.1. OBJETIVO GENERAL	7
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
5. HIPÓTESIS	7
6. ANTECEDENTES	8
6.1. GENÉTICA TOXICOLÓGICA	8
6.2. TEST DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA (SMART)	12
6.3. ESPECIES VEGETALES MEDICINALES	21
6.4. <i>Piper elongatum</i> Vahl (Matico)	25
6.4.1. <u>Nombre comunes</u>	25
6.4.2. <u>Sinónimo</u>	25
6.4.3. <u>Clasificación taxonómica</u>	25
6.4.4. <u>Distribución</u>	25
6.4.5. <u>Descripción botánica</u>	26
6.4.6. <u>Composición química</u>	28
6.4.7. <u>Usos tradicionales</u>	30
7. METODOLOGÍA	31
7.1. RECOLECCIÓN DE PLANTA VEGETAL	32
7.1.1. <u>Preparación del extracto</u>	32
7.1.2. <u>Obtención del aceite esencial</u>	34
7.2. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD de <i>Piper elongatum</i> Vahl MEDIANTE LA PRUEBA DE SMART	35
7.2.1. <u>Extracto etanolico</u>	35
7.2.2. <u>Aceite esencial</u>	35
7.2.3. <u>Cruce estándar</u>	36
7.2.4. <u>Cruce alta bioactivación</u>	36
7.2.5. <u>Tratamiento de individuos</u>	36
7.2.6. <u>Análisis de alas</u>	36
7.2.7. <u>Clasificación de manchas</u>	38
7.3. <u>Análisis de estadístico</u>	41
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
8.1. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE <i>Piper elongatum</i> Vahl MEDIANTE LA PRUEBA DE SMART	44
8.1.1. <u>Extracto etanolico</u>	44
8.1.2. <u>Aceite esencial</u>	46
8.2. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>P. elongatum</i>	49
8.2.1. <u>Cruce Estándar</u>	49

8.2.2	Cruce Alta Bioactivación	52
8.3.	EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>P. elongatum</i>	55
8.3.1	Cruce Estándar	55
8.3.2	Cruce Alta Bioactivación	58
9.	CONCLUSIONES	64
10.	RECOMENDACIONES	65
11.	BIBLIOGRAFÍA	66
12.	ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Criterios de valoración que permiten determinar su Potencial Genotóxico.....	11
Tabla 2. Aplicaciones generales de cada fitoconstituyente.....	29
Tabla 3. Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar sometidas a Diferentes concentraciones de extracto etanólico de <i>P. elongatum</i>	44
Tabla 4. Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar sometidas a diferentes concentraciones del Aceite esencial de <i>P. elongatum</i>	46
Tabla 5. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de <i>P. elongatum</i> mediante Cruce Estándar.....	50
Tabla 6. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico de <i>P. elongatum</i> mediante Cruce Alta Bioactivación.....	53
Tabla 7. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico del Aceite esencial de <i>P. elongatum</i> mediante Cruce Estándar.....	56
Tabla 8. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico del aceite esencial de <i>P. elongatum</i> mediante Cruce Alta Bioactivación.....	59

ÍNDICE DE GRAFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar sometidas a Diferentes concentraciones de extracto etanólico de <i>P. elongatum</i>	45
Gráfica 2. Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar sometidas a diferentes concentraciones del Aceite esencial de <i>P. elongatum</i>	47
Gráfica 3. Comparación de la frecuencia total de Manchas encontrada en el cruce Estándar y Alta Bioactivación, después del tratamiento con el extracto etanólico de <i>P. elongatum</i>	54
Gráfica 4. Comparación de la frecuencia total de Manchas en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación, después del tratamiento con aceite esencial <i>P. elongatum</i>	60

ÍNDICE DE FIGURAS

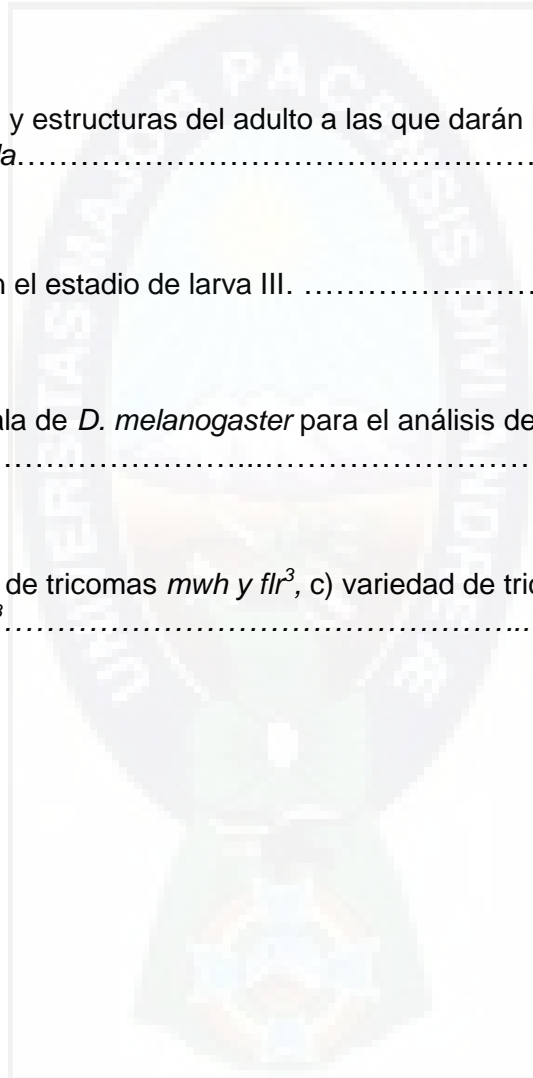
Pág.

Figura 1.

Modelo multiusos de carcinogénesis. Este modelo multi-paso sustituye un modelo anterior, llamado el modelo de iniciación-promoción. El modelo de iniciación propone que la promoción de la carcinogénesis es un evento de dos pasos, con el primer paso es una lesión en la genotóxico (llamado iniciación) y el segundo paso de ser un evento no genotóxico (llamado de promoción). Ahora está claro que este modelo de dos pasos era demasiado simple. En particular, es evidente que múltiples lesiones genotóxico, participan en muchas (no en todos) los tipos de cáncer, y que la promoción no pueden participar en todos los tipos de



cáncer.....	9
Figura 2. Fases de la <i>Drosophila melanogaster</i>	13
Figura 3. Ciclo vital de <i>Drosophila melanogaster</i> a 25°C.....	14
Figura 4. Morfología, localización y estructuras del adulto a las que darán lugar los discos imaginales de <i>Drosophila</i>	15
Figura 5. Disco imaginal de ala en el estadio de larva III.	16
Figura 6. Áreas de lectura en el ala de <i>D. melanogaster</i> para el análisis de Genotoxicidad por el Test SMART.....	17
Figura 7. a) Normal b) desviación de tricomas <i>mwh</i> y <i>flr³</i> , c) variedad de tricomas <i>mwh</i> d) variedad de tricomas <i>flr³</i>	17



ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

	Pág.
Fotografías 1-2.	
<i>Piper elongatum</i> Vahl.....	27
Fotografía 3.	
Larva de <i>Drosophila melanogaster</i> en su tercer estadio.....	37
Fotografía 4.	
Alas adultas de <i>Drosophila melanogaster</i>	37
Fotografía 5.	
Mancha Simple Pequeña <i>mwh</i>	39
Fotografía 6.	
Mancha simple grande <i>mwh</i>	39
Fotografía 7.	
Mancha Simple Pequeña <i>flr</i> ³	40
Fotografía 8.	
Manchas Gemelas – <i>mwh</i> y <i>flr</i> ³	40

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1.	
Técnica de SMART.....	31
Esquema 2.	
Obtención de extracto etanólico de <i>Piper elongatum</i> Vahl.....	33
Esquema 3.	
Obtención de aceite esencial de <i>P. elongatum</i>	34



1. INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales han sido utilizadas desde principio de los tiempos como fuente primaria para la elaboración de medicamentos. Las culturas asiáticas, hindúes y anglosajonas son líderes en el empleo de la medicina tradicional proporcionando datos importantes de la utilización de estos recursos¹.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta 1996 el 80% de la población mundial utilizaba las plantas medicinales en atención primaria. También es importante destacar que cerca de 7 mil fármacos provienen de conocimientos botánicos². Y que actualmente las investigaciones Farmacéuticas están enfocadas a buscar principios activos de diversas especies vegetales³.

Debido a las características ecológicas de Bolivia, se pueden apreciar una amplia variedad de especies vegetales (3.000 especies reconocidas hasta el 2006), que son empleadas como medicina tradicional por diversas culturas. En este sentido, la cultura Kallawayá ha contribuido al conocimiento del uso y manejo de plantas medicinales que se desarrollan en la región altiplánica⁴.

Los recursos genéticos representan oportunidades para impulsar el desarrollo económico, enmarcado dentro la sostenibilidad y equidad social. Estos recursos genéticos necesitan ser conservados junto al conocimiento tradicional por ello se están incentivando diversas investigaciones⁵.

El Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas (IIFB) está realizando continuas investigaciones para valorar la actividad biológica de varias especies vegetales. Por ejemplo, demostraron los efectos antiparasitarios y genotóxicos de *Galipea longiflora* (Evanta)⁵ y *Baccharis latifolia* (Chillka) respecto a la especie *Piper elongatum* Vahl demostraron actividades antiinflamatoria, antifúngicas contra *Neurospora crassa*, cicatrizantes, efecto anti-*Helicobacter pylori* y efecto antiparasitario frente a *Leishmania*^{6,7}.

Piper elongatum Vahl crece en la región de Sud Yungas de Bolivia, es conocida comúnmente como “matico”. La medicina tradicional la emplea como antiinflamatorio, hemostático, antiséptico⁸ y anti-infeccioso, descongestivo, contra la leucorrea y antiparasitario. Esta especie posee en sus hojas un grupo de compuestos químicos llamados los crómenos, que han evidenciado efectos tóxicos en células y bacterias. Otros metabolitos secundarios presentes son los derivados del ácido benzoico prenilados que poseen actividad anti-bacteriana, citotóxica y las dihidrochalconas poseen actividad contra los parásitos de *Leishmania*, además de una marcada relación de estructura-actividad contra el moho^{9,10, 11,12,13}.

Las características benéficas demostradas por *Piper elongatum* Vahl sugieren la necesidad de profundizar las investigaciones, por ello en este trabajo de investigación se emplea un ensayo biológico *in vivo* denominado “test de mutación y recombinación somática” (SMART), que utiliza a *Drosophila melanogaster* como organismo experimental, para evaluar los niveles de genotoxicidad de esta especie vegetal.

En los últimos años se han venido realizando estudios científicos sobre la especie *Piper* debido a su alta valoración por la medicina tradicional. Ensayos *in vitro* demostraron la actividad antibacteriana contra bacterias Gram (+)¹⁴, otros estudios validaron sus numerosas aplicaciones tradicionales como antiviral. Sin embargo, reportes de los estudios de genotoxicidad de especies del género *Piper* son muy escasos, a pesar de su amplio uso en la medicina tradicional Iberoamericana. En este sentido solo se ha encontrado el estudio genotóxico de *Piper auritum* H.B.K. sobre el ensayo de micronúcleos en medula ósea de ratones, cuyos resultados fueron negativos. Por otra parte estudios de toxicidad aguda no evidenciaron niveles de toxicidad¹⁵.

También se realizaron estudios sobre extractos etanólicos de tres especies de la familia *Piperáceas*: *Piper longum* L, *Piper ribesoides* y *Piper sarmentosum*, probándose la eficaz actividad larvicida sobre *Aedes aegypti* en el cuarto estadio

larvario. Se realizaron estudios sobre la actividad gastroprotectora, ulcerogénica y antiinflamatoria de *Piper elongatum* Vahl con muy buenos resultados⁷. Pero no así estudios de toxicidad o genotoxicidad.

Las plantas tienen la capacidad para producir una gran diversidad de metabolitos secundarios con diferente complejidad tanto química como biológica, por ello han servido como modelos para el desarrollo de numerosos fármacos de extraordinario interés. Logrando identificar sustancias químicas con propiedades terapéuticas, por ejemplo antimaláricas y leishmanicidas¹. Aplicándose también diversos ensayos genotoxicológicos, entre ellos tenemos una técnica capaz de determinar la toxicidad y genotoxicidad de una variedad infinita de agentes xenobióticos los cuales son ampliamente empleados en el tratamiento de diversas enfermedades es la prueba *in vivo* de mutación y recombinación somática (SMART: Somatic Mutation and Recombination Test.) que utiliza a *Drosophila melanogaster* conocida como “mosca de la fruta”. Esta técnica pone de manifiesto a través de la expresión genética de células mutantes producidas por exposición a compuestos o mezclas químicas evaluadas dando a conocer en este modelo un amplio espectro de mutaciones, así los resultados con esta técnica pueden ofrecer datos relevantes que podrían ser extrapolados a humanos con un alto índice de acierto, debido a que existe una elevada similitud entre rutas bioquímicas y funciones reguladoras, adicionalmente genes estudiados en *Drosophila* probaron ser homólogos a genes supresores de tumor y oncogenes de humanos^{16,17,18}.



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El resurgimiento del interés mundial por las plantas medicinales nos lleva a reflexionar sobre la necesidad de revalidar la medicina tradicional.

Actualmente existe un amplio conocimiento tradicional sobre las propiedades medicinales de las plantas, diversos estudios sobre las capacidades antiinflamatorias, cicatrizantes, antiparasitarias y antifúngicas, pero el problema radica en la escasa información respecto a los efectos que estas pueden generar sobre el material genético.

Estudios como los realizados por el Dr. Igor Iván Villalta(2009), Janet Piloto(2009) demuestran que plantas medicinales como *Piper auritum*, *Symphytum officinale* L., *Ruta graveolens* L., *Indigophera suffruticosa* Mill y *Tamarindus indica* L. que son ampliamente utilizadas para el tratamiento de parasitosis, pérdida de peso, fragilidad capilar, antiinflamatorio y en la Medicina Ayurvedica, respectivamente. Así mismo *Ruta graveolens* L. revelo mutagenicidad en el sistema Salmonella /microsome y en el ensayo *in vivo* de micronúcleos en médula ósea de ratón, estas especies vegetales mostraron ser genotóxicos en el sistema de ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón y en el estudio *in vitro* empleando la cepa D-30 de *Aspergillus nidulans* para *Piper auritum*. Y en el modelo de ensayo de toxicidad aguda presentaron diferentes niveles de toxicidad.

También está demostrado que especies como *Cortón lechler* y la *Musa paradisíaca* pueden además su capacidad antiinflamatoria y cicatrizante tener capacidades antígenotóxicas.

Por otro lado se debe resaltar que la mayoría de los estudios de toxicidad de plantas medicinales están enfocados a su composición química, pero no se debe olvidar que el efecto que puede producir una sustancia o compuestos único difiere de la respuesta de una mezcla, debido a que actúan diferentes procesos de

sinergismo y antagonismo además de los mecanismos de activación metabólica que ocurren a nivel celular.

Por ello este trabajo pretende mediante un estudio genotóxico responder la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto genotóxico del aceite esencial y del extracto total etanólico de *Piper elongatum* Vahl?



3. JUSTIFICACIÓN

En Bolivia los fármacos para tratamiento de diversas enfermedades son muy caros y debido a la pobreza actual del país en general, la población opta por un tratamiento alternativo, con plantas medicinales, tal es el caso de *Piper elongatum* Vahl (matico) el cual tiene diversas propiedades curativas como antiinflamatoria, cicatrizante, antiparasitaria, antifúngica y antibacteriana entre otras. Estudios recientes sobre esta planta han demostrado que los aceites esenciales tienen una gran actividad antiparasitaria y más efectiva ya que son capaces de inhibir el crecimiento de los parásitos tales como la leishmania y trichomonas a muy bajas concentraciones, pero también se debe analizar de manera más eficaz los efectos tóxicos que estos aceites esenciales y el extracto etanólico del “matico” tengan sobre las personas al consumirlos durante el tiempo de tratamiento.

Se han realizado diferentes estudios de las propiedades medicinales de *Piper elongatum* Vahl (**matico**), pero aun no se realizaron estudios de toxicidad y genotoxicidad de esta especie vegetal. Por ello el presente trabajo de investigación emplea un ensayo de genotoxicidad como el Test de SMART (prueba de mutación y recombinación somática) que tiene como organismo centinela a *D. melanogaster*. La ventaja de utilizar a *D. melanogaster* se debe a que esta mosca posee un ciclo de vida corto, amplio tamaño de prole, tiene un genoma ampliamente conocido y su mantenimiento en el laboratorio es económico.

Teniendo en cuenta la situación actual de los estudios genotóxicos de las plantas medicinales, específicamente de *Piper elongatum* Vahl (matico) y conociendo las características antiinflamatoria, antifúngica, cicatrizante y antiparasitaria de este género además de estar catalogada como una especie ampliamente utilizada por la población boliviana, es necesario que se realicen estudios de toxicidad y genotoxicidad.

4. **OBJETIVOS**

4.1. **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la genotoxicidad del aceite esencial y extracto etanólico de las hojas de *Piper elongatum* Vahl.

4.2. **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar las concentraciones subtóxicas del extracto etanólico y el aceite esencial de *P. elongatum*.
- Evaluar el potencial genotóxico del extracto total de *P. elongatum*
- Evaluar el potencial genotóxico del aceite esencial del *P. elongatum*

5. **HIPÓTESIS**

Ho: El aceite esencial y el extracto etanólico de *Piper elongatum* carecen de actividad genotóxica a las concentraciones evaluadas

6. ANTECEDENTES

6.1. GENÉTICA TOXICOLÓGICA

La Genética Toxicológica es la disciplina científica que identifica y analiza la acción de un grupo de agentes tóxicos que son capaces de interactuar con el material genético de los organismos (compuestos genotóxicos). Su objetivo primordial es, detectar y entender las propiedades de los agentes físicos y químicos genotóxicos que producen efectos hereditarios desde deletéreos hasta letales. Por lo tanto, es una ciencia esencialmente multidisciplinaria que pretende establecer la correlación existente entre la exposición a agentes xenobióticos y la inducción de alteraciones genéticas tanto en las células germinales como en las células somáticas de los organismos¹⁹.

Los compuestos genotóxicos o xenobióticos son agentes capaces de ocasionar toxicidad genética (ver Figura 1), se clasifican en tres categorías de acuerdo a su origen: La primera categoría está constituida por los compuestos químicos, la segunda incluye las radiaciones en todo su espectro y la última algunos parásitos, bacterias, hongos, vegetales o incluso virus. La acción o capacidad de inducir daño de estos xenobióticos está influida por la dosis recibida y el tiempo o vía de exposición, junto a la constitución genética del individuo que puede definir una susceptibilidad propia o particular. A su vez, los xenobióticos también pueden clasificarse de acuerdo a su modo de acción o efectos en mutágenos, carcinógenos o teratógenos, dando lugar a tres tipos de procesos: mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis²⁰.

Las mutaciones pueden afectar al ADN de cualquier célula del ser vivo. Si la mutación se origina en una célula somática, es decir, cualquiera que no sea un gameto o una célula relacionada con los gametos, no se transmitirá a los descendientes, pero sí a las células que procedan de ella²⁰.

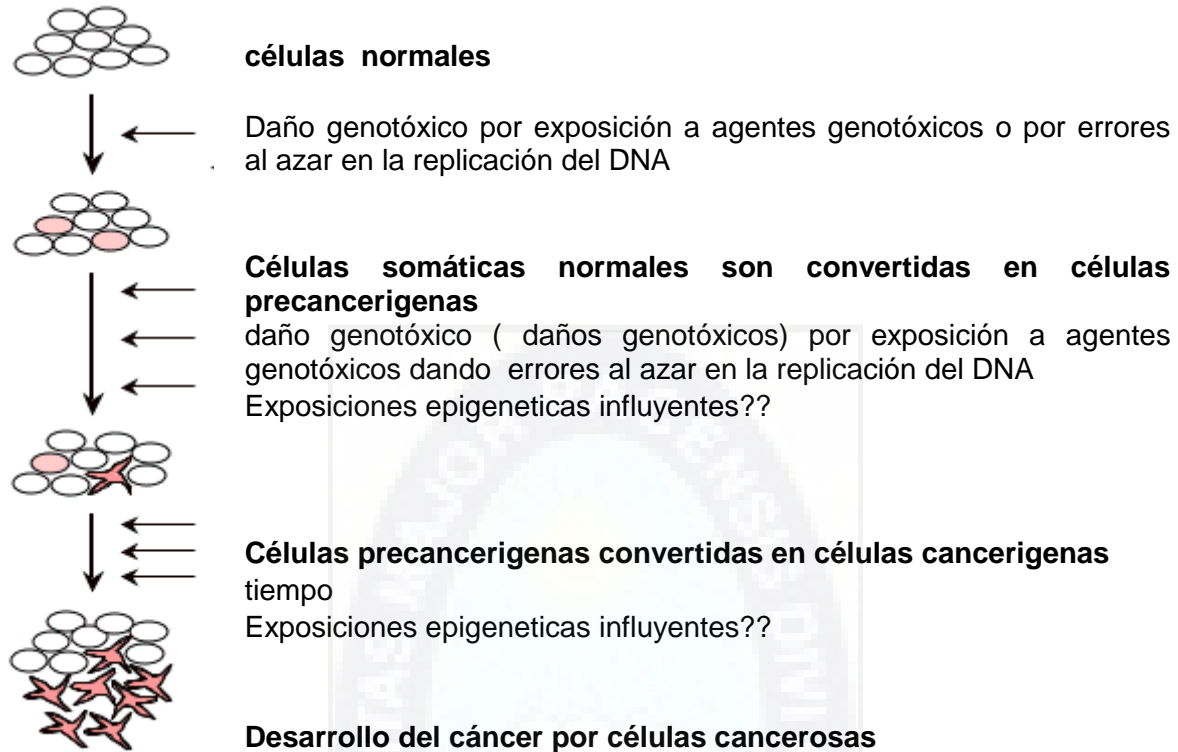


Figura 1.

Modelo multistep de carcinogénesis

Este modelo multi-paso sustituye un modelo anterior, llamado el modelo de iniciación-promoción. El modelo de iniciación propone que la promoción de la carcinogénesis es un evento de dos pasos, con el primer paso es una lesión en la genotóxico (llamado iniciación) y el segundo paso de ser un evento no genotóxico (llamado de promoción). Ahora está claro que este modelo de dos pasos era demasiado simple. En particular, es evidente que múltiples lesiones genotóxico, participan en muchas (no en todos) los tipos de cáncer, y que la promoción no pueden participar en todos los tipos de cáncer. (Moulder JE.2006)

En 1927 Herman Muller demostró de manera inequívoca que las radiaciones ionizantes son capaces de producir alteraciones genéticas en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y definió a las mutaciones como los cambios en la cantidad, cualidad y arreglo de los genes. Muller también desarrolló técnicas cuantitativas para medir en este organismo la proporción de mutaciones inducidas, y llamó la atención de la comunidad científica al sugerir que las radiaciones podrían producir cambios en las células somáticas de los tejidos, y en los que se dividen activamente podrían producirse distintos tipos de cáncer, incluyendo las leucemias²⁰.

Poco tiempo después, Charlotte Auerbach en 1942 demostró que el gas mostaza, utilizado como arma química durante la segunda Guerra Mundial, es mutagénico; un año después se demostró que el uretano empleado como agente antineoplásico es también capaz de inducir mutaciones en organismos de bioensayo. Con estos y otros descubrimientos fue posible orientar las investigaciones hacia el conocimiento de la interacción entre los agentes químicos y el material genético²¹.

Algunos agentes terapéuticos de uso común, tales como drogas y estimulantes, producen alteraciones en los cromosomas. El genetista Joshua Lederberg propuso en 1962 que se hicieran estudios genéticos para tratar de determinar si una gran variedad de sustancias químicas que producen mutaciones en los microorganismos representan o no un riesgo potencial para las células germinales de los seres humanos. A finales de los setentas se demostró la correlación que existe entre la inducción por diversos agentes químicos de mutaciones, o mutagénesis, y el desarrollo de algunos tipos de cáncer, o carcinogénesis. Esta correlación se estableció debido a que la mayoría de los carcinógenos interactúan directa o indirectamente con los ácidos nucleicos, y por lo tanto tienen la capacidad de producir cambios heredables²¹.

Los estudios de toxicología genética se han utilizado para evaluar la mutagenicidad de los factores que están presentes en el medio ambiente, los productos químicos farmacéuticos y agrícolas por más de 30 años. La mayoría de los de actividades en este campo se han centrado en el desarrollo de nuevos métodos de ensayo, normalización de los procedimientos de prueba, generación de bases de datos mutágeno y validación transversal de los resultados de la prueba. Después de muchos años de evaluaciones continuas y mejoras, contemporánea rutina de pruebas de toxicología genética son herramientas confiables para la detección de los mutágenos ambientales²².

La Genética toxicológica, centro sus investigaciones en agentes que inducen mutaciones en células germinales (porque se pone en riesgo a generaciones futuras) y en células somáticas (porque puede darse lugar a la formación de cáncer)²². La identificación del daño genético puede ser llevado a cabo mediante técnicas *in vitro* o *in vivo* como el test de Intercambio de Cromátides Hermanas (SCE), Prueba de Micronúcleos (MN), test de Electroforesis en una sola célula, test de Aberraciones Cromosómicas, el test de Ames, prueba de mutación génica en células de mamíferos, prueba de micronúcleos en células humanas y la prueba de mutación y recombinación somática (SMART), basada en la pérdida de heterocigocidad de células somáticas de *Drosophila melanogaster*²³.

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^{24,25} (ver tabla 1)

Tabla 1. Criterios de valoración que permiten determinar su Potencial Genotóxico.

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

Fuente: Pillco A. 2003

6.2. TEST DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA (SMART)

La Genética Toxicológica tiene centrado sus investigaciones en el uso de diferentes bioensayos capaces de detectar mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas y lo más reciente eventos aneuploidogénicos. Todavía una alta correlación entre las lesiones o desenvolvimiento del proceso cancerígeno un hecho cuestionable, permanece en las preguntas referentes a la existencia de carcinógenos destituidos de la actividad mutagénica sea ella génica o cromosómica. En las búsquedas de respuestas para tal comportamiento se desarrollaron sistemas de pruebas para la detección de un nuevo parámetro genético (la recombinación mitótica) que podría estar involucrado en la promoción del cáncer mediada por estos agentes. Los argumentos recientes refuerzan la participación de la recombinación homóloga²⁶.

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en *Drosophila melanogaster* (ver Figura 2) es una metodología *in vivo* con gran potencial de aplicación en estudios de genotoxicidad básicos y aplicados. En este sistema se utilizan marcadores fenotípicos para los tricomas o pelos de las alas (versión de las alas) o para el color de los ojos (versión de los ojos). Los marcadores utilizados son recesivos, por lo que las moscas adultas tienen fenotipo silvestre. Organismos trans-heterocigotos para marcadores fenotípicos de una u otra versión de SMART se exponen durante la fase larvaria al posible genotóxico de interés^{27,28, 29}.

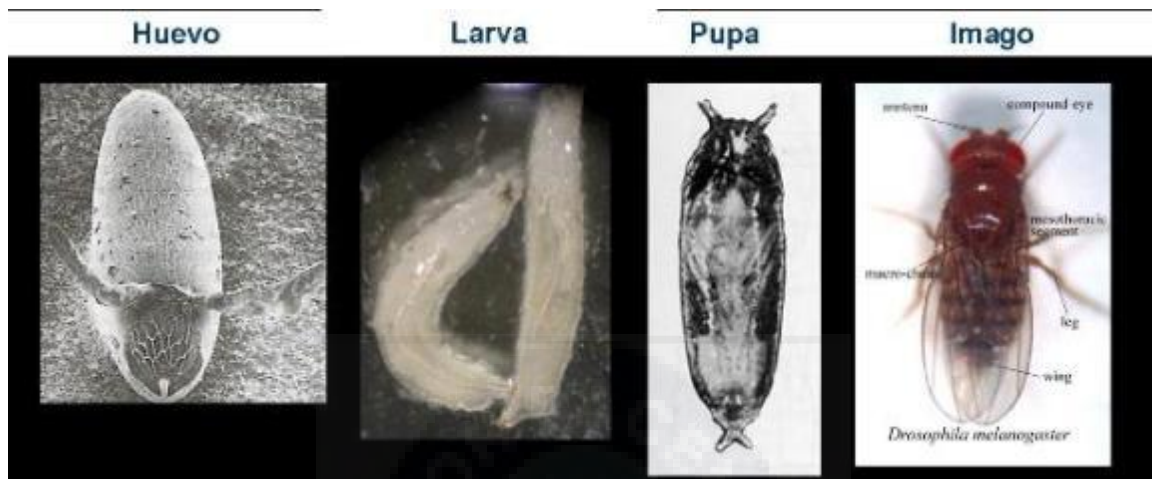


Figura 2. Fases del Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (GETEG.2007)

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, ofrece una serie de ventajas como sistema de prueba eucariótico de genotoxicidad *in vivo*. Es fácil de cultivar, su ciclo de generación es corto (ver figura 3), posee un amplio tamaño de progenie y un fácil mantenimiento debido a sus reducidas dimensiones. Los ensayos somáticos son baratos porque sólo se requiere de equipo de laboratorio básico y de bajo costo. Además de los sistemas de prueba bien establecidos y validados que utilizan células germinales, especialmente el de letales recesivos ligados al sexo, se han desarrollado otros como el de las células del ojo y del ala de los discos imaginales³⁰.

Debido al exhaustivo estudio de *Drosophila* durante el último siglo, ha sido posible la acumulación de gran cantidad de información. Uno de los avances más importantes se produjo en el año 2000 cuando la secuencia completa del genoma de *Drosophila* fue publicado³¹, este hecho, junto con la disponibilidad de multitud de técnicas y herramientas moleculares para su análisis, ha permitido consolidar a *Drosophila* como organismo modelo en los estudios de la Genética del Desarrollo. Otra de las grandes ventajas de *Drosophila* se basa en la facilidad para introducir y combinar mutaciones en su genoma. De esta forma, el fenotipo mutante nos permite inferir la posible función del gen durante el desarrollo. El genoma de

Drosophila contiene poco ADN repetitivo y la mayoría de los genes son de copia única, evitándose así los inconvenientes de la redundancia funcional.

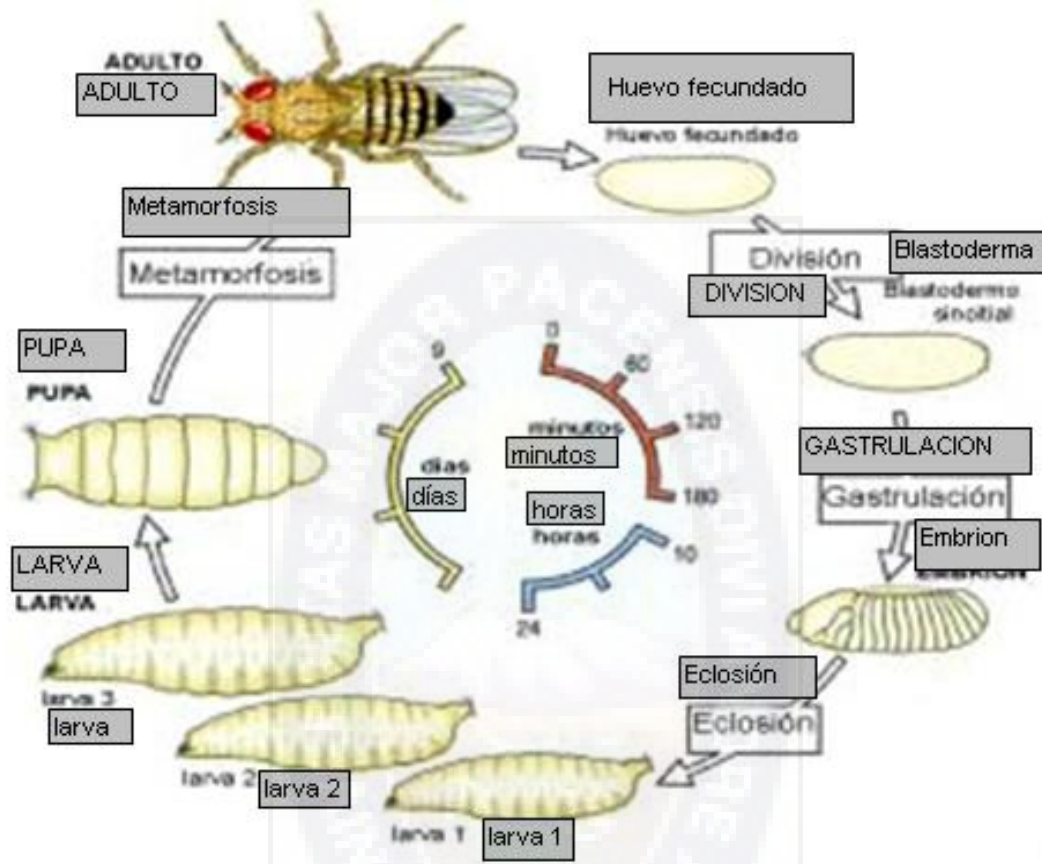


Figura 3. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster* a 25°C. Adaptado de Wolpert (1998).

Estas pruebas de mutación y recombinación Somáticas (SMART) son ensayos de una sola generación y utilizan marcadores recesivos que se expresan en la superficie de los ojos o de las alas de las moscas adultas. La principal ventaja de estos sistemas de prueba somáticos reside en el hecho de que no sólo detectan varios tipos de eventos de mutación, sino que básicamente inducen la recombinación mitótica. La inducción de la pérdida de heterocigosis de marcadores en las células de los discos imagal de las larvas mediante tratamiento con compuestos genotóxicos, conduce a la formación de un clon de células mutantes que después de la metamorfosis se expresan como manchas en los ojos o en las alas³⁰.

Los discos imaginales son las estructuras larvarias que darán lugar a la epidermis del adulto de *Drosophila melanogaster* (ver Figura 4). Los precursores de estos discos son unos conjuntos de células (cuyo número oscila entre 10 y 40 dependiendo del disco imaginal) que se segregan como invaginaciones de la epidermis embrionaria y que crecen por mitosis justo hasta antes de la metamorfosis, incrementando su número de células por un factor de 1000 aproximadamente. Las células de los discos son histológicamente similares, pero difieren enormemente en sus patrones de expresión génica³⁰.

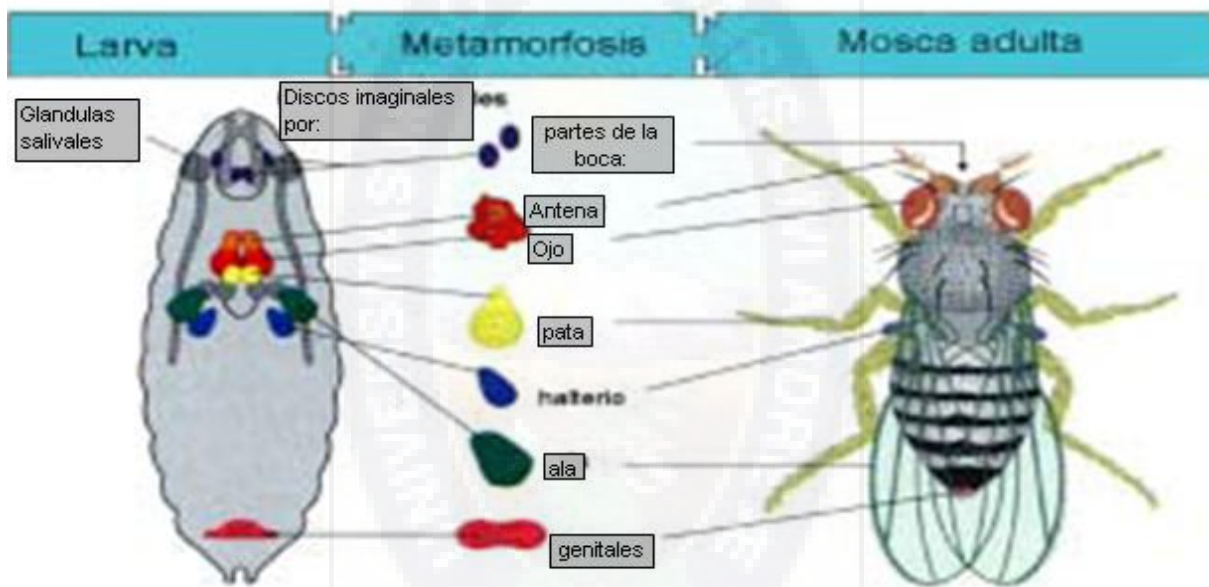


Figura 4. Morfología, localización y estructuras del adulto a las que darán lugar los discos Imaginales de *Drosophila*. Adaptado de Wolpert (1998)³⁰.

Durante la embriogénesis, el disco imaginal de ala está formado por un conjunto de unas 40 células, que empiezan a dividirse en la primera etapa larvaria (L1). La proliferación celular continuará durante los sucesivos estadios larvarios, con una división cada 8.5 horas en promedio, hasta obtener un epitelio monocapa formado por unas 50000 células aproximadamente. Sin embargo, la proliferación celular no ocurre a la misma velocidad en todo el disco, existiendo heterogeneidades en los patrones de división celular. Y estos patrones de proliferación celular están relacionados con la generación de la forma y el tamaño del ala adulta y sus dos histotipos: zonas de vena y zonas de intervena³⁰. El disco imaginal de ala dará

lugar al segundo segmento torácico del adulto, incluyendo la parte dorsal del tórax (conocido como *notum*) y al ala (ver Figura 5).

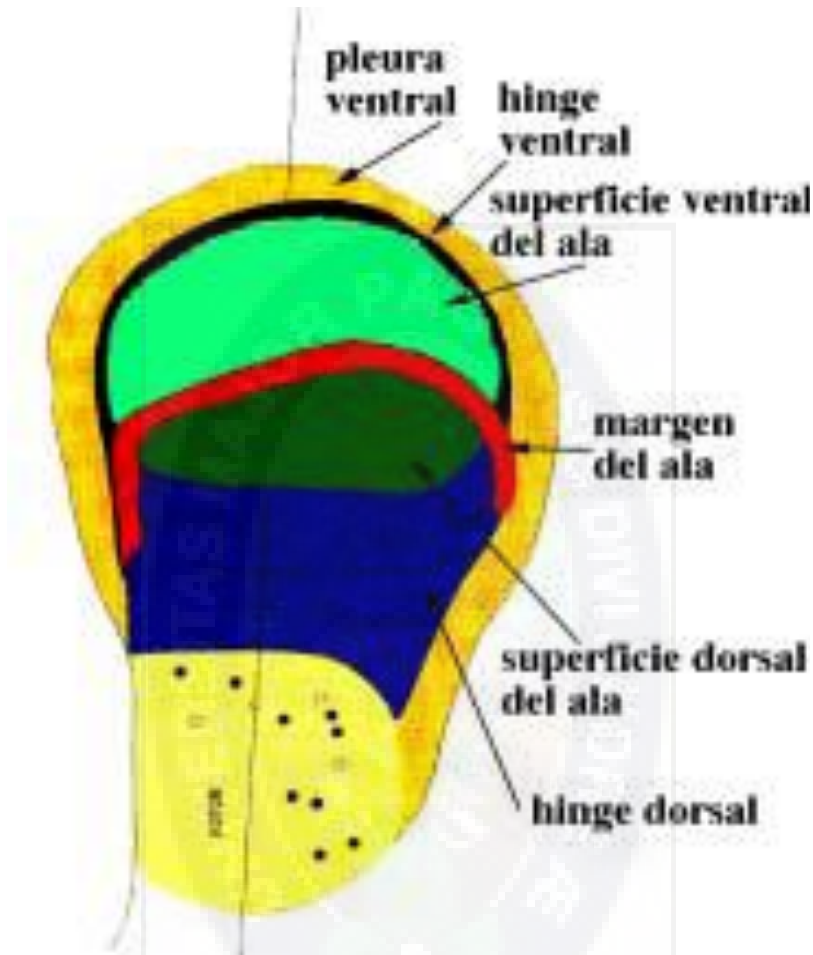


Figura 5. Disco imaginal de ala en el estadio de larva III. Adaptado de Cohen (1993).

El ala adulta (ver figura 6) está constituida por 2 capas de células epidérmicas continuas (un epitelio dorsal y uno ventral) a lo largo del margen del ala. Podemos diferenciar 3 componentes básicos: las estructuras del margen, las venas y las regiones de intervena. Sin tener en cuenta las estructuras neurales del ala, las células de intervena constituyen el 90% del área del ala, mientras que las células de vena constituyen el 10% restante. La función de las células de intervena es proveer al ala de una superficie aerodinámica para el vuelo. Las células que forman las venas son más pequeñas, están más compactadas y secretan una cutícula más pigmentada que las células localizadas en las regiones de intervena,

que comprenden las regiones entre venas. Además, las únicas células que permanecen vivas en el adulto son precisamente las células de vena³¹.

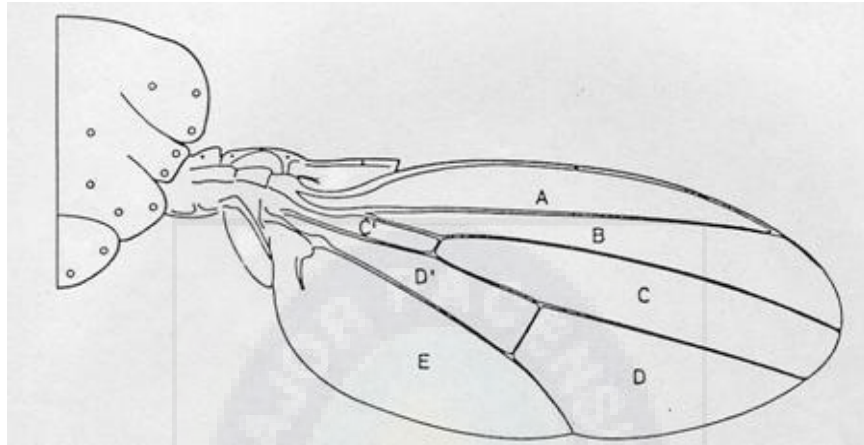


Figura.6 Áreas de lectura en el ala de *D. melanogaster* para el análisis de Genotoxicidad por el Test SMART (Tomado de Graf, 1995).

El análisis de las alteraciones genéticas inducidas, es realizado por observación microscópica de los grupos de células mutadas, ya sea que expresen el marcador genético *flr*³ o *mwh*, dichos grupos celulares son conocidos como manchas mutantes³². (Ver figura 6 y anexo 1)

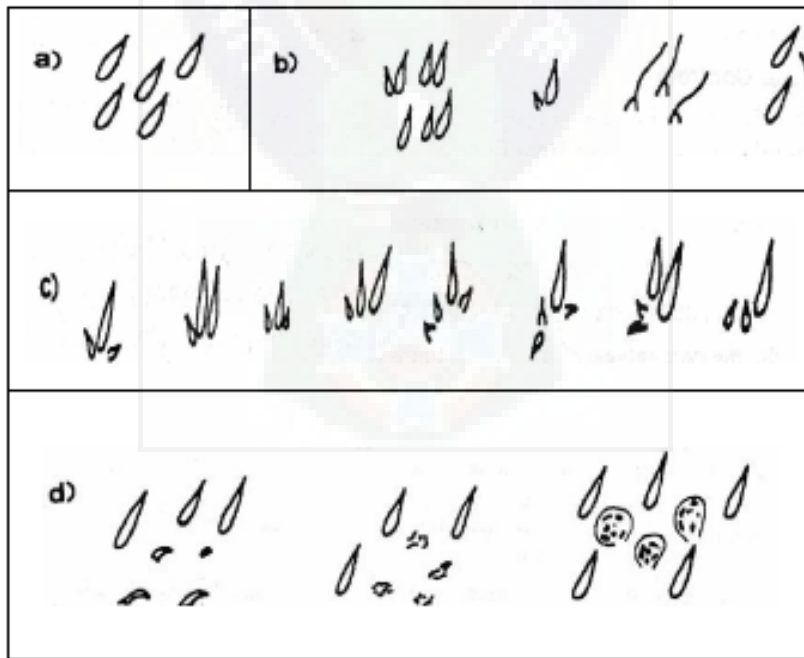


Figura 7.a) normal b) desviación de tricomas *mwh* y *flr*, c) variedad de tricomas *mwh* d) variedad de tricomas *flr* (Graf y col.1984)

- ***mwh***: son clasificados como clones *mwh*, todos los casos en que una o más células contuvieran pelos expresando el fenotipo *mwh*, esto de 3 o más pelos en cada célula. No son considerados grupos de células que representan 2 pelos en cada una. En el caso de que una célula, contenga 3 pelos mutantes, estando adyacente a una célula con dos pelos mutantes, las células con dos pelos son considerados como *mwh* e incluidas en el conteo del número de células mutantes que forman el clon.

- ***flr³***: clones simples *flr³* son poco frecuente, ya que se originan por eventos raros, como mutaciones puntuales en el locus *flr³*, pequeñas deleciones intersticiales o en recombinaciones. El gen *flr³* tiene una expresibilidad bastante variable, manifestándose como un punto, un pelo corto y alargado, como pelos amorfos, llegando al extremo de manifestarse con una forma de un balón, debido a la expulsión del material melanotico quitinizado.

- **clones gemelos**: manifiestan el fenotipo *flr³* y *mwh* en el mismo clon, son considerados clones gemelos: una o más células *mwh* adyacentes a una o más células *flr³*, deben estar separadas por no más de dos células con fenotipo salvaje.

El número total de manchas observadas ofrece información cuantitativa sobre la actividad genotóxica del compuesto evaluado; el tipo de mancha revela las diferentes lesiones que originaron dicha actividad genotóxica la cual puede ser clasificadas como:

- **Manchas simples pequeñas (MSP) y manchas simples grandes (MSG)**: ambas expresan el marcador genético *Flr³* o *mwh* e indican una mutación puntual, deleción, no disyunción o recombinación entre el gen *Flr3* y *mwh*³².

- **Mancha gemela (MG):** expresa ambos marcadores genéticos (*Flr³* y *mwh*), ofrece la información de que aconteció un evento recombinogénico entre el gen *Flr3* y el centrómero ocasionado por el agente evaluado³³.

Los individuos analizados provendrán de dos tipos de cruce:

- **Cruce Estándar:** su progenie se caracteriza por presentar niveles basales de enzimas de metabolización, por lo tanto detecta genotóxicos de acción directa (Mutágenos).

- **Cruce de Alta Bioactivación:** cuya progenie permite detectar genotoxinas de acción indirecta (Promutágenos). Esto se debe a que poseen un incremento en los niveles de acción del citocromo P-450²² encargado de suministrar centros conjugados en las genotoxinas³¹ de modo tal, que la capacidad de interactuar con el material genético se ve potencializado gracias a la activación metabólica²³.

Tanto en el cruce Estándar como en el cruce de Alta Bioactivación presentan individuos con dos tipos de progenes:

- **Individuos Trans-heterocigotos (*mwh +/+ flr3*):** Estos ofrecen la información de acontecimientos de mutación génica, cromosómica y recombinogénica. Son para los marcadores recesivos (*mwh*) que se expresan en las alas, pelos múltiples y pelos con base alargada (*flr³*).

- **Individuos Heterocigotos para el cromosoma balanceador TM3 (*mwh + /TM3, Bd^s*):** ofrecen información de acontecimientos de mutación génica y cromosómica, pero no de actividad recombinogénica. Las moscas adultas portadoras de este genotipo se diferencian de las trans-heterocigotas por presentar las alas con recortes en sus extremidades, determinados por el pelo del gen *Bd^s*

La diferencia entre ambas progenies nos permite cuantificar el daño genético producido por diferentes compuestos genotóxicos³⁴.

Basado en la constitución genética de las moscas trans- heterocigotas, los clones pequeños o grandes pueden ser originados por diferentes tipos de lesiones que ocurren en el cromosoma 3:

- Recombinación mitótica simple entre marcadores los marcadores *mwh* y *flr³* originan clones simples, que expresan el fenotipo de pelos múltiples (*mwh*).
- Recombinación entre *flr³* y el centrómero, seguida de una segunda recombinación entre *mwh* y *flr³* pasando en una misma célula. Resultando clones simples *flr³*.
- Mutaciones con contenido informacional de un de los locus de los genes marcados, con mutaciones puntuales, no disyunción o grandes deleciones conteniendo uno de los dos alelos *mwh+* o *flr³*.
- Los clones gemelos son obtenidos exclusivamente por recombinación entre *flr³* y el centrómero, con segregación de un cromosoma parental en un recombinado.
- Clones simples expresando el fenotipo *mwh* son más frecuentemente observados en los experimentos. Los clones gemelos ambos son sub clones *mwh* y *flr³* son menos frecuentes, siendo los clones simple *flr³* los que representan menor incidencia.

6.3. ESPECIES VEGETALES MEDICINALES

A inicios de los años noventa, la Organización Mundial de la Salud identificó que el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para asistir problemas de salud, la cual se basa principalmente en el empleo de plantas medicinales³⁵. En los países ricos, muchas personas recurren a diversos tipos de remedios naturales porque consideran que «natural» es sinónimo de inocuo. Existe un alto porcentaje de la población que está relacionado con la medicina tradicional lo cual permite el mantenimiento de dichos conocimientos³⁵.

Sin embargo, a medida que aumenta el uso de las medicinas tradicionales o alternativas, también aumenta el número de informes sobre reacciones adversas. En China, país en el que las terapias y los productos tradicionales se utilizan ampliamente en paralelo con la medicina convencional, en el 2002 se tuvo conocimiento de 9854 casos de reacciones adversas a los medicamentos, cuando entre 1990 y 1999 se habían registrado 4000. Aunque muchas plantas medicinales se encuentran en peligro de extinción, lo cual incide en la pérdida de recursos genéticos³⁶. En la actualidad no se dispone de información detallada al respecto y la mayoría de los países no cuentan con un inventario completo de sus plantas medicinales³⁵.

Bolivia, gracias a su alta diversidad cultural y biológica, se ha generado e identificado una amplia gama de prácticas de medicina tradicional, cuya forma de expresión principal es la utilización de diversas plantas. En este sentido, el conocimiento académico del número de plantas medicinales para el país ha incrementado, inicialmente se estimaba que existían 1.500 especies de plantas medicinales reconocidas esencialmente por los grupos étnicos³⁷. Actualmente, Giménez e Ibsch indican que se conocen alrededor de 3.000 especies de plantas medicinales identificadas y verificadas en distintos herbarios del país y se cuenta con publicaciones recientes. Sin embargo, no se ha abarcado la totalidad de las culturas, ni de las plantas medicinales existentes³⁸.

Por otro lado, se ha llegado a comprender que las plantas medicinales están inmersas en diferentes formas de vida de los pueblos originarios, grupos étnicos, comunidades y ciudades multiétnicas del país. Están insertas en una cosmovisión andino-amazónica que ha permitido su conservación, ya que considera aspectos como la ecología de la planta o su morfología que incide en las prácticas de recolección y suministro. Este conocimiento tradicional es invaluable y debe ser considerado, reconocido y protegido³⁹.

Para reconocer el contexto de la medicina tradicional en los Andes de Bolivia, es necesario identificar al valle de Charazani (provincia Bautista Saavedra, departamento La Paz) como epicentro de la cultura Kallawaya que ha contribuido enormemente al conocimiento del uso y manejo de plantas medicinales en la región. La cultura Kallawaya está conformada por curanderos itinerantes, considerados como especialistas médicos de gran renombre, por poseer un vasto conocimiento en especies herbáceas y sustancias relacionadas con la farmacopea tradicional⁴⁰. Su relevante trayectoria ha llevado al reconocimiento de la cosmovisión andina de los Kallawaya, a través de la declaración por la UNESCO, como patrimonio oral e intangible de la humanidad⁴¹.

Actualmente la práctica médica tradicional utiliza un gran número de especies herbáceas y una farmacopea natural entremezcladas con elementos mágicos empleados en rituales, que representan a la simbología andina.³⁹ En el ámbito de los recursos de la biodiversidad para la salud (medicamentos, alimentos, aromas, complementos dietéticos, pigmentos, aditivos), la cantidad de conocimientos es importante. Girault recoge la información sobre uso de 850 especies por los Kallawayas incluyendo el componente taxonómico; sin embargo, otros estudios de diferentes etnias como Guaraníes, Tacanas, entre otros. Existen alrededor de 2500 especies vegetales con uso demostrado a través de la praxis y validados por su uso a lo largo de períodos históricos⁴⁰.

Los recursos de la biodiversidad desde el origen del hombre han sido la fuente primordial para la obtención de insumos que favorezcan la salud y la vida en la tierra. Los usos más comunes reportados por la medicina tradicional boliviana se orientan al dolor, fiebre e inflamación, enfermedades del sistema nervioso central, problemas gastrointestinales, afecciones del tracto respiratorio y de la piel, antimicrobianos (bactericidas, antiparasitarios, antivirales). Sin embargo, el conjunto de plantas que conforman el ecosistema en el que participan los humanos, no provee solo nutrientes, en términos estrictos (requerimientos esenciales y no esenciales), sino también de elementos que contribuyen a la salud humana (y de los seres vivos que los consumen); entre estos se encuentran los elementos que promueven, favorecen, modulan o regulan ciertos mecanismos homeostáticos tales como antioxidantes, reguladores del peristaltismo intestinal, reguladores de la libido, moduladores de la respuesta inmunitaria, entre otros. Estos llamados nutraceuticos han sido recientemente valorados por la medicina oficial, no obstante su antiguo y extenso uso practicado por las corrientes naturistas del cuidado de la salud ^{40,42,43}.

Las empresas dedicadas a productos naturales, que abarcan el 50% de las más grandes en el rubro farmacéutico, con el establecimiento de regímenes de propiedad intelectual en gran parte de los países del mundo, permiten mayores facilidades para la aplicación por patentes y su licenciamiento, de dichos productos farmacéuticos a partir de plantas medicinales ^{44,45}.

Tiempo atrás existió un afloramiento de médicos tradicionales y especialistas en rituales indígenas de variada consideración, en consecuencia se conformó la Sociedad Boliviana de Medicina Tradicional (SOBOMETRA), instancia importante que impulsó la aprobación de un Decreto Ley en 1994 y su posterior reglamentación, mediante el cual se reconoce y autoriza la medicina tradicional, así como el ejercicio de médicos especializados en esta práctica ⁴⁶, hecho que históricamente se ha marcado un hito en la medicina tradicional de Bolivia, pues

reafirma la autoestima de los pueblos en la necesidad de realzar y valorar sus prácticas tradicionales frente al Estado y la sociedad.

Actualmente la Sociedad boliviana de Medicina Tradicional (SOBOMETRA); trabaja con 500 plantas nativas y su aplicaciones. Los laboratorios domésticos artesanales (LAD) proveen medicinas naturales entre tinturas, pomadas, almíbar, algunos cuentan con patentes y registros legales del Ministerio de salud⁴⁷.



6.4. *Piper elongatum* Vahl (MATICO)

6.4.1. Nombre comunes

“Matico” o “mático”⁴⁸, Maliku (aymara - quechua), Moqo - Moqo (quechua). pimienta de fruta ganchosa, pimienta de macaco, tapa hueco. Hierba del soldado^{7, 61},

6.4.2. Sinónimo

Piper angustifolium R.& P. o *Piper aduncum*⁴⁹.

6.4.3. Clasificación taxonómica:

Reino: Vegetal

Clase: Dicotiledoneae

Subclase: Archiclamydeae

Orden: Piperalis

Familia: *Piperaceae*

Género: *Piper*

Especie: *Piper elongatum*(ver fotos1-2)⁴⁹

6.4.4. Distribución

Las *Piperáceas* (del latín *Piperaceae* y género *Piper*), del orden de las Piperales, poseen las flores aclamídeas, androceo de 1-10 estambres y gineceo de 1-4 carpelos, generalmente tricarpelar; ovario unilocular, con un rudimento seminal ortótropo de inserción basal; tejido nutricional con perisperma y endosperma. Son plantas herbáceas o leñosas, con las hojas generalmente esparcidas, flores en densas espigas o en racimos y fruto en drupa o en baya. La mayoría de las

especies viven en los países intertropicales. *Piper* (700 especies), *Peperomia* (420 especies)⁵⁰.

El género *Piper* pertenece a la familia *Piperaceae*, y comprende más de 700 especies distribuidas en ambos hemisferios. Son hierbas que crecen rectas, como arbustos o muy rara vez como árboles. Las especies de *Piper* tienen gran interés medicinal, comercial y económico. Económicamente las *Piperaceae* son importantes por la producción de pimienta en el mercado mundial. Así, el fruto maduro de *Piper nigrum* es la fuente de pimienta blanca; mientras que el fruto inmaduro de la misma especie, es la fuente de la pimienta negra. Una bebida narcótica es producida en Oceanía a partir de raíces de *P. methysticum*. Por otro lado, muchas especies de *Piper* se cultivan como plantas ornamentales por su follaje⁵⁰.

Las especies de *Piper*, ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Crece silvestre en costas y selvas Centroamérica y Suramérica y en los valles interandinos hasta 3.000 msnm.). Abunda de manera especial en el Perú, Ecuador, Bolivia, Paraguay, Brasil y norte de Argentina. Se adapta fácilmente a cualquier clima. En nuestro medio crece a 1700 metros de altura, en casi toda la región de los Yungas⁵¹.

6.4.5. Descripción botánica⁵²

Es una planta dicotiledónea semiarborescente arbórea que alcanza una altura que alcanza una altura entre 1-3 metros.

- **Tallo:** cilíndrico, ramificado leñoso que a su vez presenta nudos prominentes y abultados.
- **Hojas:** son opuestas de color verde brillante, simples sésiles, estipuladas enteras alternas de apariencia muy rugosa por el haz con las nervaduras sobresalientes en forma de malla por el lado del envés. Miden 7-10

cm de largo por 2.5 a 3.5 cm de ancho, con bordes dentados y envés claro (albescente).

- **Inflorescencia:** espiga simple densa o compuestos con flores pequeñas hermafroditas aclamídeas desnudas acompañadas de una bráctea que va tener un ovario supero (1-5 estigmas cortos; ovulo erecto) con dos estambres.

Los estambres presentan de 2- 6 hipóginos con anteras normalmente biloculares de dehiscencia longitudinal.

- **Fruto:** es una pequeña drupa.
- **Semilla:** Con endosperma y embrión diminuto.
- **Flores:** diminutas en espigas densas



Fotografías 1-2. *Piper elongatum* Vahl

Fuentes: Plants by Scientific Names. www.natureloveyou.sg/Plants-P.html. (Fecha de acceso: 21 de agosto del 2009)

6.4.6. Composición química

En ensayos Bioquímicos se hallaron que las hojas contienen Asebogenina (flavonoide); ácido benzoico metil ester 3- (6- hidrometoxo); ácido octa trans 2-7 dienoico, 6-(-5) monoterpeno; copathulenol (sesqui-terpeno), sitosterol beta, estigmasterol (esteroides). La Canfora, el Canfene, Isoborneol. También presenta alfa pineno, mirceno, limoneno, borneol y terpinol acetato^{53,54,55}.

Además se identificaron 1 a 3.5% de aceite volátil ligeramente dextrogiro conteniendo benzodioxole 5- metoxy-6- (2- propen) fenilpropanoide (aceite esencial), dillapiol, etoxidillapiol, mirisicina y piperitona, alcanfor y en otras especies Asarol; taninos, resinas en pequeñas cantidades, maticina (principio amargo)^{53, 54,55}.

Dichos compuestos poseen gran valor económico por sus variadas acciones fisiológicas y aplicaciones industriales. (Ver Tabla 2)

Tabla 2. Aplicaciones generales de cada fitoconstituyente

Fitoconstituyentes	Aplicaciones
Aminas	Presentes en gran cantidad de compuestos orgánicos, muchas veces les confieren su actividad fisiológica
Alcaloides	Medicinal. Por su actividad fisiológica diversa constituyen materias primas para la fabricación de medicamentos
Esteroles	Medicinal. Forman parte de hormonas animales y vitaminas
Triterpenos	Medicinal e industrial. Constituyen los llamados aceites esenciales, útiles en perfumería, farmacia y en la preparación de determinados alimentos
Glucósidos cardiotónicos	Medicinal. Estimulan la función cardíaca, son los llamados venenos del corazón
Saponinas	Medicinal e industrial. Precursores de hormonas esteroidales y corticosteroides. Por su actividad tensoactiva son útiles como emulgentes y hemolizantes
Fenoles simples	Medicinal e industrial. Poseen actividad antifúngica, desinfectante y aromatizante
Flavonoides	Medicinal e industrial. Reducen fragilidad capilar, protegen frente a estados tóxicos, antiinflamatorios y colorantes
Taninos	Medicinal e industrial. Propiedades astringentes y antisépticas. Útiles en la fabricación de tintas y otros colorantes, para curtir pieles
Cumarinas	Medicinal e industrial. Anticoagulante y aromatizante

Fuente: VANDER A (1972)

6.4.7. Usos tradicionales

La medicina tradicional le atribuye propiedades variadas. Las hojas en decocción se usan como cicatrizante en el tratamiento de hemorragias, en lavados antisépticos sobre heridas y en infusión para evacuar cálculos biliares, para aliviar o curar enfermedades del tracto respiratorio (antiinflamatorio, expectorante y antitusígeno), en afecciones gastrointestinales ("empacho", diarreas agudas o crónicas) y tópicamente en infusión de las hojas para hacer gárgaras⁵⁶.

Las hojas frescas de "matico" son utilizadas por los Kallawayas como antiinflamatorio y antiséptico (comercializado en forma de jabón). Estudios *in vitro* de extractos de esta planta, muestran propiedades antifúngicas sobre hongos como; *Cryptococcus neoformans* y *Trichophyton mentagrophyte*, además esta especie vegetal presenta propiedades cicatrizantes que se le atribuye a la presencia de taninos. Así también se evidencia que tiene enormes propiedades antiinflamatorias, antisépticas y antibacteriana inhibiendo el crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*⁵⁶. En otros estudios realizados también se evidenciaron que esta especie vegetal posee propiedades diuréticas frente a la furosemida y propiedades anti – *Helicobacter pylori*^{6,7}.

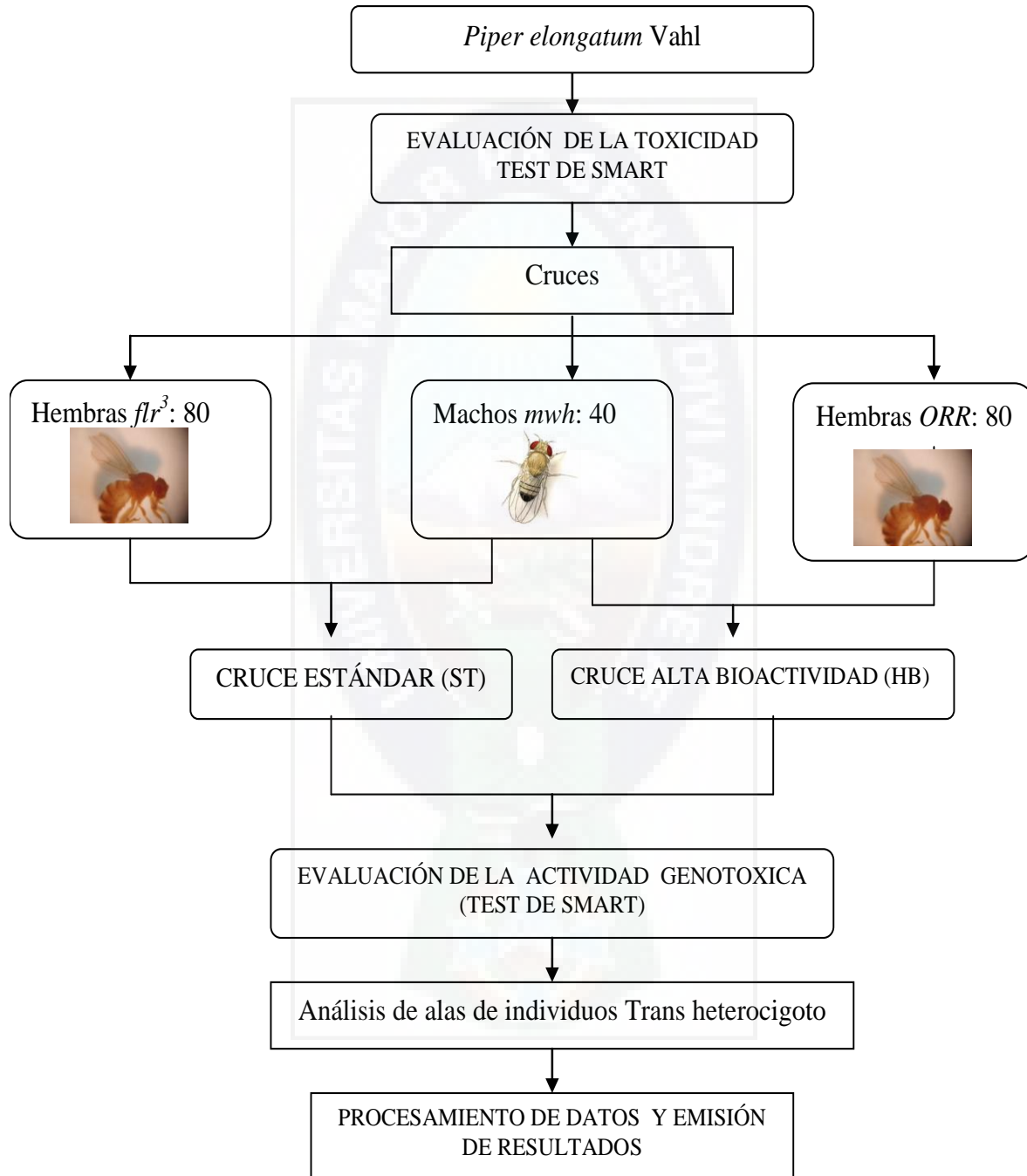
La infusión de estas hojas conjuntamente con la malva o la zarzaparrilla se usa en lavados vaginales para detener los flujos blanquecinos causados por el parásito *Trichomonas vaginalis* o por la blenorragia, cicatriza las heridas provocadas por la sífilis. Podemos señalar que esta especie vegetal tiene un efecto relajador sobre la musculatura lisa debido a la presencia de varios tipos de alcaloides^{57,58}.

También tenemos a los aceites esenciales (AE) de *Piper spp.* Inhiben el crecimiento de una amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes en humanos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *E. coli*, y los hongos *Trichophyton mentagrophytes*, *C. albicans*, *A. flavus* y *A. fumigatus*. Estimula la función cardíaca al inhalarlo^{59,60,61}.

7. METODOLOGÍA

El trabajo se ha realizado de acuerdo al esquema 1 y a continuación se detallan cada una de las etapas.

Esquema 1. Técnica de SMART



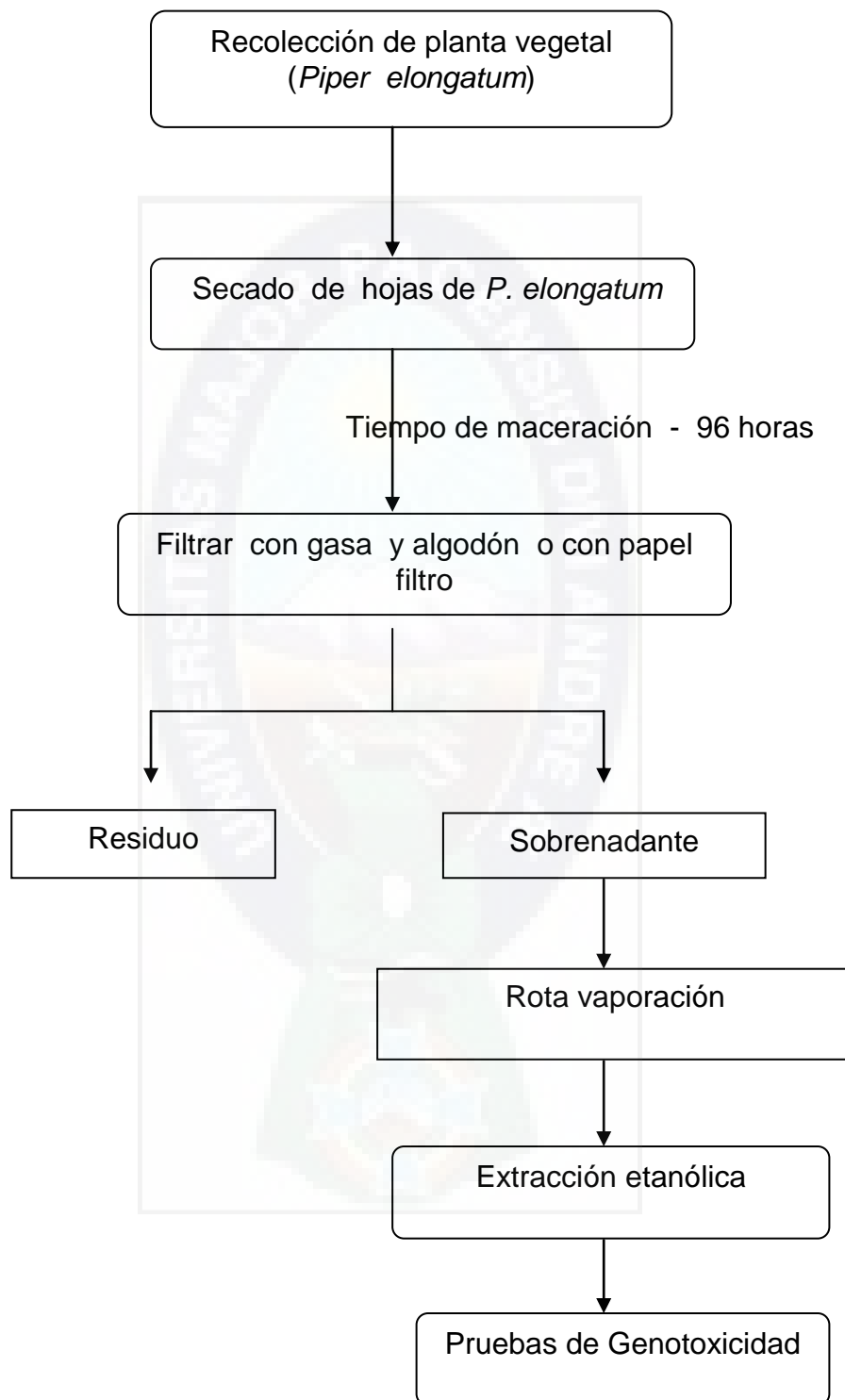
7.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La especie vegetal *P. elongatum* fue recolectada del área de Sud Yungas del Cantón de Chicaloma, población de Irupana ubicado en el departamento de La Paz. Las personas que ayudaron en la recolección fueron Emilio Torres y Ana Paula Jiménez. Luego se prepararon muestras de colección para poder ser depositadas en el Herbario Nacional de Bolivia LPB, donde se realizó la identificación con la colaboración de los botánicos Emilia García y Javier Quisbert (Ver anexo 2).

7.1.1. Preparación del extracto

El material vegetal fue recolectado y secado en condiciones adecuadas, para posteriormente ser pulverizado. Se pesó 500 g de la planta seca y pulverizada, se realizó una maceración con 2 litros de etanol destilado al 70% durante 48 horas a temperatura ambiente, posteriormente la maceración se filtró con ayuda de una gasa y algodón, separando de esta manera la parte acuosa del residuo. Se procedió a concentrar el extracto acuoso, por rota vaporación (120rpm y 40°C) dicho proceso está representado en el Esquema 2

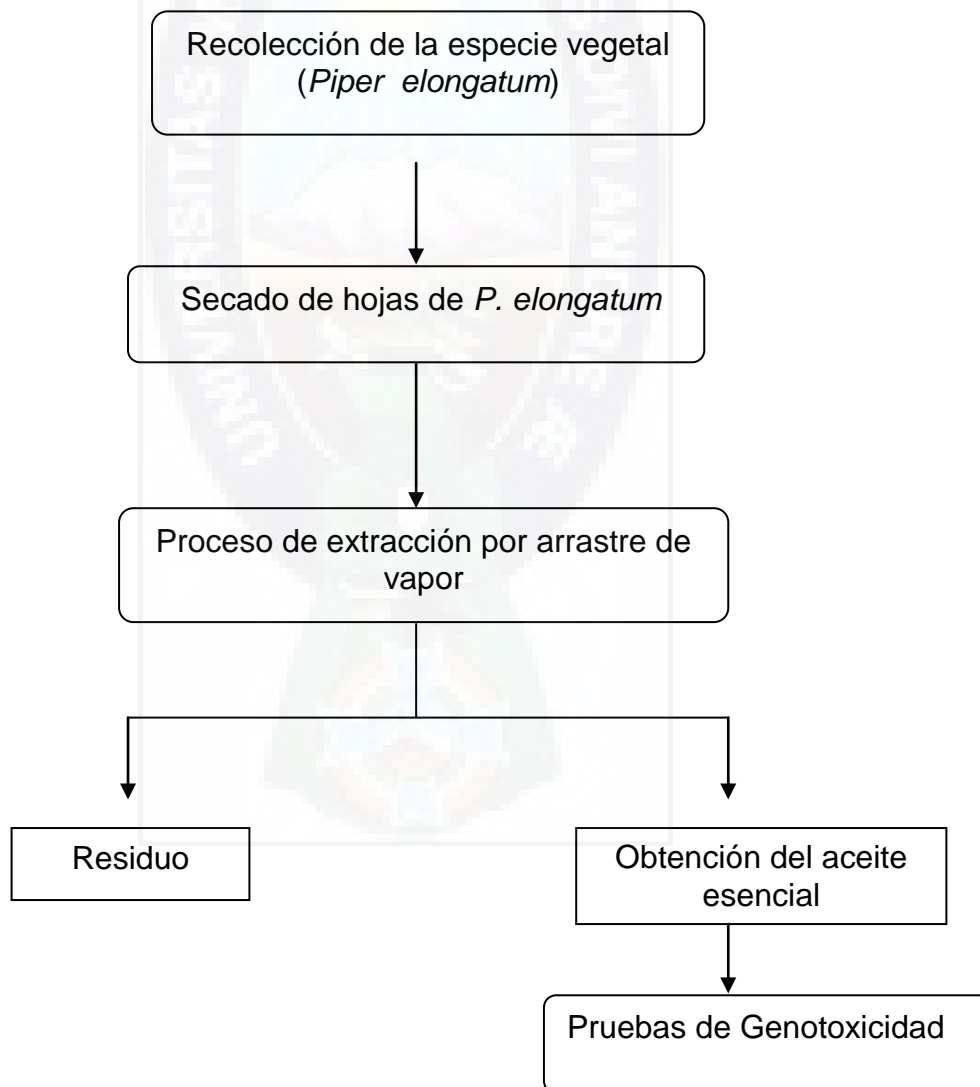
Esquema 2. Obtención de extracto etanólico de *Piper elongatum* Vahl (ver anexo 3)



7.1.2. Obtención del aceite esencial

Para la obtención del aceite esencial, se pesaron 500g de hojas secas de *P. elongatum* Vahl que fueron recolectadas de la región Sud Yungas cantón Chicaloma población de Irupana ubicado en el departamento de La Paz. Estas hojas secas fueron desmenuzadas y colocada en el destilador realizándose así una extracción, del aceite esencial mediante destilación por arrastre de vapor de agua (ver **Esquema 3**).

Esquema 3. Obtención de aceite esencial de *P. elongatum*



7.2. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE *P. elongatum* Vahl. MEDIANTE LA PRUEBA DE SMART

Para la evaluación de la toxicidad^{62,63} se establecieron concentraciones sub-toxicas de la especie vegetal en estudio. Tanto el extracto total etanólico como el aceite esencial fueron disueltos en tween 80 al 3.5%(que se empleo como control negativo) y Mitomicina C como control positivo en una concentración de 0.05mM.

7.2.1. Extracto total etanólico

Para la evaluación de la toxicidad del extracto total etanólico se trabajo inicialmente con concentraciones de 75, 50, 25, 10 mg/ml en la segunda etapa se evaluaron concentraciones de 25, 50,75 y 100 mg/mL en ambos caso se trabajo frente a un control negativo (tween 80 al 3.5%) y se sometió un número de 100 larvas de tercer instar a cada concentración evaluada, en los cruces Estándar (ST) y Alta Bioactivación (HB). Cada concentración se evaluó por triplicado.

7.2.2. Aceite esencial

En la evaluación de la toxicidad del aceite esencial se sometió un número de 100 larvas de tercer instar procedentes de los cruces ST y HB, en cada una de las concentraciones empleadas , este procedimiento se realizo en dos etapas: En la primera, se evaluaron cuatro concentraciones que fueron de 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5%(p/v) en una segunda etapa se emplearon concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2%(p/v) y estas fueron comparadas con un control negativo(Tween 80 al 3.5%). Cada concentración se evaluó por triplicado.

7.2.3. Cruce estándar

Las hembras de las cepas *flr³/ln* (3LR) TM3, *ri p^D sep 1(3)89Aa bx^{34e}* y *Bd^S* fueron cruzadas con machos del linaje *mwh/mwh*

7.2.4. Cruce alta bioactivación

En este caso las hembras de la cepa ORR/ORR; *flr³/In* (3LR) TM3, ri p^p sep1 (3)89Aa bx^{34e} y Bd^s fueron cruzadas con machos del linaje *mwh/mwh*.

7.2.5. Tratamiento de individuos

Después de realizados los cruces se procedió al recuento de las larvas de tercer *instar* (ver fotografía 3) procedentes de los cruces Estándar y Alta Bioactivación. En un número inicial de 100 larvas por cada concentración de muestra empleada en cada experimentación, fueron trasladados a sus respectivos frascos que contenían 1.5g de *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply, Burlington) y 5 mL de la muestra por un lapso de 48 horas.

Una vez desarrolladas las larvas que sobrevivieron hasta convertirse en moscas adultas, fueron recontadas y recolectadas en frascos con etanol al 70% para su mantenimiento. Este procedimiento se realizó para cada una de las 2 etapas bajo las mismas condiciones de 25°C y 60% de humedad relativa. Tomando en cuenta el porcentaje de sobrevivencia se pudo elegir las concentraciones adecuadas para la evaluación de la genotoxicidad mediante lectura de alas de los individuos recolectados.

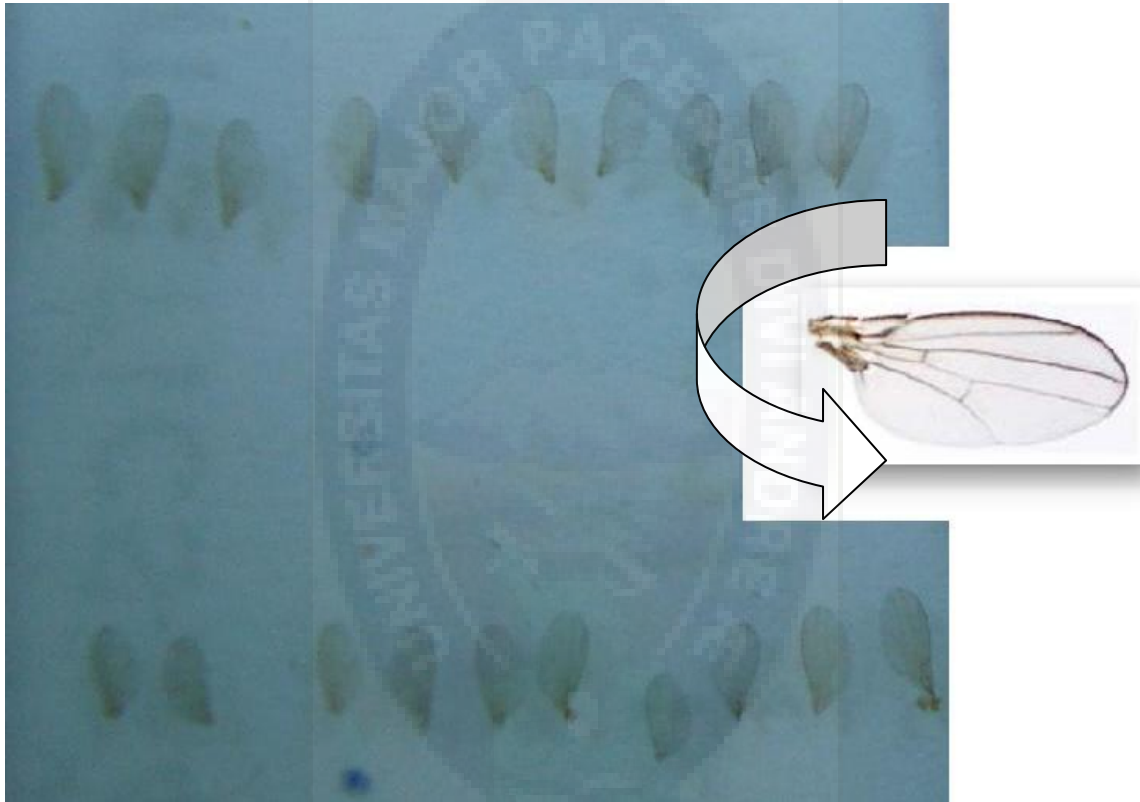
7.2.6. Análisis de alas

Para el análisis de las alas tanto del cruce Estándar como el cruce de Alta Bioactivación se toman en cuenta los genotipos Trans-heterocigoto (*mwh/flr³*) y Heterocigoto (*mwh/TM3*), tanto de machos como de hembras que fueron fijadas con solución de Faure en portaobjetos, según el procedimiento de Graf et al^{64,65}.

La lectura se realizó tomando en cuenta las diferentes aéreas en que se subdivide el ala de la mosca descrita por Graf y col. (1984), donde se buscan marcadores genéticos *fl³* o *mwh*.^{66,67} (ver fotografía 4)



Fotografía 3. Larva de *Drosophila melanogaster* en su tercer estadio
Fuente Instituto de investigaciones fármaco Bioquímicas 05/08/09.



Fotografía 4. Alas adultas de *Drosophila melanogaster*
Fuente Instituto de investigaciones fármaco Bioquímicas 05/08/09.

➤ **Marcador genético *mwh***

En este marcador se observa el crecimiento de tres o más tricomonas en lugar de uno.

➤ **Marcador genético *flr*³**

Este marcador posee la característica de presentar una base ensanchada respecto a la base delgada que presentan los pelos normales⁶⁸

7.2.7. CLASIFICACIÓN DE MANCHAS

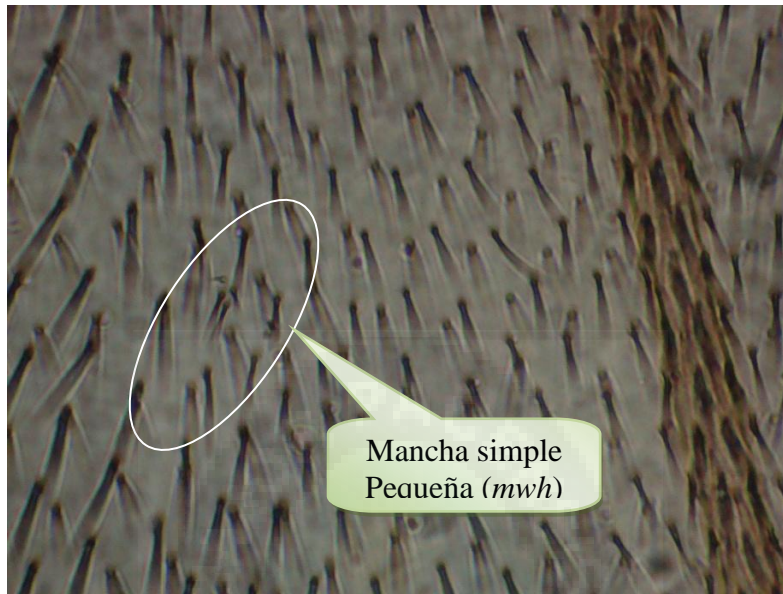
La clasificación de las manchas en las áreas de lectura con alteraciones fenotípicas de los tricomas (manchas), se realizó mediante el método descrito por Graf U.1984. Tomando en cuenta el tipo y tamaño de su expresión:

- **MANCHAS SIMPLES**

Fueron clasificadas dentro este tipo, aquellas manchas que presentaban la expresión del fenotipo *mwh* o *flr*³.

- ✓ **Manchas simples pequeñas (MSP)**

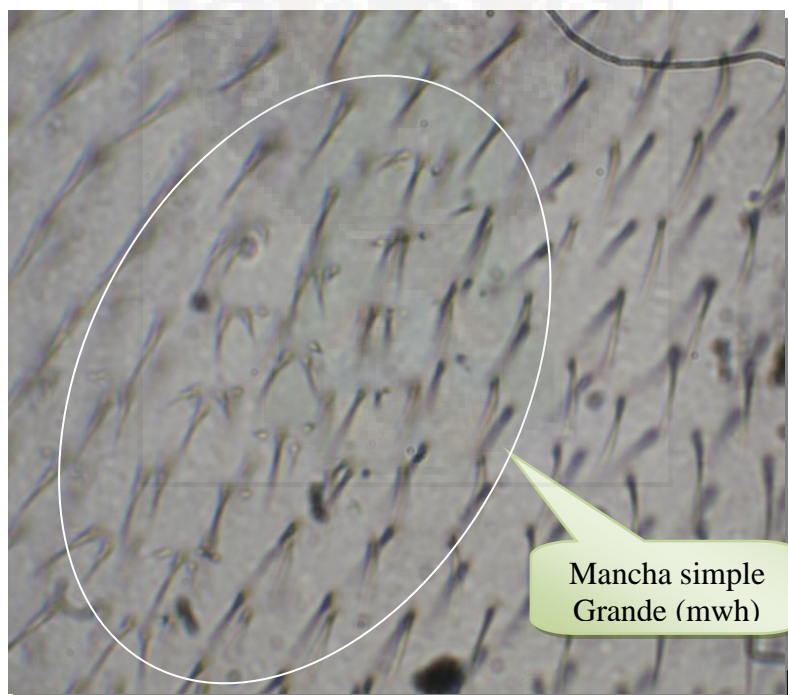
Cuando el número de células afectadas fue de 1 o 2 como se muestra en la fotografía 5.



Fotografía 5. mancha simple pequeña *mwh*.

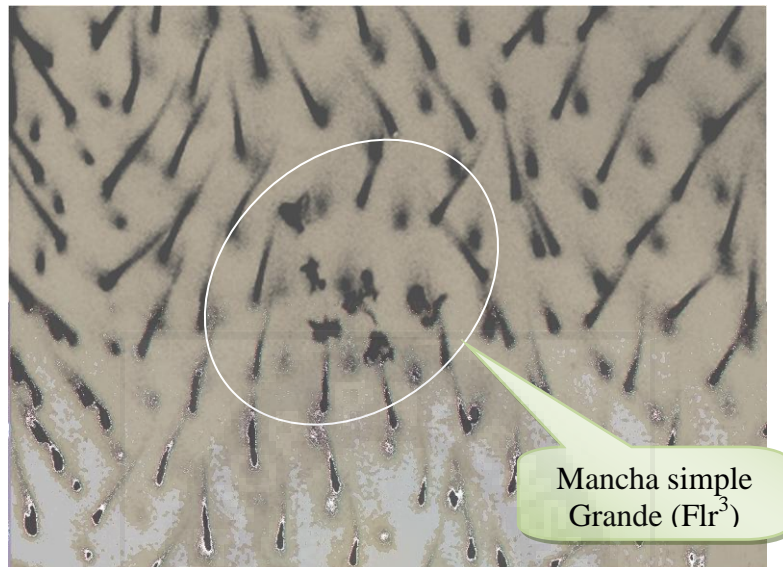
✓ **Manchas Simples Grandes (MSG)**

Cuando el número de células afectadas fue mayor a 2 como se puede ver en las fotografías 6 y 7



Fotografía 6. Mancha simple grande *mwh*.

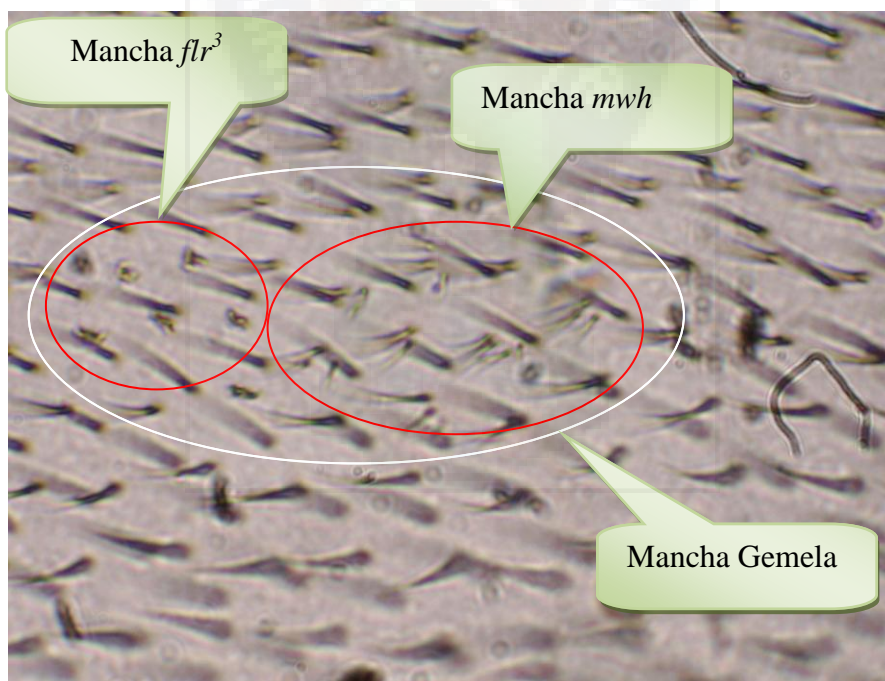
Fuente: Instituto de investigaciones fármaco bioquímicas.2009



Fotografía 7. mancha simple pequeña *flr³*.
Fuente: Dra. Heloisa Rodrigues 2003

- **Mancha Gemela (MG)**

Fueron clasificadas dentro este tipo, aquellas manchas que expresaban el fenotipo *mwh* y *flr³* ubicados de forma adyacente (ver fotografía 8).



Fotografía 8. manchas gemelas – *mwh* y *flr³*.
Fuente: Instituto de investigaciones fármaco bioquímicas.2009

7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico empleado para el Test SMART según la explicación de Graf fue el Test binomial de Kastenbaum – Bowman, el cual se basa en la formulación de dos hipótesis que permiten distinguir si un resultado es positivo o negativo o inclusivo⁶⁹.

- **Hipótesis nula (Ho)**

Cuando no existe diferencia en la frecuencia de manchas halladas en las muestras tratadas y el control negativo.

- **Hipótesis alterna (Hi)**

Cuando la frecuencia de manchas halladas en las muestras tratadas es mayor a la frecuencia de manchas del control negativo.

Las respuestas generadas en base a estas hipótesis son:

- **Respuesta positiva**

Cuando la frecuencia de manchas de los tratamientos es dos veces mayor ($m=2$) a la frecuencia encontrada en el control negativo. Entonces se rechaza la hipótesis Nula (Ho).

- **Respuesta negativa**

Cuando la frecuencia de manchas de los tratamientos es menor a la frecuencia encontrada en el control negativo. Entonces se rechaza la hipótesis Alterna (Hi).

- **Respuesta inconclusiva**

Cuando ambas hipótesis son excluyentes ya que los datos obtenidos no fueron significativos como para generar un resultado positivo.



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hojas de *Piper elongatum* se han recolectado en el cantón de Chicaloma, población de Irupana. Y ha sido identificada por el Herbario Nacional de Bolivia Voucher 1p. (Ver anexo 2):

Las hojas secas de la planta fueron sometidas a una extracción por arrastre de vapor para obtener el aceite esencial, con un rendimiento del 3.26% (15 ml); por otra parte se ha medido la densidad del aceite determinándose una δ de 0.996 g/ml.

Por otra parte, hojas secas de *P. elongatum*, fueron sometidas a una extracción con etanol, durante 48 hrs., el cual posteriormente fue filtrado y el solvente evaporado, obteniéndose así el extracto total etanólico, con un porcentaje de rendimiento del 8%.

Tanto el aceite esencial y el extracto etanólico obtenido, se han utilizado para realizar los ensayos de toxicidad y genotoxicidad mediante la prueba de SMART.

8.1 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE *Piper elongatum* Vahl MEDIANTE LA PRUEBA DE SMART.

Para la determinación de la toxicidad del extracto etanólico y el aceite esencial, se emplearon un número de 100 larvas de tercer instar de *Drosophila melanogaster* a diferentes concentraciones, tanto para el cruce Estándar (ST) como para el cruce de alta Bioactivación (HB), utilizando como control negativo Tween al 3.5% (disolvente del extracto y aceite esencial). Se utiliza como parámetro para determinar la toxicidad de un compuesto el % de sobrevivencia de los individuos tratados, considerando una **dosis toxica** cuando el % de sobrevivencia es a $< 60\%$ y una **dosis sub-toxica** cuando el % de sobrevivencia es $> 60\%$ ²⁹

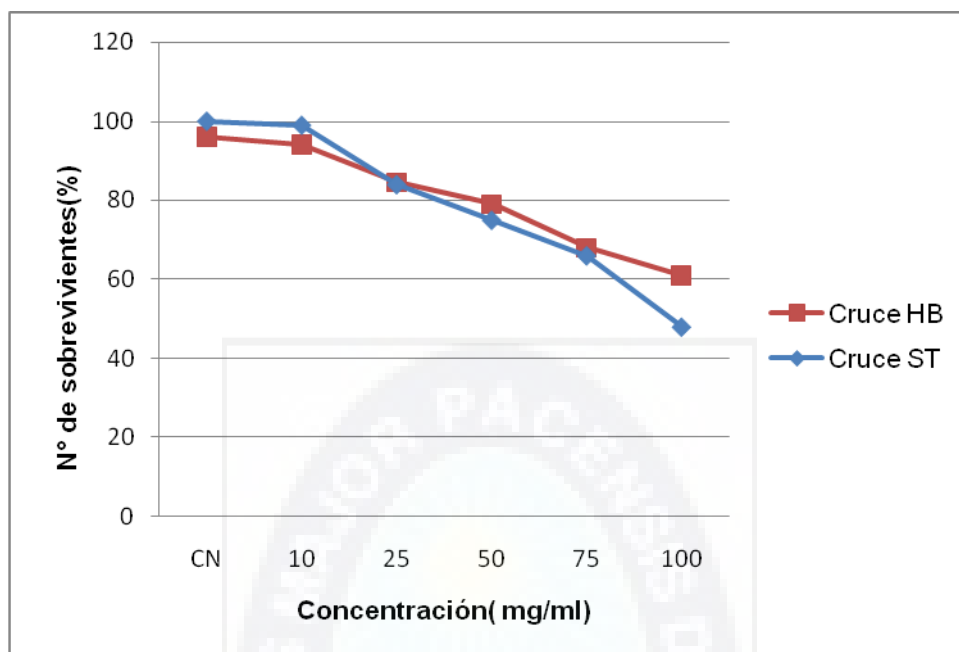
8.1.1 Extracto etanólico

La evaluación de la toxicidad del extracto etanólico de *P. elongatum*, se realizó en dos etapas: en la primera se evaluaron cuatro concentraciones: 10, 25, 50 y 75 mg/ml y en la segunda etapa se analizaron concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mg/ml, obteniendo como resultado un porcentaje de sobrevivencia de imagos sobre las larvas de tercer instar de *D. melanogaster* inversamente proporcional, a las concentraciones empleadas para ambos cruces estandar (ST) y de Alta Bioactivación (HB), como se puede observar en la tabla 3 y grafica 1.

Tabla 3. Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar sometidas a Diferentes concentraciones de extracto etanólico de *P. elongatum*

Concentraciones evaluadas (mg/ml)	% DE SOBREVIVENCIA	
	Cruce ST	Cruce HB
10	99,0 ± 1	94,0 ± 0
25	84,0 ± 12	84,5 ± 0.5
50	75,0 ± 9	79,0 ± 1
75	66,0 ± 10	68,0 ± 0
100	48,0 ± 0	61,0 ± 0
C.N.	100,0± 0	96,5± 0.5
0,05uM	62,5 ± 0.05	65 ± 0.1

C.N=Control negativo: tween 80 al 3.5%



Grafica 1. Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar sometidas a Diferentes concentraciones de extracto etanólico de *P. elongatum*

Como se observa en la tabla 3 y la grafica 1, los resultados obtenidos muestran que a la mínima concentración de 10 mg/ml el porcentaje de imagos sobrevivientes en el cruce estándar (ST) es de 99% y en el cruce de Alta Bioactivación (HB) es del 94%; a la concentración máxima de 100 mg/ml el porcentaje de sobrevivencia es de 48% para el cruce ST y de 61% para el cruce HB.

Estos resultados nos muestran que el extracto etanólico de *P. elongatum* no presentan toxicidad a concentraciones menores a 75 mg/ml, 66 % y 68 % sobrevivencia para el cruce ST y HB respectivamente; sin embargo por encima de 100 mg/ml, el % de sobrevivencia es bajo (< 61%), para ambos cruces, por lo que esta dosis se considera tóxica.

Los datos obtenidos en este ensayo de toxicidad, han permitido determinar las concentraciones subtoxicas a utilizar en la evaluación de la genotoxicidad del extracto etanólico de *P. elongatum*, definiéndose que las concentraciones utilizadas en el ensayo serán inferiores a 75 mg/ml para ambos cruces ST y HB.

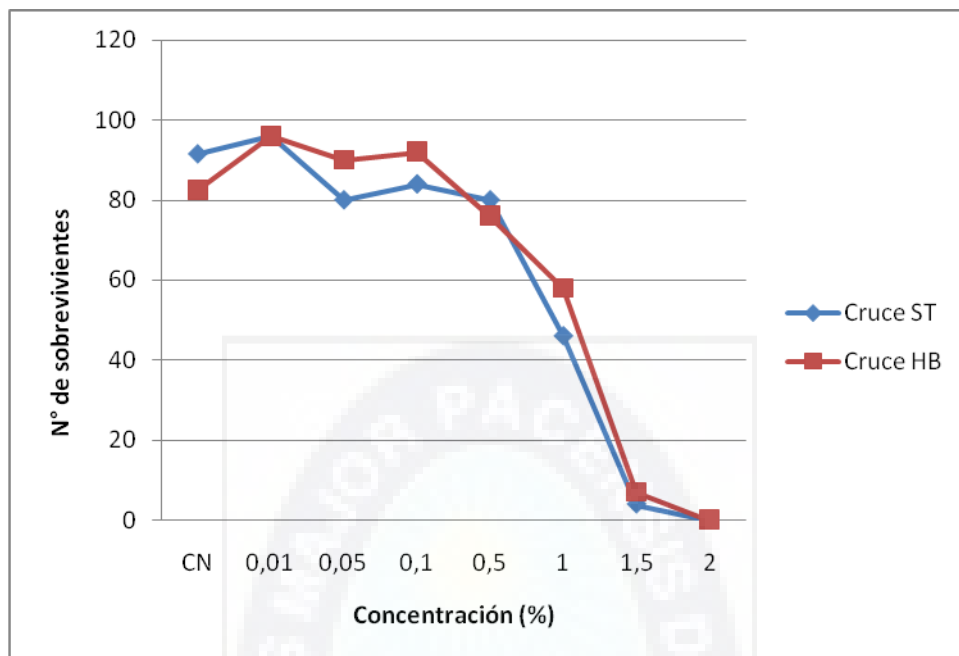
8.1.2 Aceite esencial

Para determinar la toxicidad del aceite esencial de las hojas de *P. elongatum*, se evaluaron inicialmente concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5 y 2 % (p/v) las cuales mostraron un porcentaje de sobrevivencia inversamente proporcional a las dosis administradas, en el cruce estándar (ST) y de Alta Bioactivación (HB), como se puede observa en la tabla 4 y grafica 2

Tabla 4. Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar sometidas a diferentes concentraciones de aceite esencial de *P. elongatum*.

Concentraciones evaluadas (%)	% DE SOBREVIVENCIA	
	Cruce ST	Cruce HB
0.01	96	96
0.05	80	90
0.10	84	92
0.50	80	76
1.00	46	58
1.50	4	7
2.00	0	0
C. N.	91.5	82.5
0,05uM	62,5	65

C.N.=Control negativo: Tween 80 al 3.5%



Grafica 2. Porcentaje de sobrevivencia de larvas de tercer instar sometidas a diferentes concentraciones de aceite esencial de *P. elongatum*.

La tabla 4 y el grafico 2 muestran que a concentraciones inferiores o iguales a 0.5%, se observa que el porcentaje de sobrevivencia esta con una rango de 80-96% para el cruce ST y del 76-96% para el cruce HB; por otra parte a concentraciones superiores a 0.5%, el porcentaje de sobrevivencia es bajo, en un rango entre 46- 0 para el cruce ST y de 58-0 para el cruce HB.

El análisis de los datos obtenidos indican que el aceite esencial a concentraciones superiores a 1%, porcentaje de sobrevivencia de los individuos < 61%, por lo que es considerado toxica. Concentraciones iguales o inferiores a 0.5%, son las concentraciones consideradas sub-toxicas, debido a que el porcentaje de sobrevivencia de individuos es mayor a 61%. Por lo tanto para la evaluación del potencial genotoxico del aceite esencial de *P. elongatum*, se utilizaran concentraciones menores al 0.5%.

En ambos casos, extracto etanólico y aceite esencial, se ha observado un comportamiento similar, una relación inversamente proporcional entre las concentraciones evaluadas y el % de sobrevivencia de los individuos para ambos cruces.

El análisis de los datos de este ensayo, nos ha permitido determinar las concentraciones sub-toxicas, que para el extracto etanólico de *P. elongatum* es menor o igual a 75 mg/ml y para el aceite esencial menor o igual a 0.5% (p/v), concentraciones que serán utilizadas para la determinación del potencial genotóxico de ambas muestras.



8.2. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE EXTRACTO ETANÓLICO DE *Piper elongatum* Vahl.

Para la evaluación del potencial genotóxico se tomaron en cuenta el número de moscas nacidas, que llegaron a su etapa adulta, las que posteriormente fueron recolectadas en etanol al 70% para proceder al montaje de alas (anexo 4) para cada cruce (ST y HB) y genotipo (heterocigoto y trans- heterocigoto) de donde se obtuvieron la frecuencia de pelos mutados presentes en cada ala.

8.2.1. Cruce estándar

De las larvas que se sometieron al tratamiento crónico con el extracto a concentraciones de 25, 50 y 75 mg/ml, durante 48 horas, se han obtenido los datos del porcentaje de sobrevivencia tanto para el cruce ST y el cruce HB, analizándose el genotipo trans-heterocigoto; se evidencia una frecuencia de 1.18 de manchas simples pequeñas MSP/mosca a la concentración de 25mg/ml y una frecuencia de 0.45 MSP/mosca a una concentración de 75mg/ml del extracto etanólico de *P. elongatum*. En el control negativo se observó una frecuencia de 1.53 MSP/mosca (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico del extracto etanolico de *P. elongatum* mediante Cruce Estándar

Genotipos	Concentración (mg/ml)	N° de moscas (N)	Manchas por mosca (N° de manchas) diagnóstico estadístico ^a					Total de Manchas <i>m</i> = 2	Total de manchas <i>mwh</i> ^c (n)
			Manchas Simples Pequeñas (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	Manchas Simples Grandes (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	Manchas Gemelas <i>m</i> = 5				
<i>mwh/flr³</i>	0	30	1,53 (46)	0,20 (06)	0,10 (03)	1,83 (55)	131		
	25	40	1,18 (47) -	0,23 (09) i	0,10 (04) i	1,50 (60) -	82		
	50	40	0,33 (13) -	0,18 (07) i	0,05 (02) i	0,55 (22) -	88		
	75	40	0,45 (18) -	0,00 (00) -	0,00 (00) -	0,45 (18) -	23		
	MMC 0.05mM (Control Positivo)	20	9,90 198 +	3,35 (67) +	0,25 (05) i	13,50 (270) +	265		

^aDiagnóstico 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 $\alpha = 0,05$.

^bIncluso las manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

Control positivo: Mitomicina C 0.05 mM (0.016mg/ml)

En este cruce la mayor frecuencia observada corresponde al control negativo, observándose una disminución proporcional en la frecuencia de manchas con relación a la concentración para los grupos con tratamiento, para MSP. Los valores obtenidos mediante el paquete estadístico, muestran resultados negativos para la actividad genotóxica del extracto a las 3 concentraciones evaluadas.

Para las Manchas Simples Grandes, a la concentración de 25mg/ml se observó una frecuencia de 0.23 (MSG)/mosca, comparado con el control negativo que fue de 0.20 (MSG)/mosca, no representa significancia estadística.

La frecuencia de Mancha Gemela (MG) encontradas en el control negativo es de 0.1 MG/mosca a una concentración de 25mg/ml; una frecuencia de 0.10 MG/mosca a 50 mg/ml y una frecuencia de 0.05 MG/mosca a la concentración de 75 mg/kg, estos datos nos reportan la ausencia de Manchas Gemelas.

Los datos obtenidos nos refieren que el extracto etanólico a las concentraciones evaluadas no presenta daño genotóxicos, debido a que las frecuencias de manchas encontradas son inferiores respecto al control negativo, lo que nos indica que la genotoxicidad para el cruce ST el genotipo trans- heterocigoto, es negativo de acuerdo a los datos obtenidos mediante el paquete estadístico empleado.

8.2.2. Cruce Alta Bioactivación

En los datos obtenidos en el cruce HB, se analizó el genotipo trans-heterocigoto, reportados en la tabla 4; donde se observa una frecuencia de 1.0 MSP/moscas para el control negativo, lo cual es superior a las frecuencias obtenidas en los tratamientos con las diferentes concentraciones del extracto, mostrando en estos un rango que varía de 0.10 a 0.80 MSP/mosca, reportándose el resultado como negativo para la actividad genotóxica del extracto etanólico, según el análisis estadístico aplicado.

Para el marcador MSG la frecuencia encontrada en el control negativo es de 0.30 MSG/mosca, la cual es mayor a las frecuencias obtenidas en los tratamientos con el extracto, que varía en un rango entre 0.10 a 0.13 MSG/mosca, datos que nos permiten determinar la actividad genotóxica del extracto como negativo, para este marcador a las concentraciones evaluadas.

No se observó ningún marcador de mancha gemela (MG) en los tres tratamientos con el extracto; en el control negativo nos dio una frecuencia de 0.15 MG/mosca, estos datos nos permiten establecer que la actividad genotóxica del extracto es negativa.

Los resultados que se presentan en la tabla 6, nos muestran que el extracto no es genotóxico ya que la frecuencia de manchas encontradas es menor a la frecuencia del control negativo. Incluso se tiene ausencia de manchas gemelas que es un marcador relevante para la determinación de la genotoxicidad producida. Confirmando de esta manera que el extracto a las concentraciones evaluadas no es genotóxico.

Tabla 6. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico del extracto etanólico de *P. elongatum* mediante Cruce Alta Bioactivación

Genotipo	Concentración (mg/ml)	N° de moscas (N)	Manchas por mosca (N° de manchas) diagnóstico estadístico ^a							
			Manchas Simples Pequeñas (1-2 céls) ^b m = 2		Manchas Simples Grandes (>2 céls) ^b m = 5		Manchas Gemelas m = 5		Total Manchas m = 2	de Total de manchas mwh ^c (n)
<i>mwh/flr³</i>	0	20	1,00 (20)	0,30 (06)	0,15 (03)	1,45 (29)		59		
	25	30	0,53 (16) -	0,10 (03) -	0,00 (00) -	0,63 (19) -		30		
	50	30	0,80 (24) -	0,13 (04) -	0,00 (00) -	0,93 (28) -		40		
	75	30	0,10 (03) -	0,10 (03) -	0,00 (00) -	0,20 (06) -		18		
	MMC 0.05mM (Control Positivo)	20	4,70 (94) +	2,20 (44) +	0,15 (03) i	7,05 (141) +		138		

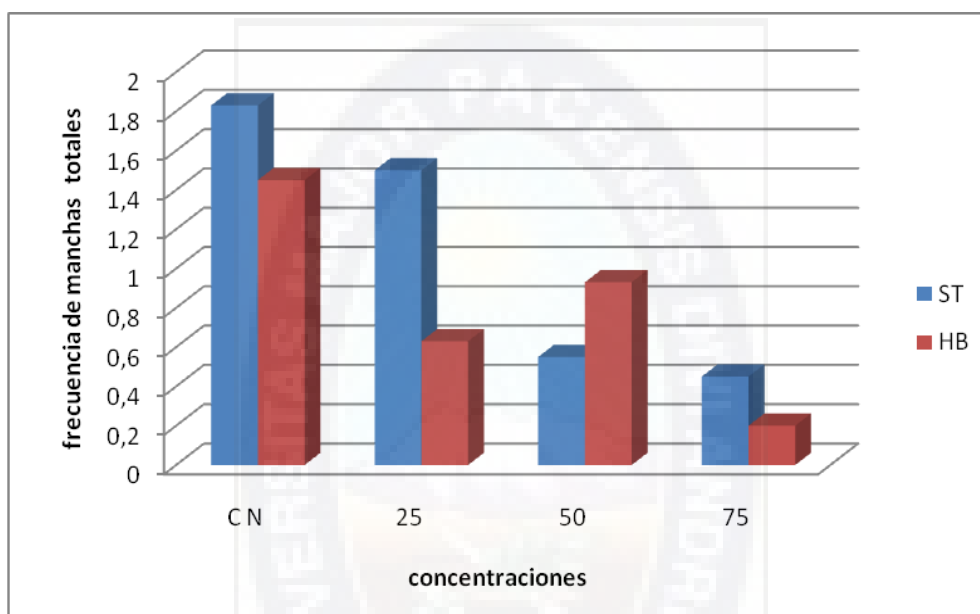
^aDiagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = 0,05$

^bIncluso las manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

Control positivo: Mitomicina C 0.05 mM (0.016mg/ml)

Realizando el análisis comparativo de la frecuencia total de manchas entre el cruce ST y HB; se puede observar que la frecuencia máxima es de 1.5 total de manchas (TM)/mosca a 25 mg/ml y la mínima frecuencia de 0.45 a una concentración de 75 mg/ml para el cruce ST; para el cruce HB la frecuencia máxima es de 0.93 TM/mosca a 50 mg/ml y la frecuencia mínima es de 0.45 a 75 mg/ml como se puede observar en la Gráfica 3.



Gráfica 3. Comparación de la frecuencia total de Manchas encontrada en el cruce Estándar y Alta Bioactivación, después del tratamiento con el extracto etanólico de *P. elongatum*.

El análisis comparativo del total de manchas entre el cruce ST y HB en relación al control negativo, nos demuestran que el extracto etanólico de *P. elongatum*, **no presenta un efecto genotóxico** a las concentraciones evaluadas.

8.3. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTOXICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper elongatum* Vahl

8.3.1. Cruce Estándar

Las larvas de tercer instar del cruce ST fueron sometidas a tratamiento crónico, por 48 horas, a las concentraciones sub- tóxicas encontradas en la evaluación de toxicidad 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 %, analizándose el genotipo trans-heterocigoto. Los datos obtenidos permiten determinar una frecuencia de 0.40 manchas simples pequeñas MSP/mosca, a una concentración de 0.01% y 0.05% del aceite esencial de *P. elongatum*; a una concentración máxima de 0.5% la frecuencia encontrada fue de 0.75 MSP/mosca; en el control negativo la frecuencia de manchas encontradas fue de 1.00 MSP/mosca (ver Tabla 7).



Tabla 7. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico del Aceite esencial de *P. elongatum* mediante Cruce Estándar

Genotipo	Concentración (mg/ml)	N° de moscas (N)	Manchas por mosca (N° de manchas) diagnostico estadístico ^a												
			Manchas Simples Pequeñas (1-2 céls) ^b m = 2		Manchas Simples Grandes (>2 céls) ^b m = 5		Manchas Gemelas m = 5		Total de Manchas m = 2		Total de manchas mwh ^c (n)				
<i>mwh/flr³</i>	0	20	1,00	(20)	0,30	(06)	0,15	(03)	1,45	(29)		59			
	0,01	20	0,40	(08)	-	0,05	(01)	-	0,45	(09)	-	11			
	0,05	20	0,40	(08)	-	0,10	(02)	-	0,50	(10)	-	28			
	0,1	20	0,60	(12)	-	0,10	(02)	-	0,70	(14)	-	16			
	0,5	20	0,75	(15)	-	0,25	(05)	i	0,05	(01)	i	1,05	(21)	-	57
	MMC 0.05mM (Control Positivo)	20	9,90	198	+	3,35	(67)	+	0,25	(05)	i	13,50	(270)	+	265

^aDiagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = 0,05$

^bIncluso las manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

Control positivo: Mitomicina C 0.05 mM (0.016mg/ml)

En este cruce, la mayor frecuencia observada, respecto a MSP corresponde al control negativo, y los resultados demuestran una disminución en la frecuencia de manchas en relación a la concentración de cada tratamiento. La interpretación de estos valores mediante el paquete estadístico, demuestra un resultado negativo para la actividad genotóxica del aceite esencial, a las concentraciones evaluadas.

Respecto a las manchas simples grandes (MSG), la frecuencia encontrada fue de 0.05 MSG/mosca a una concentración de 0.01% y de 0.25 a una concentración 0.5%; las cuales están por debajo de la frecuencia del control 0.30 MSG/mosca, información que permite determinar que la genotoxicidad frente a este marcador es negativa.

En cuanto a la frecuencia de mancha gemela (MG), se ha determinado 0.15 MG/mosca para el control negativo. Comparando con los grupos de tratamiento, se ha observado que el rango de frecuencia de manchas está por debajo, entre 0.00 - 0.05 MG/mosca. De acuerdo al análisis estadístico. Estos datos nos indican que el aceite esencial no presenta actividad genotóxica a ninguna de las concentraciones evaluadas, en comparación con el control negativo.

Los resultados obtenidos muestran que en ninguno de los marcadores analizados MSP, MSG y MG, el aceite esencial a concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 % no presenta genotoxicidad; sin embargo a la concentración de 0.5% los resultados obtenidos son inconclusos debido a que el número de manchas encontradas no son suficientes para poder establecer si el aceite esencial no presenta genotoxicidad a esa concentración

8.3.2. Cruce Alta Bioactivación

En los datos obtenidos en el cruce HB se analizó el genotipo trans-heterocigoto los cuales se reportan en la tabla 8.

El análisis de los datos de las manchas simples pequeñas (MSP), se observó una frecuencia de 1.0 MSP/moscas, para el control negativo, que es superior a las frecuencias obtenidas en los tratamientos con el aceite esencial de *P. elongatum*, que varía en un rango de 0.70 a 0.10 MSP/mosca, llegando a reportar. Comparando estos datos con el control negativo, aplicando el análisis estadístico, nos permiten determinar que el aceite esencial no es genotóxico a las concentraciones evaluadas.

Para el marcador MSG, la frecuencia encontrada en el control negativo es de 0.30 MSG/mosca, mayor a la frecuencia de los tratamientos con el aceite esencial, en un rango que varía entre 0.05 a 0.07 MSG/mosca para la mínima y máxima concentración empleada respectivamente.

Por otra parte respecto al marcador de manchas gemelas MG, no se ha observado presencia de las mismas a las concentraciones evaluadas, a excepción del control negativo que presentó una frecuencia de 0.15 MG/mosca, lo cual nos demuestra que los resultados son negativos. Determinándose, que el aceite esencial no es genotóxico para este marcador a las concentraciones evaluadas, ya que los resultados evidencian que la frecuencia de manchas encontradas está significativamente más bajo que la frecuencia del control negativo.

Tabla 8. Análisis Estadístico del Potencial Genotóxico del aceite esencial de *P.elongatum* mediante Cruce Alta Bioactivación

Genotipo	Concentración (mg/ml)	N° de moscas (N)	Manchas por mosca (N° de manchas) diagnóstico estadístico ^a					Total de manchas mwh ^c (n)
			Manchas Simples Pequeñas (1-2 céls) ^b m = 2	Manchas Simples Grandes (>2 céls) ^b m = 5	Manchas Gemelas m = 5	Total de Manchas m = 2		
<i>mwh/flr</i> ³	0	20	1,00 (20)	0,30 (06)	0,15 (03)	1,45 (29)	59	
	0,01	20	0,70 (14) -	0,05 (01) -	0,00 (00) -	0,75 (15) -	14	
	0,05	20	0,15 (03) -	0,00 (00) -	0,00 (00) -	0,15 (03) -	4	
	0,1	20	0,10 (02) -	0,05 (01) -	0,00 (00) -	0,15 (03) -	11	
	0,5	15	0,53 (08) -	0,07 (01) -	0,00 (00) i	0,60 (09) -	11	
	MMC 0.05mM (Contr. Positiv.)	20	4,70 (94) +	2,20 (44) +	0,15 (03) i	7,05 (141) +	138	

^aDiagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = 0,05$.

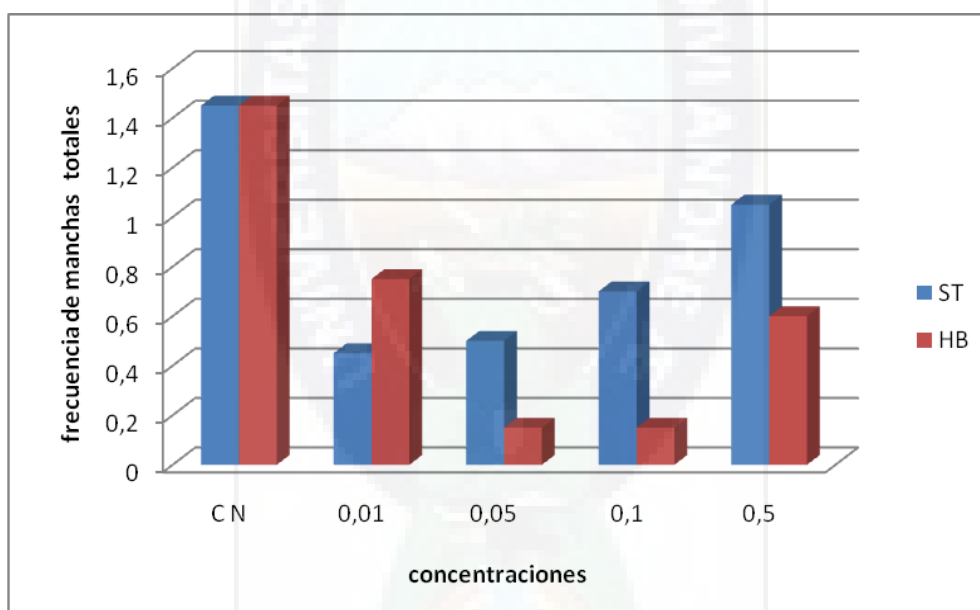
^bIncluso las manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

Control positivo: Mitomicina C 0.05 mM (0.016mg/ml)

En el Gráfico 4, se muestra la comparación del total de manchas TM del cruce ST y HB del aceite esencial de *P. elongatum*. Donde podemos observar que la frecuencia del total de manchas para el cruce ST aumenta en relación a las concentraciones evaluadas, sin embargo estos datos son menores que el obtenido para el control.

Por otro lado, la frecuencia del total de manchas para el cruce HB, no presenta un comportamiento similar que el ST, observándose una frecuencia de 0.75 TM/mosca a la concentración de 0.01 %, mayor que los obtenidos para concentraciones superiores como es el caso del 0.5%, sin embargo estos datos de frecuencia son menores que el obtenido para el control 1.45 TM/moscas.



Gráfica 4. Comparación de la frecuencia total de Manchas en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación, después del tratamiento con aceite esencial *P. elongatum*.

En el gráfico 4 se puede observar que a las concentraciones evaluadas del aceite esencial, la frecuencia total de manchas es menor tanto para el cruce ST y HB, respecto al control negativo.

El análisis estadístico de todos estos datos nos indica, que el aceite esencial no evidencia actividad genotóxica mediante la técnica de SMART.

La observación de una baja frecuencia de MSP/mosca en el cruce ST, a las concentraciones evaluadas, tanto para el extracto etanólico como el aceite esencial, nos indican que sus componentes 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 manchas simples pequeñas, en relación a las manchas simples grandes, las cuales se presentan cuando el compuesto actúa en las etapas iniciales de división mitótica.²⁰

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 mancha simple pequeña y mancha simple grande. Estos resultados sugieren que los compuestos presentes en el extracto y aceite esencial al pasar por la ruta metabólica vía Citocromo P-450 se convierten en metabolitos menos activos, que aquellos que sufren metabolización, considerando que el Cruce HB posee un nivel elevado del citocromo P-450 en comparación con el cruce ST, sugiriendo así que el extracto no posee capacidad pro-mutagénica o sus componentes no sufren metabolización por la Vía Citocromo P – 450, mediante la prueba de mutación y recombinación somática²⁰

Es importante esta observación pues existen compuestos que reportaron resultados negativos en el cruce ST, detectándose que su actividad mutagénica solo mediante el cruce HB, tal es el caso de nitro derivados⁶⁴, o compuestos como el safrol y eugenol, que son genotóxicos de acción directa.

Los resultados obtenidos en la evaluación genotóxica del extracto etanólico muestran que el mismo no es genotóxico, mediante el cruce ST en *D. melanogaster*, debido a que la frecuencia total de manchas encontradas en las tres concentraciones evaluadas son inferiores a las del control negativo. Respecto al aceite esencial los datos obtenidos muestran un comportamiento similar a los del extracto etanólico, debido a que a las concentraciones

evaluadas dieron una frecuencia total de manchas para el cruce ST que son menores a las del control negativo.

Si comparamos las frecuencias de manchas totales encontradas tanto en el extracto etanólico como en el aceite esencial de *P. elongatum* Vahl, con las de la Mitomicina C, se observa que las frecuencias encontradas en el aceite esencial son significativamente inferiores a las frecuencias de Manchas Totales reportadas con Mitomicina C, a concentraciones de 0.05 mM (0.016mg/ml)⁷⁰

La frecuencia total de manchas en las moscas trans-heterocigotas no posee un incremento estadísticamente significativo, interpretando este resultado como negativo para el cruce ST, lo que significa que tanto el extracto etanólico y el aceite esencial no son capaces de producir mutaciones puntuales, disyunción, delección o recombinación, sugiriendo así que ambas muestras no poseen actividad mutagénica directa mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática.

En el presente estudio, el aceite esencial y el extracto etanólico de *P. elongatum*, tanto para los mutágenos directos como los indirectos en las concentraciones evaluadas, nos da una respuesta negativa, razón por la cual se descarta a la especie vegetal *P. elongatum* Vahl como agente recombinogénico, mediante la prueba de SMART, debido a que el total de manchas no presenta un incremento estadísticamente significativo dando como expresión fenotípica la formación de Manchas Simples Pequeñas en un número mayor a las Manchas Simples Grandes y la ausencia de Manchas Gemelas nulas. En la mayoría de los casos, estas últimas son producidas exclusivamente por la recombinación mitótica, lo que indica que, tanto el aceite esencial como el extracto etanólico no inducen a una recombinación mitótica en forma directa sobre el DNA ni de manera indirecta, en cuanto a las manchas simples pueden ser producidas por varios mecanismos.²⁶

El análisis de los datos obtenidos en este estudio sugieren que el extracto etanólico y el aceite esencial, no poseen la capacidad de promover el

desarrollo de procesos cancerígenos, debido a que el proceso de recombinación mitótica inhibe la acción de los genes supresores de tumores siendo en muchos casos un factor desencadenante de cáncer.



9. CONCLUSIONES

La identificación taxonómica realizada en el Herbario Nacional de Bolivia confirma que las plantas colectadas corresponden a la especie *Piper elongatum* Vahl.

Concentraciones superiores a 75mg/ml del extracto etanólico de *Piper elongatum* Vahl son tóxicas para evaluar genotoxicidad en *Drosophila melanogaster*.

Concentraciones superiores a 0.5% p/v del aceite esencial de *Piper elongatum* Vahl son tóxicas para evaluar genotoxicidad en *Drosophila melanogaster*.

El extracto total etanólico de *P. elongatum* no ejerce una actividad genotóxica directa y tampoco una actividad genotóxica indirecta detectada por el test de mutación y recombinación somática SMART de *Drosophila melanogaster*.

El aceite esencial de *P. elongatum* no demuestra actividad genotóxica directa y tampoco actividad genotóxica indirecta detectada por el test de mutación y recombinación somática SMART de *Drosophila melanogaster*.

El estudio de la genotoxicidad de esta planta *P. elongatum*, es relevante ya que es una especie ampliamente utilizada en la medicina tradicional boliviana por sus propiedades cicatrizantes y antiinflamatorias, y es importante contar con este tipo de estudios que reportan datos importantes para la salud pública.

10. RECOMENDACIONES

Con respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo con ayuda del test de SMART se recomienda realizar más pruebas de genotoxicidad en los sistemas de ensayo de eucariotas para una evaluación final. De esta manera poder tener la certeza que un compuesto pueda ser declarado no genotóxico dando resultados por lo menos en tres pruebas de genotoxicidad, en organismos complejos (no bacterias) que tengan la capacidad de producir aberraciones cromosómicas⁷¹. Así también se recomienda profundizar el estudio sobre la toxicidad del aceite esencial.



11. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Flores N (2001) Metabolitos Bioactivos aislados de cinco especies Piper con actividad antiparasitaria y/o leishmanicida. Tesis para optar el título de *Magister Scientiarum* en Ciencias Biológicas y Biomédicas en la mención de Fitofarmacia. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. La Paz, Bolivia.
- ² Betancourt A (2002) Ganan 40 Mil millones de dolares al año por venta de fármacos basados en medicina tradicional. Explotan laboratorios el conocimiento indígena. Reportaje de periódico. La Jornada, Lunes en la Ciencia, México
- ³ Centro de Noticias OPS/OMS Bolivia (2004) OMS advierte sobre las medicinas alternativas. BBC Mundo. Londres, Inglaterra.
- ⁴ Vidaurre P (2006) Plantas medicinales en los Andes de Bolivia. Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. 268-284
- ⁵ Organización de las Naciones Unidas para el desarrollo industrial, Subdivisión de Promoción de Inversión y Tecnología, Gobierno de Bolivia, Ministerio de Planificación y Desarrollo, Viceministerio de Ciencia y Tecnología (2007) Plantas Medicinales en Bolivia. Estado del Arte. La Paz, Bolivia
- ⁶ Claros M (2006) Determinación de la actividad anti –*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *verbena ofiucinalis*, *clinopodium bolivianum*, *caléndula ofiucinalis* *Piper angustifolium* y *Rubus boliviensis* por el método de difusión de disco. Tesis para optar al título de Química Farmacéutica, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, UMSA. La Paz, Bolivia
- ⁷ Flores E, Vargas F, Gimenez A, Jiménez A (2001) Aislamiento y caracterización de los principios antifúngicos y leishmanicidas del Matico - *Piper elongatum* Vahl. *BIOFARBO*. IX-Diciembre : 45-50
- ⁸ Palacios V (1997) “Plantas Medicinales Nativas”. *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYTE*. 2º Edición, Lima. Perú.

-
- ⁹ Analisis Físico y Químico de Piper Angustifolium (Matico)
Http://Pdf.Rincondelvago.Com/Analisis-Fisico-Y-Quimico-De-La-Piper-Angustifolium.Html. [Fecha de acceso el 20 de mayo del 2008]
- ¹⁰ VANDER A (1972) Plantas medicinales. *editorial: SINTES*. Barcelona, España
- ¹¹ Palacios V J(1993) Plantas Medicinales Nativas del Perú. Lima: *CONCYTE*
- ¹² Lipkin M (1971) Progress report: in Defense of the gastric mucosa. *Gut*. 12: 599-603.
- ¹³ Fonc Her (1986) Plantas medicinales y sus principios activos. *Editorial: AELUZ*. Madrid, España
- ¹⁴ Abbas A, Abu S, Sarmina Y, Mohal K, Aby S (2008) Characteristics of Seed Oils and Nutritional Compositions of Seeds from Different Varieties of Momordica charantia Linn. *Cultivated in Bangladesh Czech Journal of Food Sciences and Agricultural Journals* 4: 275-283
- ¹⁵ Montero R, Perez G, Fernandez E, Bada A, Arteaga E, Mancebo A(2001) mutagénesis, médula ósea, micronúcleos, plantas medicinales. *Revista de Toxicología*, 18: 75-78.
- ¹⁶ Tiburi M, Reguly, M, Schwartzmann G, Cunha K, Lehman M, Rodriguez H (2002) Comparative genotoxic effect of vinblastine, and vinorelbine in somatic cells Of *Drosophila melanogaster*. 26; 519 (1-2):141-9.
- ¹⁷ Chesis L, Levin E, Smidt T ,Ernstert L., Ames N (1984) Mutagenicity of quinones plants of metabolic activation and detoxification (benzolapyrene quinines/oxygen radicals/NADP-cytochrome P-450 reductase). *Proc. Natl. Acad. Sci.USA Biochemistry*. 81: 1696 -1700.
- ¹⁸ Jowett T, Mustafa Fadzil F, Oxtoby E. and Wolf R (1991) Mammalian genes expressed in *Drosophila*: a transgenic model for the study of mechanisms of chemical mutagenesis and metabolism. *The EMBO Journal*. 10 (5): 1075-1081.
- ¹⁹ Genotoxicidad y Medio Ambiente www.farbio.edu.bo [Fecha de acceso 11 de septiembre, 2009]

-
- ²⁰ Las toxinas ambientales y la genética:
<http://es.geocities.com/ecored2000/coctel.html>[Fecha de acceso 11 de septiembre, 2009]
- ²¹ Butler E (1992) The molecular biology of G6PD Variants and other red cell defects. *ANNU Revist Medic.* 43:47-59.
- ²² Wai Nang C (2001) Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment
- ²³ Frei H, Würigler F (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research.* 334: 247-258.
- ²⁴ Würigler F, Vogel E (1986) In vivo mutagenicity testing using cells of *Drosophila melanogaster*. In: De Serres, F, J. *Chemical mutagens, Principles and Methods for their detection*, Plenum Press, New York, 10: 1-72
- ²⁵ Sánchez A, Fonseca L, Capiro N, Fernández D (2000) Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Revista Cubana Farmacología* . 34 (1): 34 – 43.
- ²⁶ Ribeiro R, Favero D, Kanan E (2006) Mutagênese Ambiental. ed da Ulbra. Brasil. 2º ed. 281-307
- ²⁷ Graf U, Singer D (1992.) Genotoxicity testing of promutagens in the wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 8:15-27
- ²⁸ Vogel E, Zijlstra, J (1987). Mechanistic and methodological aspects of chemically induced somatic mutation and recombination in *Drosophila*. *Mutation Research.* 182: 243-264
- ²⁹ Ramos P (2000) Reducción de factores de confusión en la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas de *Drosophila*. respuestas enmascaradas. Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D F. 04510, México

-
- ³⁰ Ramos P (2000) Reducción de factores de confusión en la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas de *Drosophila*. respuestas enmascaradas. Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D F. 04510, México
- ³¹ Ribeiro, R., Rodríguez H (2002) Métodos para o diagnóstico da exposição genotóxica ambiental e ocupacional. 1º ed. ed Ulbra. Brasil. 1-500
- ³² Stryer L (1995) Bioquímica. 4º ed, Reverté S.A. Barcelona, España.
- ³³ Graf U, Würigler, F, Frei H (1985) Investigation of spots in *Drosophila* genotoxicity tests. Food Chemical Toxicology. 19: 35-42
- ³⁴ Graf, U (1998) Segundo taller sobre SMART: un método para detectar las Actividades Mutagénica y Recombinogénica en Células Somáticas de *Drosophila* en la Universidad Federal de Uberlandia (MG), Brasil. Revista Internacional de Contaminación ambiental. 14:111-114
- ³⁵ Ribeiro R, Rodríguez H (2002) Métodos para o diagnóstico da exposição genotóxica ambiental e ocupacional. 1-500
- ³⁶ UICN, OMS, WWF (1993) Directrices sobre conservación de plantas medicinales. Organización mundial de la Salud (OMS). Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) and World Wildlife Fund (WWF), Gland.
- ³⁷ Organización Mundial de la Salud (2004) Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Ginebra, Suiza.
- ³⁸ Beck S, Paniagua N, Paz C (1999) Potenciales de los recursos fitogenéticos nativos de Bolivia. 1-3.
- ³⁹ Giménez A, Ibisch P (2003) Uso de la biodiversidad como recurso genético. 313-323.
- ⁴⁰ Fernández, G (1999) Médicos y Yatiris: Salud e interculturalidad en el Altiplano Aymara. Cuadernos de Investigación CIPCA. La Paz, Bolivia. 51: 1-276.
- ⁴¹ Girault L (1987) Kallawaya, Curanderos Itinerantes de los Andes. UNICEF-OPS-OMS, La Paz, Bolivia. p 670
- ⁴² Loza C (2005) Kallawaya. Reconocimiento mundial a una ciencia de los Andes. Editores: UNESCO, Viceministerio de Cultura de Bolivia, Fundación Cultural Banco Central de Bolivia, La Paz, Bolivia. p180

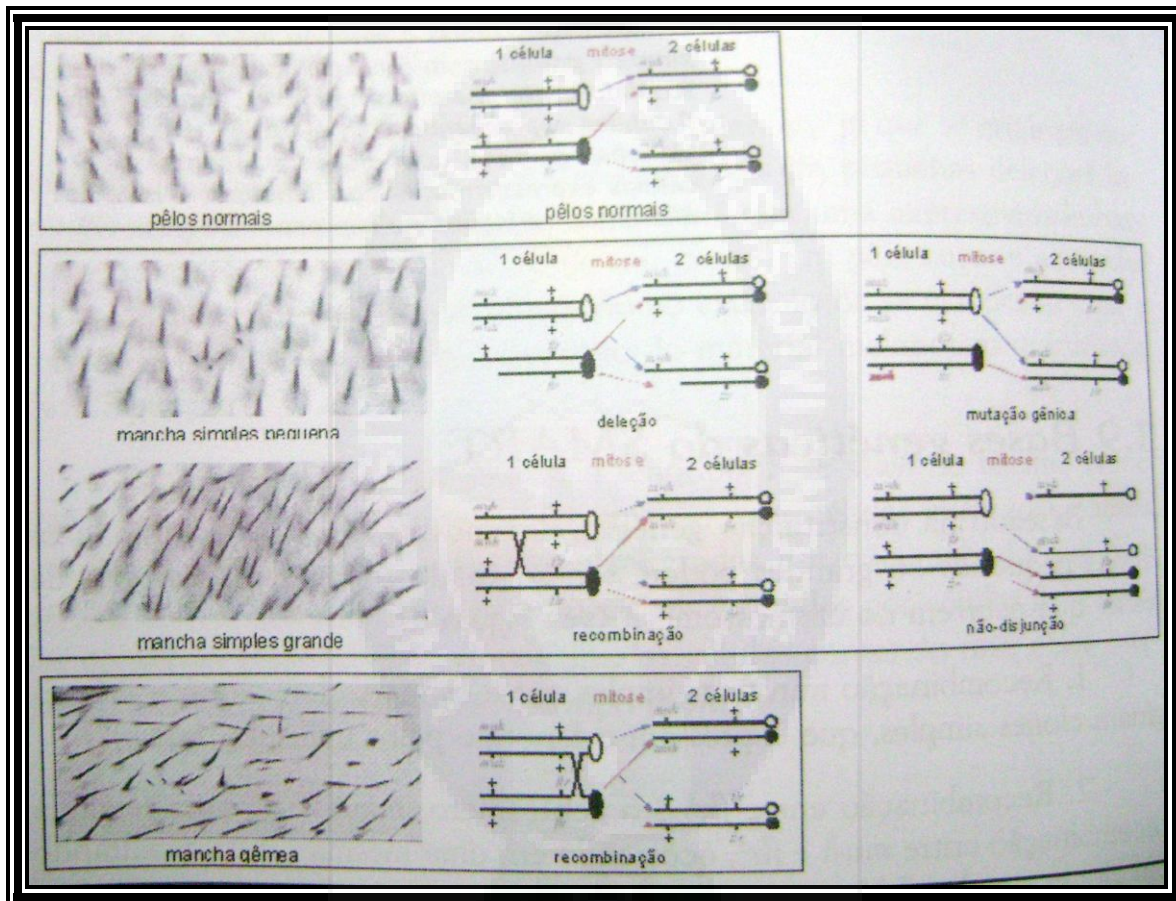
-
- ⁴³ Abelson P (1990) *Medicine from Plants*. Science. 247-513
- ⁴⁴ Bourdy G, Gimenez A, Quenevo C (1999). Tacana: Ecuánasha Aquí, Ecuánasha Idírene Cuana, Me Schanapaque. Tacana: Conozcan nuestras plantas, nuestras hierbas. 1° ed. editores: UMSA: IIFB-IIQ-IBBA, FONAMA-EIA, IRD (ex Orstom), ed Plural, La Paz, Bolivia
- ⁴⁵ Ministerio de Desarrollo Sostenible y Planificación (2001) *Estrategia Nacional de Conservación y uso sostenible de la Biodiversidad*. La Paz, Bolivia
- ⁴⁶ Ministerio de Desarrollo Sostenible y Planificación, Viceministerio de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Desarrollo Forestal, Dirección General de Biodiversidad (2002) *Diagnóstico sobre el Biocomercio en Bolivia y Recomendaciones para la puesta en marcha del Programa Nacional de Biocomercio Sostenible*. La Paz, Bolivia
- ⁴⁷ Fundación Bolivia Exporta (2004) *Diagnóstico sobre biocomercio en Bolivia y recomendaciones para la puesta en marcha del Programa Nacional de comercio Sostenible*, Ministerio de Desarrollo Sostenible, Viceministerio de Recursos Naturales y Medio Ambiente, Dirección General de Biodiversidad, La Paz. 165 p.
- ⁴⁸ Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial Subdivisión de Promoción de Inversión y Tecnología-Gobierno de Bolivia Ministerio de Planificación del Desarrollo Viceministerio de Ciencia y Tecnología (2007) *Plantas Medicinales en Bolivia Estado de Arte*. La Paz, Bolivia.
- ⁴⁹ Mac Bride J (1937) *Flora del Perú*. Ed. Publ. Field Museum Natural History Bot. Tomo II
- ⁵⁰ Tebbs M, Kubitzki K, Rohwer J, Bittrich V (1993) «Piperaceae». *The Families and Genera of Vascular Plants. II. Flowering Plants - Dicotyledons.* Springer-Verlag: Berlín. ISBN 3-540-55509-9.
- ⁵¹ Mamani B (1999) *Metabolitos secundarios bioactivos de la flora medicinal iberoamericana: Piper elongatum, Copaifera paupera, crossopetalum tonduzii y Maytenus cuzcoina.*». tesis Doctoral, Departamento de Química Orgánica. Universidad de la Laguna.
- ⁵² Alonzo J (1998) *Tratado de fitomedicina. Bases clínicas y farmacología*. ed Iris. Buenos Aires, Argentina.
- ⁵³ Cabrera A, Zardini E (1978) *Manual de Flora de los alrededores de Buenos Aires*.

-
- ⁵⁴ Gilg F, Brandt W (1926) "Farmacognosia". ed. Labor, Barcelona-Buenos Aires, p. 97-98
- ⁵⁵ Youngken, H (1946) "Phamzaceutical Botany": Blakiston, p. 4
- ⁵⁶ Youngken, H (1951) "Tratado de Farmacognosia" ed Atlante, México. p 321-323
- ⁵⁷ Ibisch P, Mérida G. (editores.) (2002). Biodiversidad: La Riqueza de Bolivia. Estado de Conocimiento y Conservación. Ministerio de Desarrollo Sostenible, Editorial FAN, Santa Cruz de la Sierra.
- ⁵⁸ HIPERnatural.com. <http://www.hipernatural.com/es/pltmatico.html> [fecha de acceso 02 de abril del 2009]
- ⁵⁹ Napralert (1997) Profile for Piper elongatum. Program for Collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences. College of Pharmacy of the University of Illinois. Chicago.
- ⁶⁰ Palacios J (1995) "Plantas Medicinales Nativas del Perú".
- ⁶¹ Taylor (2006) «Technical Data Report for Matico (Piper aduncum, angustifolium)» (en inglés) (PDF). Raintree Nutrition, Inc. [Consultado el 29 marzo 2009].
- ⁶² Hernández N, Ramos A, Visozo A (2006) Evaluación toxica y genotóxica del extracto fluido de Piper auritum H.B.K. Revista Cubana Plantas Medicinales 11:3-4
- ⁶³ Montero C, Perez G, Fernandez E, Bada A, Arteaga E, Mancebo A (2001) Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. Revista de Toxicología 18: 75-78.
- ⁶⁴ Ribeiro R, Rodrigues H (2003) Métodos Para Diagnostico Da Exposição Genotóxica Ambiental e Ocupacional. Mutagenese Ambiental. Rio Grande De Soul: Ed Ulbra: 173-2000
- ⁶⁵ Graf U, Spano M, Guzman G, Suresh K, Andrade E (2000) The Wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) In Drosophila Melanogaster. Electronic Journals: African Newsletter: 1996-01
- ⁶⁶ Graf, U & Würigler, F (1986) Investigation of coffee in Drosophila genotoxicity tests. Food Chemistry Toxicology. 24: 835-842.

-
- ⁶⁷ Graf U, Würzler F, Katz A, Frey H. (1984) Somatic Mutation and recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis* 6:153-188
- ⁶⁸ Graf U, Würzler, F(1986) Investigation of coffee in *Drosophila* genotoxicity tests. *Food. Chemistry Toxicology*. 24: 835-842
- ⁶⁹ Graf U, Würzler, F, Katz A, Frei H (1984) Somatic and Recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental molecular Mutagenesis*.6:153-188
- ⁷⁰ Gonzales M (2006) Evaluación de la actividad genotóxica de Ciclofosfamida y Mitomicina C mediada por su biotransformación empleando el Test de Mutación y Recombinación Somática: SMART. Tesis de licenciatura. Carrera de Química farmacéutica. UMSA
- ⁷¹ Frei H, Würzler F (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*.203:297-308

ANEXOS

Anexo 1



Base genética de la prueba de SMART en alas, ilustrando las diferentes formas de pelos cuando ocurre la formación de manchas expresando los genes marcadores *mwh* y *flr³*.note que los cromosomas homólogos se encuentran duplicados antes de la mitosis

Anexo 2.

PLANTAS COLECTADAS POR: ANA PAULA JIMENEZ DASILBA

Determinadas por: Emilia Garcia y Javier Quisbert

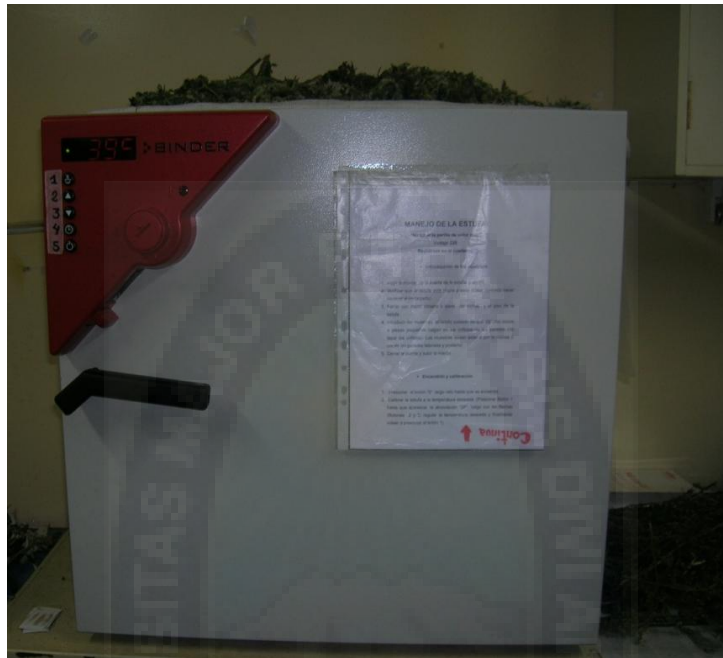
Fecha: marzo de 2008

1 Piperaceae *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.

2 Piperaceae *Piper elongatum* Vahl



Anexo 3
Estufa de secado mArca Binder



**Fotografía tomada en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
Tomada en abril del 2008**



**Fotografía tomada en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
Toma en fecha abril del 2008**



Proceso de filtración del extracto
Fotografía tomada en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas



Proceso de rota vaporación del extracto etanólico de *Piper elongatum* Vahl
Fotografía tomada en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas

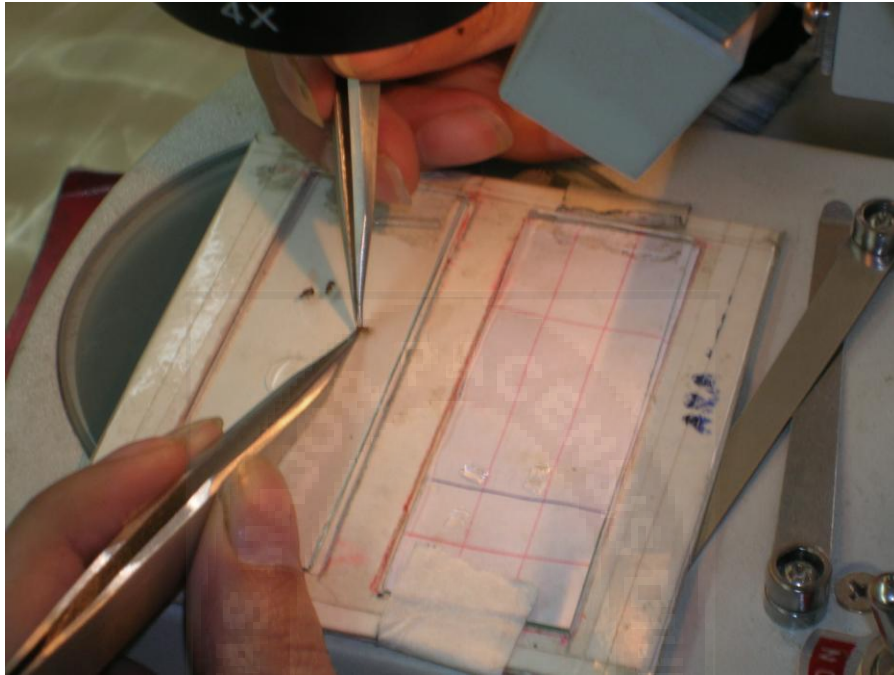
ANEXO 4



Fotografía de Cruces entre *mwh* y *flr3*(Cruce ST); *M}mwh* y *ORR*(Cruce HB) tomada en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímica en fecha 23 de mayo del 2009



Montaje de alas conayuda de un estereomicroscopio marca Quimix tomada en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímica en fecha 30 de mayo del 2009



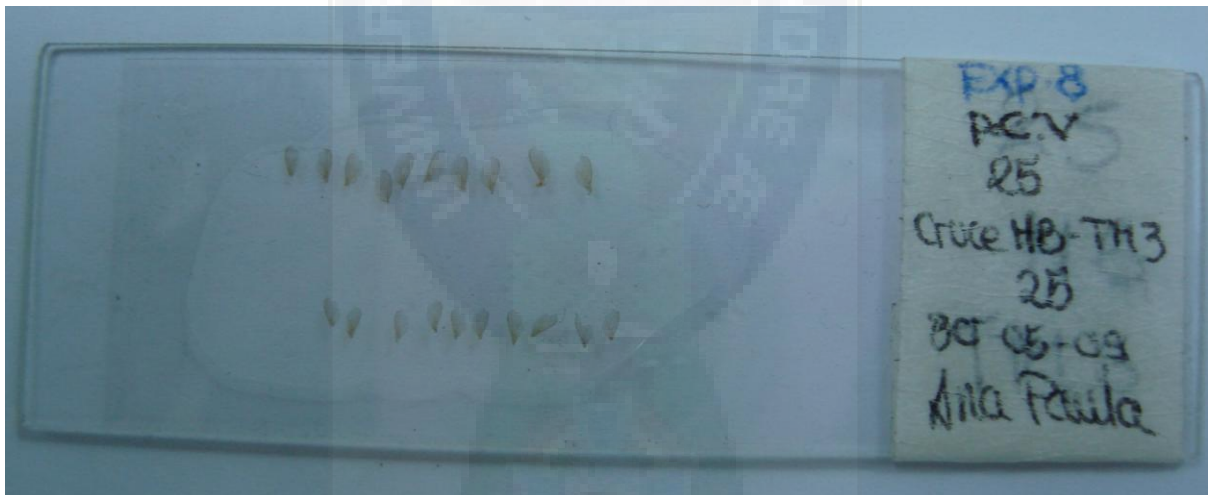
Proceso de sepracion de alas de las moscas, para proceder al montaje de las mismas en portaobjetos con ayuda de la goma arabiga tomada en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímica en fecha 30 de mayo del 2009



Alas montadas en un porta objetos



**Fijación de las alas de las moscas con tratamiento en plancha caliente
Modelo Quimix
tomada en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímica en fecha 30
de mayo del 2009**



**Placa con alas montadas del cruce HB, (TM3), lista para la lectura
tomada en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímica en fecha junio
del 2009**



GLOSARIO

Antineoplásico. Son sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento, y/o proliferación de células tumorales malignas. Estas sustancias pueden ser de origen natural, sintético o semisintético.

Cáncer. Es un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas (conocidas como cancerígenas o cancerosas), con crecimiento y división más allá de los límites normales, (invasión del tejido circundante y, a veces, metástasis).

Carcinógeno o cancerígeno. tanto físico, como químico o biológico, es aquél que puede actuar sobre los tejidos vivos de tal forma que produce cáncer. Generalmente, el término se refiere a aquellos agentes que han sido introducidos por el hombre, pero puede usarse para toda sustancia que tiende a causar cáncer.

Convencional. Que se acepta por acuerdo entre personas, empresas, instituciones o países: la longitud del metro es una medida convencional. Que es muy común o no tiene nada de espontáneo u original.

Disco imaginal. Son órganos de la mosca adulta se desarrollan a partir de sacos epiteliales que crecen en el interior de la larva. Cada disco da lugar a un conjunto de órganos determinados en adultos como ojos, antenas o alas.

Embriogénesis. Proceso de división y diferenciación celular que se inicia tras la fertilización de los gametos para dar lugar al embrión, en las primeras fases de desarrollo de los seres vivos pluricelulares. En el ser humano este proceso dura unas ocho semanas, momento a partir del cual el producto de la concepción acaba su primera etapa de desarrollo y pasa a denominarse feto.

Etnia. "pueblo" o "nación", es una población humana en la cual los miembros se identifican entre ellos, normalmente con base en una real o presunta genealogía y ascendencia común, o en otros lazos históricos.

Fenotipo. Expresión del genotipo en un determinado ambiente. Los rasgos fenotípicos incluyen rasgos tanto físicos como conductuales. Es importante destacar que el fenotipo no puede definirse como la "manifestación visible" del genotipo, pues a veces las características que se estudian no son visibles en el individuo, como es el caso de la presencia de una enzima.

Gameto. Son unas células sexuales haploides de organismos pluricelulares que reciben nombres diferentes según el sexo al cual pertenezcan y son más comúnmente conocidos como óvulos y espermatozoides. En otras palabras, son células compuestas por un solo juego de cromosomas (es decir que tienen solo una versión de la información genética que determinará las características físicas de la persona) que más tarde se fusionarán con otro gameto del sexo opuesto durante la fecundación para formar el cigoto.

gen p53 .Gen del factor de **transcripción** supresor de tumores en la especie humana, cuyo daño o **mutación** parece ser responsable de más del 60% de todos los tumores cancerígenos. Si, a pesar de la presencia de la **proteína** p53, una célula con su ADN dañado comienza a dividirse de forma incontrolada, el gen *p53* desencadena la **apoptosis** para prevenir la formación del tumor.

Genética. Es el campo de la biología que se encarga del estudio de la herencia y de todo lo relacionado a ella. El concepto también hace referencia a aquello perteneciente o relativa a la génesis u origen de las cosas. La genética, por lo tanto, analiza cómo la herencia biológica es transmitida de una generación a la siguiente, y cómo se efectúa el desarrollo de las características que controlan estos procesos.

Genoma. Es todo el material genético contenido en las células de un organismo en particular. Por lo general, al hablar de genoma en los seres eucarióticos nos referimos sólo al ADN contenido en el núcleo, organizado en cromosomas.

Genotipo. Es el contenido genético (el genoma específico) de un individuo, en forma de ADN. Junto con la variación ambiental que influye sobre el individuo, codifica el fenotipo del individuo. De otro modo, el genotipo puede definirse como el conjunto de genes de un organismo y el fenotipo como el conjunto de rasgos de un organismo. Por tanto, los científicos y los médicos hablan a veces por ejemplo del genotipo de un cáncer particular, separando así la enfermedad del enfermo. Aunque pueden cambiar los codones para distintos aminoácidos por una mutación aleatoria (cambiando la secuencia que codifica un gen), eso no altera necesariamente el fenotipo.

Heterocigoto. (hetero, desigual; cigoto, huevo) (o híbrido) Individuo con alelos no idénticos para un determinado gen o genes. La condición se denomina "heterocigosis". es en Genética un individuo diploide que para un gen dado (locus), tiene en cada uno de dos cromosomas homólogos un alelo distinto, que posee dos formas diferentes de un gen en particular; cada una heredada de cada uno de los progenitores. Cada persona tiene 46 cromosomas agrupados en 23 pares.

Heterocigoto *trans*. Doble **heterocigoto** que contiene dos mutaciones dispuestas en configuración *trans*.

Inocuo: es libre de peligro, digno de confianza, que no produce injuria alguna. Certeza que la ingestión del alimento no producirá enfermedad, habida cuenta que la manera y cantidad de ingestión sea la adecuada. Inocuo es sinónimo de seguro en una de las acepciones del español, pero no es aconsejable su uso porque se lo puede confundir con seguridad alimentaria la que difiere de inocuidad de los alimentos.

Leucemia. Es un grupo de enfermedades malignas de la médula ósea (cáncer hematológico) que provoca un aumento incontrolado de leucocitos (glóbulos blancos) clonales en la médula ósea, que suelen pasar a la sangre periférica

aunque en ocasiones no lo hacen (leucemias aleucémicas). Ciertas proliferaciones malignas de glóbulos rojos se incluyen entre las leucemias (eritroleucemia).

Mutación. En genética y biología, es una alteración o cambio en la información genética (genotipo) de un ser vivo y que, por lo tanto, va a producir un cambio de características, que se presenta súbita y espontáneamente, y que se puede transmitir o heredar a la descendencia. La unidad genética capaz de mutar es el gen que es la unidad de información hereditaria que forma parte del ADN.

Mutación genética. Cualquier cambio permanente en el ADN de una célula. Las mutaciones pueden deberse a errores en el proceso de división celular o a la exposición a agentes presentes en el medioambiente y que puedan dañar el ADN. Las mutaciones pueden ser nocivas, benéficas o no tener efectos. Pueden heredarse si se dan en células productoras de óvulos o de esperma; no así en otros tipos de células. Ciertas mutaciones pueden causar cáncer u otras enfermedades.

Mutación somática. Es aquella mutación que afecta a las células somáticas del individuo. Como consecuencia aparecen individuos mosaico (o quimeras) que poseen dos líneas celulares diferentes con distinto genotipo. Una vez que una célula sufre una mutación, todas las células que derivan de ella por divisiones mitóticas heredarán la mutación. Un individuo mosaico originado por una mutación somática posee un grupo de células con un genotipo diferente al resto, cuanto antes se haya dado la mutación en el desarrollo del individuo mayor será la proporción de células con distinto genotipo. En el supuesto de que la mutación se hubiera dado después de la primera división del cigoto (en estado de dos células), la mitad de las células del individuo adulto tendrían un genotipo y la otra mitad otro distinto. Las mutaciones que afectan solamente a las células de la línea somática no se transmiten a la siguiente generación.

Mutagénesis. Producción de mutaciones sobre DNA, clonado o no. De realizarse in Vitro, dicha alteración puede realizarse al azar (mutagénesis al azar), sobre cualquier secuencia, o bien de forma dirigida (mutagénesis dirigida) sobre una secuencia conocida y en la posición de interés. En el caso de realizarse in vivo, sobre organismos y no sobre DNA clonado por tanto, se realiza a gran escala y sin conocimiento de secuencia, empleando para ello sustancias denominadas mutágenos.

Mutágeno. Es un agente físico o químico que altera o cambia la información genética (usualmente ADN) de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural.

No Disyunción. Fallo de los cromosomas homólogos o cromátides de segregarse durante la mitosis o la meiosis, dando por resultado que una célula hija tenga dos cromosomas parentales o dos cromátides y que la otra no tenga ninguno.

Nutracéutico. Palabra derivada de nutrición y farmacéutico, hace referencia a todos aquellos alimentos que se proclaman como poseedores de un efecto beneficioso sobre la salud humana. Estos alimentos a menudo se denominan también alimentos funcionales. Del mismo modo, el término puede aplicarse a compuestos químicos individuales presentes en comidas comunes como algunos fitoquímicos.

Recombinación. La recombinación genética es el proceso por el cual una hebra de material genético (usualmente ADN; pero también puede ser ARN) es rota y luego unida a una molécula de ADN diferente. La recombinación de eucariotas comúnmente se produce durante la meiosis como entrecruzamiento cromosómico entre los cromosomas apareados.

Teratógeno. Es cualquier agente que produce anomalías congénitas o aumenta su frecuencia en la población. Particularmente, los teratógenos son aquellos químicos que al actuar cuando se forma el embrión (embriogénesis) interfieren con su desarrollo normal, de lo que resultan diversas malformaciones orgánicas. En ocasiones, un mismo compuesto actúa como tóxico o como teratógeno dependiendo de la etapa en la cual se produjo la exposición a él. Los teratógenos, durante las dos primeras semanas de desarrollo, pueden matar al embrión o no tener efecto alguno; asimismo, durante la formación de los órganos (u organogénesis) alteran su desarrollo y pueden producir defectos congénitos mayores, en particular de cerebro y ojos.

Teratogénesis. Proviene del griego teratos, que significa monstruo. El sentido original de la palabra viene a referirse a malformaciones anatómicas macroscópicas, aunque los conceptos actuales de este término se han expandido para incluir anomalías del desarrollo más sutiles, como el retraso del desarrollo intrauterino, alteraciones de la conducta, muerte intrauterina y otras deficiencias funcionales.

Toxico. Es toda sustancia química que, administrada a un organismo vivo, tiene efectos nocivos. El estudio de los venenos es conocido como toxicología.

Toxicología. Es una rama de la medicina que estudia los efectos de las toxinas o venenos vegetales, animales y minerales, tanto como tratamiento o intoxicación. También podría definirse a la Toxicología como la disciplina que estudia los efectos nocivos de los agentes químicos y de los agentes físicos (agentes tóxicos) en los sistemas biológicos y que establece, además, la magnitud del daño en función de la exposición de los organismos vivos a dichos agentes. Se ocupa de la naturaleza y de los mecanismos de las lesiones y de la evaluación de los diversos cambios biológicos producidos por los agentes nocivos.

Xenobiótico. Compuesto externo a un organismo vivo que interacciona con él, generalmente a través de alteraciones metabólicas.

