

Vol. 12(1) – 2020
ISSN 2304-2907 (on line)

Steviana



Área del cerrado. Límite sur del Parque Nacional Cerro Corá, Departamento de Amambay, Paraguay



**Laboratorio de Recursos Vegetales
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Asunción**



La revista *Steviana* es una publicación semestral, del Laboratorio de Recursos Vegetales (LAREV), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), la misma fue creada en 2009, y cubre áreas de investigación primaria, en todas las líneas de trabajo en el campo de las ciencias botánicas y áreas relacionadas. Las subsecciones temáticas son: Conservación, Ecología, Etnobotánica y Botánica Económica, Ficología, Fisiología, Biotecnología, Fitoquímica, Flora y Vegetación, Genética y Biología Molecular, Micología, Morfoanatomía Vegetal, Palinología, Sistemática y Taxonomía, Toxicología, entre otras.

Además *Steviana* publica números especiales, tales como: libros y suplementos con los resúmenes de los trabajos presentados a las Jornadas Paraguayas de Botánica.

Cuenta con dos versiones, una impresa con tirada anual (ISSN 2077-8430) y otra on-line con publicación semestral (ISSN 2304-2907). Se publican investigaciones originales (artículos), revisiones (reviews), notas cortas y una sección de noticias, divulgación de redes y eventos, sin costo para los autores.

La revista se encuentra indexada desde el 2012 al Catálogo de Latindex con N° de Folio 21767.

La **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción**, agradece a los investigadores, que han dedicado su tiempo y esfuerzo incondicional en el arbitraje de los artículos:

MSc. Luis Oakley

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y
Agrimensura (FACENA-UNNE)
Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE)

Dra. Gloria Rodrigo Lira

Unidad de Vigilancia Ambiental y
Genotoxicología. Instituto de Biología
Molecular y Biotecnología
Universidad Mayor de San Andrés

Dra. Edith Alba Luz Segovia Corrales

Genética Toxicológica-Laboratorio de
Biotecnología. CEMIT
Universidad Nacional de Asunción

MSc. Gloria González de Weston

Laboratorio de Hidrobiología
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
(FACEN). Universidad Nacional de
Asunción

MSc. Danilo Fernández Ríos

Laboratorio de Biotecnología
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
(FACEN). Universidad Nacional de
Asunción.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCION

RECTORA

Prof. Dra. Zully Concepción Vera de Molinas

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DECANO

Prof. Lic. Constantino Nicolás Guefos K., MAE

CUERPO EDITORIAL

Editor

Bonifacia Benítez de Bertoni
(FACEN – UNA)

Co-editores

María Vera Jiménez
Pamela Marchi Brusquetti

Asistentes de edición

Claudia Mancuello (FACEN – UNA)

Diseño y diagramación

María Vera Jiménez

Fotografía de tapa

Área del cerrado. Límite sur del Parque Nacional Cerro Corá. Departamento de Amambay, Paraguay. Autor: Victoria Vázquez.

Revisión de escritos en Inglés

Nidia Beatriz Benítez Candia
(FACEN – UNA)

Comité Científico

María de Fátima Mereles H.

Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica – CEDIC

Gloria Yaluff

FACEN-UNA, Paraguay

Claudia Pereira S.

FACEN-UNA, Paraguay

Miguel Angel Martínez

FACEN-UNA, Paraguay

Christian Vogt P.

FACEN-UNA, Paraguay

Karina Nuñez G.

FACEN-UNA, Paraguay

Michelle Campi G.

FACEN-UNA, Paraguay

Revista Steviana: Indexada al Catálogo de Latindex, N° de folio 21767

DIRECCIÓN OFICIAL

Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales-UNA

Telefono-fax: (595-21) 585 600

Dirección Postal: 1039

Campus Universitario, San Lorenzo-Paraguay

Página web: www.facen.una.py

CONTENIDO POR SECCIONES

Ecología

- 3-14 Cuantificación de la especie exótica *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (Poaceae) en el Cerrado del Parque Nacional Cerro Corá, Departamento de Amambay, Paraguay
Vázquez, V.; Mereles, F.; Vogt, C.

Genética y Biología Molecular

- 15-28 Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Taropé) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación Somática y Recombinación
de Oliveira, R.; Gayozo, E.; Martínez, M.; Pereira Sühsner, C.; Marín, L.; Torres, E.; Ferreira, F.
- 29-39 Efectos teratogénicos del extracto acuoso de *Maytenus ilicifolia* (Reissek ex Mart.) sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*
Ruiz Díaz, K.; Torres, E.; Marín, L.; Gayozo, E.
- 40-52 Evaluación de la actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka'a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART
Escobar Ibarrola, L.; Torres, E.; Gayozo, E.; Marín Insfrán, L.

Biotecnología

- 53 - 71 Estudio predictivo *in silico* del posible acoplamiento molecular entre la proteína SARS-CoV-2-S y lectinas cianobacterianas con actividad antiviral
Gayozo, E. & Rojas, L.

Cuantificación de la especie exótica *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (Poaceae) en el Cerrado del Parque Nacional Cerro Corá, Departamento de Amambay, Paraguay

Vázquez, V.^{1*}; Mereles, F.²; Vogt, C.³

^{1,3}Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, San Lorenzo, Paraguay

² Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Asunción Paraguay y Programa Nacional de Incentivo a Investigadores, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, PRONII-CONACYT, Asunción, Paraguay

*E mail del autor: vickypps@gmail.com

Cuantificación de la especie exótica *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (Poaceae) en el Cerrado del Parque Nacional Cerro Corá, Departamento de Amambay, Paraguay.

Urochloa decumbens es considerada una especie-exótica. La misma se encuentra presente en el Parque Nacional Cerro Corá y cuyos datos de dispersión dentro del Cerrado son desconocidas. El objetivo fue realizar un relevamiento cuantitativo de *U. decumbens* en función a la proximidad de la distancia desde los bordes de caminos hacia el interior de las formaciones vegetales del Cerrado dentro del parque. Para ello fueron seleccionadas seis áreas de estudio con 5 parcelas de 50 m x 5 m cada una ellas, dispuestas en forma paralela a diferentes distancias (0, 10, 20, 40 y 60 m), desde el borde del camino hacia el Cerrado. En el interior de cada parcela fueron delimitadas 5 subparcelas de 5 m x 1 m (5 m²), dispuestas transversalmente a una distancia de 10 m entre sí. En cada subparcela se estimó la cobertura de la especie según la escala ampliada de Braun-Blanquet. El avance de *U. decumbens* se encuentra limitado hasta aproximadamente 20 m de distancia de los caminos. La misma predomina en los sitios de muestreo caracterizados por fuertes influencias antrópicas, como las zonas históricas con mayor aglomeración de visitantes y la ruta pavimentada, que pasa dentro del parque. Los resultados no demuestran que *U. decumbens* tenga un comportamiento invasivo dentro del Cerrado, pero si se evidencia una dispersión de la especie en varios sitios del parque, lo cual puede representar un peligro potencial de invasión, teniendo en cuenta los atributos de la misma.

Palabras clave: Cerrado; especie exótica; Parque Nacional Cerro Corá; *Urochloa decumbens*

Quantification of the exotic species *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster (Poaceae) in the Cerrado of Parque Nacional Cerro Cora, Amambay, Departament, Paraguay.

Urochloa decumbens is considered an exotic species. It is present in the Parque Nacional Cerro Corá, whose dispersion data within the Cerrado are unknown. The objective was to carry out a quantitative survey of *U. decumbens* based on the proximity of the distance from the roadsides to the interior of the Cerrado plant formations within the Park. For this, six study areas with 5 plots of 50 m x 5 m each were selected, arranged in parallel at different distances (0, 10, 20, 40 and 60 m), from the edge of the road towards the Cerrado. Inside each parcel, 5 subplots of 5 m x 1 m (5 m²) were delimited, arranged transversely at a distance of 10 m from each other. In each subplot, the species coverage was estimated according to the expanded Braun-Blanquet scale. The advance of *U. decumbens* is limited to approximately 20 m from the paths. It predominates in the sampling sites characterized by strong anthropic influences, such as the historical areas with the largest number of visitors and the paved route that passes within the Park. The results do not demonstrate that *U. decumbens* has an invasive behavior within the Cerrado, but a dispersion of the species is evident in several Park sites, which may represent a potential danger of invasion, taking into account the attributes of the species.

Keywords: Cerrado; exotic species Parque Nacional Cerro Corá; *Urochloa decumbens*

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las especies del género *Urochloa* P. Beauv son conocidas en el ámbito ganadero por su potencial forrajero (Oliveira & Marquis, 2002). En pasturas implantadas en Sudamérica y América Tropical predominan especies de origen africano (Espíndola *et al.*, 2005), muy codiciadas por ser consideradas de rentabilidad debido a su rápido crecimiento, rendimiento nutricional y adaptación a suelos ácidos con baja fertilidad (Mateus *et al.*, 2013).

En Paraguay habitan diez especies del género *Urochloa*, de las cuales tres son forrajeras introducidas en América (Zuloaga *et al.*, 2014). *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster, conocida comúnmente como “pasto peludo”, “pasto alambre” o “pasto de orillas”, es nativa de África tropical y ampliamente distribuida en América y habita en ambas regiones de Paraguay (Zuloaga *et al.*, 2014). Una de las características importantes es su alta capacidad de dispersión con posibilidades de escapar de las zonas de cultivo (Ziller & Zalba, 2007), siendo los sitios mayormente vulnerables para el ingreso de esta especie las áreas protegidas (Pitelli & Pavani, 2005) y destacándose como agresiva su presencia en fisionomías del Cerrado (Pilon *et al.*, 2017).

Las principales formaciones del Parque Nacional Cerro Corá (PNCC) constituyen los Cerrados con 981,52 hectáreas, un 17.72% del total de su superficie, con árboles aislados y con mayor presencia de herbáceas con raíces engrosadas (Gamarra de Fox, 2012). Mereles (2007) define al Cerrado del Parque Nacional Cerro Corá como formaciones vegetales de tipo sabanoideo de escasos árboles, arbustos de 3-4 m de altura, agrupados, con suelos arenosos

de grano grueso y ácidos, donde las hierbas y los sufrútices por lo general presentan rizomas o raíces muy engrosadas; también abundan las palmeras. Además, menciona a los Cerradones como otro tipo de formación similar a los Cerrados en donde éstos constituyen una transición entre los Cerrados y los bosques, con una formación arbórea que domina sobre los campos. Basualdo *et al.* (1997) mencionan que los bosques del PNCC poseen una altura entre 10-30 m, con escasas lianas y epífitas, predominan herbáceas, con especies de leguminosas y compuestas como dominantes. Los campos bajos se caracterizan porque sus especies son tolerantes a las variaciones de niveles hídricos y los humedales descritos como lugares de inundación permanente.

En los últimos años se ha registrado una mayor presencia de *Urochloa decumbens* en el PNCC (Gamarra *et al.*, 2012), pero hasta la fecha de la realización de esta investigación se conocía muy poco acerca de su dispersión en las formaciones vegetales del Cerrado. El objetivo del trabajo fue realizar un relevamiento cuantitativo de *Urochloa decumbens* para determinar de esta manera el comportamiento actual de la misma dentro del Parque Nacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El PNCC, se encuentra ubicado en el departamento de Amambay, dentro de la ecorregión del mismo nombre (Acevedo *et al.*, 1990), con una superficie de 5538 hectáreas. Para el área de trabajo se seleccionaron seis sitios de muestreo denominados A, B, C, D, E y F, identificados mediante mapas satelitales y posterior verificación *in situ*, ubicadas dentro de la formación del Cerrado (Figura 1).

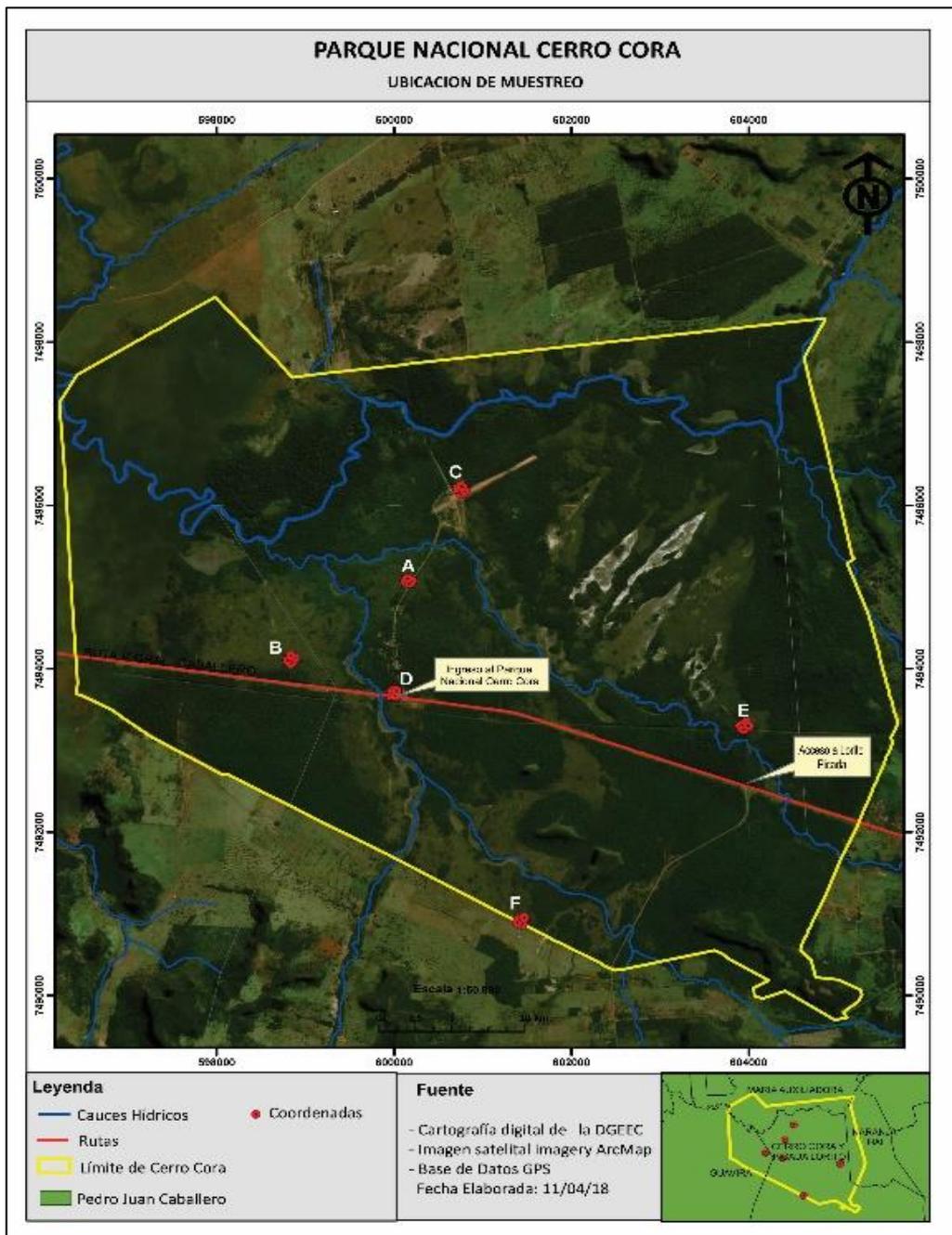


Figura 1. Imagen satelital con los sitios de muestreo en el Parque Nacional Cerro Corá.

Posteriormente se llevó a cabo el trabajo de campo en los meses de mayo a diciembre del 2017.

Diseño experimental y colecta de datos

Para determinar el grado de avance de *U. decumbens* se utilizó el método de la Red de Parcelas Permanentes del Cerrado (Felfili *et al.*, 2005) con modificaciones utilizadas por de Mendonça (2010).

En cada sitio de muestreo se instaló un conjunto de 5 parcelas (50 m x 5 m), dispuestas en forma paralela a diferentes distancias (0, 10, 20, 40 y 60 m) con punto de origen desde bordes de caminos (internos, ruta pavimentada, senderos). En el interior de cada parcela fueron delimitadas 5 subparcelas de 5 m x 1 m (5 m²), dispuestas transversalmente a 10 m una de otra (Figura 2).

En total para cada sitio de muestreo fueron instaladas 25 subparcelas (5 m²) respectivamente. A cada especie se asignó un coeficiente o índice de abundancia-dominancia (Braun-Blanquet, 1979), que es el índice de cobertura estimada llevada a rangos de la escala dominancia-abundancia. También fueron registradas las especies dominantes de las subparcelas en cada sitio.

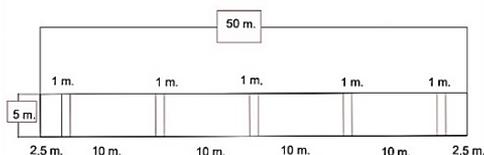


Figura 2. Diseño de muestreo detallado de una parcela de 50 m x 5 m, indicando la ubicación de las subparcelas de 5 m².

Análisis estadístico y trabajo de gabinete

Los datos registrados en planilla fueron cargados y procesados en el software TURBOVEG 2.0 para el almacenamiento

de datos de vegetación, cobertura de parcelas y de especies (Hennekens & Schaminée, 2001). Para el análisis de cobertura en las cinco distancias se aplicó la prueba de normalidad, y posteriormente como datos no paramétricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. Se utilizó el paquete estadístico *IBM SPSS Statistic 25.0.0* (IBM, 2017) y utilizando el manual de Moreno (2008).

Con el objetivo de interpretar el comportamiento según la variable de cobertura para *U. decumbens* en los 6 sitios de muestreo, se trabajó con el método de medición de la similitud: medidas de distancia. La medida seleccionada utilizada fue la distancia euclídea mediante el software *Past* versión 2.17 (Hammer *et al.*, 2001).

La identificación taxonómica se realizó utilizando claves de identificación y comparando con base de datos disponible en la web (TROPICOS), Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur (Instituto Darwinion), y con material de herbario. Las muestras colectadas se depositaron en el Herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN).

RESULTADOS

Descripción florística de los sitios de muestreo

Sitio A. Ruta empedrada: El sitio presenta una fisionomía de Cerrado, con árboles aislados de hasta 6 m de altura como *Guibourtia hymenaeifolia* (Moric.) J. Léonard; *Eriotheca gracilipes* (K. Schum.) A. Robyns; *Ocotea* sp y arbustos, con una altura entre 3-4 m compuesto por: *Helietta apiculata* Benth y *Bromelia balansae* Mez.

La cobertura más elevada de *U. decum-*

bens se registró a una distancia entre 0-10 m; a partir de los 10 m, un descenso en la cobertura de la misma y hacia los 40 m aún más, en donde interactúa bastante y en estrecha relación con otras gramíneas como *Axonopus pressus* (Steud.) Parodi y *Tristachya leiostachya* Ness, debido probablemente a que el estrato arbustivo presenta una disminución en cobertura. Nulo registro a 60 m de la especie, pero presencia de *Bromelia balansae* y otras palmeras. (Figura 3A).

Sitio B. Camino a aceite'í: En el sitio se observa un proceso de regeneración de plántulas, debido al incendio que afectó al parque en el mes de setiembre. En las subparcelas se encontraron en mayor proporción especies arbustivas con una altura de ≥ 80 cm. La mayoría de las especies estériles, lo cual dificultó su identificación, sin registrarse la especie estudiada. Aparecieron como dominantes *Byrsonima intermedia* A. Juss, *Caryocar brasiliense* Cambess. y *Casimirella guaranitica* Hassl. (Figura 3B).

Sitio C. Monumento histórico: El área es un campo abierto con dominancia de *U. decumbens*, con importante cobertura para el sitio. La especie se encuentra ampliamente distribuida desde los 0 m hasta 60 m. Presenta zonas modificadas años atrás con la creación del monumento histórico y pista de aviación, causante de grandes cambios en el lugar. Aparecen otras herbáceas y sufrútices como *Campomanesia adamantum* (Cambess.) O. Berg y *Byrsonima intermedia*, entre las más comunes (Figura 3 C).

Sitio D. Acceso principal al PNCC, y ruta V General Bernardino Caballero: Se registraron algunas especies tales como: *Helietta apiculata*; *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. f.; *Annona* sp

y *Pavonia cancellata* (L.) Cav.; entre otras. La cobertura de *U. decumbens* se encuentra entre 0 a 20 m, desde el borde del camino y disminuyendo hacia el interior. Se constató altos impactos de perturbación como montículos de vegetales, basuras inorgánicas, vestigios de quemados no recientes, entre otros. Este sitio es considerado como una vía importante de entrada de la especie (Figura 3 D).

Sitio E. Camino a Cerro Muralla: Se observaron regeneraciones de herbáceas y con un alto porcentaje de suelo descubierto. Las especies mejor representadas: *Annona dioica* A. St.-Hil.; *Commelina erecta* L.; *Pavonia cancellata*; *Casimirella guaranitica*; *Bromelia balansae* y *Butia* sp. No se constató la presencia de *U. decumbens* (Figura 3 E).

Sitio F. Lindero del PNCC: Sitio con árboles como *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg y especies arbustivas como *Campomanesia* sp, *Pouteria* sp, *Annona* sp, *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. Este sitio también sufrió las consecuencias del incendio, con regeneración de herbáceas observadas. La especie sufre un descenso al ingresar al interior de la formación, hasta 20 m (Figura 3 F).

Grado de avance poblacional de *U. decumbens* según distancias

Los datos no siguen una distribución normal con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y el de Shapiro-Wilk. Utilizando la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, se concluye que la distribución de cobertura no es la misma entre las categorías de distancia. Las cinco distancias estudiadas en función a la cuantificación de la cobertura relativa de la especie estudiada los valores más altos corresponden hasta 20 m.



Figura 3. Imagen de las 5 áreas de muestreo, fisionomía del Cerrado PNCC. **a**-sitio A ruta empedrada; **b**-sitio B camino a aceite'i; **c**-sitio C monumento histórico; **d**-sitio D acceso principal al PNCC; **e**- sitio E camino a cerro muralla; **f**-sitio F lindero del PNCC.

La cobertura de las poblaciones de la especie es alta en los bordes de los caminos y descende con la disminución de la alteración de las formaciones naturales del Cerrado, con un desbalance de 20 m. Esto podría ser consecuencia de las condiciones o fisionomías del lugar y características morfológicas de la especie, para luego seguir una tendencia de disminución a partir de los 40 y 60 m (Figura 4). Es importante destacar que la especie tiene una mejor

cobertura hasta aproximadamente unos 20 m desde el borde, en tanto que aquellas que llegan a una distancia de 40-60 m podrían ser mejor evaluadas según las características que presenta el lugar y obviamente la intromisión humana. En síntesis, a mayor perturbación mayor penetración de la misma hacia los Cerrados.

Estos resultados se han dado en todos los puntos de muestreo.

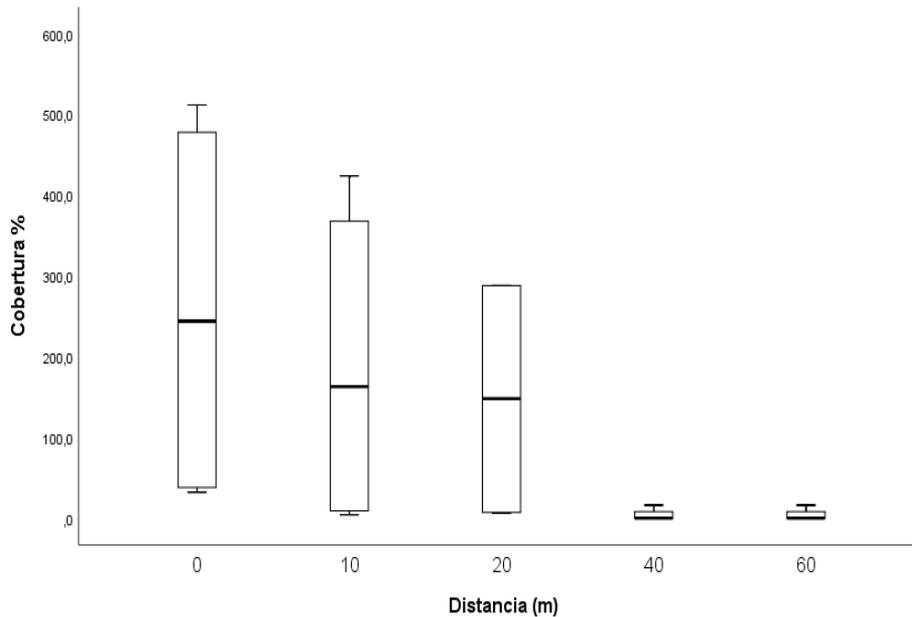


Figura 4. Relación entre cobertura % en los 6 sitios de muestreo con las distancias estudiadas.

Grado de avance poblacional de *U. decumbens* según lugar de muestreo

En el gráfico de columnas se aprecian todos los sitios donde fue registrada la especie A, C, D y F (Figura 5), con las distancias de 0, 10, 20, 40, 60 m y se evidencia la cobertura a los 0, 10 y 20 m en los sitios C y D, estos con características similares en cuanto al grado de perturbación, el primero con cambios de uso de suelo en años atrás y afluencia turística, el segundo con impactos antrópicos por ubicarse sobre la ruta que atraviesa el parque. Se observa el mismo comportamiento en el dendrograma de análisis de agrupamiento (Figura 6) para los sitios de muestreo que agrupa los sitios C-D. El incendio como perturbación del ecosistema del parque influyó en la separación muy marcada de los sitios B y E. Como es de esperar, la comunidad vegetal pasa por un proceso de regeneración total de las especies, de tal

modo que la población de *U. decumbens* al momento de levantamiento de datos en esos sitios no pudo ser registrada y evaluada. Características comunes comparten los sitios A y F ubicadas en los bordes de caminos y las primeras distancias presentaron mayor registro.

DISCUSION

La introducción de plantas exóticas se lleva a cabo con el propósito de satisfacer carencias alimentarias, medicinales, elaboración de utensilios y usos forrajeros (Richardson & Pyšek, 2000). Richardson *et al.* (2000) y Pyšek *et al.* (2004) describen especies exóticas como especies introducidas de manera intencional o no por medio de intervención humana, el cual corresponde a las características que presenta *Urochloa decumbens*, especie introducida desde Africa con fines de producción forrajera.

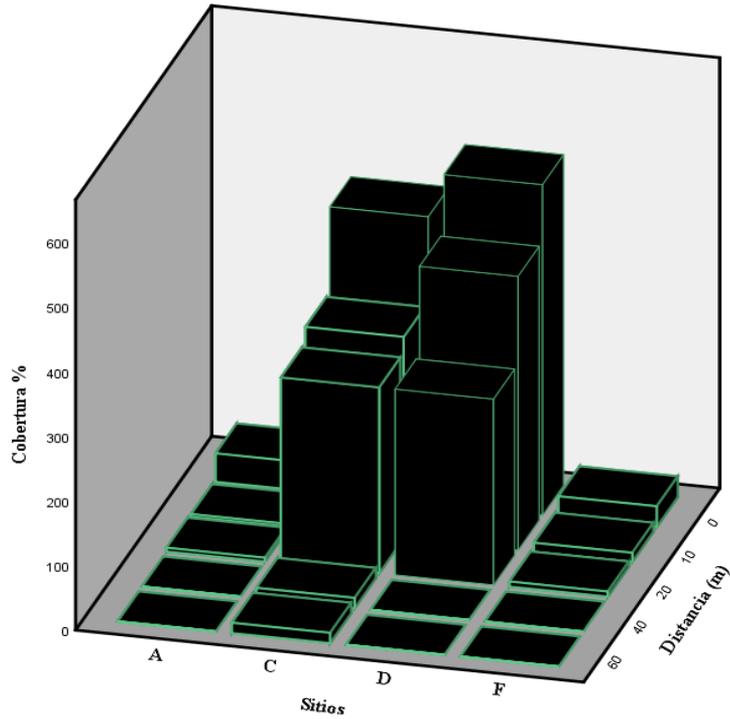


Figura 5. Registros de la especie en sitios A, C, D y F en relación de cobertura (%) en función a las cinco distancias (0, 10, 20, 40 y 60m)

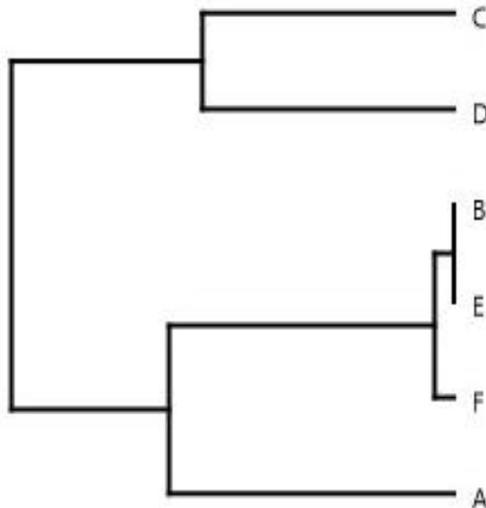


Figura 6. Dendrograma de análisis de agrupamiento utilizando el Índice de similaridad euclídea para seis áreas de muestreo A, B, C, D, E y F

Las especies con potencial invasor como *U. decumbens* son consideradas como agentes de cambio en el Cerrado (Klink & Machado, 2005), donde las condiciones eco-lógicas semejantes a las de su hábitat de origen, como son las sabanas africanas, facilitó su diseminación, provista de una fisionomía abierta propia de estratos herbáceos como son los campos abiertos, campos cerrados y Cerrado *sensu stricto*. *Urochloa decumbens* es descrita con grado de invasión elevado (I3N, 2015) y en áreas protegidas de la región como Brasil (Ribeiro et al., 2006; Horowitz et al., 2013), pudiendo ser sumamente agresiva en áreas abiertas, generando impactos negativos y socioeconómicos con necesidad de manejo. Según Pivello et al. (1999), la presencia de la especie es destacada con 100% de cobertura iniciando en bordes de carreteras y/o caminos, luego disminuyendo a los 10 m limitándose a un máximo de 20 m. Datos comparados con el de Mendoza (2010) demuestran la misma tendencia comparando distancias desde 0 a 80 m. Igualmente, Ribeiro et al. (2006) especifican que la especie encuentra ventajas en su dispersión sobre todo en los bordes de caminos perturbados.

Según los dos datos obtenidos en el presente estudio, *U. decumbens* es destacada en cobertura a los 0, 10 y 20 m representados en los cuatro sitios de muestreo y coincidiendo con Pivello et al. (1999). Sin embargo, las condiciones y fisionomía del lugar podrían de alguna forma influir o limitar su presencia como la exposición lumínica, ya que expuestas al sol presentan mayor vigorosidad y crecimiento, desarrollando mayor tamaño foliar (Guenni et al., 2008), lo que fue observado también en el PNCC.

Si bien algunos hábitats resultan más propensos que otros, los factores mencionados y las vías de ingreso cobran un rol importante en el mecanismo de introducción (Rejmánek, 1989; Mendoza et al., 2014). Especialmente son las áreas protegidas que tienen gran influencia de caminos, rutas, senderos y vías de acceso (Brancatelli & Zalba, 2012), susceptibles a modificaciones antrópicas. Spellerberg (1998) y Parendes & Jones (2000) destacan a estas vías como introducción primaria utilizadas por plantas exóticas mediante agentes vectores conocidos, como medios de transportes, animales y personas, los cuales facilitan la propagación y posterior instalación de la especie de manera involuntaria o intencional. Esto evidenciado en la introducción de plantas exóticas en áreas protegidas que provocaron cambios en la estructura florística, aumentando la proporción de especies no nativas en relación a las nativas (Matthei et al., 1993; Swenson et al., 1997).

Se puede concluir que no todas las especies exóticas son invasoras, es decir *U. decumbens* ciertamente corresponde a una especie exótica y puede desarrollar el potencial de invasora dentro del PNCC por los atributos tanto de la especie como de la comunidad en la cual se establece. Las áreas críticas como de gran afluencia antrópica respaldan la proliferación de la misma, dependientes en gran medida de las perturbaciones ambientales que favorecen su dispersión. Las distancias que sobresalen son a 0, 10 y 20 m y posterior a esta distancia en descenso al ingresar al interior del fragmento del cerrado. Sin embargo, puede ocupar áreas de cobertura a distancias de 0 y 60 m si las condiciones son propicias o bien limitarse a bordes de caminos

cuando las características y comunidades vegetales sean oportunas.

Podríamos aseverar que lo sucedido hasta el momento con el avance de *U. decumbens* dentro del PNCC constituye algo así como una etapa inicial de lo mencionado por Spellerberg (1998) y Parendes & Jones (2000), por lo que urge tratar de impedir aún más la proliferación de la especie dentro del mismo, a causa de su degradación progresiva.

CONCLUSION

La expansión de *U. decumbens* es una realidad; se debe tener en cuenta que la erradicación de una especie invasora puede tener un alto costo económico y no llegar a conseguirse dicho fin. Los próximos planes de manejo del parque deberán incluir sin ninguna duda en primer lugar los trabajos de cuantificación dentro del territorio y finalmente proponer un Plan de Manejo que incluya la manera de cómo va a controlarse la expansión de la misma, como el realizado por (Benítez, 2016), con el uso de herbicidas.

Los controles dentro de las áreas protegidas deben incluir además un monitoreo permanente del avance de la misma, así como de otras especies con potencial invasor similar, dadas las condiciones de deterioro en el PNCC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, C.; Fox, J.; Gauto, R.; Granizo, T.; Keel, S.; Pinazzo, J.; Spinzi, L.; Sosa, W. & Vera, V. (1990). Áreas Prioritarias para la Conservación en la Región Oriental del Paraguay. Ministerio de Agricultura y Ganadería y Dirección de Parques Nacionales y Vida Silvestre. Asunción, Paraguay. 99pp.
- Basualdo, I.; Soria, N.; Keel, S. & Rivarola, N. (1997). Recursos Fitogenéticos. Parque Nacional Cerro Corá – Amambay. Frutos Silvestres. Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Químicas - UNA. San Lorenzo, Paraguay. 73.
- Benítez, S.R. (2016). Evaluación del efecto de dos herbicidas en dosis diferentes para el control de *Brachiaria brizantha*, *decumbens*, en un área seleccionada del Parque Nacional Cerro Corá, Paraguay. Trabajo de Fin de Grado (Ingeniería Ambiental). Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Agrarias. San Lorenzo.
- Brancatelli, G.I.E. & Zalba, S.M. (2012). Vector analysis: a tool for preventing the introduction of invasive alien species into protected areas. *Nature Conservation* 24: 43-63.
- Braun-Blanquet, J. (1979). Fitosociología. Bases para el estudio de las comunidades vegetales. Blume Ediciones. Madrid, 835 pp.
- de Mendoça, A. (2010). Avaliação do efeito de borda sobre a vegetação do cerrado stricto sensu inserido em matriz de pastagem. (Programa de Pós – Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia). Universidade de São Paulo. Brasil.
- Espíndola, M.; Bechara, F.; Bazzo, M. & Reis, A. (2005). Recuperação ambiental e contaminação biológica: aspectos ecológicos e legais. *Biotemas*. 27-38.
- Felfili, J.M.; Carvalho, F.A. & Flores, R. (2005). Manual o monitoramento de nos biomas Cerrado e Pantanal. Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Florestal 1-60.

- Flora del Conosur. (2019). Catálogo de plantas vasculares. Disponible en: <http://www.darwin.edu.ar/>.
- Gamarra de Fox, I.; Amarilla, I. & Dure, R. (2012). Evaluación Ecológica Rápida Parque Nacional Cerro Corá. Boletín del Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay, Secretaria del Ambiente (SEAM), Asunción. 1-100.
- Guenni, O.; Gil, J. L. & Rodriguez, S. (1987). El pasto alambre o barrera (*Brachiaria decumbens*). FONAIAP. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Serie B. Maracay. 7(2): 1-24.
- Hammer, Ø.; Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological software package education and data analysis. *Palaentologia Electrónica* 4(1):9.
- Hennekens, S. & Schaminée, J.H. (2001). TURBOVEG, a comprehensive data base management system for vegetation data. *Journal of Vegetation Science* 12: 589-591.
- Horowitz, C.; Oliveira, A.; da Silva, V.; Pacheco, G. & Sobrinho, R. (2013). Manejo da Flora Exótica Invasora no Parque Nacional de Brasília: Contexto Histórico e Atual. *Biodiversidade Brasileira* 3(2): 217-236.
- IBM. (2017). IBM SPSS – Estadísticas Avanzadas 25. 128p. Acceso file:///C:/Users/victoria/Desktop/IBM_SPSS_Advanced_Statistics%20(2).pdf
- I3N Brasil. (2015). Base de datos nacional de especies exóticas invasoras, Instituto Hórus de Desarrollo y Conservación Ambiental, Florianópolis – SC. Recuperado de: <http://bd.institutohorus.org.br/www/>
- Klink, C. & Machado, R. (2005). A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1(1): 149-155.
- Mateus, R.G.; Barrios, S.C.L.; Figueredo, U.J.; Do Valle, C.B.; Seixas, M.A.C. & Esteves, A. (2013). Agronomic evaluation of 324 intraspecific hybrids of *Brachiaria decumbes* in Brazil. *Trop grasslands forrajes tropicales. 1*: 99-100.
- Matthei, O.C.; Marticorena, C. & Stuessy, T.F. (1993). La flora adventicia del Archipiélago de Juan Fernández. Chile. *Gayana Botánica* 50:69-102.
- Mendoza, R.; Ramírez – Martínez, C.; Aguilera, C. & Meave del Castillo, M.E. (2014). Principales vías de introducción de las especies exóticas, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.), Especies acuáticas invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 43-73.
- Mereles, F. (2007). La Diversidad Vegetal en el Paraguay. *En*: Salas-Dueñas, D.A; Facetti, J.F. Biodiversidad del Paraguay: Una aproximación a sus realidades. 1º Ed. Fundación Moisés Bertoni. USAID, GEF/BM. 89-100.
- Moreno, E. (2008). Manual de uso SPSS. 1ra Edición. Universidad Nacional de Educación a distancia. Madrid. 279.
- Oliveira, P. & Marquis, R. (2002). The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna. New York, Columbia University Press. 1-398.
- Parendes, L.A. & Jones, J.A. (2000). Role of light availability and dispersal in alien plant invasion along roads and streams in the H.J. Andrews Experimental Forest, Oregon. *Conservation Biology* 14: 64-75.
- Pilon, N.; Buisson, N. & Durigan, G. (2017). Restoring Brazilian savanna ground layer vegetation by topsoil and

- hay transfer. *Society for Ecological Restoration*. doi: 10.1111/rec.12534. 1-9.
- Pitelli, R. A. & Pavani, M. C. (2005). Feralidade vegetal e transgeniase. *Biotecnologia ciência & desenvolvimento 34*: 1-100.
- Pivello, V. R.; Carvalho, V. M.; Lopes, P. F.; Peccinini, A. A. & Rosso, S. (1999). Abundance and distribution of native and invasive alien grasses in a “cerrado” (Brazilian savanna) biological reserve. *Biotropica 31*: 71-82.
- Pivello, V.R. (2011). Invasões Biológicas no Cerrado Brasileiro: Efeitos da Introdução de Espécies Exóticas sobre a Biodiversidade. *Ecologia*. <http://www.ecologia.info/cerrado.htm>
- Pyšek, P.; Richardson, D.M.; Rejmánek, M.; Webster, G.L.; Williamson, M. & Kirschner, J. (2004). Alien plants in checklists and floras: towards better communication between taxonomists and ecologists. *Taxon 51*(3):131-143.
- Rejmánek, M. (1989) Invasibility of plant communities. *In: Biological Invasions. A Global Perspective* (eds J.A. Drake, H.A. Mooney, F. di Castri, R.H. Groves, F.J. Kruger, M. Rejmánek & M. Williamson) John Wiley & Sons, Chichester. 369–388.
- Ribeiro, K.; De Filippo, D.; Paiva, C.; Madeira, A. & Serafim, J. (2006). Ocupação por *Brachiaria* spp. (poaceae) no parque nacional da serra do cipó e infestação decorrente da obra de pavimentação da rodovia mg-010, na APA Morro da Pedreira, Minas Gerais. Artigo científico. https://www.mma.gov.br/estruturas/174/_arquivos/174_05122008113143.pdf.
- Richardson, D. M.; Pyšek, P.; Rejmánek, R.; Barbour, M.; Dane Panetta, F. & West, C.J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions 6*: 93–107.
- Richardson, D. & Pyšek, P. (2007). In: *Progress in Physical Geography. Classics in physical geography revisited 31*(6): 659–666.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 14abril2018.<http://www.tropicos.org>
- Spellerberg, I. F. (1998). Ecological effects of roads and traffic: a literature review. *En: Global Ecology and Biogeography Letters 7*(5): 317-333.
- Swenson, U.; Stuessy, T. F.; Baeza, M. & Crawford, D. F. (1997). New and historical plant introductions, and potential pests in the Juan Fernández Islands. *Pacific Science 51*: 233-253.
- Ziller, S. & Zalba, S. (2007). Propostas de ação para prevenção e controle de espécies exóticas invasoras. *Natureza & Conservação 5*(2):8-15.
- Zuloaga, F. O.; Morrone, O. & Pensiero, J. F. (2014). Gramineae VI. *In: Ramella, L & Perret, P* (eds). *Flora del Paraguay 45*: 1-399.

Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Taropé) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación Somática y Recombinación

de Oliveira, R.^{1*}, Gayozo, E.²; Martínez, M.³; Pereira Siihsner, C.⁴; Marín, L.²; Torres, E.²; Ferreira, F.⁵

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Odontología, Carrera de Odontología, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo, Paraguay.

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Recursos Vegetales-Área de Química Orgánica de los Productos Naturales, San Lorenzo, Paraguay.

⁴Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Recursos Vegetales-Área de Botánica, San Lorenzo, Paraguay.

⁵Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química, Laboratorio de Instrumental, San Lorenzo, Paraguay.

*E-mail del autor: racdeoliveira@gmail.com

Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Taropé) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación Somática y Recombinación. *Dorstenia brasiliensis* es empleada popularmente en infusiones y maceraciones con el fin de curar afecciones orales, sin embargo, sus acciones ante la presencia de radicales libres y sustancias mutágenas son poco conocidas. Los objetivos de esta investigación fueron determinar las actividades antioxidantes y antimutagénicas del extracto crudo etanólico de rizomas de *D. brasiliensis*. La capacidad antioxidante del extracto crudo se cuantificó exponiendo cantidades de 400-1000 µg y 8-24 µg de ácido ascórbico (referencia) al radical •DPPH 3,9 mg% valorando absorbancia a 517 nm. La actividad antimutagénica se evaluó en cepas *Drosophila melanogaster* con marcadores mutantes recesivos *flr*³ y *mwh*, los cuales fueron sometidos a un pretratamiento con el extracto a 0,1; 1 y 10 mg.mL⁻¹, luego Uretano 1 mg.mL⁻¹, cotratamiento simultáneo Uretano 1 mg.mL⁻¹, junto con el extracto 0,1; 1 y 10 mg.mL⁻¹ y un postratamiento con el extracto 0,1; 1 y 10 mg.mL⁻¹, luego de un primer tratamiento con Uretano 1 mg.mL⁻¹; como controles se utilizaron agua destilada y Uretano 1 mg.mL⁻¹. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el test de Kastenbaum-Bowman $\alpha=\beta=0,05$. La IC₅₀ del extracto fue de 1355±0,5 µg y la del Ácido ascórbico 22,1±0,03 µg. También se registró una reducción en mutaciones del 64, 53 y 51%, en el pretratamiento, 40, 45 y 80% con el cotratamiento y 92, 68, 82% en el postratamiento con las concentraciones evaluadas. Los resultados indican baja actividad antioxidante ante la presencia del radical •DPPH y una elevada acción antimutagénica ante el mutágeno empleado.

Palabras clave: Carapiá, DPPH, radicales libres, SMART, Taropé

Antioxidant and antimutagenic activity of the ethanolic extract of rhizomes of *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Taropé) in *Drosophila melanogaster* by Somatic Mutation and Recombination Test. *Dorstenia brasiliensis* is popularly used in infusions and macerations to treat oral affections, however, its actions in the presence of free radicals and mutagenic substances are poorly known. The objectives of this research were to determine the antioxidant and antimutagenic activities of the crude ethanolic extract of *D. brasiliensis* rhizomes. The antioxidant capacity of crude

Steviana, Vol. 12(1), 2020 pp. 15 – 28

Original recibido el 17 de junio de 2020

Acceptado el 13 de octubre de 2020

extract was quantified by exposing amounts of 400-1000 µg and 8-24 µg of Ascorbic acid (antioxidant reference) to the radical •DPPH 3.9 mg% evaluating absorbance at 517 nm wavelength. Antimutagenic activity was evaluated in *Drosophila melanogaster* strains with recessive mutant markers *flr*³ and *mwh*, which were pretreated with the extract at 0.1, 1 and 10 mg.mL⁻¹ following by Urethane 1 mg.mL⁻¹ treatment, simultaneous cotreatment with Urethane 1 mg.mL⁻¹ and extracts at 0.1, 1 and 10 mg.mL⁻¹ and finally a posttreatment with extracts at 0.1, 1 and 10 mg.mL⁻¹, after a first treatment with Urethane 1 mg.mL⁻¹; distilled water and Urethane 1 mg.mL⁻¹ were used as controls. Data obtained was analyzed using Kastenbaum-Bowman test $\alpha \beta = 0.05$. *D. brasiliensis* extract IC₅₀ was 1355±0.5 µg and Ascorbic acid 22.1±0.03 µg. There was also a reduction in mutations presence of 64, 53 and 51% in pre-treatment, reduction of 40, 45 and 80% with co-treatment and 92, 68, 82% in post-treatment at evaluated concentrations. The results indicate low antioxidant activity in the presence of the radical •DPPH and a high antimutagenic action against the mutagen used.

Keywords: Carapiá, DPPH, free radicals, SMART, Taropé

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres son especies químicas, ya sean átomos, moléculas, iones, que poseen al menos un electrón desapareado en su órbita más externa, lo que las hace muy reactivas e inestables; capaces de generar reacción en cadena. Esas especies en número controlado se forman en el cuerpo y juegan un papel relevante en el metabolismo; las fuentes más importantes en el organismo son las mitocondrias y las células fagocíticas activadas como los monocitos, macrófagos y neutrófilos. Algunas situaciones externas como exposición a sustancias tóxicas, radiación ionizante, altas temperaturas, dietas hipercalóricas y ejercicio físico intenso favorecen su generación excesiva, lo que posibilita la mayor afectación de biomoléculas presentes en lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, azúcares y membranas celulares ocasionando la muerte celular, y alterando el funcionamiento del organismo (Roosevelt *et al.*, 2016).

Los antioxidantes son compuestos que contrarrestan a los radicales libres, lo que les permite actuar en la prevención. El desequilibrio ocasionado por la producción excesiva de radicales libres o la presencia insuficiente de antioxidantes, conocido co-

mo estrés oxidativo, se relaciona con el desarrollo de numerosas patologías, tales como algunos tipos de cáncer, el bloqueo de arterias y la degradación del sistema nervioso. Los antioxidantes biológicos son aquellas sustancias que al estar presentes en bajas concentraciones respecto a las biomoléculas pueden reducir o prevenir la destrucción oxidativa de ellas (Durán *et al.*, 2019).

Los antioxidantes son muy numerosos, su consumo se da mayormente a través de la dieta o como suplementos, en ese sentido muchos estudios actualmente evalúan su presencia en alimentos y plantas medicinales con el fin de tratar diversas enfermedades (Berdonces, 2019). Los podemos encontrar en alimentos de origen vegetal como hortalizas, legumbres, frutas, frutos secos y cereales. Los antioxidantes polifenoles y flavonoides pueden consumirse a través de té e infusiones (Ayuso *et al.*, 2018). Algunos ejemplos de infusiones con poder antioxidante son las elaboradas con el mate, la manzanilla, anís verde, el jengibre, la melisa, entre otras (Buitrago, 2018).

Entre las especies a las que se le atribuye valor medicinal se encuentra la *Dorstenia brasiliensis*, conocida comúnmente como Taropé, Contrayerba o Carapiá, es una especie perteneciente a la familia

de Oliveira, R. et al. Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de Dorstenia brasiliensis en Drosophila melanogaster

Moraceae, se la puede encontrar en Paraguay, Brasil, Argentina y Uruguay; es una planta pequeña, perenne, con raíces de hasta 12 centímetros de largo, se caracteriza por tener raíz tuberosa rodeada de raicillas secundarias (Ballvé *et al.*, 2004). Toda la planta es empleada por la población, atribuyéndole propiedades antirreumáticas, antipiréticas, antiofídicas, antileucorreicas, diuréticas, purgativas, tónicas y diaforéticas (Ballvé *et al.*, 2004; Welter, 2012). Se menciona también que en Uruguay los indígenas creían que el vegetal era útil para contrarrestar los efectos de otras especies venenosas, de ahí su nombre vernáculo, “contrayerba” (Barreiro, 1984). También se menciona su uso para paliar las posibles consecuencias de picaduras de insectos y se le atribuye propiedades eméticas a la corteza de la planta (Martínez, 1978). Ha sido utilizada por los aborígenes para neutralizar los efectos producidos por venenos de víbora, para lavar heridas contaminadas, también como sudorífico, diurético y estimulante digestivo, contra afecciones eruptivas, dispepsias y enfermedades de las vías urinarias.

En cuanto a su composición química se encuentra escasa información, González *et al.* (2019) en estudios de caracterización morfoanatómica de la planta, al igual que Hoehne (1939) reportaron la presencia de furanocumarinas, (psolareno y bergapteno) esteroides (sistosterol y estigmasterol), 3-O- β -glucosilsistoterol y sucrosa (Kuster *et al.*, 1994). Atawodi (2005) describe la presencia de las Umbelíferonas en especies del mismo género. Estudios realizados con fitoconstituyentes (Ácido dorsténico A y B) han demostrado actividad citotóxica moderada en líneas celulares leucémicas (L-1210 y HL-60) (Uchiyama *et al.*, 2002). Otra investigación realizada con el extracto

de la misma especie evidenció que este ante la presencia de rayos UVA presenta actividades genotóxicas en el organismo modelo la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el estudio también evidenció actividad melanogénica (Quevedo & Pires, 2011). También Patiño Cabral *et al.* (2019) describen que la exposición del extracto etanólico de rizomas de *D. brasiliensis* a células meristemáticas de *A. cepa* evidencia actividades citotóxicas en las mismas, sin registrarse daños genotóxicos. A pesar de la escasa información acerca de las actividades biológicas de *D. brasiliensis*, es importante destacar que no existe suficiente información referente a las actividades antimutagénicas y antioxidantes de los rizomas de la especie. La posible presencia de estos fitoconstituyentes en los rizomas de la especie nos permite plantear la idea de que el extracto etanólico de los rizomas podría poseer una alta capacidad de presentar actividades antioxidantes y consecuentemente ejercer efectos anti-mutagénicos. Es por esto que se propuso como objetivo principal de esta investigación determinar la antimutagenicidad y la actividad antioxidante del extracto etanólico de los rizomas de *D. brasiliensis* a diferentes concentraciones, empleando para ello la técnica SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) en *Drosophila melanogaster* y la técnica *in vitro* de captura de radicales libres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal estudiado

Dorstenia brasiliensis Lam.; Departamento Central, San Lorenzo, Barrio Bella Vista, Calle Hermegildo Fernández; 25°22'40.91" – 57°30'55.25", 13-IV-2018; de Oliveira 01. Herbario FACEN.

Preparación del extracto etanólico de rizomas de *D. brasiliensis*

Los rizomas fueron secados a temperatura ambiente y colocados en un lugar cerrado con el fin de evitar la degradación de los compuestos presentes a causa de la abundante oxigenación y radiación solar (Hostettmann *et al.*, 2008). Luego se realizó la molienda con ayuda de un triturador manual, el pulverizado obtenido fue tamizado en una malla de 0,05 mm de modo a homogeneizarlo (Martínez *et al.*, 2012).

Se pesaron 217,66 g del triturado y se mezcló con el solvente (Etanol 98°) en una proporción de 3:50. La solución se dejó reposar durante 20 días con agitación diaria, transcurrido este periodo, la solución se filtró de modo a separar residuos del sobrenadante (Singh *et al.*, 2011). El filtrado fue sometido a calentamiento en un rotavapor a temperatura constante de 80° C con el fin de evaporar el solvente y obtener el extracto crudo. El extracto crudo pesó 12,67 g con un rendimiento de 5,83 % del mismo.

Ensayo *in vitro* de captura de radicales libres •DPPH

Del extracto crudo se pesó 0,1 g y se disolvió en 100 mL de Etanol seco 100° obteniéndose una solución stock de 1000 µg.mL⁻¹, de esta solución stock se obtuvieron cantidades de 400, 600, 800 y 1000 µg en un volumen de 2 mL respectivamente en tubos de ensayos independientes. A estas fueron añadidas 5 mL de solución del radical libre •DPPH, 3,9 mg⁰% en cada tubo de ensayo (el •DPPH es un radical libre estable, presenta un color púrpura, al recibir un electrón o protón de una sustancia antioxidante la tonalidad se torna amarillo).

Se procedió a mezclar las soluciones de manera homogénea con ayuda de un equipo vórtex durante 1 min., se dejó reposar en ausencia de luz a temperatura ambiente por 15 min. Los ensayos fueron realizados por triplicado, los valores medios obtenidos sirvieron para representar los puntos en la curva de calibración.

Transcurrido los 15 min. se procedió a realizar las lecturas de absorbancia de los ensayos a 517 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro QUIMIS® (Kuskoski *et al.*, 2005).

Ensayo *in vivo* de mutación somática y de recombinación en *Drosophila melanogaster*

Se realizó el cruce estándar entre hembras vírgenes de la cepa *flr³/In (3LR) TM3, ri p^p sep I (3)89Aa bx^{34e} & Bd^S* con machos de la cepa *mwh/mwh* en una proporción sexual 2:1 respectivamente, en medio de cultivo ovopositor a temperatura ambiente de 25° C (Graf *et al.*, 1984).

Transcurridas el tiempo entre 48 y 72 horas se extrajeron larvas de segundo y tercer estadio, las cuales fueron sometidas a tratamientos según lo expuesto a continuación en una cantidad de 100 larvas por tratamiento.

Pretratamiento de larvas con extracto

Las larvas de segundo estadio fueron expuestas durante 24 horas en medios instantáneos de puré de papa rehidratados con 5 mL de cada concentración del extracto (0,1, 1 y 10 mg.mL⁻¹). Transcurrido dicho periodo, las larvas pretratadas fueron transferidas a medios instantáneos de puré de papa rehidratados con 5 mL de Uretano 1 mg.mL⁻¹, como control se utilizó agua destilada y como agente mutágeno Uretano

1 mg.mL⁻¹. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Cotratamiento de larvas con extracto y agente mutágeno

Las larvas de tercer estadio fueron expuestas durante 72 horas en medios instantáneos de puré de papa rehidratados con 2,5 mL de cada concentración (0,1; 1 y 10 mg.mL⁻¹) junto con 2,5 mL de Uretano 1 mg.mL⁻¹, como control se empleó agua destilada y como agente mutágeno para inducción de mutaciones Uretano a una concentración de 1 mg.mL⁻¹. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Postratamiento de larvas con extracto

Las larvas de tercer estadio fueron sometidas a tratamiento agudo durante 6 horas con el agente mutágeno (5 mL, Uretano 1 mg.mL⁻¹). Transcurridas las 6 horas de tratamiento, las larvas fueron transferidas a otro medio rehidratadas con las diferentes concentraciones del extracto (0,1, 1 y 10 mg.mL⁻¹) por 46 horas hasta la eclosión de las mismas. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Una vez eclosionados los adultos, se seleccionaron al azar 20 individuos transheterocigotas *mwh+/+flr³* de cada uno de los tratamientos realizados, de los cuales se extrajeron las alas y fueron montadas en láminas en solución de Faüre (Goma arábica 300 g, Glicerol 20 mL, Hidrato de Cloral 50 g, y Agua destilada 50 mL). Las observaciones de las alas se realizaron a un aumento de 400X en microscopio óptico compuesto. Se observaron solo las

regiones A, B, C', C, D, D' y E, incluyendo los márgenes de separación según lo sugerido por Rodrigues de Andrade *et al.* (2004).

Análisis de datos obtenidos

Los datos obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante: se determinó el porcentaje de inhibición (I%) mediante la siguiente fórmula, se obtuvo la concentración inhibitoria, 50 (EC₅₀) mediante la función de regresión lineal.

$$I\% = \frac{(AC - AM - AB)}{AC} \times 100$$

Donde:

AM es la absorbancia de la muestra + ●DPPH

AB es la absorbancia del blanco (muestra + Etanol)

AC es la absorbancia del blanco del reactivo (●DPPH + Etanol)

En cuanto a los resultados obtenidos en el ensayo realizado con individuos de *D. melanogaster*, fueron comparados según el estadístico propuesto por Frei y Würzler (1988), que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman), con niveles de significancia $\alpha=\beta=0,05$ (Kastenbaum & Bowman, 1970). Se determinó el porcentaje de inhibición ejercida por el extracto etanólico frente a la acción del agente mutágeno, empleando la siguiente ecuación:

$$I = \left\{ \frac{TM \text{ agente mutágeno} - (TM \text{ extracto} + \text{agente mutágeno})}{TM \text{ agente mutágeno}} \right\} \times 100$$

Donde:

I: Porcentaje de inhibición

TM: Total de mutaciones

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo *in vitro* de captura de radicales libres •DPPH

Los ensayos para la determinación de la actividad antioxidante demostraron según la ecuación de regresión lineal calculada para la curva patrón de referencia de ácido ascórbico (AA) graficada teniendo en cuenta los porcentajes de inhibición (I%) de cada cantidad del ácido ascórbico empleado en μg (Figura 1), valores de $I\% = 2,66[\text{AA}] - 8,83$ y un valor de coeficiente de correlación lineal (r) igual a 0,999, lo cual indica una alta correlación positiva de los datos obtenidos en contraste con la curva obtenida, siendo que el valor de la IC_{50} determinada para el mismo fue de $22,1 \pm 0,03 \mu\text{g}$, lo cual indica que a dicha cantidad se registra un 50% de inhibición del radical libre empleado. En cuanto al extracto crudo de los rizomas de *D. brasiliensis* (EC), se registró según la ecuación de regresión lineal determinada mediante los porcentajes de inhibición, valores de $I\% = 0,0355[\text{EC}] - 1,8906$ con un valor de correlación lineal (r) de 0,997.

En cuanto a la IC_{50} del extracto fue de $1355,19 \pm 0,5 \mu\text{g}$, lo cual comparado con la IC_{50} del ácido ascórbico fue mucho mayor, demostrando de esta manera que el poder antioxidante del extracto fue unas 61 veces menor en comparación al patrón de referencia (Figura 1).

A pesar de evidenciarse actividad antioxidante moderada a baja con el extracto de *D. brasiliensis*; mucho menor (61 veces) en comparación con el patrón de referencia (ácido ascórbico), las IC_{50} se ajustan con las que fueron descritas por Omisore *et al.* (2005), quienes trabajaron con muestras de compuestos provenientes de *Dorstenia barteri* y *Dorstenia convexa*, a las concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6,

0.8, 1, 5, 10, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y hallaron también actividades antioxidantes. También Dufall *et al.* (2003) describe buena acción antioxidante de la especie *Dorstenia mannii* en hojas y ramas (Rodríguez *et al.*, 2004). Atawodi (2005) y Doroteo *et al.* (2013) describen la buena acción antioxidante de especies emparentadas como *Dorstenia psilurus* y *Dorstenia ciliata*. Es importante destacar que este es el primer registro científico de la actividad antioxidante de los rizomas de la especie *D. brasiliensis*, lo cual se ajusta a lo descrito en otros estudios con especies taxonómicamente emparentadas. Esta actividad antioxidante evidenciada en este estudio, podría deberse a la presencia de un grupo de moléculas denominadas Umbeliferonas, las cuales son capaces de absorber fuertes radiaciones UV, así como unirse a especies reactivas como los radicales libres (Omisore *et al.*, 2005).

Ensayo *in vivo* de mutación somática y de recombinación (SMART)

Los datos obtenidos en el ensayo realizado a las larvas evidenció en el pretratamiento realizado con la concentración de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ solo 16 (1,60) clones mutantes del tipo MSP y ningún otro tipo de clon mutante, siendo este significativamente mayor ($P < 0,05$) en comparación al control (agua destilada). El pretratamiento con la concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ registró un aumento significativo ($P < 0,05$) en la cantidad de clones del tipo MSP siendo este de 20 (2,00) y 1 (0,10) clon del tipo MSG el cual no evidenció ninguna diferencia ($P > 0,05$) en comparación al tratamiento control. En el pretratamiento con $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ del extracto se encontró un valor significativamente mayor ($P < 0,05$) de clones del tipo MSP siendo este de

de Oliveira, R. et al. Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* en *Drosophila melanogaster*

17(1,70), 1(0,10) clones del tipo MSG y 4(0,40) clones del tipo MG los cuales no evidenciaron diferencias ($P>0,05$). El tratamiento con el agente mutágeno Ureano 1 mg.mL⁻¹ demostró un total de 43(4,30) clones del tipo MSP y 2(0,20) clones MSG, a su vez el tratamiento realizado con el agua destilada (control) registró solo 3 clones MSP. Es importante destacar que en los tratamientos realizados con el extracto se evidenció una disminución en las frecuencias de aparición de mutaciones en los individuos siendo estos del 64%, 53% y 51% respectivamente (Tabla 1, Figura 2).

En el grupo de individuos de *D. melanogaster* a los cuales se les realizó un cotratamiento entre el agente mutágeno y el extracto, evidenció con el extracto a 0,1 mg.mL⁻¹ 8(0,80) clones MSP y 3(0,30) clones MSG y 1(0,10) clones del tipo MG, sin registrar diferencias ($P>0,05$) en comparación al control. En el cotratamiento con el 1 mg.mL⁻¹ del extracto se registró un aumento significativo ($P<0,05$) de clones mutantes del tipo MSP siendo este de 10(1,00) y 1(0,10) clones del tipo MSG sin diferencias ($P>0,05$). En el cotratamiento realizado con la concentración de 10 mg.mL⁻¹ del extracto se observaron solo 3(0,30) clones MSP y 1(0,10) clones MSG, los cuales no resultaron ser diferentes ($P>0,05$) en comparación a las registradas en el tratamiento control. En el caso del tratamiento con el mutágeno (Ureano 1mg .mL⁻¹) se encontraron 16(1,60) clones MSP y 4(0,40) clones MSG, el tratamiento con el agua destilada (control) se observó solo 3(0,30) clones del tipo MSP. Los tratamientos con el extracto a las concentraciones mencionadas demostraron 40%, 45% y 80% de disminución en la aparición de mutaciones respectivamente (Tabla 1,

Figura 2).

El grupo de individuos que recibieron un postratamiento con el extracto evidenciaron con el extracto a la concentración de 0,1 mg.mL⁻¹ solo 5(0,50) clones mutantes del tipo MSP y 1(0,10) clones del tipo MG, sin diferencias significativas ($P>0,05$) en comparación a las registradas en el control. El postratamiento con la concentración de 1 mg.mL⁻¹ se registró un aumento significativo ($P<0,05$) de 24(2,40) clones MSP y 1(0,10) clones MG, sin ser este último diferente ($P>0,05$) a las encontradas en el control. De igual manera en el caso del postratamiento con el extracto a 10 mg.mL⁻¹ se observó un aumento significativo ($P<0,05$) de 12(1,20) clones MSP, 1(0,10) clones del tipo MSG y 1(0,10) clones MG, los cuales no registraron diferencias ($P>0,05$) en comparación al control. A su vez, el tratamiento realizado con el agente mutágeno evidenció 65(6,50) clones MSP, 8(0,80) clones MSG y 6(0,60) clones mutantes del tipo MG; en el tratamiento realizado con el agua destilada (control) se encontró solo 3(0,30) clones del tipo MSP. La reducción de mutaciones en los postratamientos realizado con el extracto a las concentraciones descritas fue de 92%, 68% y 82% (Tabla 1, Figura 2).

Es importante destacar que los diferentes tipos de marcadores mutantes observados son consecuencia de la pérdida de heterosis, en el caso de los clones mutantes del tipo MSP (manchas simples pequeñas) se originan a consecuencia de eventos mutagénicos como deleciones, mutaciones puntuales, o no disyunciones; el siguiente tipo de clon mutante MSG (manchas simples grandes) son originados por eventos mutagénicos igual a la anterior, como no disyunciones, mutaciones puntuales y deleciones; los clones del tipo MG (manchas

gemelas) es un indicador de eventos de recombinaciones mitóticas los cuales son muy casuales de observar, este último tipo de mutaciones poseen una gran importancia ya que según estudios señalan que la activación de protooncogenes o la supresión de genes tumorales se originan por este proceso dando como resultado final la proliferación de células tumorales cancerígenas (Young *et al.*, 2006; Imreh *et al.*, 2003; Rodrigo, 2007; Jiménez *et al.*, 2013) (Figura 2).

La reducción de mutaciones observadas en los diferentes grupos de tratamientos realizados (pretratamiento, cotratamiento y postratamiento) con el extracto de *D. brasiliensis* fueron altos con valores en un rango de 40-92%, siendo estos inclusive mayor a los porcentajes de disminución de mutaciones encontrados en otros estudios con extractos vegetales de *S. rebaudiana* (50-58%), *S. hispanica* (13-36%) y *B. forficata* (57-79%), demostrando de esta manera la eficacia del extracto de *D. brasiliensis* como posible antimutágeno o antígenotoxina, pudiendo los metabolitos secundarios presentes en el extracto actuar interfiriendo la acción del agente mutágeno directamente o reduciendo los daños genéticos ocasionados por el mismo (Gayozo *et al.*, 2016a; Gayozo *et al.*, 2016b, Marín Insfrán *et al.*, 2019). El grupo experimental con mayor porcentaje de reducción fue en el postratamiento realizado con el extracto con valores de 68-92%, por lo que el extracto presenta una mayor acción de detención de las lesiones genéticas fijadas o inducidas por el Uretano (Jiménez, 2013; Marín Insfrán *et al.*, 2019). Esta actividad antimutagénica podría deberse, al igual que en el caso de la actividad antioxidante, a la presencia del metabolito secundario Umbeliferonas en los rizomas de esta especie,

ya que esta molécula es capaz de actuar como antioxidante y por ende unirse a moléculas disminuyendo las actividades mutagénicas o citotóxica de las mismas (Atawodi, 2005).

Estos resultados también representan el primer registro científico de la actividad antimutagénica del extracto de los rizomas de esta especie, otros estudios mencionan que la *D. brasiliensis* presenta en su composición furanocumarinas o psolarenos, estas sustancias son muy empleadas como fotosensibilizadores, en el tratamiento de vitiligo, demostrándose la actividad melanogénica de esta especie (García, 2007). A pesar de esto, también se describió en otro estudio una muy pequeña actividad genotóxica del vegetal, empleando la misma técnica utilizada en esta investigación (test SMART) (García, 2007). Otra investigación realizada utilizando bacterias en el test de AMES, demostraron bajo efecto genotóxico, del metabolito dorstenina, el cual un análogo del psoraleno recientemente aislado de rizomas de *D. bahiensis* (Lopes *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES

Los resultados indican que el extracto etanólico de *D. brasiliensis* posee baja actividad antioxidante, unas 61 veces menor con relación al antioxidante de referencia (ácido ascórbico), sin embargo, los estudios en *D. melanogaster*, demuestran una eficaz actividad antimutagénica; se apreció inhibición del 40-92% de las mutaciones inducidas por el Uretano, agente conocido por su potencial mutagénico. El postratamiento reveló resultados superiores con relación a los demás, a pesar de que el pretratamiento y cotratamiento también hayan presentado resultados alentadores. Se recomienda continuar con la investigación rea-

de Oliveira, R. et al. Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de Dorstenia brasiliensis en Drosophila melanogaster

lizando la separación de los metabolitos secundarios presentes en los rizomas según sus afinidades químicas empleando para ello solventes polares y apolares, también se recomienda emplear otros modelos animales como *Mus musculus* y *Danio rerio* en los ensayos *in vivo* para conocer el efecto del extracto sobre diferentes organismos animales.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, a la Prof. Lic. Elodia Concepción Torres, responsable del laboratorio y a los demás miembros del equipo de investigación, Univ. Lucía Dávalos, Leticia Gómez, Andrea Ucedo, Lic. Rossana Ocampos, Lic. José Oliver y a la familia Domínguez por permitir la colecta del material vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atawodi, S. E. (2005). Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(2), 128-133.
- Ayuso, D. M.; Tejedor, L. M.; Serrano, A. G. (2018). Enfermería Familiar y Comunitaria: Actividad Asistencial y Aspectos Ético-Jurídicos. Díaz de Santos, Segunda edición, 530 pp.
- Ballvé, A.; Saraiva, N.; Auler, L. A. & Frabes, K. (2004). Plantas Medicinaias de uso popular, atlas farmacognóstico. Editorial ULBRA. Brasil. 205 pp.
- Barreiro, P. (1984). El Cerro de Montevideo. Montevideo: Intendencia Municipal de Montevideo.
- Berdonces, J. L. (2019). Enciclopedia de Fitoterapia y Plantas Medicinales. Integral, 239 pp.
- Buitrago Gallego-Nicasio, V. M. M. (2018). Preparación y catas de aguas, cafés e infusiones. H0TR0209. Editorial IC. M06.
- Doroteo, V. H.; Díaz, C.; Terry, C. & Rojas, R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 79(1): 13-20.
- Dufall, K. G.; Ngadjui, B. T.; Simeon, K. F.; Abegaz, B. M. & Croft, K. D. (2003). Antioxidant activity of prenylated flavonoids from the West African medicinal plant *Dorstenia mannii*. *Journal of ethnopharmacology* 87(1), 67-72.
- Durán, D. H.; Tzintzun, O. C.; Juárez, O. G.; González, D. M.; Ceceña, C. D.; Cervantes L. D.; Michel, C. Y. L. & Ruíz, C. A. (2019). Compendio Científico en Ciencias Agrícolas y Biotecnología. Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. Ciudad de México. 2: 68.
- Frei, H. & Würzler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 203(4), 297-308.
- García, C. (2007). Estudio fitoquímico e atividade biológica de *Pavonia distinguenda* A.ST.- HILL. et naudin e *Dorstenia brasiliensis* Lam. Manancial. Santa Maria: Repositorio digital da UFSM.
- Gayozo, E.; Rivarola, C.; Marín Insfrán, L. & Filizzola, N. (2016)a. Actividad antimutagénica de *Salvia hispanica* sobre mutaciones y recombinaciones somáticas en *Drosophila melanogaster*. *Steviana* 8(1):50-58.

- Gayozo, E.; Rivarola, C.; Núñez, C.; Marín Insfrán, L. (2016)b. Efecto antimutagénico del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre mutaciones y recombinaciones inducidas en *Drosophila melanogaster*. *Steviana* 8(2):92-101.
- González M. G. G.; González Y. P. V. & Degén, R. L. A. (2019). *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Moraceae): caracterización morfoanatómica de una especie polimórfica, empleada con fines medicinales en Paraguay, *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 7 (2): 116-125.
- Graf, U.; Würzler, F. E.; Katz, A. J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C. B. & Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis* 6(2): 153-188. doi: 10.1002/em.2860060206.
- Hoehne, F.C. (1939) Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. Departamento de Botânica do Estado, São Paulo.
- Hostettmann, K.; Gupta, M. P.; Marston, A. & Ferreira Quiroz. E. (2008). Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos. Secretaría Ejecutiva de la Organización del Convenio Andrés Bello. Colombia, 234 pp.
- Imreh, S.; Klein, G. & Zabarovsky, E. R. (2003). Search for unknown tumor antagonizing genes. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 38(4): 307-321.
- Jiménez, M. R. (2013). Estudio antigenotóxico y de citotoxicidad de plantas medicinales de uso cotidiano y de sus fenoles más característicos (Doctoral dissertation, Universidad de Córdoba).
- Kastenbaum, M. A. & Bowman, K. O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 9(5): 527-549. doi: 10.1016/0027-5107(70)90038.
- Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J. & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology* 25(4): 726-732.
- Kuster, R.; Robson, B.; Da Silva, A; Parente, J. & Mors, W. (1994). Furocoumarins from the rhizomes of *Dorstenia brasiliensis*. *Phytochemistry* 36(1): 221-223.
- Lopes, D.; Rodrigues, R.; Coelho, K.; Santos, C. & Leitao, C. (2001). Photosensitization and Mutation Induced in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Strains by Dorstenin, a Psoralen Analog Isolated from *Dorstenia bahiensis*. *Planta Med.* 67(9): 820-824.
- Marín Insfrán, L.; Gayozo, E. & Zamorano-Ponce, E. (2019). Efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* Link (Pata de buey) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática. *Steviana* 11(1):15-25.
- Martínez, D. (1978). Semanario farmacéutico. Revista científica, profesional y económica de la respectiva facultad. Madrid; Oficina Tipográfica del Hospicio, p.75.
- Martínez, M.; Mancuello, M.; Brítez F.; Pereira, C.; Arrúa, J.; Franco, G.; Conteiro, M.; Iañez, V.; González, F.; Benítez, B.; López, T.; Pérez, S. & Ferreira, F. (2012). Caracterización química y actividades biológicas de Lapachol ais-

de Oliveira, R. et al. Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* en *Drosophila melanogaster*

- lado de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos. *Steviana* 4: 47–64.
- Omisore, N. O. A.; Adewunmi, C. O.; Iwalewa, E. O.; Ngadjui, B. T.; Adenowo, T. K.; Abegaz, B. M.; Ojewole, J. A. & Watchueng, J. (2005). Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7):1087-1094.
- Patiño Cabral, L. M.; Domínguez, S.; Martínez, P.; Gayozo Melgarejo, E.; De Oliveira, R.; Torres, E.; Ocampos Jara, R. M. & Marín Insfrán, L. (2019). Evaluación mutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. en células meristemáticas de *Allium cepa* L. *Journal of Basic & Applied Genetics* (30) Suppl. 1: 330.
- Quevedo, A. & Pires, E. (2011). Atividades melanogénica, genotóxica e anti-proliferativa de extratos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e *Dorstenia brasiliensis* Lam induzidas por radiação UVA. Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
- Rodrigo, G. (2007). Actividad genotóxica de *Opuntia soehrensii*, evaluada por el test de mutación y recombinación somática en *D. melanogaster*. *Biofarbo*, 15: 61-66.
- Rodrigues De Andrade, H.H.; Reguly, M. L. & Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. En *Drosophila Cytogenetics Protocols*, Ed. D. S. Henderson, 389-412. Humana Press. Totowa. New Jersey.
- Roosevelt, L. C. P.; Roosevelt, C. V. & Valdés O. F. F. (2016). Ozonoterapia. Libros en Red. Santa Fe, 38-39 pp.
- Singh, K.P.; Dwevedi, A.K. & G. Dhakre. (2011). Evaluation of antibacterial activities of *Chenopodium album* L. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 2(3): 398–401.
- Uchiyama, T., Hara, S.; Makino, M. & Fujimoto, Y. (2002). Seco-Adianane Type Triterpenoides from *Dorstenia brasiliensis* (Moraceae). *Elsevier*. 60(8): 761-764.
- Welter, S. (2012). Levantamento de plantas medicinais utilizadas como anti-oftálmicas nas reducoes jesuítico-guaraní (Provincia Jesuítica do Paraguai, séculos XVII e XVIII). Rio Grande do Sul: UFRGS.
- Young, B. D.; Debernardi, S.; Lillington, D. M.; Skoulakis, S.; Chaplin, T.; Foot, N. J. & Raghavan, M. (2006). A role for mitotic recombination in leukemogenesis. *Advances in enzyme regulation* 46(1): 90-97.

ANEXOS

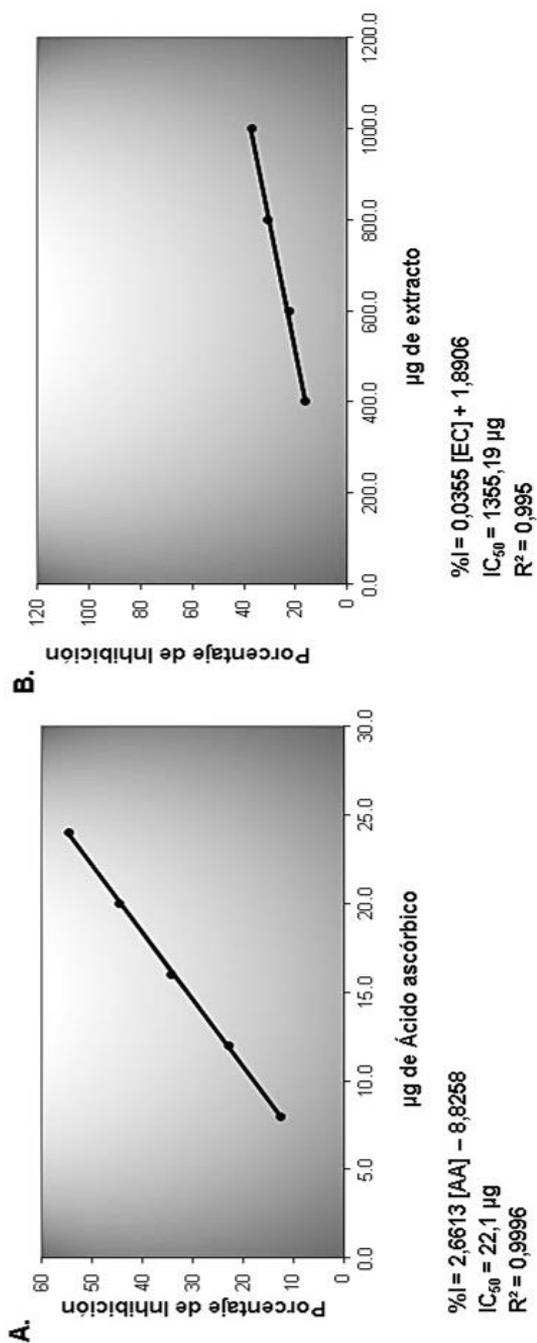


Figura 1. Curva de calibración de las actividades antioxidantes. **A.** Patrón de referencia, Ácido Ascórbico. **B.** Extracto crudo de *D. brasiliensis*.

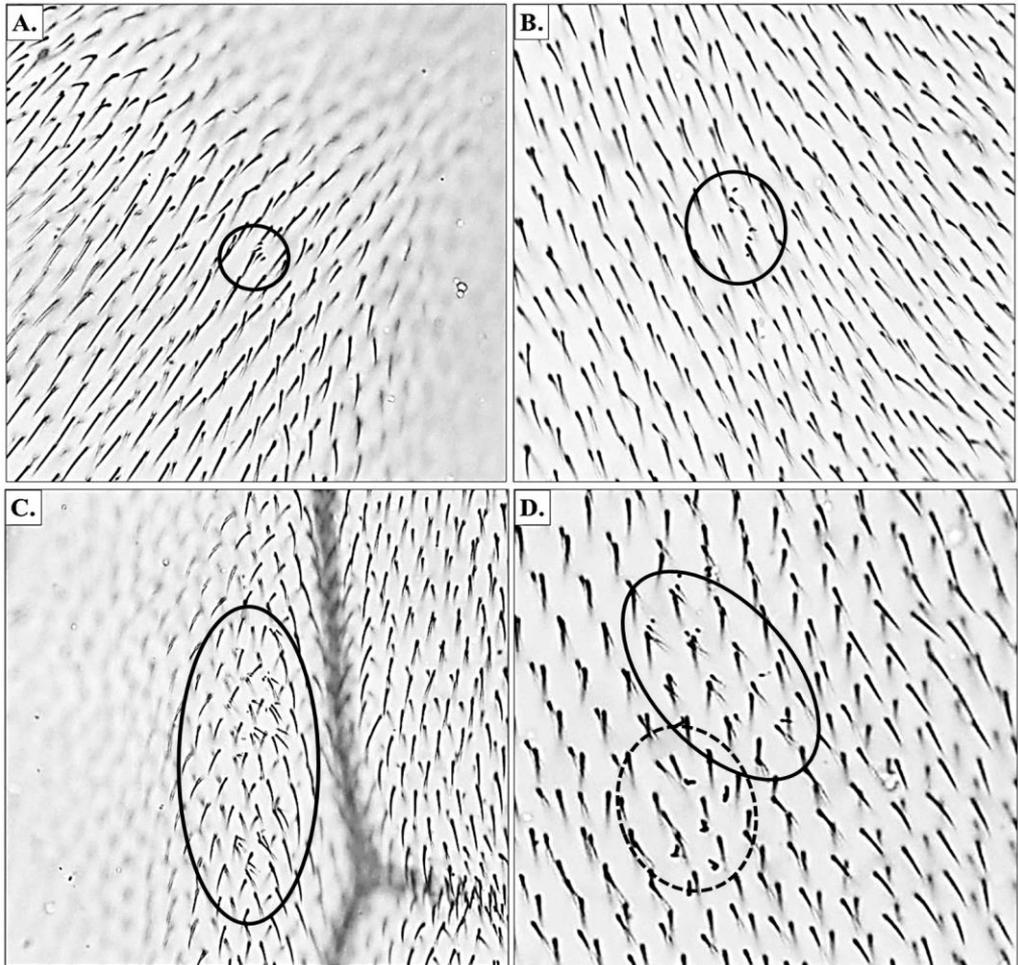


Figura 2. Clones mutantes encontrados en las alas de *D. melanogaster*. **A.** Mancha Simple Pequeña (MSP) tipo *mwh* (circulo) en tratamiento con Uretano 1 mg.mL⁻¹ y 0,1 mg.mL⁻¹ del extracto etanólico de *D. brasiliensis*. **B.** Mancha Simple Pequeña (MSP) tipo *mwh* (circulo) en tratamiento con Uretano 1 mg.mL⁻¹ y 10 mg.mL⁻¹ del extracto. **C.** Mancha Simple Grande (MSG) tipo *mwh* (elipse) en tratamiento con Uretano 1 mg.mL⁻¹ y 1 mg.mL⁻¹ del extracto. **D.** Mancha Gemela (MG) tipo *mwh* (elipse sólida) y *flr*³ (elipse punteada) en tratamiento con Uretano 1 mg.mL⁻¹ y 0,1 mg.mL⁻¹ del extracto.

Tabla 1. Análisis estadístico del potencial antimutagénico del extracto etanólico de la *D. brasiliensis*.

Tratamientos	Número de alas	MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2	Inhibición (%)
Pretratamiento						
Agua destilada	20	0,30 (03)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,30 (03)	-
Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	4,30 (43)	+ 0,20 (02)	i 0,00 (00)	i 4,50 (45)	+ -
0,1 mg.mL ⁻¹ extracto + Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	1,60 (16)	+ 0,00 (00)	i 0,00 (00)	i 1,60 (16)	+ 64
1 mg.mL ⁻¹ extracto + Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	2,00 (20)	+ 0,10 (01)	i 0,00 (00)	i 2,10 (21)	+ 53
10 mg.mL ⁻¹ extracto + Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	1,70 (17)	+ 0,10 (01)	i 0,40 (04)	i 2,20 (22)	+ 51
Cotratamiento						
Agua destilada	20	0,30 (03)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,30 (03)	-
Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	1,60 (16)	+ 0,40 (04)	i 0,00 (00)	i 2,00 (20)	+ -
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 0,1 mg.mL ⁻¹ extracto	20	0,80 (08)	i 0,30 (03)	i 0,10 (01)	i 1,20 (12)	+ 40
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 1 mg.mL ⁻¹ extracto	20	1,00 (10)	+ 0,10 (01)	i 0,00 (00)	i 1,10 (11)	+ 45
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 10 mg.mL ⁻¹ extracto	20	0,30 (03)	i 0,10 (01)	i 0,00 (00)	i 0,40 (04)	i 80
Posttratamiento						
Agua destilada	20	0,30 (03)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,30 (03)	-
Uretano 1 mg.mL ⁻¹	20	6,50 (65)	+ 0,80 (08)	+ 0,60 (06)	+ 7,90 (79)	+ -
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 0,1 mg.mL ⁻¹ extracto	20	0,50 (05)	i 0,00 (00)	i 0,10 (01)	i 0,60 (06)	i 92
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 1 mg.mL ⁻¹ extracto	20	2,40 (24)	+ 0,00 (00)	i 0,10 (01)	i 2,50 (25)	+ 68
Uretano 1 mg.mL ⁻¹ + 10 mg.mL ⁻¹ extracto	20	1,20 (12)	+ 0,10 (01)	i 0,10 (01)	i 1,40 (14)	+ 82

Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$ ^bIncluso las manchas simples f_{r^2} raras.

Efectos teratogénicos del extracto acuoso de *Maytenus ilicifolia* (Reissek ex Mart.) sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*

Ruiz Díaz, K.^{1*}, Torres, E.², Marín, L.², Gayozo, E.²

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Carrera Bioquímica, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo, Paraguay.

*E-mail del autor: karenpatriciaruizdiazalmiron@gmail.com

Efectos teratogénicos del extracto acuoso de *Maytenus ilicifolia* (Reissek ex Mart.) sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*. En Paraguay la planta medicinal *Maytenus ilicifolia* (Cangorosa) es muy utilizada para regular la fecundidad, purificar la sangre y tratar otras afecciones. El uso frecuente en la población es con fines abortivos, empleando las hojas para su consumo vía oral, sin embargo, existe muy poca información acerca de sus efectos sobre el desarrollo embrionario. Por esto se propuso como objetivo evaluar los efectos teratogénicos de hojas de *M. ilicifolia* sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*. Para ello se prepararon diferentes diluciones de extracto acuoso de hojas *M. ilicifolia* equivalentes a las concentraciones de consumo popular. Los embriones viables de *G. gallus domesticus* fueron expuestos, luego de 4 días de incubación, a tres concentraciones del extracto acuoso (0,0004 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 0,0038 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y 0,0382 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y a los controles (solución salina 34,35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y cafeína 0,92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), durante 10 días más. Posteriormente, se procedió a realizar la evaluación morfométrica de los embriones. Los datos obtenidos fueron analizados empleando el test de Kruskal-Wallis y el test U de Mann-Whitney, los resultados evidenciaron diferencias significativas en las dimensiones de la cabeza y del ala izquierda ($P < 0,05$), también se encontraron embriones muertos y embriones con malformaciones a las concentraciones evaluadas. Estos resultados sugieren que el extracto acuoso de *M. ilicifolia* tendría efectos sobre el desarrollo embrionario de *G. gallus domesticus* con un alto índice de embriotoxicidad y retraso en el desarrollo de los mismos.

Palabras clave: Teratógeno, embriotoxicidad, *Gallus gallus domesticus*, *Maytenus*

Teratogenic effects of *Maytenus ilicifolia* (Reissek ex Mart.) aqueous extract on the embryonic development of *Gallus gallus domesticus*. In Paraguay the medicinal plant *Maytenus ilicifolia* (Cangorosa) is widely used to regulate fertility, purify blood and treat other conditions. Frequent use in population is for abortion purposes, using the leaves for oral consumption; however, there is not enough information about its effects on embryonic development. The mainly objective was to evaluate the teratogenic effects of aqueous extract of *M. ilicifolia* leaves on *Gallus gallus domesticus* embryonic development. For this, different concentrations of the aqueous extract of *M. ilicifolia* leaves were prepared, equivalent to popular consumption. The viable embryos of *G. gallus domesticus* were exposed, after 4 days of incubation, to three concentrations of the aqueous extract (0.0004 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.0038 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 0.0382 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and controls (saline 34.35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and caffeine 0.92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), for another 10 days. Subsequently, the morphometric evaluation of the embryos was carried out. The data obtained was analyzed using the Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney U test, results showed significant differences in the dimensions of the head and left wing ($P < 0.05$), dead embryos were also found at the evaluated concentrations. These results suggest that the aqueous extract of *M. ilicifolia* would have effects on the embryonic development of *G. gallus domesticus* with a high rate of embryotoxicity and delay in their development.

Keywords: Teratogenic effects, embryotoxicity, *Gallus gallus domesticus*, *Maytenus*

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son de uso muy común en toda Sudamérica, se siguen utilizando en varios países, tanto en poblaciones ancestrales como en culturas actuales (Huamantupa *et al.*, 2011). Paraguay no escapa de estas creencias y costumbres que se transmiten de generación en generación, siendo comercializadas generalmente por el nombre común o vernáculo y consumidas oralmente en forma de infusiones, decoctos o bebidas tradicionales como el tereré o el mate, sin embargo persiste en la población la creencia de que el consumo de plantas medicinales carecen de efectos adversos para la salud, y a su vez que su consumo resulta más bien beneficioso, en desconocimiento de que las plantas presentan metabolitos secundarios que podrían presentar algún tipo de toxicidad en el organismo (Degen *et al.*, 2005).

Existen numerosas especies vegetales que son empleadas con la finalidad de regular la fertilidad o con fines abortivos directamente, sin embargo, muchas de estas especies podrían presentar efectos adversos, como ser tóxicos, genotóxicos e incluso teratogénicos (de Araújo *et al.*, 2016).

El *Maytenus ilicifolia*, más comúnmente conocido en nuestro país como Cangorosa, es una planta dioica y nativa de Brasil, Paraguay, Argentina, Bolivia y Uruguay, pertenece a la familia Celastraceae, en su mayoría son árboles o arbustos perennes (de hasta 5 metros de altura), con hojas coriáceas alternas, florecen en primavera y fructifican en verano, contienen diferentes fitoconstituyentes dependiendo del órgano vegetal, y son muy consumidos en forma de infusiones calientes (té), o como decocciones (bebidas tradicionales como el mate) para purificar la sangre, el tratamiento

de úlceras, diurético, para regular la fertilidad e inducir la menstruación, y también como abortivo (Alonso *et al.*, 2007; Pin *et al.*, 2009; Crestani *et al.*, 2009, Ibarrola & Degen, 2011).

En un trabajo realizado con ratas *Wistar* les fueron suministrados un extracto hidroacetónico de *M. ilicifolia* durante el periodo organogénico, la gestación se desarrolló normalmente y no se observaron cambios durante el desarrollo del embrión, sin embargo, posibles efectos tóxicos como resultado de la interacción del extracto de *M. ilicifolia* con los órganos implicados en la proliferación celular, así como en tejidos embrionarios, aún debían determinarse (Cunha *et al.*, 2014).

En nuestro país no existen registros científicos sobre los posibles efectos teratogénicos que podrían ocasionar el consumo de las hojas de *M. ilicifolia* en forma de infusiones durante la etapa embriogénica. A pesar de su uso popular generalizado, la información embriotoxicológica científica para esta especie vegetal (*M. ilicifolia*) sobre el rendimiento reproductivo sigue siendo limitada, es por esto que este estudio tiene como objetivo principal determinar los posibles efectos embriotóxicos y teratogénicos sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal estudiado

Maytenus ilicifolia Reissek ex Mart.: Paraguay. Vivero etnobotánico-jardín de aclimatación de plantas nativas medicinales del Jardín Botánico y Zoológico de Asunción, Departamento Central; 25°14'56" S - 57°34'23" O. Material de herbario testigo: K. Ruiz Díaz, E. Gayozo y Luciano Paniagua 001 (FACEN).

Preparación del extracto acuoso de hojas de *Maytenus ilicifolia*

Se procedió al secado de las hojas de *M. ilicifolia* de manera natural que fueron puestas a temperatura ambiente ($25^{\circ}\pm 2^{\circ}$ C) evitando el contacto directo con el sol o cualquier acto que acelere dicho proceso, seguidamente se procedió a la molienda de las mismas mediante el uso de un molino manual, el tamizaje hasta obtener las partículas pulverizadas y por último se realizó el pesaje de las mismas (Hostettmann *et al.*, 2008).

Posteriormente se realizó la suspensión en agua destilada para el proceso de cocción hasta el punto de ebullición durante 5 minutos, hasta la obtención de la infusión para los tratamientos correspondientes. Luego se procedió al filtrado con ayuda de un equipo filtrador a modo de separar restos de la molienda, una vez filtrado se empleó la misma como solución stock y a través de las cuales se obtuvieron las diluciones ($0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) para los tratamientos correspondientes, estas diluciones se refrigeraron a 4° C hasta su uso (Segovia *et al.*, 2016).

Bioensayo de evaluación teratogénica con embriones de *G. gallus domesticus*

Se emplearon un total de 30 huevos fecundados, los cuales fueron verificados con ayuda de un ovoscopio, los mismos fueron pesados obteniéndose una media de 52,4 g por huevo. La limpieza de cada huevo se realizó con Etanol 70% a modo de eliminar la carga de agentes contaminantes, luego fueron transferidos a un recipiente de plástico de dimensiones 15 x 30 x 11 cm recubiertos con algodón estéril. Los huevos dispuestos equidistantes entre sí se depositaron en una incubadora (Thermo

Schaker 2502, Fanem) a temperatura constante de $38\pm 2^{\circ}$ C y humedad relativa del 30% (Bupp *et al.*, 1998).

Los huevos fueron incubados en dos fases, la primera fue por 96 horas (4 días), culminado este periodo se determinó la localización de la cámara de aire con ayuda del ovoscopio y posteriormente con una jeringa estéril se inoculó un volumen de 0,2 mL las dosis de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ del extracto de *M. ilicifolia* determinadas en base al peso promedio de los huevos según el consumo popular, como control negativo se empleó suero fisiológico $34,35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y como control positivo cafeína de $0,92 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en las cámaras de aire. Primeramente, se emplearon 6 huevos en cada tratamiento; luego del proceso de inoculación las aberturas fueron selladas con parafina, todo el proceso fue realizado en condiciones estériles en campana de flujo laminar. Se depositaron nuevamente los huevos en la incubadora para continuar con su desarrollo por 10 días más, lo cual comprende la segunda fase de la incubación. Culminada la segunda fase de incubación, se procedió a la apertura de cada huevo, se extrajeron los embriones, se depositaron en Etanol 98° GL para su conservación y fueron pesados en una balanza de precisión 0,0001 (KERN®) (Pawlak *et al.*, 2013).

Las evaluaciones de las malformaciones fueron determinadas realizando mediciones de las longitudes del pico (superior e inferior); cabeza (laterolateral), alas (derecha e izquierda), y tarsos (derecho e izquierdo) con ayuda de un calibre de precisión de 0,005 mm. Se calculó el porcentaje de embriotoxicidad para cada concentración del extracto de *M. ilicifolia* por medio de la fórmula descrita por (R. *et al.*, 2018):

$$\% \text{ de Embriotoxicidad} = \frac{\text{Número de embriones muertos}}{\text{Número total de embriones}} \times 100$$

Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos fueron analizados empleando Test U de Mann-Whitney (5% de error) para determinar diferencias entre parámetros morfológicos evaluados y el test de Kruskal-Wallis, para determinar diferencias entre tratamientos (95% de confianza), para ello se empleó el software estadístico Past 4.0 (Hammer *et al.*, 2001). Los gráficos estadísticos se realizaron también con software Past 4.0 (Hammer *et al.*, 2001).

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ - UNA) con dictamen número 509/19.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el ensayo realizado con las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *M. ilicifolia* en las determinaciones de los pesos de los embriones del tratamiento control se registró un valor promedio de 14,75±4,69 g y en el control positivo se observó un promedio de 15,63±6,39 g. En el tratamiento realizado con el extracto a una concentración de 0,0382 µg.g⁻¹ los embriones presentaron un peso medio de 22,67±12,21 g, con la concentración de 0,0038 µg.g⁻¹ se obtuvo un promedio de 18,7±15,06 g y con la concentración de 0,0004 µg.g⁻¹ se observó un promedio de 19,4±19,37 g. Sin embargo, estos no fueron significativamente diferentes ($P>0,05$) en comparación con los datos

encontrados en el control negativo (Tabla 1, Figura 1.B).

El porcentaje de embriotoxicidad hallado en los distintos tratamientos con el extracto acuoso de *M. ilicifolia*, a la concentración de 0,0004 µg.g⁻¹, 0,0038 µg.g⁻¹ y 0,0382 µg.g⁻¹ fueron del 50%, 66,67% y 50% respectivamente, observando un efecto embriotóxico significativo ($P<0,05$). Todos evidenciaron que el extracto acuoso de *M. ilicifolia* a dichas concentraciones es tóxico para los embriones de *G. gallus domesticus* expuestos, resultados similares presentaron embriones expuestos al control positivo, indicando con un 50% la toxicidad del medio siendo significativa ($P<0,05$) (Figura 1.A). Los embriones expuestos al control negativo no demostraron toxicidad alguna.

En las determinaciones de longitudes de los picos no se evidenciaron diferencias entre los distintos tratamientos ($P>0,05$), en cuanto a la longitud de picos superiores se obtuvieron en las concentraciones de 0,0004 µg.g⁻¹ de 0,35±0,07 cm, 0,0038 µg.g⁻¹ con 0,35±0,21 cm y 0,0382 µg.g⁻¹ con 0,35±0,17cm. Sin embargo, presenta una diferencia significativa ($P<0,05$) los picos inferiores hallándose una disminución en la longitud del pico con promedio de 0,48±0,06 cm en los embriones expuestos al control positivo, lo que demuestra el retraso en el crecimiento de los embriones. Para los tratamientos de 0,0382 µg.g⁻¹, 0,0038 µg.g⁻¹ y 0,0004 µg.g⁻¹ no se observaron una disminución de la longitud promedio de los picos inferiores en comparación al control negativo con promedios de 0,63±0,12 cm, 0,43±0,31 cm y 0,55±0,07 cm respectivamente (Tabla 1, Figura 2.A, B).

En relación a la longitud de la cabeza antero-posterior, se observaron diferencias

Ruiz Díaz, K. et al. Efectos teratogénicos de *Maytenus ilicifolia* en el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*

significativas ($P < 0,05$), con el control positivo se obtuvo un promedio de $1,36 \pm 0,17$ cm y a la concentración más elevada de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ el promedio fue de $1,17 \pm 0,25$ cm, con menor longitud en comparación a los datos encontrados en el control negativo. A las demás concentraciones, $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ presentaron un promedio de $1,15 \pm 0,35$ cm y $1,17 \pm 0,59$ cm respectivamente, estos resultaron ser significativamente diferentes ($P > 0,05$) en comparación con el control negativo (Tabla 1, Figura 2.C). En cuanto a la longitud de la cabeza latero-lateral en los diferentes tratamientos presentaron un promedio de $1,45 \pm 0,21$ cm para el tratamiento con la concentración de $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, con el tratamiento a la concentración de $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ los valores fueron de $1,43 \pm 0,64$ cm y para el tratamiento con la concentración de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ fue de $1,47 \pm 0,15$ cm, en todas se observó un ligero aumento en la longitud comparados al control negativo, sin embargo no fueron significativos ($P > 0,05$) (Tabla 1, Figura 2.D). Sin embargo, se observaron anomalías craneofaciales muy visibles, como reducción del cráneo, deformidad en una región de la cabeza en algunos embriones.

En las determinaciones de longitudes de las alas, el lado derecho, no registró diferencias significativas ($P > 0,05$) en los distintos tratamientos, dando un promedio de $1,5 \pm 0,42$ cm en la concentración más baja $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $1,93 \pm 1,59$ cm en la concentración de $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $1,63 \pm 0,46$ cm a la concentración de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ que corresponde a la más elevada, siempre en comparación a los datos obtenidos en el control negativo con valores promedio de $2,03 \pm 0,79$ cm (Tabla 1, Figura 3.A). En cuanto a las longitudes de las alas, lado izquierdo, el control

negativo registro un valor promedio de $2,03 \pm 0,79$ cm, en los tratamientos realizados con la concentración de $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ los embriones presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) con aumento en las longitudes con un valor promedio de $1,5 \pm 0,43$ cm y $1,63 \pm 0,52$ cm respectivamente, lo mismo se observó en embriones expuestos al control positivo. Sin embargo, a la concentración de $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ el promedio fue de $1,93 \pm 1,60$ cm lo cual no fue significativamente diferente ($P > 0,05$) comparado al control negativo (Tabla 1, Figura 3.B).

Además, se observó que los embriones tenían una ausencia parcial de las plumas en ciertas partes del ala en la dosis más elevada y morfo-anatómicamente se observaron diferencias en cuanto al tamaño de las alas, se encontró además, que los embriones de *G. gallus domesticus*, presentaron evisceración al ser expuestos a distintas dosis del extracto acuoso de *M. ilicifolia*, siendo más evidente a la dosis de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

En las distintas concentraciones del extracto se pudo observar una gran diferencia significativa ($P < 0,05$) en cuanto a la longitud del tarso derecho e izquierdo en los embriones expuestos al control positivo. En la longitud promedio del tarso derecho en el tratamiento control negativo se evidenció un valor de $2,06 \pm 2,23$ cm, mientras que los tratamientos llevados a cabo con las concentraciones de $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ presentaron valores promedios de $0,75 \pm 0,49$ cm, $0,73 \pm 0,40$ g y $0,63 \pm 0,21$ cm respectivamente, sin embargo, estos resultados no fueron significativamente diferentes ($P > 0,05$) en comparación con lo hallado en el control negativo (Tabla 1, Figura 3.C).

El mismo comportamiento se observó en la longitud promedio del tarso izquierdo, el tratamiento control negativo registro un valor promedio de $2,05 \pm 2,23$ cm, los embriones tratados con $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ presentaron un promedio de $0,75 \pm 0,49$ cm, y tanto la concentración de $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ como la más elevada $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ presentaron promedios de $0,77 \pm 0,45$ cm y $0,67 \pm 0,23$ cm respectivamente los cuales resultaron no ser significativos ($P > 0,05$) comparados al grupo control (Tabla 1, Figura 3.D).

Estas alteraciones concuerdan, en general, con la información consultada, donde a mayores dosis, se observó mayor frecuencia de malformaciones, además se observaron evisceraciones en las concentraciones más elevadas y ausencia parcial de las plumas en ciertas partes del ala en todas las concentraciones expuestas (Acuña *et al.*, 1997).

No obstante, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en cuanto a los pesos de los embriones y en las longitudes de las alas, solo los tarsos presentaron diferencias, aunque en efecto, la dieta del organismo modelo empleado es importante, ya que exceso o deficiencia de minerales o vitaminas, podrían también modificar la embriogénesis. Además, debe considerarse la vía y el vehículo utilizado por la sustancia testada, ya que la distribución, metabolismo y absorción de éste, también juegan un rol importante en el desarrollo embrionario (Acuña *et al.*, 1997).

M. ilicifolia es una planta tradicionalmente utilizada en nuestro país como alterativa medicinal, es utilizada como abortivo, específicamente la parte de sus hojas como té. En otros ensayos se han reportado efectos antiulcerogénico (Ibarrola *et al.*,

2011). Sin embargo, el mecanismo de acción permanece desconocido como lo indican en otro experimento realizado con *M. ilicifolia* (Leite *et al.*, 2010). Las hojas de *M. ilicifolia* contienen mayoritariamente triterpenos glucósidos, flavonoides y derivados de catequinas, los cuales podrían ser los causantes de los efectos registrados (Itokawa *et al.*, 1991).

Además, en otro estudio llevado a cabo por Cunha *et al.* (2014) con el extracto hidroacetónico de *M. ilicifolia* para evaluar los efectos en el rendimiento reproductivo femenino y desarrollo embrionario en ratas *Wistar* no presentó alteración en comparación con el extracto acuoso de *M. ilicifolia* el cual presentó embriotoxicidad y efectos teratogénicos en el modelo empleado en este estudio.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que a todas las concentraciones del extracto acuoso de *M. ilicifolia* evaluadas, presentan embriotoxicidad y alteraciones en el desarrollo embrionario, evidenciando diferentes malformaciones, ya sea en las dimensiones de la cabeza, en las extremidades y en el tronco de los embriones de *G. gallus* empleados. La dosis de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ resultó ser la que posee un mayor efecto adverso sobre las dimensiones antero-posterior de la cabeza y del ala izquierda, así también anomalías morfo-anatómicas como evisceraciones, reducción del tamaño de las alas y de la cabeza. Para todas las concentraciones del extracto acuoso de *M. ilicifolia* utilizadas, $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, presentaron efectos embriotóxicos en el 50% de los embriones tratados, los cuales no finalizaron el desarrollo embrionario, sugiriendo que podría deberse a la acción

Ruiz Díaz, K. et al. Efectos teratogénicos de *Maytenus ilicifolia* en el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*

del extracto acuoso sobre el organismo, el tiempo de exposición y las dosis utilizadas. A fin de confirmar estos resultados, se recomienda realizar otros ensayos con metabolitos secundarios aislados según la polaridad de los mismos, y empleando otros organismos modelos como ratones (*Mus musculus*), mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) o pez cebra (*Danio rerio*) a fin de obtener mayores detalles del posible mecanismo de acción teratogénica, el principio activo que lo podría estar ocasionando y por sobre todo extrapolar dichos resultados en poblaciones humanas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acuña, H.; Silva, T.; Muñoz, T.; Lemus A. & Fuenzalida B. (1997). Efecto del ion cobre en el desarrollo embrionario de pollo (*Gallus gallus*). *Revista Chilena de Anatomía*.
- Alonso, J. & Desmarchelier C. (2007). *Maytenus ilicifolia* Martius (Congo-rosa). In *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* Vol. 6, pp. 11–22.
- Bupp S. & Shibley I. (1998). Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. *Alcohol and Alcoholism*, 33(5), 457–464. <https://doi.org/10.1093/alcalc/33.5.457>
- Crestani, S.; Rattmann, Y.; Cipriani, T.; de Souza, L.; Iacomini, M.; Kassuya, C. & da Silva, J. (2009). A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. *Vascular Pharmacology*, 51(1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2009.02.005>
- Cunha, A.; Auharek, S.; Oliveira, R.; Siqueira, J.; Vieira, M.; Leite, V. & Portugal, L. (2014). Effects of *Maytenus ilicifolia* on reproduction and embryo-fetal development in Wistar rats. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 3711–3720. <https://doi.org/10.4238/2014.May.9.16>
- de Araújo, C.; Santiago, F.; Peixoto, M.; de Oliveira, J. & Coutinho, M. (2016). Use of medicinal plants with teratogenic and abortive effects by pregnant women in a city in northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 38(3), 127–131. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1580714>
- Degen, R.; Soria, N. & Ortiz, M. (2005). Problemática de nombres comunes de plantas medicinales comercializadas en Paraguay Medicinal plants marketed in Paraguay : Problematic of folk names. *Rev. Dominguesa*, 21(1), 11–16.
- Hammer, Ø.; Harper, D. A. & Ryan, P. (2001). Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1–9.
- Hostettmann, K.; Gupta, M. P.; Marston, A. & E. Ferreira Quiroz. (2008). Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos. Secretaría Ejecutiva de la Organización del Convenio Andrés Bello. Colombia. 234 pp.
- Huamantupa, I.; Cuba, M.; Urrunaga, R.; Paz, E.; Ananya, N.; Callalli, M. & Coasaca, H. (2011). Riqueza, uso y origen de plantas medicinales expandidas en los mercados de la ciudad del Cusco. *Revista Peruana de Biología*, 18(3), 283–291. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i3.439>
- Ibarrola, D. A. & Degen de Arrúa, R. L. (2011). Catálogo ilustrado de 80 plantas medicinales del Paraguay. Facultad de Ciencias Químicas-UNA y Agencia de

- Cooperación Internacional del Japón, Asunción, Paraguay.
- Itokawa, H.; Shiota, O.; Ikuta, H.; Morita, H.; Takeya, K. & Iitaka, Y. (1991). Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry*, 30(11), 3713–3716. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)80096-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)80096-J)
- Leite, J. P. V.; Braga, F. C.; Romussi, G.; Persoli, R. M.; Tabach, R.; Carlinid, E. A. & Oliveirab, A. B. (2010). Constituents from *Maytenus ilicifolia* leaves and bioguided fractionation for gastroprotective activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(2), 248–254. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000200009>
- R., E. B.; Jesubatham, P. D.; Berlin, B. G.; Viswanathan, S. & Srividya, S. (2018). Non-toxic and non teratogenic extract of *Thuja orientalis* L. inhibited angiogenesis in zebra fish and suppressed the growth of human lung cancer cell line. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106: 699–706 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.010>
- Pawlak, K.; Dżugan, M.; Wojtysiak, D.; Lis, M. & Niedziółka, J. (2013). Effect of in ovo injection of cadmium on chicken embryo heart. *African Journal of Agricultural Research* 8(16), 1534–1539.
- Pin, A.; González, G.; Marín, G.; Céspedes, G.; Cretton, S. Christen, P. & Roguet, D. (2009). Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. AGR Servicios Gráficos. Paraguay. p 229.
- Segovia, E.; Arrúa, R.; Barrozo, N.; Duré, R.; Nakayama, H. & Peralta, I. (2016). Evaluación de los efectos mutagénicos/antimutagénicos de *Luehea divaricata* en ratones. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 14(3), 102–106. [https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014\(03\)102-106](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014(03)102-106)

ANEXOS

Tabla 1: Parámetros morfológicos evaluados en embriones de *Gallus gallus domesticus* tratados con el extracto acuoso de *M. ilicifolia*.

Parámetros morfológicos	Tratamientos				
	C. Negativo	C. Positivo	0,0004 µg.g ⁻¹	0,0038 µg.g ⁻¹	0,0382 µg.g ⁻¹
PE (g)	14,75±4,69	15,63±6,39	19,4±19,37	18,7±15,06	22,67±12,21
LPS (cm)	0,57±0,19	0,32±0,02	0,35±0,07	0,35±0,21	0,35±0,17
LPI (cm)	0,60±0,15	0,48±0,06*	0,55±0,07	0,43±0,31	0,63±0,12
LCAP (cm)	1,77±0,51	1,36±0,17*	1,15±0,35	1,17±0,59	1,17±0,25*
LCLL (cm)	1,26±0,15	1,92±0,08	1,45±0,21	1,43±0,64	1,47±70,15
LAD (cm)	2,03±0,79	2,24±0,94	1,5±0,42	1,93±1,59	1,63±0,46
LAI (cm)	2,03±0,80	2,24±0,95*	1,5±0,43*	1,93±1,60	1,63±0,52*
LTD (cm)	2,06±2,23	4,20±1,09*	0,75±0,49	0,73±0,40	0,63±0,21
LTI (cm)	2,05±2,22	4,2±1,09*	0,75±0,49	0,77±0,45	0,67±0,23

PE: peso de embriones, LPS: longitud del pico superior, LPI: longitud del pico inferior, LCAP: longitud de la cabeza antero-posterior, LCLL: longitud de la cabeza latero-lateral, LDA: longitud ala derecha, LAI: longitud ala izquierda, LTD: longitud del tarso derecho y LTI: longitud del tarso izquierdo. * Significancia estadística ($P < 0,05$).

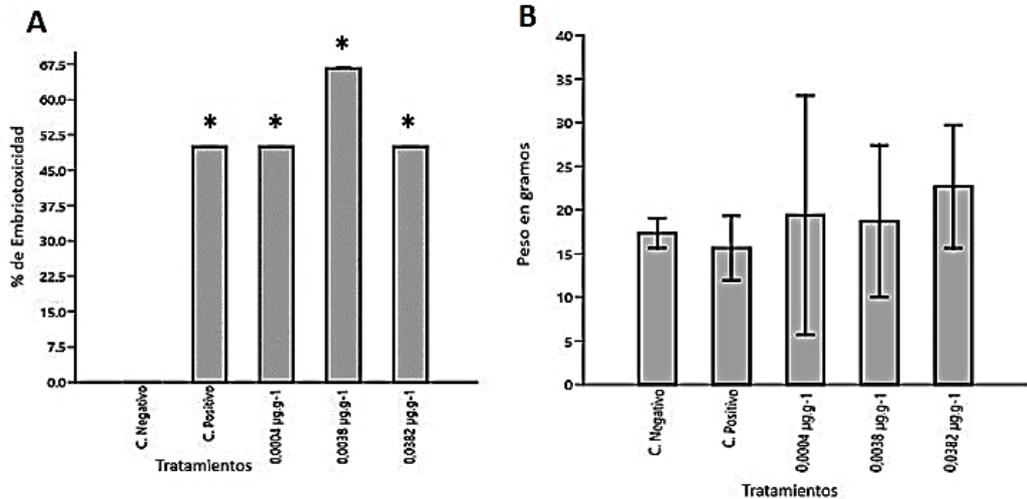


Figura 1. A. Embriotoxicidad del extracto acuoso de *M. ilicifolia* a las concentraciones evaluadas. B. Peso de los embriones de *G. gallus domesticus* expuestas a distintas concentraciones del extracto acuoso de *M. ilicifolia*. * Significancia estadística ($P < 0,05$).

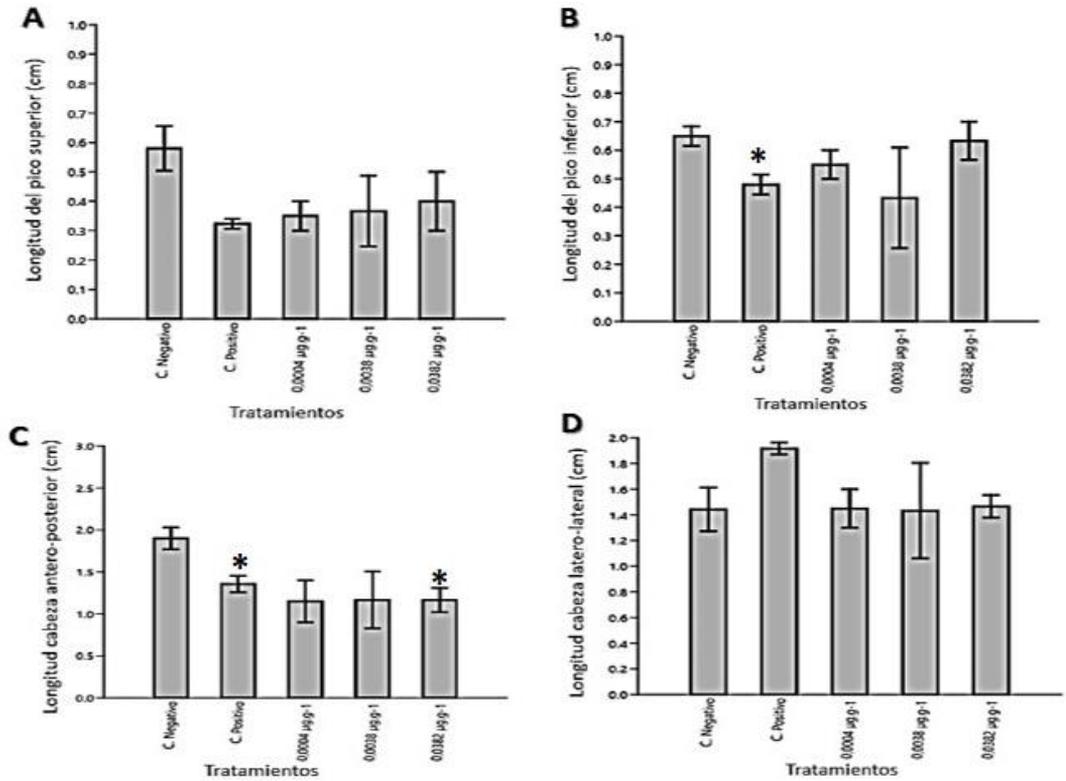


Figura 2. Parámetros morfológicos analizados en el desarrollo embrionario de *G. gallus domesticus*. **A.** Longitud del pico superior **B.** Longitud del pico inferior **C.** Longitud de la cabeza antero-posterior **D.** Longitud de la cabeza latero-lateral. * Significancia estadística ($P < 0,05$).

Ruiz Díaz, K. et al. Efectos teratogénicos de *Maytenus ilicifolia* en el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*

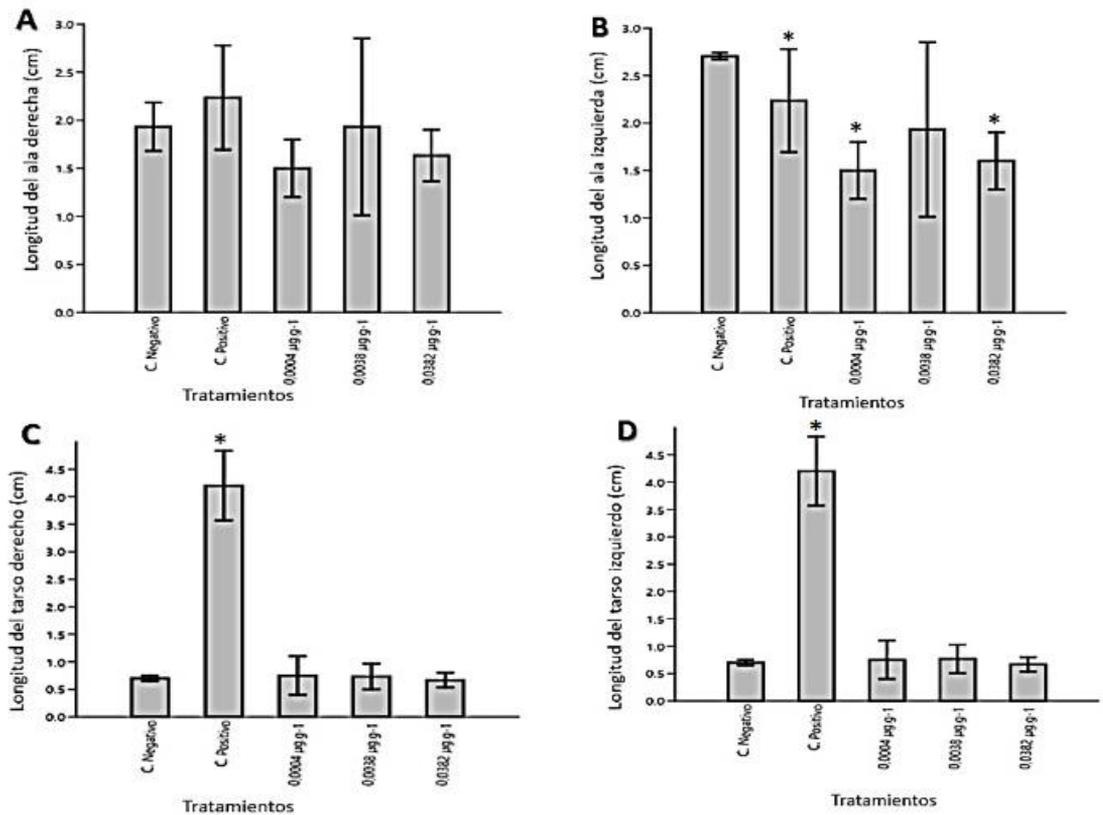


Figura 3. Parámetros morfológicos analizados en el desarrollo embrionario de *G. gallus domesticus*. **A.** Longitud ala derecha **B.** Longitud ala izquierda. **C.** Longitud tarso derecho **D.** Longitud tarso izquierdo. * Significancia estadística ($P < 0,05$).

Evaluación de la actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART

Escobar Ibarrola, L.^{1*}, Torres, E.², Gayozo, E.², Marín Insfrán, L.²

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Carrera de Bioquímica, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo, Paraguay.

*E-mail del autor: leslicale94@gmail.com

Evaluación de la actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART. *Baccharis trimera* es una hierba medicinal perteneciente a la familia Asteraceae con alto contenido de flavonoides, a las que se les atribuye sus capacidades antiinflamatorias y antioxidantes principalmente. Por otra parte, se ha visto que algunas especies de *Baccharis* son potencialmente genotóxicas, y esto podría deberse a ciertos metabolitos con capacidad pro-oxidantes presentes en la planta. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad genotóxica a diferentes concentraciones del extracto acuoso de la parte aérea de *B. trimera* empleando como organismo modelo *Drosophila melanogaster*, para ello, se determinó primeramente la dosis letal 50 (DL₅₀) del extracto realizando tratamientos a individuos de la cepa silvestre Samarkand, siendo esta la concentración de 35,91 mg.mL⁻¹ ($P < 0,05$; r: 0,694). Posteriormente se seleccionaron las concentraciones de 30, 15, 7,5, 3,75 y 1,87 mg.mL⁻¹ para realizar tratamientos crónicos (72 horas) a individuos trans-heterocigotas *mwh+/+flr³*, empleando como control agua destilada y como agente mutágeno Uretano 0,178 mg.mL⁻¹. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el test estadístico de Kastenbaum-Bowman $\alpha = \beta = 0,05$ (binomial condicional), estos resultados evidenciaron que las concentraciones de 1,87 y 7,5 mg.mL⁻¹ presentaron un aumento significativo en la frecuencia de aparición de clones mutantes MSG (manchas simples grandes) y en el número total de clones, lo cual sugiere que el extracto de *B. trimera* a estas concentraciones presentan una actividad potencialmente genotóxica en *D. melanogaster*.

Palabras clave: *Baccharis*, *Drosophila melanogaster*, mutaciones, jaguarete ka`a

Mutagenic activity evaluation of *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) aqueous extract in *Drosophila melanogaster* using the SMART test. *Baccharis trimera* is a medicinal herb belonging to Asteraceae family with a high content of flavonoids, to which anti-inflammatory and antioxidant capacities are mainly attributed. On the other hand, it has been seen that some species of *Baccharis* are potentially genotoxic, and this could be due to certain metabolites with pro-oxidant capacity present in the plant. The objective of this study was to evaluate the genotoxic activity at different concentrations of aqueous extract from aerial part of *B. trimera* using *Drosophila melanogaster* as model organism, for this, the lethal dose 50 (LD₅₀) of the extract was first determined in individuals of wild type strain Samarkand, LD₅₀ concentration was 35.91 mg.mL⁻¹ ($P < 0.05$; r: 0.694). Subsequently, concentrations of 30, 15, 7.5, 3.75 and 1.87 mg.mL⁻¹ were selected to perform chronic treatments (72 hours) to trans-heterozygous individuals *mwh+/+flr³*, using distilled water as control and Urethane 0.178 mg.mL⁻¹ as mutagenic agent. Data obtained were analyzed using Kastenbaum-Bowman test $\alpha = \beta = 0.05$, these results showed that the concentrations of 1.87 and 7.5 mg.mL⁻¹ presented a significant increase in the frequency of appearance of LSS (large single spots) mutant clones and in the total number (TM) of clones, which

suggests that *B. trimera* extract at these concentrations has a potentially genotoxic activity in *D. melanogaster*.

Keywords: *Baccharis*, *Drosophila melanogaster*, mutations, jaguarete ka'a

INTRODUCCIÓN

B. trimera es una hierba nativa de la familia Asteraceae, conocida comúnmente como Jaguarete ka'a o carqueja, se distribuye ampliamente en la región oriental del país, como también en otros países de la región. Generalmente se ingiere la parte aérea de la planta como remedio caliente en infusiones o decocción para tratar afecciones digestivas por sus propiedades como diurético, tónico amargo, y también como preventivo de embarazo y abortivo (Soria & Ramos, 2015).

La composición fitoquímica de la planta consta de flavonoides, diterpenos, saponinas y aceite esencial, predominando el contenido de flavonoides a las que se les atribuye las propiedades farmacológicas de dicha hierba (De Andrade *et al.*, 2004; Reiter *et al.*, 2001). Existe evidencia de que algunas especies del género *Baccharis* presentan potencial genotóxico en estudios realizados en roedores; además en su composición de flavonoides se encuentran la apigenina y la quercetina, identificadas con actividad prooxidante según estudios *in vitro*, los cuales sugieren un potencial genotóxico de dichos flavonoides (Aguilar *et al.*, 2010; Pérez Trueba, 2003; Rodríguez *et al.*, 2009; Soicke & Leng-Peschlow, 1987).

El consumo de hierbas medicinales nativas en forma de té, mate o terere forma parte de la cultura paraguaya, con la finalidad de prevenir o tratar ciertas afecciones. En el país, la demanda de hierbas medicinales ha ido en aumento, y según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población mun-

dial utiliza la medicina tradicional herbolaria para la atención primaria de la salud (APS); por ello fue creado el programa de Medicina Tradicional de la OMS, donde instan a los países en general a la práctica de la medicina natural y tradicional, apoyando las investigaciones, de modo a que las hierbas medicinales formen parte de programas de APS (Chifa, 2010; Fogel *et al.*, 2016; Marinoff, *et al.*, 2009; Soria & Ramos, 2015).

El consumo de forma crónica o en grandes cantidades de hierbas puede producir intoxicaciones hasta el grado de letalidad; dicha situación se da principalmente por el desconocimiento debido a escasos estudios científicos que avalen sus propiedades curativas, que revelen su toxicidad o efectos colaterales (De Pardo Ghetti *et al.*, 2009; Enríquez *et al.*, 2018). Las sustancias comercializadas con fines terapéuticos deben atravesar rigurosos controles, para garantizar su seguridad; los estudios de genotoxicidad forman parte del perfil toxicológico a los que deben ser sometidos, a modo de evaluar el riesgo sobre el beneficio obtenido ante el consumo de hierbas utilizadas en la medicina tradicional (Carballo *et al.*, 2005; Dearfield, 1995).

La importancia del estudio de las hierbas utilizadas en medicina tradicional y su efecto sobre el material genético (ADN), es debido al contenido de sustancias potencialmente genotóxicas, entre las cuales se encuentra la *B. trimera* tradicionalmente utilizada. En este estudio, partiendo de los antecedentes mencionados, se propuso evaluar el potencial mutagénico del extracto de *B. trimera* empleando para ello

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de Baccharis trimera (Less) (Jaguarete ka`a) en Drosophila melanogaster mediante el test SMART

como organismo modelo la mosca de fruta (*D. melanogaster*) aplicando el ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material estudiado

Baccharis trimera (Less.): Paraguay. Vivero de plantas medicinales del Jardín Botánico y Zoológico de Asunción (JBZA), Depto. Central; 25°14'56"S - 57°34'23" W. Material de herbario medicinal testigo: G. González 319 (JBZA), referencia de colección viva: JBZA 113.

Preparación del extracto acuoso de la parte aérea de *B. trimera*

El proceso de secado de la hierba colectada fue de 15 días, en ausencia de corriente de aire a temperatura ambiente (25±2° C), evitando el contacto directo con el sol (Hostettmann *et al.*, 2008). Una vez seca se procedió a la molienda con la utilización de un molino manual, hasta la obtención de partículas pulverizadas uniformes.

Se preparó la infusión para la obtención del extracto acuoso liofilizado, agregando 50 gramos del triturado de *B. trimera*, en 500 mL de agua destilada en su punto de ebullición, el hervor de la mezcla se realizó durante cinco minutos y posteriormente la infusión fue filtrada con el uso de un equipo filtrador; por último, el producto fue congelado a -120°C en un ultracongelador, para el proceso de liofilización. Se obtuvo 2,44 gramos del extracto liofilizado, con un rendimiento del 4,88 % (p/p).

Determinación de la DL₅₀ en *Drosophila melanogaster*

Se evaluaron cinco concentraciones 60 mg.mL⁻¹, 30 mg.mL⁻¹, 15 mg.mL⁻¹, 7,5

mg.mL⁻¹ y 3,7 mg.mL⁻¹ y se utilizaron 100 larvas de tercer estadio de la cepa pura silvestre Samarkand por concentración; las mismas fueron depositadas en frascos de vidrio conteniendo el medio de cultivo elaborado con puré de papa instantáneo Knorr® rehidratado con 5 mL del extracto acuoso a las concentraciones de estudio. Las larvas fueron sometidas a exposición crónica por 72 horas de exposición, hasta la eclosión y conteo de imagos (Miyazawa *et al.*, 2003).

Bioensayo SMART para evaluación de actividad genotóxica

La obtención de las larvas de interés para el estudio se realizó mediante la cruce estándar de hembras vírgenes de la cepa *flr3/In (3LR)TM3, ri ppsep I(3)89Aa bx34e* y *BdS* con machos homocigotas de la cepa *mwh/mwh*, para la evaluación de la actividad de probables genotoxinas de acción directa que pudieran encontrarse en la muestra vegetal evaluada. La obtención de las hembras vírgenes se realizó en cultivo convencional (42 gramos de harina de maíz, 6 gramos agar-agar, 28 gramos de sacarosa, 25,6 gramos de levadura, 500 mL de agua destilada, 2 mL de ácido propiónico-ácido ortofosfórico (1:1) y 2 mL de solución de nipagín al 10%). La cruce se llevó a cabo en medio ovopositor (Graf *et al.*, 1984), en una proporción 2:1 (hembras: machos), obteniéndose larvas trans-heterocigotas *mwh+/+flr³* las cuales poseen los genes recesivos *mwh* y *flr³* (Graf *et al.*, 1984).

El ensayo se realizó empleando cinco concentraciones del extracto *B. trimera* (30, 15, 7,5, 3,7 y 1,9 mg.mL⁻¹), se extrajeron 700 larvas de tercer estadio obtenidas a las 72 horas luego de la puesta; se usaron 100 larvas para cada tratamiento con las concentraciones mencionadas, para

ello se empleó medio de puré de papa Knorr® rehidratado con 5 mL de cada concentración (Marín *et al.*, 2019). Como control del ensayo se realizaron en las mismas condiciones empleando agua destilada y como agente mutágeno Uretano 0,178 mg.mL⁻¹.

Posteriormente, se realizó la identificación de clones mutantes, diferenciando los fenotipos pilosos de las alas. Los clones del tipo mancha simple pequeña (MSP) *flr*³ o *mwh* presentan una o dos células alteradas con tricomas pilosos anormales, los clones del tipo mancha simple grande (MSG) *flr*³ o *mwh* presentan más de 2 células alteradas pudiendo alcanzar grandes regiones dentro de las alas y los clones del tipo mancha gemela (MG) *flr*³-*mwh* presentan regiones en donde ambos fenotipos mutantes se encuentran cercanas entre sí (Graf *et al.*, 1984; Romero Jiménez, 2013).

Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos en el ensayo de determinación de la DL₅₀ fueron analizados mediante test Probit, test de Chi-cuadrado y un análisis de regresión a modo de determinar la ecuación de la recta de los resultados obtenidos, todo esto para determinar la concentración letal 50 (Finney, 1952).

Los datos obtenidos en el ensayo SMART fueron analizadas mediante tablas estadísticas de acuerdo con Frei y Würigler (1988) que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman) $\alpha=\beta=0,05$ (Frei & Würigler, 1988; Kastenbaum & Bowman, 1970). Los gráficos fueron realizados empleando el software GraphPad Prism 6.00, La Jolla California USA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el ensayo de determinación de la DL₅₀ con las concentraciones de 60 mg.mL⁻¹, 30 mg.mL⁻¹, 15 mg.mL⁻¹, 7,5 mg.mL⁻¹, 3,85 mg.mL⁻¹ y 1,87 mg.mL⁻¹ del extracto acuoso de *B. trimera* evidenciaron que la dosis sugerida por el análisis probit en la que se induce al 50% de mortandad del total de los individuos de *D. melanogaster* tratados, es de 35,91 mg.mL⁻¹ ($P<0,05$; R²: 0,481, r: 0,694), por lo que los ensayos posteriores fueron con concentraciones por debajo a esta – Fig. 1.

En cuanto al ensayo SMART, se pudo registrar la frecuencia de los diferentes tipos de clones mutantes encontrados en las alas de los individuos de *D. melanogaster* tratados con las diferentes concentraciones del extracto de *B. trimera*. Los individuos expuestos al extracto a la concentración de 1,87 mg.mL⁻¹, presentaron 6 MSP y 3 MSG con frecuencias de aparición de mutaciones de 0,15 y 0,30 respectivamente. Los individuos tratados con la concentración de 3,75 mg.mL⁻¹ del extracto evidenciaron 2 MSP y 2 MSG, ambas con frecuencias de 0,10 respectivamente. Así también los individuos expuestos al extracto a la concentración de 7,5 mg.mL⁻¹ registraron 2 MSP, 8 MSG y 1 MG, con frecuencias de aparición de mutaciones de 0,10, 0,50 y 0,005 respectivamente -Tabla 1, Fig. 2, Fig. 3.

Los individuos expuestos al extracto acuoso a la concentración de 15 mg.mL⁻¹ evidenciaron un total de 2 MSG, con una frecuencia de 0,10. Por último, en los individuos tratados con la concentración del extracto acuoso a 30 mg.mL⁻¹ se observó solamente la presencia de 1 MSP con una frecuencia de 0,05. En el caso del agente mutágeno Uretano 0,728 mg.mL⁻¹ se obtuvo una mayor cantidad de clones en un to-

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART

tal de 20, donde se encontraron 16 MSP y 4 MSG, con frecuencias de 0,80 y 0,20 respectivamente. El tratamiento realizado con el agua destilada no evidenció la presencia de clones mutantes en las alas de los individuos tratados -Tabla 1, Fig. 2, Fig. 3.

También se pudo observar claramente que los individuos tratados con el extracto acuoso a las concentraciones de 1,87 mg.mL⁻¹ y 7,5 mg.mL⁻¹ presentaban un total de 9 y 11 clones mutantes respectivamente, los cuales aumentaron significativamente ($P < 0,05$) la frecuencia de aparición de mutaciones con respecto a las halladas en el tratamiento con el control (agua destilada), siendo positivo para los marcadores del tipo MSG en ambos casos; mientras que las concentraciones del extracto acuoso de 3,7 mg.mL⁻¹, 15 mg.mL⁻¹ y 30 mg.mL⁻¹ no presentaron un aumento significativo ($P < 0,05$) en el número total de clones mutantes en comparación con el tratamiento control.

Según los resultados obtenidos la frecuencia relativa de clones encontrados en las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *B. trimera* demostraron que a mayor concentración del extracto acuoso, menor es la cantidad de clones mutantes hallados en alas de los individuos tratados, considerando que las plantas son una mezcla compleja de fitoconstituyentes, este efecto se puede explicar por el elevado contenido de flavonoides que podrían estar presentes en los extractos a mayores concentraciones, permitiendo de ese modo aumentar la capacidad antioxidante, protegiendo al ADN de los daños que pudieran ser causados por metabolitos con actividad genotóxica y que podrían estar presentes también en el extracto, según lo descrito en un estudio donde se confirmó la presencia

de flavonoides y saponinas en extracto acuoso de *B. trimera* (Rodrigues *et al.*, 2009).

En la evaluación de la actividad como inhibidores de la peroxidación lipídica y captadores de radicales libres de tres especies de *Baccharis*, la *B. trimera*, *B. spicata* y *B. usterii*, en diferentes fracciones y concentraciones de los extractos de las partes aéreas de las especies citadas, se observó que a mayor concentración y polaridad de los extractos, mayor fue la actividad antioxidante, siendo las fracciones con mayor actividad el extracto acuoso y *n*-butanol a 25 µg.mL⁻¹, por otra parte las fracciones estudiadas mediante el ensayo de TBA, disminuyeron la producción de malondialdehído mediante la inhibición de la peroxidación lipídica e inhibieron la mortalidad celular inducida por peróxido de hidrogeno; finalmente se pudo determinar mediante cromatografía en capa fina la presencia de derivados fenólicos y terpenoides que podrían estar relacionados a su actividad antioxidante (De Oliveira *et al.*, 2004). En la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de seis plantas peruanas y de su composición de fenoles, mediante ensayos de inhibición de radicales DPPH●, superóxido e hidroxilo, de su poder reductor y actividad antioxidante total, se observó que *Uncaria tomentosa* y *Krameria triandra* presentaron mayor poder antioxidante, el cual podría deberse al elevado contenido de sustancias antioxidantes debido al contenido de flavonoides, ácido ascórbico y compuestos fenólicos (Doroteo *et al.*, 2013).

El contenido de flavonoides presentes en los extractos estudiados podrían jugar un papel fundamental en la actividad antioxidante, tal como se demostró mediante un estudio *in vitro*, donde se determinó la

capacidad antioxidante de once flavonoides mediante el test de captación de radicales DPPH● y el poder antioxidante reductor férrico (FRAP), comparando el poder antioxidante de los flavonoides de manera individual y de la mezcla entre flavonoides, se evidenció en los mismos un efecto sinérgico de la capacidad antioxidante en combinaciones de ciertos flavonoides, comparándolos con sus actividades individuales, lo que puede explicar los resultados obtenidos al realizar la medición del efecto antioxidante de alimentos íntegros (Hidalgo *et al.*, 2010). Este efecto sinérgico pudo observarse en el estudio realizado por (Soicke & Leng-Peschlow, 1987), donde evaluaron el efecto de la fracción rica en flavonoides de *B. trimeria* y de los flavonoides individuales purificados, sobre la tasa de supervivencia de ratones luego de la administración de faloidina (hepatotóxico), observándose que la fracción rica en flavonoides aumento al 100 % la tasa de supervivencia de los ratones tratados, frente al 25 % de supervivencia de los ratones no tratados con la fracción, al mismo tiempo se pudo observar que el mayor aumento de supervivencia se dio con la administración de la fracción rica en flavonoides en comparación con la administración de los flavonoides individuales purificados, concluyéndose que existe una probable interacción entre flavonoides que genere un efecto sinérgico para el efecto antihepatotóxico involucrado en la actividad hepatoprotectora.

Existen otros estudios realizados en donde no se detectaron actividad genotóxica, como en la evaluación del extracto acuoso de *B. trimeria* a 6,84 mg.mL⁻¹ y 68,40 mg.mL⁻¹ empleando células de médula ósea de ratas (Peron *et al.*, 2008); y otro mediante el test de *Allium cepa* de dos

extractos acuosos de diferentes especies de *Baccharis* (*B. genistelloides* y *B. buxifolia*), que tampoco evidenciaron actividad genotóxica (Lipa Quispe & Paúcar Quispe, 2015), ajustándose así a los resultados obtenidos a las concentraciones del extracto acuoso de 3,75 mg.mL⁻¹, 15 mg.mL⁻¹ y 30 mg.mL⁻¹ utilizados en el presente trabajo.

A diferencia de los estudios mencionados donde se no se demostraron algún potencial genotóxico de especies del género *Baccharis*, también se encontraron estudios que concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo a las concentraciones de 1,87 mg.mL⁻¹ y 7,5 mg.mL⁻¹ que presentaron actividad genotóxica, donde mediante el test de cometa y el test de micronúcleo en ratones se evaluaron actividades genotóxica y antigenotóxica del extracto acuoso de *B. trimeria*, a las concentraciones de 500, 1000 y 2000 mg.kg⁻¹ en dosis aguda, sin evidenciarse actividad genotóxica en ninguna de las concentraciones empleadas, sin embargo cuando el extracto fue administrado a los ratones durante tres días consecutivos, se observó un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos en la médula ósea de los ratones a las concentraciones de 1000 y 2000 mg.kg⁻¹, lo que sugiere un potencial mutagénico del extracto a dosis crónica (Rodrigues *et al.*, 2009); por otro lado en la evaluación de la actividad genotóxica del extracto de otra especie del mismo género, *Baccharis dracunculifolia*, empleando como solvente acetato de etilo con el test de cometa en células V79 de hámster chino, se observó que a las concentraciones de 50 µg.mL⁻¹ y 100 µg.mL⁻¹ indujeron a daño significativo en el material genético (Aguilar *et al.*, 2010). Los metabolitos responsables de la actividad genotóxica podrían ser

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART

propias de la hierba o de algún factor externo, como fue demostrado en un estudio, donde se evaluó el potencial genotóxico del extracto acuoso de *B. trimera*, proveniente de una región afectada por la quema de carbón mediante el ensayo de cometa, dando como resultado que el extracto preparado a partir de la hierba sin exposición al carbón no presentó actividad genotóxica, mientras que el extracto preparado a partir de la hierba expuesta al carbón indujo a un aumento significativo de daño al ADN en las células tratadas a elevadas concentraciones, sugiriendo que la *B. trimera* es sensible al impacto causado por la quema de carbón (Cruz *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en esta investigación evidenciaron que la DL_{50} del extracto acuoso de *B. trimera* en *D. melanogaster*, bajo tratamiento crónico, es de 35,91 mg.mL⁻¹. La evaluación a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *B. trimera* en *D. melanogaster* reveló que las concentraciones con un potencial genotóxico de acción directa fueron las concentraciones de 1,87 mg.mL⁻¹ y 7,5 mg.mL⁻¹. Se recomienda realizar la determinación de la actividad de genotoxinas de acción indirecta, y continuar con otros ensayos empleados en bioensayos con fraccionamiento bioguiados y un perfil fitoquímico de las fracciones con actividad, a modo de identificar la probable genotoxina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, C.; Alves, J.; Bastos, J.; & Tavares, D. (2010). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 30(1), 22-28.
- Carballo, M. A.; Cortada, C. M. & Gadano, A. B. (2005). *Riesgo y beneficio en el consumo de plantas medicinales*. 14(2), 15.
- Chifa, C. (2010). La perspectiva social de la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(4), 242-245.
- Cruz, C.; Silva, F.; Decker, N.; Menezes, A.; Ferraz, A.D & Silva J.D. (2013). Avaliação do potencial genotóxico de *Baccharis trimera* proveniente de região impactada pelo efeito da queima do carvão através do Ensaio Cometa *in vitro*. XIX Salão de Iniciação Científica e Tecnológica. <http://www.conferencias.ulbra.br/index.php/sic/xix/paper/view/1579>
- De Andrade, H. H. R.; Reguly, M. L. & Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 247, 389-412. <https://doi.org/10.1385/1-59259-665-7:389>
- De Oliveira, S. Q.; Dal-Pizzol, F.; Moreira, J. C. F.; Schenkel, E. P. & Gosmann, G. (2004). Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. 23(3), 365-368.
- De Pardo Ghatti, E.; Monroy Delgadillo, M & Copali. D. (2009). Sustancias folclóricas como causa de Intoxicación por sustancia Desconocida en Terapia Intensiva del "Hospital Pediátrico Manuel Asencio Villarroel " (2003—2008). *Gaceta Médica Boliviana*, 32(2), 17-22.
- Dearfield, K. L. (1995). Information requirements and regulatory approaches for

- heritable genetic risk assessment and risk communication. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 330(1), 35-40.
- Doroteo, V.H.; Díaz, C.; Terry, C. & Rojas R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(1), 13-20.
- Enríquez, S.; Quispe, R. E.; Amurrio, P.; Peñaranda, J. C.; Calle, A.; Orsag, V. & Almanza, G. R. (2018). Contenidos flavonocidos en las hojas de *Baccharis latifolia*, según el tipo de hoja, y su dependencia de las propiedades fisicoquímicas de los suelos. *Revista Boliviana de Química*, 35(5), 146-154.
- Finney, M. A. (1952). *Probit Analysis*. 78(3), 388-390.
- Fogel, R.; Céspedes, C.; López, L. & Valdez, S. (2016). *Propiedades medicinales de plantas: Conocimiento tradicional y patentes* (1a Edición). CERI.
- Frei, H. & Würgler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*, 203(4), 297-308.
- Graf, U.; Würgler, F. E.; Katz, A. J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C. B. & Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6(2), 153-188.
- Hidalgo, M.; Sánchez-Moreno, C. & de Pascual-Teresa, S. (2010). Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(3), 691-696.
- Hostettmann, K.; Gupta, M.; Marston, A. & Ferreira-Quiroz, E. (2008). *Manual de Estrategias para Aislamiento de Productos Naturales Bioactivos*.
- Kastenbaum, M. A. & Bowman, K. O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 9(5), 527-549.
- Lipa Quispe, F. & Paúcar Quispe, W. (2015). Caracterización farmacobotánica y evaluación genotóxica del extracto acuoso de dos especies de *Baccharis* (asteraceae). *Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco*.
- Marín, L.; Gayozo, E. & Zamorano, E. (2019). Efecto antimutagénico del extracto etanólico de *Bauhinia forficata* Link (Pata de buey) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación y Recombinación Somática. *Steviana* 11(1), 15-25.
- Marinoff, A.M.; Martinez, J.L. & Urbina, M.A. (2009). Precauciones en el empleo de plantas medicinales. *Boletín Latino-americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 8(3), 184-187.
- Miyazawa, M.; Anzai, J.; Fujioka, J. & Isikawa, Y. (2003). Insecticidal compounds against *Drosophila melanogaster* from *Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc. *Natural Product Research*, 17(5), 337-339.
- Perez Trueba, J. (2003). *Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes* (N.º 1). 22(1), Article 1.
- Peron, A.; Felipes, J.; Mattge, G.; Cantagalli, L.; Mariucci, R. & Vicentini, V. (2008). Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera*

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART

- Less, E. Solanum melongena L., em células de medula óssea de ratos Wistar. *Revista Brasileira de Biociências*, 6(2), Article 2.
- Reiter, L.; Potocki, L.; Chien, S.; Gribskov, M. & Bier, E. (2001). A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melano-gaster*. *Genome Research*, 11(6), 1114-1125.
- Rodrigues, C.; Dias, J.; de Mello, R.; Richter, M.; Picada, J.; & Ferraz, A. (2009). Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 97-101.
- Romero Jiménez, M. (2013). Estudio anti-genotoxicológico y de citotoxicidad de plantas medicinales de uso cotidiano y de sus fenoles más característicos [Tesis doctoral]. Universidad de Córdoba. Departamento de Genética.
- Soicke, H. & Leng-Peschlow, E. (1987). Characterization of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their Antihepatotoxic Properties. *Planta Medica*, 53(1), 37-39. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962613>
- Soria, N. & Ramos, P. (2015). Uso de plantas medicinales en la atención primaria de salud en Paraguay: Algunas consideraciones para su uso seguro y eficaz. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 13(2), 8-17.

ANEXOS

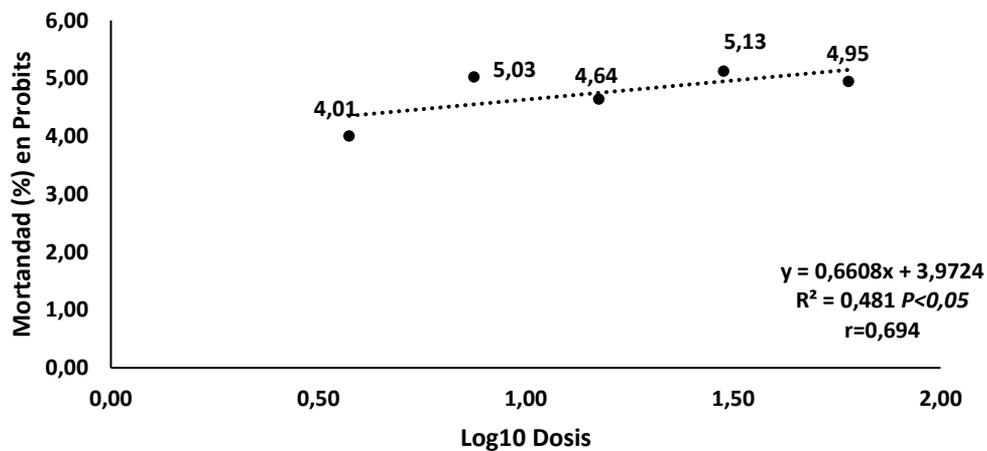


Figura 1. Análisis *probit* para la determinación de la DL_{50} del extracto acuoso de *B. trimera* en *D. melanogaster*.

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de Baccharis trimera (Less) (Jaguarate ka`a) en Drosophila melanogaster mediante el test SMART

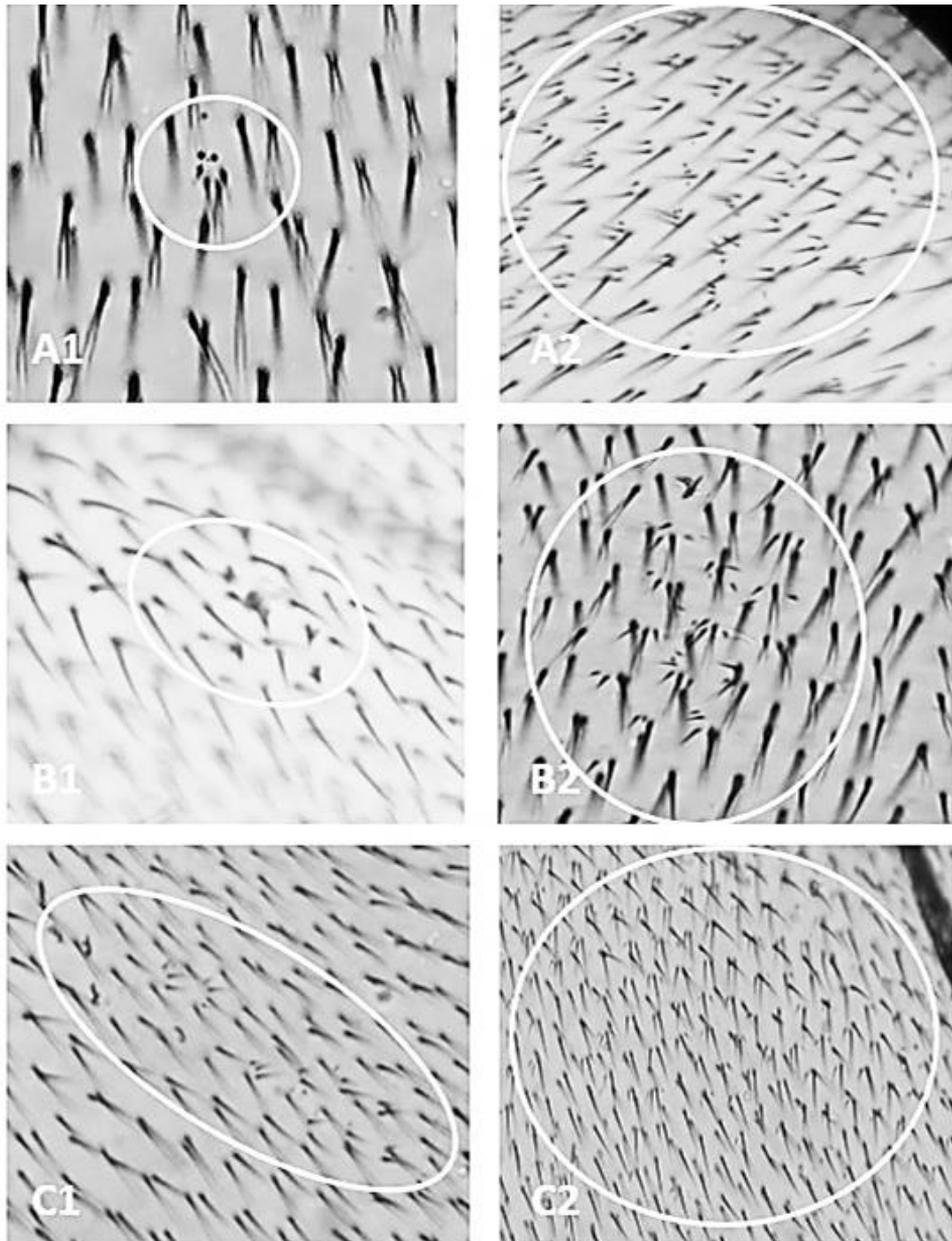


Figura 2. Clones mutantes identificados en alas de los individuos tratados con el extracto acuoso de *B. trimera* con microscopio óptico a 400X. (A). Individuos tratados con el extracto a $1,87 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, A1. MSP de tipo *mwh* A2. MSG de tipo *mwh* (B). Individuos tratados con el extracto a $3,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ B1. MSG de tipo *flr³* B2. MSG de tipo *mwh* (C). Individuos tratados con el extracto a $7,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ C1. MG C2. MSG de tipo *mwh*.

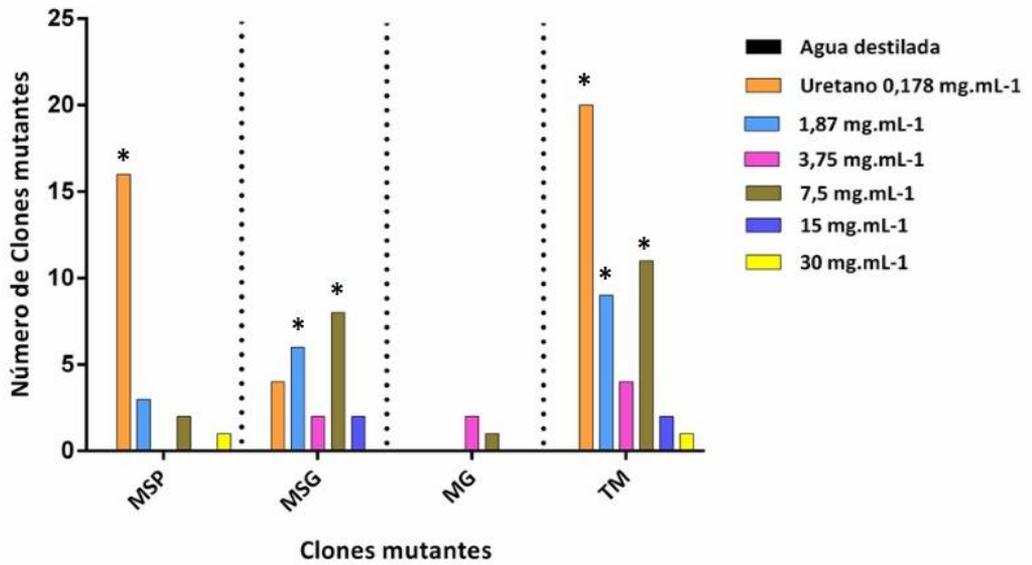


Figura 3. Cantidad de clones mutantes contabilizados en alas de *D. melanogaster* del ensayo realizado. (*) Aumento significativo en el número de clones mutantes ($P < 0,05$).

Escobar Ibarrola, L. et al. Actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka`a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART

Tabla 1: Análisis *in vivo* del potencial mutagénico del extracto acuoso de *B. trimera* en *D. melanogaster* empleando el Test de Mutación Somática y de Recombinación (SMART)

Tratamientos	Número de alas	MSP (1-2 céls) ^a <i>m</i> = 2		MSG (>2 céls) ^a <i>m</i> = 5		MG <i>m</i> = 5		TM <i>m</i> = 2	
Agua destilada	40	0,00	(00)	0,00	(00)	0,00	(00)	0,00	(00)
Uretano 0,178 mg.mL⁻¹	40	0,80	(16) +	0,20	(04) i	0,00	(00) i	1,00	(20) +
1,87 mg.mL⁻¹	40	0,15	(03) i	0,30	(06) +	0,00	(00) i	0,45	(09) +
3,75 mg.mL⁻¹	40	0,00	(00) i	0,10	(02) i	0,10	(02) i	0,20	(04) i
7,5 mg.mL⁻¹	40	0,10	(02) i	0,40	(08) +	0,05	(01) i	0,55	(11) +
15 mg.mL⁻¹	40	0,00	(00) i	0,10	(02) i	0,00	(00) i	0,10	(02) I
30 mg.mL⁻¹	40	0,05	(01) i	0,00	(00) i	0,00	(00) i	0,05	(01) I

Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, factor de multiplicación. Niveles de significancia $\alpha=\beta=0,05$. ^aIncluso las manchas simples *flr*³ raras. TM: Total de Manchas.

Estudio predictivo *in silico* del posible acoplamiento molecular entre la proteína SARS-CoV-2-S y lectinas cianobacterianas con actividad antiviral

Gayozo, E.^{1*} & Rojas, L.²

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

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Microbiología Industrial, San Lorenzo, Paraguay.

*E-mail del autor: elviologo@gmail.com

Estudio predictivo *in silico* del posible acoplamiento molecular entre la proteína SARS-CoV-2-S y lectinas cianobacterianas con actividad antiviral. El brote del SARS-CoV-2 ha ocasionado en pocos meses una pandemia de la enfermedad respiratoria denominada COVID-19. La glicoproteína viral S (SARS-CoV-2-S) cumple un rol fundamental en el proceso de infección viral, por lo que encontrar moléculas capaces de neutralizar dicha glicoproteína es una de las metas en la carrera por desarrollar un tratamiento eficaz para dicha afección. Las lectinas son proteínas capaces de interactuar con glicoproteínas y algunas tienen actividad antiviral neutralizante y aglutinante. Este estudio tiene por objetivos identificar *in silico* lectinas cianobacterianas capaces de interactuar con la SARS-CoV-2-S, y predecir los posibles sitios de acoplamiento en la glicoproteína viral y las lectinas analizadas. Para ello se seleccionaron tres lectinas aisladas de cianobacterias con actividades antivirales conocidas (la Microvirina, la Cianovirina y la Scytovirina), y se obtuvieron las estructuras proteicas de estas y de la SARS-CoV-2-S. Primeramente, se procedió a caracterizar las proteínas según las propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas de sus residuos, seguido por las pruebas de acoplamiento entre las lectinas seleccionadas y la SARS-CoV-2-S mediante simulaciones computacionales, empleando para ello algoritmos FTDock y pyDockRST. Se seleccionó el mejor modelo de acoplamiento basado en el valor de la energía de unión del complejo. La lectina cianobacteriana con el mejor resultado en el acoplamiento con la SARS-CoV-2-S, fue la Microvirina, siendo capaz de demostrar buena afinidad con el dominio de unión al receptor (RBD), demostrando de esta manera su posible capacidad como neutralizante viral, sin embargo, la validación experimental *in vitro* e *in vivo* de estas observaciones son fundamentales.

Palabras clave: Lectinas, COVID-19, cribado computacional, acoplamiento molecular

***In silico* predictive study of the possible molecular docking between SARS-CoV-2-S protein and cyanobacterial lectins with antiviral activity.** The outbreak of SARS-CoV-2 has caused in a few months a pandemic of a new respiratory disease called COVID-19. Viral glycoprotein S (SARS-CoV-2-S) plays a fundamental role in viral infection process, so finding molecules with the ability to neutralize to this viral glycoprotein is one of the goals in the race to develop an effective treatment for this affection. Lectins are proteins capable to interact with glycoproteins and some of them have antiviral activities neutralizing and binding to them. The objective of this study is to identify *in silico* cyanobacterial lectins capable to interact with SARS-CoV-2-S, and to predict the possible coupling sites in the viral glycoprotein and the analyzed lectins. For this, three lectins isolated from cyanobacteria with known antiviral activities (Microvirin, Cyanovirin and Scytovirin) were selected, these protein structures and SARS-CoV-2-S structure were obtained. Firstly, the proteins were characterized according to their residues' hydrophobic and hydrophilic properties, followed by molecular docking experiments between selected lectins and SARS-CoV-2-S by means of computer simulations, using for it, FTDock and pyDockRST algorithms. Best docking model was selected based on binding energy values of the complex. The cyanobacterial lectin with best result in docking

experiments with SARS-CoV-2-S, was the Microvirin, being able to demonstrate good affinity for the receptor binding domain (RBD) of SARS-CoV-2-S, thus demonstrating its possible capacity as a neutralizer. However, an *in vitro* and *in vivo* experimental validation of these observations are essential to be performing.

Keywords: Lectins, COVID-19, computational screening, molecular docking

INTRODUCCIÓN

A inicios del año 2020 se dio a conocer al mundo una nueva enfermedad respiratoria severa (COVID-19), los pacientes presentan sintomatologías en común: fiebre alta (>38 °C), tos seca y en el peor de los casos neumonía atípica (Wu *et al.*, 2020). El agente causal fue identificado como un nuevo virus (SARS-CoV-2), perteneciente a la Familia Coronaviridae, específicamente al grupo de los Betacoronavirus (Chen *et al.*, 2020; Gralinski & Menachery, 2020; Wu *et al.*, 2020). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) lleva hasta la fecha (18 de octubre 2020) más de 40 millones de infectados en 188 países, con más de 1,1 millón de fallecidos. La familia de los Coronavirus poseen en común un genoma de cadena simple positiva de ARN (+ssRNA), la cual codifica varias proteínas (estructurales y no estructurales), entre todas las proteínas codificadas una de las más indispensables para la infección y replicación del virus es la glicoproteína S (SARS-CoV-2-S) ya que esta es la responsable del reconocimiento entre el virus y las células hospederas (Chen *et al.*, 2020).

SARS-CoV-2-S es un homotrímero conformado por tres cadenas (A, B y C), en las cuales se pueden identificar regiones funcionalmente diferenciadas: dominio N-Terminal, región del péptido de fusión, región de hélice central, región de repetición Heptad 1 y 2, dominio conector, y la región de unión al receptor (RBD). Este último reconoce e interacciona directamente con el dominio peptidasa de la proteína ACE2 (Enzima Conversora de An-

giotensina 2), permitiendo de esta manera la infección de células del pulmón, intestino delgado, colon, duodeno y riñones, que expresan en gran proporción la proteína ACE2 (Chen *et al.*, 2020; Gralinski & Menachery, 2020; Kirchdoerfer *et al.*, 2016; Wrapp *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020). El acoplamiento entre SARS-CoV-2-S:ACE2 ha puesto en la mira de la comunidad científica a ambas proteínas, específicamente al dominio RBD de la SARS-CoV-2-S, como posibles blancos para el desarrollo de nuevos tratamientos que eviten la interacción entre ambas proteínas bloqueando sus sitios activos con el empleo de inhibidores de bajo peso molecular, disminuyendo los niveles de infección (Chen *et al.*, 2020).

Entre estos inhibidores de bajo peso molecular se encuentran las lectinas, conocidas por su capacidad de interactuar irreversiblemente con carbohidratos, glicoproteínas o con proteínas, que se encuentran en las superficies de las membranas, confiriéndoles actividad aglutinante, sin presentar actividad catalítica, es por esto que desde las últimas décadas son investigadas exhaustivamente (Kulandaivel *et al.*, 2015; Nilsson, 2011; Singh *et al.*, 2017). Esto permite a las lectinas bloquear interacciones intercelulares, uniéndose a los receptores proteicos como ligandos, y le provee actividad antiviral evidenciada en varios estudios, cobrando de esta manera protagonismo para áreas como la farmacología, la biotecnología y la medicina (Adamson, 2020; Nilsson, 2011; Rüdiger & Gabius, 2001; Singh *et al.*, 2017).

Gayozo, E. & L. Rojas. Estudio predictivo *in silico* del posible acoplamiento molecular entre la proteína SARS-CoV-2-S y lectinas cianobacterianas

Las lectinas son aisladas de varios organismos (bacterias, algas, plantas, hongos y animales), las de menor peso molecular y conformación monomérica son las obtenidas de microalgas, siendo las más estudiadas por sus actividades antivirales. Entre las más prometedoras se encuentran la Microvirina, la Cianovirina y la Scytovirina, aisladas de cianobacterias *Microcystis aeruginosa*, *Nostoc ellipsosporum* y *Scytonema variatum* respectivamente, estas demostraron actividades antivirales ante el HIV-1, HIV-2 (virus de inmunodeficiencia humana 1 y 2), HCV (virus de la hepatitis C), virus de inmunodeficiencia del simio DeltaB₆₇₀, virus parainfluenza tipo 3, HSV-1 (virus herpes simplex 1), virus Epstein-Barr, HHV-6 (virus herpes humano), virus influenza A y B, EboZV (virus del Ébola-Zaire) y MbgV (virus Marburgo). Su acción neutralizante a estos virus se da mediante la unión a proteínas receptoras, por lo que pueden ser consideradas como potenciales candidatas para el desarrollo de nuevos tratamientos y para detener afecciones de origen viral en tempranas etapas de la infección (Barrientos *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 1997; de Souza *et al.*, 2016; Garrison *et al.*, 2014; Helle *et al.*, 2006; Huskens *et al.*, 2010; Manivannan & Muralitharan, 2017; Min *et al.*, 2017; Mitchell *et al.*, 2017; O'Keefe *et al.*, 2003; Shahid *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2017; Takebe *et al.*, 2013).

En el presente estudio se realiza el análisis *in silico* del posible acoplamiento molecular entre la región RBD de la SARS-CoV-2-S y lectinas cianobacterianas (Microvirina, Cianovirina y Scytovirina), caracterizando los probables sitios de interacción y los residuos activos implicados en la formación de los complejos, así como la determinación de las fuerzas intermolecu-

lares que podrían asistir en la estabilización de la estructura del complejo. Este tipo de investigaciones pretende encontrar, mediante simulaciones computacionales, moléculas de bajo peso molecular que puedan presentar la posibilidad de unirse a sitios activos de proteínas del SARS-CoV-2, ofreciendo ventajas en la carrera por la búsqueda de posibles tratamientos farmacológicos antivirales o neutralizantes para este nuevo virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pruebas *in silico* de acoplamiento molecular y predicción de sitios de unión

Las estructuras de las proteínas SARS-CoV-2-S, Microvirina, Cianovirina y Scytovirina, fueron obtenidas de la base de datos Protein Data Bank RCSB (rcsb.org, Berman *et al.*, 2000) en formato PDB (PDB-ID: 6VSB, 6VXX, 2Y1S, 3EZM y 2QT4 respectivamente). A modo de obtener información acerca del contenido de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos de las estructuras proteicas empleadas se determinaron los índices de hidropatía GRAVY (gran promedio de hidropatía) (Kyte & Doolittle, 1982), para la SARS-CoV-2-S, el ectodominio RBD de la misma y de las lectinas, además de realizar la visualización de la distribución de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en la superficie de las proteínas, para ello se emplearon los programas Discovery Studio Visualizer v. 20 (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017) y UCSF Chimera v. 1.14 (Pettersen *et al.*, 2004).

Las pruebas de acoplamiento molecular entre el ectodominio RBD en la configuración abierta de la SARS-CoV-2-S y las lectinas cianobacterianas (Microvirina, Cianovirina y Scytovirina) se llevaron a

cabo utilizando el programa pyDock 3.0 (Cheng *et al.*, 2007; Jiménez-García *et al.*, 2013), teniendo en cuenta para la selección del mejor modelo de acoplamiento las energías electrostáticas, desolvatación y una contribución limitada de la energía de Van der Waals (Cheng *et al.*, 2007; Grosdidier *et al.*, 2007; Jiménez-García *et al.*, 2013; Pallara *et al.*, 2017). Para las pruebas se emplearon las distancias restraints de la proteína SARS-CoV-2-S (cadena A, K 417, Y 453, P 491, Q 498, T 500, V 503), el cual corresponde al sitio de unión del ec-todominio RBD con la proteína ACE2, la optimización de las orientaciones de las proteínas (receptor-ligando) se realizaron utilizando los algoritmos FTDock (Fourier Transform Dock) y pyDockRST (Chelliah *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007; Gabb *et al.*, 1997; Grosdidier *et al.*, 2007; Jiménez-García *et al.*, 2013; Pons *et al.*, 2010; Wrapp *et al.*, 2020).

Se seleccionó el modelo de acoplamiento molecular RBD-SARS-CoV-2-S:Lectina con menor energía de unión (modelo más favorable), y se realizaron pruebas de acoplamiento molecular entre la lectina seleccionada y las otras cadenas de SARS-CoV-2-S (cadena B y C) para identificar sitios de afinidad de acoplamiento entre la lectina y la proteína viral. Todas las pruebas de acoplamiento molecular realizadas fueron posteriormente sometidas a un refinamiento empleando para ello el programa FireDock (Andrusier *et al.*, 2007; Mashiah *et al.*, 2008)

La identificación de los sitios probables de unión entre las proteínas SARS-CoV-2-S y las lectinas, así como de los residuos activos se realizó empleando el programa Discovery Studio Visualizer v. 20 (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017) y UCSF

Chimera v. 1.14 (Pettersen *et al.*, 2004). Los diferentes tipos de fuerzas intermoleculares existentes, así como las distancias entre residuos activos en los sitios de acoplamiento se determinaron empleando el programa Discovery Studio Visualizer v. 20 (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017), la visualización de los residuos activos en interacción se realizó utilizando el programa UCSF Chimera v. 1.14 (Pettersen *et al.*, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según las investigaciones de Walls *et al.* (2020) existen dos conformaciones probables del ectodominio RBD de la cadena A de la SARS-CoV-2-S, una cerrada y otra abierta, y es en esta última la que se da la unión entre la SARS-CoV-2-S y la proteína ACE2 de las células hospederas, la representación del mismo ajustado a las propiedades hidrofóbicas-hidrofílicas de sus residuos, reveló pequeños cambios en la conformación tridimensional de la proteína, la más evidente es la exposición de una región rica en aminoácidos hidrofóbicos por debajo del dominio RBD (Walls *et al.*, 2020) -Figura 1.

El índice de hidropatía del homotrímero SARS-CoV-2-S (GRAVY_S) fue de -0,163 determinada en cada una de las tres cadenas (A, B y C), también se calculó el índice para el ectodominio RBD (L335-P527) GRAVY_{RBD} siendo este -0,098. Estos valores indican el grado de hidrofobicidad de la glicoproteína, demostrando un comportamiento mayoritariamente hidrofílico (GRAVY<0), concordando con la disposición extraviral de la misma (Kyte & Doolittle, 1982; Walls *et al.*, 2020).

Así también la estructura tridimensional de la lectina Microvirina evidenció la

Gayozo, E. & L. Rojas. Estudio predictivo *in silico* del posible acoplamiento molecular entre la proteína SARS-CoV-2-S y lectinas cianobacterianas

presencia de un segmento rico en aminoácidos hidrofóbicos y la misma se encuentra en la región interna de la estructura proteica, a su vez los residuos con una tendencia hidrofílica se disponen en las regiones periféricas, ajustándose a su índice de hidropatía (GRAVY = -0,618) -Figura 2.A. En el caso la lectina Cianovirina también se pudo observar regiones hidrofóbicas distribuidas en la estructura proteica, el índice de hidropatía GRAVY fue de -0,447 -Figura 2.B. Sin embargo, la lectina Scytovirina, no presentó regiones hidrofóbicas apreciables sino solo residuos en su mayoría de tendencia hidrofílica, esta observación se ajusta al valor del índice de hidropatía (GRAVY= -1,100) el cual fue menor a las mencionadas anteriormente -Figura 2.C.

La prueba del acoplamiento molecular entre la Cianovirina y la RBD-SARS-CoV-2-S, presentó un valor de energía de unión igual a -95,997 kcal.mol⁻¹, los residuos activos identificados en la lectina fueron Q14, G15, S16, V17, T19, D35, N37, H90 y Y100, estos intervienen formando en su mayoría interacciones del tipo puentes de hidrógeno con el ectodominio de la glicoproteína, también se identificaron interacciones del tipo hidrofóbica y una unión del tipo enlace de hidrógeno generado entre orbitales π (π) del residuo aromático Tirocina de la glicoproteína viral y el átomo hidrógeno del mismo residuo pero perteneciente a la de la lectina -Tabla 1.

Así también el experimento de acoplamiento molecular entre la Scytovirina y el ectodominio de la glicoproteína viral, evidenció un valor de energía de unión de -89,393 kcal.mol⁻¹, también se pudo identificar los residuos activos en la lectina siendo estos P14, D57, E58, A59, P65, R67, A94, T415, Y421, V503 y Y505, las

interacciones intermoleculares en su mayoría fueron del tipo hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, también se pudo identificar interacciones electrostáticas pero en menor número -Tabla 1. De igual manera la simulación de acoplamiento entre el ectodominio RBD-SARS-CoV-2-S y la Microvirina manifestó un valor de energía de unión de -108,790 kcal.mol⁻¹, por lo que este modelo de acoplamiento molecular resulta ser el más favorable comparada con la Cianovirina y Scytovirina (Cheng *et al.*, 2007; Jiménez-García *et al.*, 2013; Kulan-daivel *et al.*, 2015; Pallara *et al.*, 2017).

Se identificaron los posibles residuos activos de la Microvirina siendo estos S10, N12, S21, E23, Q25, E30, W31, P33 y E35, este acoplamiento se encuentra estabilizado por puentes de hidrógeno, interacciones del tipo carbono hidrógeno no convencional, uniones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas -Tabla 1, Figura 3.A, Figura 5.

Consecutivamente, la prueba de acoplamiento molecular entre la cadena B de la glicoproteína viral y la Microvirina, evidenció una energía de unión mucho mayor a las observadas anteriormente siendo esta de -37,286 kcal.mol⁻¹, por lo que este modelo es menos favorable en comparación al modelo de acoplamiento entre la Microvirina y el ectodominio RBD de la cadena A de la SARS-CoV-2-S.

Los residuos activos de la Microvirina en este modelo de unión (Microvirina:Cadena B) fueron M01, P02, H06, E48, L49, F51, D69, W75, T90, Q91, I92, L93, S96 y Q97, se registraron la formación de interacciones hidrofóbicas en su mayoría, interacciones del tipo puentes de hidrógeno, uniones electrostáticas y unión del tipo carbono hidrógeno no convencional. A su vez los residuos activos de la cadena B

de la SARS-CoV-2-S también fueron identificados siendo estos A27, Y28, W64, F65, H66, P82, E96, I100, N137, F140 y R237 -Tabla 2, Figura 3.B.

De igual manera el experimento de acoplamiento entre la cadena C de la glicoproteína SARS-CoV-2-S y la Microvirina presentó una energía de unión de $-33,419 \text{ kcal.mol}^{-1}$, la cual también nos indica que el modelo de acoplamiento entre la lectina y la cadena C es muy poco favorable (mayor valor de energía de unión) al igual que el modelo anterior, en comparación a la energía de acoplamiento existente entre la lectina y el ectodominio RBD.

Los residuos activos de la lectina en este modelo de interacción receptor-ligando fueron T07, S09, S10, W31, F67, G68 y E71, los cuales están involucrados en la formación de interacciones del tipo puente de hidrógeno, interacciones del tipo hidrofóbicas, uniones del tipo electrostática y del tipo carbono hidrógeno no convencionales con la cadena C de la glicoproteína, las cuales estabilizan la formación del complejo. A su vez, los residuos activos de la cadena C de la glicoproteína viral también fueron identificados siendo estos R102, A123, N125, F157, R158, Y160 y H245 -Tabla 2, Figura 3.C.

El modelo receptor-ligando más favorable, de acuerdo a la puntuación de energía de unión pyDock es el de la RBD-SARS-CoV-2-S y la Microvirina (valor de energía menor). Este complejo se encuentra estabilizado principalmente por interacciones del tipo de puentes de hidrógeno, los cuales se dan entre los residuos R403:W31, Q498:Q25, G504:E30, P491:N12 y Q493:S21, en la configuración RBD-SARS-CoV-2-S:Microvirina respectivamente, es importante destacar que entre los residuos Q498:Q25 se generan dos puentes

de hidrógeno donde ambos residuos actúan como donadores y aceptores de interacciones con átomos de hidrógeno – Tabla 2, Figura 4.A-D.

Otro tipo de fuerza intermolecular que estabiliza la estructura del complejo de unión entre estas proteínas es conocido como interacciones de uniones de carbono-hidrógeno no convencionales, que se da entre los residuos R403:E23, R403:W37, K417:E35, S494:S10 y Q493:S10. Esta interacción es del tipo puente de hidrógeno débil y la misma ocurre gracias a un átomo de carbono polarizado que se encuentra inmediatamente contiguo a otro átomo de oxígeno o nitrógeno en el mismo residuo, el carbono actúa de donador de hidrógeno para que se genere el puente de hidrógeno con otro átomo de otro residuo, este tipo de unión se encuentra activamente involucrado en la formación de la mayoría de los complejos receptor-ligando, sin embargo, son poco considerados, pese a ello cumplen un rol importante en la estabilización de la estructura (Gómez-Jeria *et al.*, 2020; Itoh *et al.*, 2019) -Tabla 2, Figura 4. E-H.

Otras de las fuerzas intermoleculares presentes en la predicción del modelo de acoplamiento son las uniones del tipo electrostáticas, formadas por cargas de residuos básicos y ácidos generalmente, los residuos que forman este tipo de interacciones en el modelo RBD-SARS-CoV-2-S:Microvirina son R403:E23 y K417:E35 respectivamente, es importante destacar que este tipo de fuerza intermolecular es la más fuerte luego de las uniones covalentes como los puentes de disulfuros, algunos investigadores nominan a este tipo de unión como puente salino (Mathews & Ahern, 2002) -Tabla 2, Figura 4.I-J.

También se registró la existencia de interacciones hidrofóbicas que ayudan a es-

Gayozo, E. & L. Rojas. Estudio predictivo *in silico* del posible acoplamiento molecular entre la proteína SARS-CoV-2-S y lectinas cianobacterianas

tabilizar el modelo del complejo acoplado, es una de las uniones intermoleculares más débiles sin embargo, ayudan a mantener muy estable la conformación del sistema de acoplamiento, dicha unión se forma en los residuos K417:P33 y Y453:P33 del complejo RBD-SARS-CoV-2-S:Microvirina respectivamente. El aporte de dicha interacción no se da necesariamente por el enlace hidrófobo sino por la interacción de Van der Waals resultante, y así la estructura receptor-ligando formado termina siendo estable por efectos de la entropía del sistema (Appling *et al.*, 2018; Mathews & Ahern, 2002) -Tabla 2, Figura 4.K-L.

Entre las fuerzas intermoleculares que se encuentran participando en la formación de estructuras de acoplamiento del tipo receptor-ligando o antígeno-anticuerpo, las más fuertes son las interacciones electrostáticas conocidas también como interacciones carga-carga o puentes salinos, este tipo de uniones aportan en gran medida en la estabilidad de los complejos siendo capaces de perder la interacción solo en condiciones desfavorable de pH, menor o mayor al pK_a o pK_b de las cadenas laterales de los residuos implicados en la unión (Appling *et al.*, 2018; Mathews & Ahern, 2002).

El tipo de interacción que aporta a la estabilidad del acoplamiento, es el puente de hidrógeno, el cual se da generalmente entre residuos con grupos hidroxilos, grupos aminos y el oxígeno de grupos carbonilos, estas uniones son relativamente fuertes si existen más de una y constituyen otra posible opción en la generación de interacciones de hidrógeno por átomos que actúan como donadores de hidrógeno, estos hidrógenos son capaces de interactuar inclusive con orbitales π (pi) de residuos con grupos aromáticos en cadenas laterales (Appling *et al.*, 2018; Mathews & Ahern,

2002). Entre las interacciones más débiles se encuentran las interacciones hidrofóbicas y las de Van der Waals, ambas aportan solo unas pocas kcal por mol de energía a la entalpía total de la conformación del complejo, sin embargo participan activamente en la estabilización de la estructura en el medio citoplasmático (Appling *et al.*, 2018; Mathews & Ahern, 2002).

Las predicciones generadas en este estudio resultaron ser energéticamente favorables para la formación del complejo Microvirina:RBD-SARS-CoV-2-S; estudios semejantes fueron realizadas *in silico* con lectinas buscando predecir interacciones con proteínas de importancia médica (Kulandaivel *et al.*, 2015). Estos tipos de predicciones son muy empleadas ya que la viabilidad del análisis, así como la precisión de los métodos matemáticos empleados para el modelado de la interacción entre las proteínas son constantemente validadas y comparadas con ensayos *in vitro* e *in vivo* (Kulandaivel *et al.*, 2015; Pallara *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2007; Jiménez-García *et al.*, 2013; Grosdidier *et al.*, 2007).

Estudios han demostrado la efectividad de las lectinas en la neutralización de los virus bloqueando la interacción de las glicoproteínas con los receptores de las potenciales células hospederas, y evitando la agregación viral, conllevando a la alteración de los niveles de infectividad directa de los virus (Ji *et al.*, 2005). Uno de los claros ejemplos de este tipo de actividad mediada por lectinas es la MBL (Mannose-Binding Lectin), lo cual fue evidenciado ante el virus de la influenza A, la lectina MBL se une con la glicoproteína viral y evita de esta manera la interacción con el receptor celular bloqueando el reconocimiento y la infección; también se pudo

observar que esta lectina (MBL) es capaz de interactuar con glicoproteínas de filovirus circundantes (virus del Ébola y Marburg) neutralizando a las mismas y reduciendo efectivamente la infección viral (Hartshorn *et al.*, 1993; Ji *et al.*, 2005).

La Microvirina fue primeramente aislada de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* PCC7806, y comparte un poco más del 30% de semejanza con otras lectinas monoméricas, sin embargo, posee una mayor capacidad de inhibir la infección del virus HIV-1 (cepas laboratoriales y aislados clínicos), los ensayos *in vitro* que confirmaron esta actividad antiviral inhibitoria, fueron llevadas a cabo con líneas celulares MT-4 T, y se pudo registrar que esta actividad inhibitoria se da por la capacidad de la Microvirina de interactuar con glicoproteínas virales (gp 120) que participan en reconocimiento de las células dianas, además es importante destacar que esta lectina evidencia una citotoxicidad 50 veces menor comparada a la encontrada en la Cianovirina (Huskens *et al.*, 2010; Kehr *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017).

En el análisis estructural y funcional de la Microvirina, de Souza *et al.* (2016) demostraron que la misma puede ser potencializable en cuanto a sus actividades antivirales (neutralizantes), mediante ciertos cambios puntuales en algunos aminoácidos que dotarían a la misma de mayor rigidez a la estructura. Un estudio llevado a cabo con una variante modificada de la Microvirina (LUMS1), evidencia dicha potencialización en las actividades neutralizantes en los virus del HIV-1 y el virus de la Hepatitis C (HCV), este ensayo se realizó *in vitro* con células TZM-bl, HEK293 T y HepG2, demostrando que esta variante de Microvi-

rina no presenta actividad inmunogénica, de igual manera esta actividad antiviral se da por la formación de un complejo de acoplamiento también con las glicoproteínas virales gp120, evitando el reconocimiento del virus con células dianas (Adamson, 2020; Mitchell *et al.*, 2017; Shahid *et al.*, 2020).

Se ha observado un mayor poder neutralizante de la Microvirina en presencia de trímeros y tetrámeros de la lectina ante el virus HCV (Virus de la Hepatitis C) empleando células Huh-7.5, registrándose una mayor eficacia con estos oligómeros en el acoplamiento a la glicoproteína viral (Min *et al.*, 2017).

El posible acoplamiento existente entre la SARS-CoV-2-S (específicamente el ectodominio RBD) y la Microvirina, encontrado en este estudio mediante análisis de aproximaciones computacionales de acoplamiento molecular, sugiere que esta lectina podría ser blanco de estudios de análisis de dinámica molecular así como de ensayos en sistemas a escalas *in vitro* y consecuentemente *in vivo* lo cual sería fundamental y necesaria para corroborar si la interacción aquí observada podría desencadenarse en una posible actividad neutralizante, esperando que pueda darse el bloqueo del reconocimiento entre la ACE2 y la SARS-CoV-2-S (Li *et al.*, 2011; Shahid *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2017).

CONCLUSIÓN

La SARS-CoV-2-S es una de las proteínas estructurales más importante del nuevo Coronavirus, siendo la responsable del reconocimiento y posterior infección a células hospederas. Las predicciones realizadas en este estudio demostraron que la lectina Microvirina presenta un acopla-

miento favorable con el ectodominio RBD de la proteína viral, según los valores de energía registradas en el análisis. Esta posible formación del complejo del tipo receptor-ligando se encuentra estabilizado principalmente por interacciones de hidrógeno, uniones electrostáticas e hidrofóbicas entre residuos del sitio de acoplamiento entre ambas proteínas, indicando una alta probabilidad de que esta lectina actúe como neutralizante viral impidiendo su entrada a las células hospederas, lo cual aún queda por validar experimentalmente para confirmar a la Microvirina como potencial inhibidor de la infección viral.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adamson, C. S. (2020). Antiviral Agents: Discovery to Resistance. *Viruses*, 12(4), 406. <https://doi.org/10.3390/v12040406>
- Andrusier, N.; Nussinov, R. & Wolfson, H. J. (2007). FireDock: Fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 69(1), 139-159. <https://doi.org/10.1002/prot.21495>
- Appling, D. R.; Anthony-Cahill, S. J. & Mathews, C. K. (2018). *Biochemistry: Concepts and Connections*. Pearson.
- Barrientos, L. G.; Lasala, F.; Otero, J. R.; Sanchez, A. & Delgado, R. (2004). In Vitro Evaluation of Cyanovirin-N Antiviral Activity, by Use of Lentiviral Vectors Pseudotyped with Filovirus Envelope Glycoproteins. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(8), 1440-1443. <https://doi.org/10.1086/382658>
- Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Boyd, M. R.; Gustafson, K. R.; McMahon, J. B.; Shoemaker, R. H.; O'Keefe, B. R.; Mori, T.; Gulakowski, R. J.; Wu, L.; Rivera, M. I.; Laurencot, C. M.; Currens, M. J.; Cardellina, J. H.; Buckheit, R. W.; Nara, P. L.; Pannell, L. K.; Sowder, R. C. & Henderson, L. E. (1997). Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: Potential applications to microbicide development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(7), 1521-1530. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.7.1521>
- Chelliah, V.; Blundell, T. L. & Fernández-Recio, J. (2006). Efficient Restraints for Protein-Protein Docking by Comparison of Observed Amino Acid Substitution Patterns with those Predicted from Local Environment. *Journal of Molecular Biology*, 357(5), 1669-1682. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.001>
- Chen, Y.; Liu, Q.; & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418-423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>
- Chen, Y.; Guo, Y.; Pan, Y. & Zhao, Z. J. (2020). Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 525(1), 135-140. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.071>
- Cheng, T. M. K.; Blundell, T. L. & Fernandez-Recio, J. (2007). pyDock: Electrostatics and desolvation for

- effective scoring of rigid-body protein-protein docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(2), 503-515. <https://doi.org/10.1002/prot.21419>
- Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, version 20.1. (2019). San Diego: Dassault Systèmes.
- de Souza, C. R.; de Medeiros Muniz, G.; Siqueira, A. S.; de Melo Lima, A.; da Silva, A. P.; Gonçalves, E. C. & da Silva Gonçalves Vianez Júnior, J. L. (2016). Investigating the effects of point mutations on the affinity between the cyanobacterial lectin microvirin and high mannose-type glycans present on the HIV envelope glycoprotein. *Journal of Molecular Modeling*, 22(11), 269. <https://doi.org/10.1007/s00894-016-3137-3>
- Gabb, H. A.; Jackson, R. M. & Sternberg, M. J. E. (1997). Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *Journal of Molecular Biology*, 272(1), 106-120. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1203>
- Garrison, A. R.; Giomarelli, B. G.; Lear-Rooney, C. M.; Saucedo, C. J.; Yellayi, S.; Krumpke, L. R. H.; Rose, M.; Paragas, J.; Bray, M.; Olinger, G. G.; McMahon, J. B.; Huggins, J. & O'Keefe, B. R. (2014). The cyanobacterial lectin scytovirin displays potent in vitro and in vivo activity against Zaire Ebola virus. *Antiviral Research*, 112, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.09.012>
- Gómez-Jeria, J. S., Robles-Navarro, A., Kpotin, G. A., Garrido-Sáez, N., & Gatica-Díaz, N. (2020). Some remarks about the relationships between the common skeleton concept within the Klopman-Peradejordi-Gómez QSAR method and the weak molecule-site interactions. *Chemistry Research Journal*, 5, 32-52.
- Gralinski, L. E. & Menachery, V. D. (2020). Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, 12(2), 135. <https://doi.org/10.3390/v12020135>
- Grosdidier, S.; Pons, C.; Solernou, A. & Fernández-Recio, J. (2007). Prediction and scoring of docking poses with pyDock. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 69(4), 852-858. <https://doi.org/10.1002/prot.21796>
- Hartshorn, K. L.; Sastry, K.; White, M. R.; Anders, E. M.; Super, M.; Ezekowitz, R. A. & Tauber, A. I. (1993). Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. *The Journal of Clinical Investigation*, 91(4), 1414-1420. <https://doi.org/10.1172/JCI116345>
- Helle, F.; Wychowski, C.; Vu-Dac, N.; Gustafson, K. R.; Voisset, C. & Dubuisson, J. (2006). Cyanovirin-N Inhibits Hepatitis C Virus Entry by Binding to Envelope Protein Glycans. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25177-25183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602431200>
- Huskens, D.; Férrir, G.; Vermeire, K.; Kehr, J. C.; Balzarini, J.; Dittmann, E. & Schols, D. (2010). Microvirin, a Novel $\alpha(1,2)$ -Mannose-specific Lectin Isolated from *Microcystis aeruginosa*, Has Anti-HIV-1 Activity Comparable with That of Cyanovirin-N but a Much Higher Safety Profile. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24845-24854. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.128546>
- Itoh, Y.; Nakashima, Y.; Tsukamoto, S.; Kurohara, T.; Suzuki, M.; Sakae, Y.;

Gayozo, E. & L. Rojas. Estudio predictivo *in silico* del posible acoplamiento molecular entre la proteína SARS-CoV-2-S y lectinas cianobacterianas

- Oda, M.; Okamoto, Y. & Suzuki, T. (2019). N + -C-H...O Hydrogen bonds in protein-ligand complexes. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36987-9>
- Ji, X.; Olinger, G. G.; Aris, S.; Chen, Y.; Gewurz, H. & Spear, G. T. (2005). Mannose-binding lectin binds to Ebola and Marburg envelope glycoproteins, resulting in blocking of virus interaction with DC-SIGN and complement-mediated virus neutralization. *Journal of General Virology*, 86(9), 2535-2542. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81199-0>
- Jiménez-García, B.; Pons, C. & Fernández-Recio, J. (2013). pyDock WEB: A web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring. *Bioinformatics*, 29(13), 1698-1699. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt262>
- Kehr, J.-C.; Zilliges, Y.; Springer, A.; Disney, M. D.; Ratner, D. D.; Bouchier, C.; Seeberger, P. H.; Marsac, N. T. D. & Dittmann, E. (2006). A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 59(3), 893-906. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05001.x>
- Kirchdoerfer, R. N.; Cottrell, C. A.; Wang, N.; Pallesen, J.; Yassine, H. M.; Turner, H. L.; Corbett, K. S.; Graham, B. S.; McLellan, J. S. & Ward, A. B. (2016). Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature*, 531(7592), 118-121. <https://doi.org/10.1038/nature17200>
- Kulandaivel, S.; Nagarajan, S.; Jagatheesan, K. & Oorkalan, P. (2015). *In silico* docking evaluation of bacterial derived anticancer (Lectin) Protein with different oncogene protein. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4(2), 650-658.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Li, M.; Patton, D. L.; Cosgrove-Sweeney, Y.; Ratner, D.; Rohan, L. C.; Cole, A. M.; Tarwater, P. M.; Gupta, P. & Ramratnam, B. (2011). Incorporation of the HIV-1 microbicide cyanovirin-N in a food product. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 58(4), 379-384. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31823643fe>
- Manivannan, P. & Muralitharan, G. (2017). Probing Potent Interfacial Residues in Microvirin before Complexation with Glycoproteins: Visualizing Anti-HIV Activity *in silico*. *J Marine Sci Res Dev* 7: 241. doi: 10.4172/2155-9910.1000241 Page 2 of 5 *J Marine Sci Res Dev*, an open access journal ISSN: 2155-9910 Volume 7• Issue 7• 1000241. *Asp*, 62(2.57), 3.
- Mashiach, E.; Schneidman-Duhovny, D.; Andrusier, N.; Nussinov, R. & Wolfson, H. J. (2008). FireDock: A web server for fast interaction refinement in molecular docking. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl_2), W229-W232. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn186>
- Mathews, C. K. & Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica*. Pearson Educación.
- Min, Y. Q.; Duan, X. C.; Zhou, Y. D.; Kulinich, A.; Meng, W.; Cai, Z. P.; Ma, H. Y.; Liu, L.; Zhang, X. L. & Voglmeir, J. (2017). Effects of microvirin monomers and oligomers on hepatitis C virus. *Bioscience Reports*,

- 37(3). <https://doi.org/10.1042/BSR20170015>
- Mitchell, C. A.; Ramessar, K. & O’Keefe, B. R. (2017). Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. *Antiviral Research*, 142, 37-54. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.03.007>
- Nilsson, C. L. (2011). *Lectins: Analytical Technologies*. Elsevier.
- O’Keefe, B. R.; Smee, D. F.; Turpin, J. A.; Saucedo, C. J.; Gustafson, K. R.; Mori, T.; Blakeslee, D.; Buckheit, R. & Boyd, M. R. (2003). Potent Anti-Influenza Activity of Cyanovirin-N and Interactions with Viral Hemagglutinin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2518-2525. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2518-2525.2003>
- Pallara, C.; Jiménez-García, B.; Romero, M., Moal, I. H. & Fernández-Recio, J. (2017). pyDock scoring for the new modeling challenges in docking: Protein–peptide, homo-multimers, and domain–domain interactions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 85(3), 487-496. <https://doi.org/10.1002/prot.25184>
- Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pons, C.; Solernou, A.; Perez-Cano, L.; Grosdidier, S. & Fernandez-Recio, J. (2010). Optimization of pyDock for the new CAPRI challenges: Docking of homology-based models, domain–domain assembly and protein-RNA binding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(15), 3182-3188. <https://doi.org/10.1002/prot.22773>
- Rüdiger, H. & Gabius, H.-J. (2001). Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18(8), 589-613. <https://doi.org/10.1023/A:1020687518999>
- Shahid, M.; Qadir, A.; Yang, J.; Ahmad, I.; Zahid, H.; Mirza, S.; Windisch, M. P. & Shahzad-ul-Hussan, S. (2020). An Engineered Microvirin Variant with Identical Structural Domains Potently Inhibits Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Cellular Entry. *Viruses*, 12(2), 199. <https://doi.org/10.3390/v12020199>
- Singh, R. S.; Walia, A. K.; Khattar, J. S.; Singh, D. P. & Kennedy, J. F. (2017). Cyanobacterial lectins characteristics and their role as antiviral agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 475-496. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.041>
- Takebe, Y.; Saucedo, C. J.; Lund, G.; Uenishi, R.; Hase, S.; Tsuchiura, T.; Kneteman, N.; Ramessar, K.; Tyrrell, D. L. J.; Shirakura, M.; Wakita, T.; McMahan, J. B. & O’Keefe, B. R. (2013). Antiviral Lectins from Red and Blue-Green Algae Show Potent In Vitro and In Vivo Activity against Hepatitis C Virus. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064449>
- Walls, A. C.; Park, Y.-J.; Tortorici, M. A.; Wall, A.; McGuire, A. T. & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K. S.; Goldsmith, J. A.; Hsieh, C. L.; Abiona, O.; Graham, B. S. & McLellan, J. S.

Gayozo, E. & L. Rojas. Estudio predictivo *in silico* del posible acoplamiento molecular entre la proteína SARS-CoV-2-S y lectinas cianobacterianas

- (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260-1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y. M.; Wang, W.; Song, Z. G.; Hu, Y.; Tao, Z. W.; Tian, J. H.; Pei, Y. Y.; Yuan, M. L.; Zhang, Y. L.; Dai, F. H.; Liu, Y.; Wang, Q. M.; Zheng, J. J.; Xu, L.; Holmes, E. C. & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Yan, R.; Zhang, Y.; Li, Y.; Xia, L.; Guo, Y. & Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 367(6485), 1444-1448. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>

ANEXOS

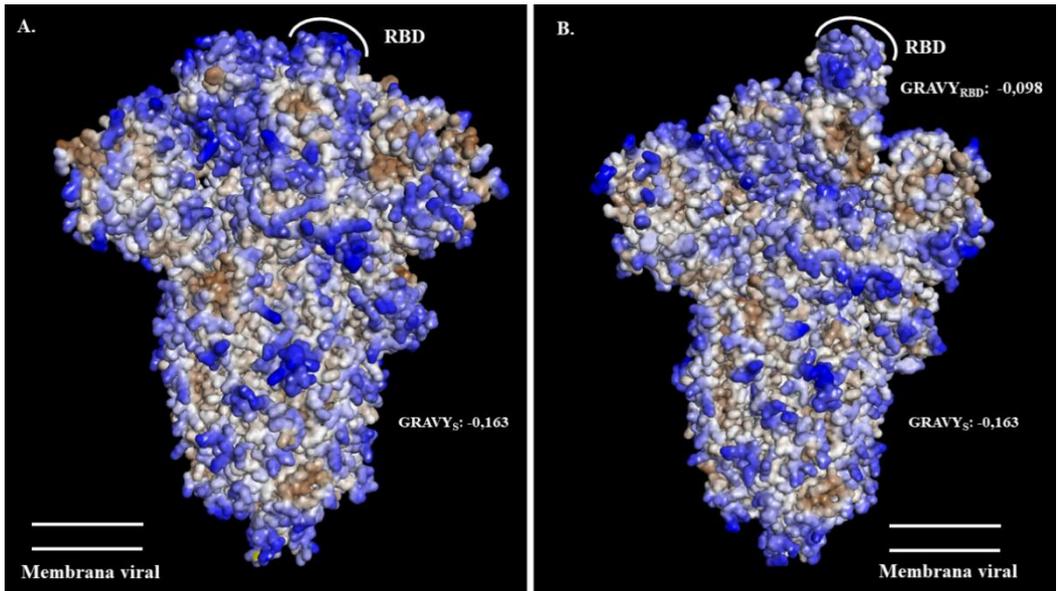


Figura 1: Hidrofobicidad e hidrofilia de la SARS-CoV-2-S. **A.** SARS-CoV-2-S con el ectodominio RBD (Dominio de Unión al Receptor) cerrado, PDB: 6VXX. **B.** SARS-CoV-2-S con el ectodominio RBD abierto, PDB: 6VSB. Código de colores: marrón: hidrofobicidad, azul: hidrofilia.

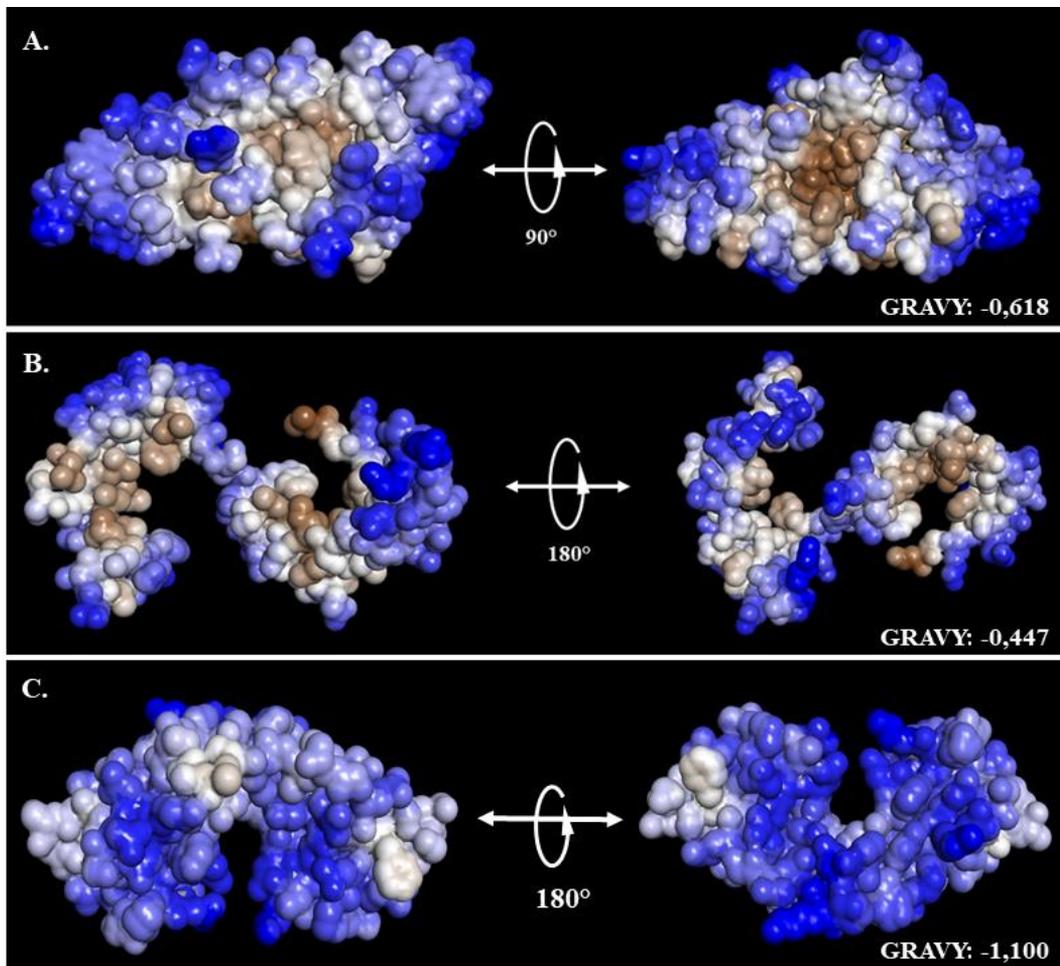


Figura 2: Hidrofobicidad e hidrofilia de las lectinas cianobacterianas. **A.** Microvirina, PDB: 2Y1S. **B.** Cianovirina, PDB: 3EZM, **C.** Scytovirina, PDB: 2QT4.

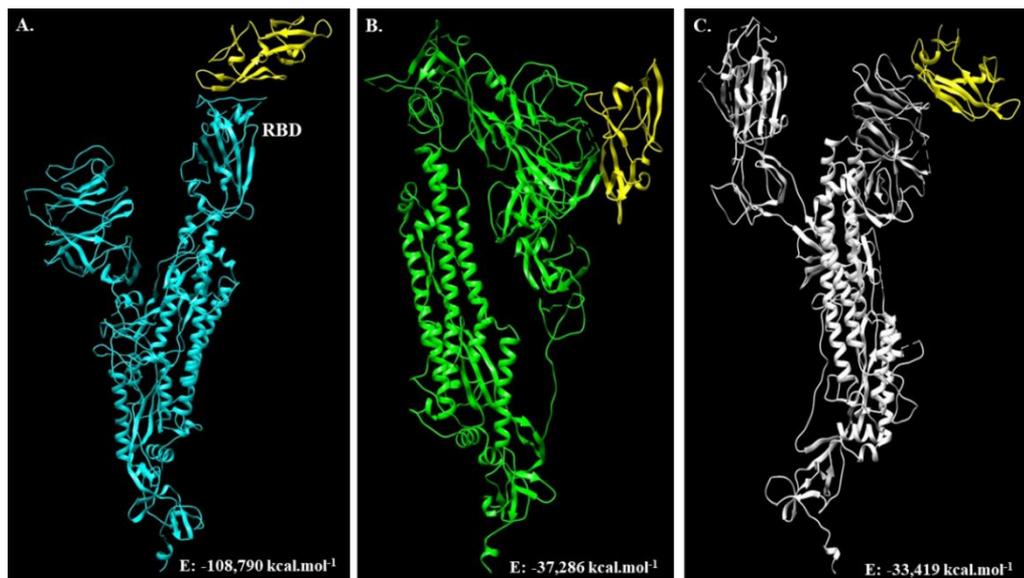


Figura 3: Complejo receptor ligando entre Microvirina y las cadenas de la SARS-CoV-2-S. **A.** Com-plejo formado entre la Microvirina (amarillo) y la cadena A de la SARS-CoV-2-S (cian). **B.** Complejo formado entre la Microvirina (amarillo) y la cadena B de la SARS-CoV-2-S (verde). **C.** Complejo for-mado entre la Microvirina (amarillo) y la cadena C de la SARS-CoV-2-S (blanco). **E:** Energía de unión.

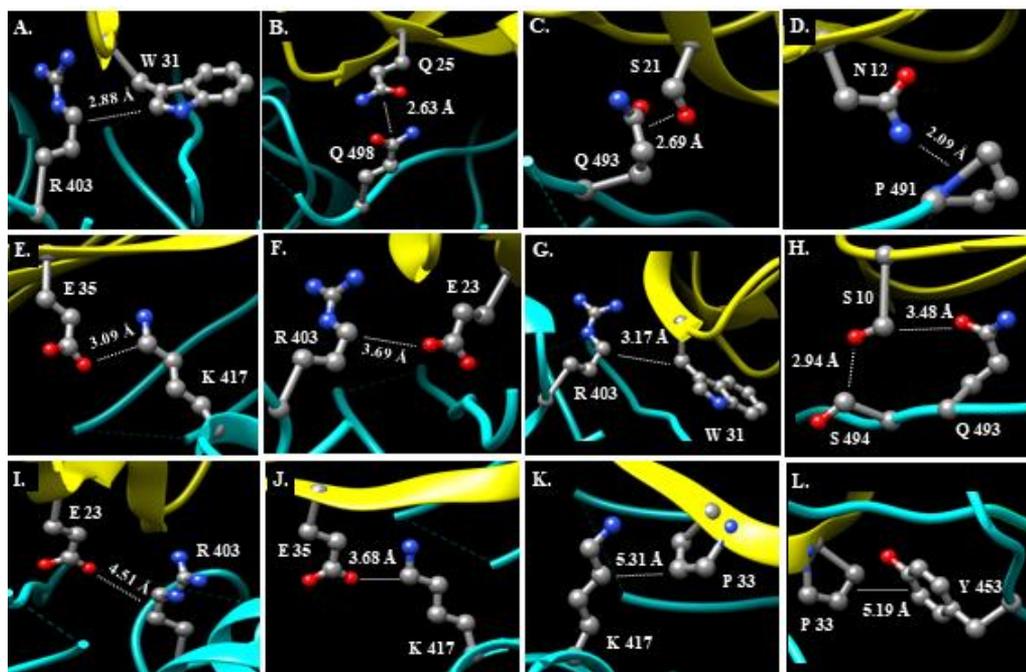


Figura 4: Interacciones entre residuos en el sitio de acoplamiento entre la Microvirina (amarillo) y el ectodominio RBD-SARS-CoV-2-S (cian). **A-D.** Puentes de hidrógeno. **E-H.** Interacciones carbono hidrógeno no convencionales. **I-J.** Interacciones electrostáticas. **K-L.** Interacciones hidrofóbicas. Distancia entre residuos en Angstrom (Å) (líneas blancas que unen a cadenas laterales de residuos).

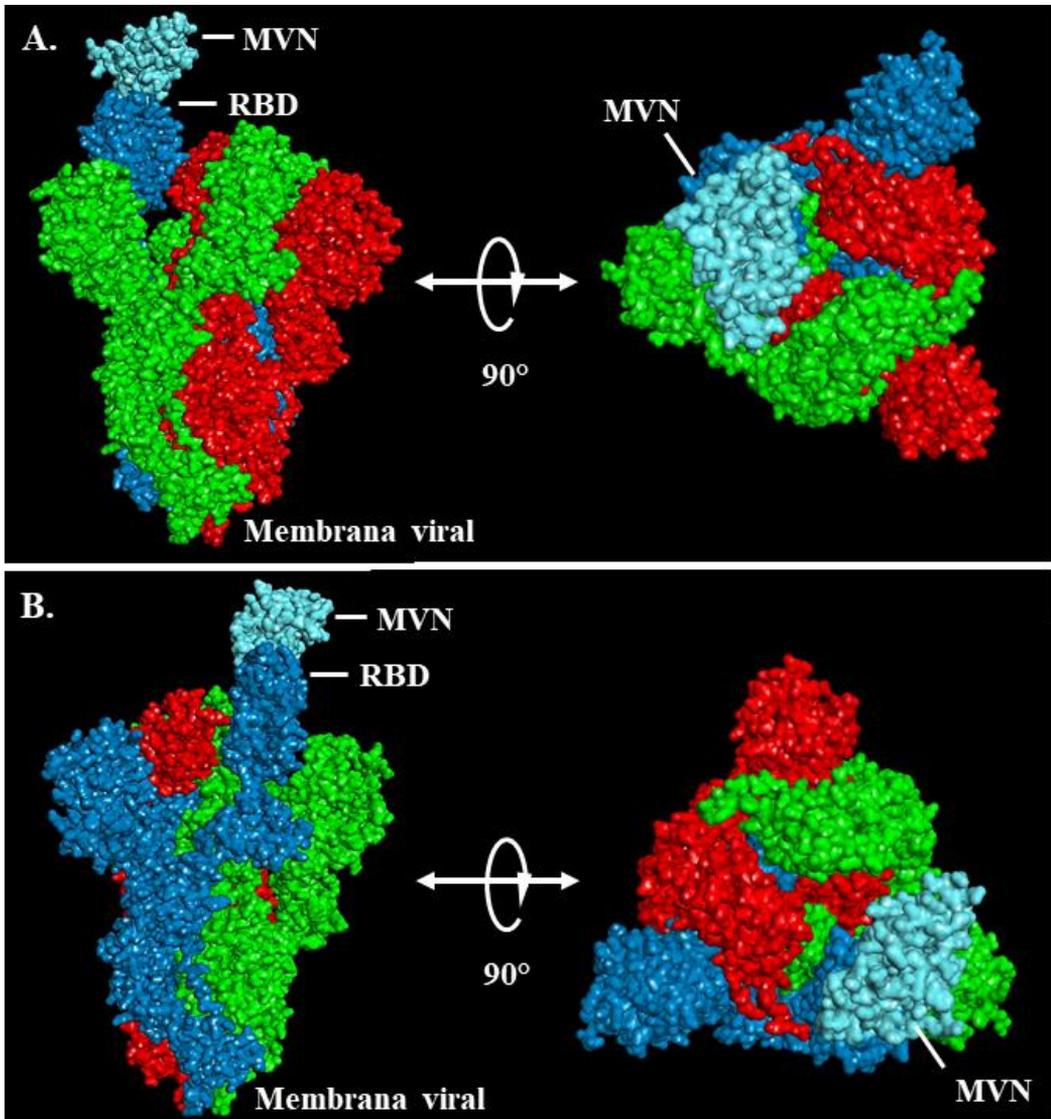


Figura 5: Estructura del complejo acoplado SARS-CoV-2-S:Microvirina (MVN). **A-B.** Diferentes vistas del complejo de unión. Código de colores: azul: cadena A; verde: cadena B; rojo: cadena C; cian: Microvirina.

Tabla 1: Residuos activos implicados en la unión entre RBD-SARS-CoV-2-S y las lectinas cianobacterianas.

Lectina	Energía de unión (kcal.mol ⁻¹)	Interacciones de hidrógeno				Interacciones electrostáticas				Interacciones hidrofóbicas			
		Puentes de hidrógeno		Interacciones de hidrógeno no convencionales		SARS-CoV-2-S		Lectina		SARS-CoV-2-S	Lectina		
		N	SARS-CoV-2-S	Lectina	N	N	SARS-CoV-2-S	N	SARS-CoV-2-S				
Cianovirina	-95,997	9	R403 K417 N439 Y453 Q493 G496 V503 Y453 Y453	N37 G15 Y100 Q14 T19 D35 Y100 S16 V17	1	‡Y505	Y100	–	–	–	1	V503	H90
Scytovirina	-89,393	4	Y421 Y505 V503 T415	Y421 Y505 V503 T415	–	–	–	3	K417 K417 K417	D57 E58 D75	5	K417 Y421 Y449	P65 P14 A59 R67 A94
Microvirina	-108,790	6	R403 Q493 Q498 G504 P491 Q498	W31 S21 Q25 E30 N12 Q25	5	‡R403 ‡R403 ‡K417 ‡S494 ‡Q493	E23 W31 E35 S10 S10	2	R403 K417	E23 E35	2	K417 Y453	P33 P33

‡Interacciones entre Orbitales P_i-Donadores de hidrógeno; †Interacción carbono hidrógeno; N: número de interacciones entre residuos activo.

Tabla 2: Residuos activos implicados en la unión entre la proteína SARS-CoV-2-S y la lectina Microvirina.

Cadenas SARS-CoV-2-S	Energía de unión (kcal.mol ⁻¹)	Interacciones de hidrógeno						Interacciones electrostáticas			Interacciones hidrofóbicas									
		Puentes de hidrógeno			Interacciones carbono no convencionales			SARS-CoV-2-S	Microvirina	N	SARS-CoV-2-S	Microvirina	N	SARS-CoV-2-S	Microvirina					
		N	SARS-CoV-2-S	Microvirina	N	SARS-CoV-2-S	Microvirina													
Cadena A (RBD)	-108,790	R403	W31	R403	E23															
		Q493	S21	R403	W37															
		Q498	Q25	R403	E35	2	R403	E23												
		G504	E30	K417	S10		K417	E35												
		P491	N12	S494	S10															
		Q498	Q25	Q493	S10															
Cadena B	-37,286	N137	H06																	
		H66	S96																	
		E96	Q97	1	H66	L93	2	A27	E48	9	A27	I92								
		H66	Q97					R237	D69											
		Y28	Q91																	
Cadena C	-33,419	F157	S09																	
		R158	S09																	
		R158	T07	1	H245	S10	2	F157	E71	2	A123	F67								
		N125	F67					R102	E71		R158	W31								
		N125	G68																	
		Y160	E71																	

N: número de interacciones entre residuos activo.

CONTENIDO POR SECCIONES

Ecología

- 3-14 Cuantificación de la especie exótica *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (Poaceae) en el Cerrado del Parque Nacional Cerro Corá, Departamento de Amambay, Paraguay
Vázquez, V.; Mereles, F.; Vogt, C.

Genética y Biología Molecular

- 15-28 Actividad antioxidante y antimutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Taropé) en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación Somática y Recombinación
de Oliveira, R.; Gayozo, E.; Martínez, M.; Pereira Sühsner, C.; Marín, L.; Torres, E.; Ferreira, F.
- 29-39 Efectos teratogénicos del extracto acuoso de *Maytenus ilicifolia* (Reissek ex Mart.) sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*
Ruiz Díaz, K.; Torres, E.; Marín, L.; Gayozo, E.
- 40-52 Evaluación de la actividad mutagénica del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less) (Jaguarete ka'a) en *Drosophila melanogaster* mediante el test SMART
Escobar Ibarrola, L.; Torres, E.; Gayozo, E.; Marín Insfrán, L.

Biotecnología

- 53 - 71 Estudio predictivo *in silico* del posible acoplamiento molecular entre la proteína SARS-CoV-2-S y lectinas cianobacterianas con actividad antiviral
Gayozo, E. & Rojas, L.