

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE FITOPRODUCTOS AUTÓCTONOS ACTIVOS CONTRA *LEISHMANIA* Y *TRYPANOSOMA* MEDIANTE EL TEST DE AMES Y EL ENSAYO COMETA

EVALUATION OF GENOTOXIC POTENCIAL OF COLOMBIAN PHYTOPRODUCTS ACTIVE AGAINST *LEISHMANIA* AND *TRYPANOSOMA* BY USING OF THE AMES TEST AND THE COMET ASSAY

Juliana Navarro-Yepes^{1,3}, Angélica Bonilla-Iriarte^{1,4}, Andrea I. Trujillo-Correa^{1,5}, Lía C. Upegui-González^{1,2,6}

Resumen

La Leishmaniosis y la enfermedad de Chagas son causas importantes de morbilidad y mortalidad en Colombia y en países tropicales. Los tratamientos existentes son insatisfactorios mientras que la enorme biodiversidad en nuestro medio aparece como una fuente abundante de productos potencialmente antiparasitarios. En este trabajo evaluamos dos fracciones extraídas de una planta del género *Sapindus*, con actividad anti-*Leishmania* y anti-*Trypanosoma* para determinar su eventual efecto mutagénico o genotóxico, mediante el Test de Ames y el Ensayo Cometa. Se estudiaron dos fracciones con actividad antiparasitaria promisorias, 3S-E y 3S-F, a tres concentraciones diferentes: 0,3, 3 y 30 µg/ml. Los resultados obtenidos indican que ninguna de las fracciones es mutagénica en las cepas de *Salmonella typhimurium* evaluadas, TA-100 y TA-98. En el ensayo de genotoxicidad (**Cometa**), la fracción 3S-E mostró diferencias estadísticamente significativas entre las dosis 3 y 30 µg/ml y el control negativo (**DMSO** 1,5%), lo cual indica la capacidad de esta fracción de afectar el material genético. Por lo tanto, se requieren estudios adicionales que permitan determinar la capacidad genotóxica de la fracción 3S-E en células humanas, dentro del rango de dosis efectivo como antiparasitarias. De manera interesante, la fracción 3S-F mostró no ser genotóxica en linfocitos humanos de sangre periférica, lo cual permite postular esta fracción como candidato para continuar su desarrollo como posible tratamiento contra la Leishmaniosis y la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: enfermedad de Chagas, Ensayo Cometa, genotoxicidad, Leishmaniosis, mutagenicidad, Test de Ames.

Abstract

Leishmaniasis and Chagas diseases are important causes of morbidity and mortality in Colombia and tropical areas. Treatments currently used show high toxicity and several limitations. Therefore, the search for new drugs is imperative. Meanwhile, the great biodiversity of these regions is an abundant source of potential antiparasitic products. In this study, we evaluated two active fractions extracted from a plant of the genus *Sapindus*, in the scope to evaluate their possible clinical use. Their mutagenic and genotoxic potential were assessed using the Ames Test and the Comet Assay on human primary peripheral blood cells. The results show that these fractions (3S-E and 3S-F) at three concentrations evaluated: 0.3, 3, and 30 µg/ml are not mutagenic in *Salmonella typhimurium*, strains TA-100 and TA-98. The Comet Assay with the 3S-E fraction indicated statistical significance between the doses 3 and 30 µg/ml and the negative control (**DMSO** 1.5%), showing the capacity of this fraction to affect ADN even at doses of 3 µg/ml. Subsequent studies are then required in order to determine the genetic damage produced by 3S-E fraction in human cells at the effective doses. Interestingly, peripheral blood cells treated with the 3S-F fraction presented no genotoxicity at all. The data make suggest that this fraction may be an important candidate in the development of therapeutic products against Leishmaniasis and Chagas disease.

Key words: Ames Test, Chagas disease, Comet Assay, genotoxicity, Leishmaniasis, mutagenicity.

Recibido: abril de 2006; aceptado: noviembre de 2006.

¹ Grupo Carcinogénesis. Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

² Grupo Inmunodeficiencias Primarias. Sede de Investigación Universitaria (SIU). Universidad de Antioquia. Medellín (Antioquia), Colombia.

Correos electrónicos: ³ <junay14@yahoo.es>, ⁴ <biobonilla@yahoo.es>, ⁵ <maitc559@udea.edu.co>, ⁶ <lcupeguig@yahoo.com>.

INTRODUCCIÓN

En Colombia y América Latina existe un alto índice de morbilidad ambulatoria y hospitalaria, con tasas en incremento, debido a enfermedades crónicas e infecciosas. Hoy la situación de las enfermedades parasitarias constituye uno de los problemas de salud pública más importante a escala nacional (WHO, 2005). En Colombia, se calcula que 1,3 millones de individuos están infectados con *Trypanosoma* y 3,6 millones están en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas, la cual se produce tras la infección con este parásito (WHO, 2005). Así mismo, la enfermedad causada por *Leishmania* tiene una prevalencia global estimada en más de 12 millones de personas infectadas y 350 millones en riesgo de adquirir la infección; es una enfermedad endémica en todo el territorio nacional con una incidencia anual de 6.500 casos y un subregistro considerable, si se tiene en cuenta el carácter rural y semi-urbano de la parasitosis (WHO, 2005).

Los tratamientos para la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis están entre los más insatisfactorios. Se cuenta con fármacos que, aunque son efectivos para curar aproximadamente el 50% de los casos agudos, presentan baja efectividad en las etapas crónicas de la parasitemia, poca consistencia en la respuesta al tratamiento en las distintas áreas geográficas, efectos colaterales deletéreos y necesidad de tratamientos prolongados (Trouiller et al., 2002).

A través de la historia, las plantas han sido fuente importante de compuestos terapéuticos y dada la amplia biodiversidad de la flora colombiana, la disponibilidad tecnológica nacional y los conocimientos de nuevos compuestos derivados de productos naturales de los que se tienen resultados alentadores como antiparasitarios, es pertinente la caracterización de los efectos que dichas sustancias puedan tener sobre los usuarios potenciales (Echeverri, 2003).

Por lo tanto, para escalar en el desarrollo de tratamientos terapéuticos derivados de fitoproductos autóctonos, es necesario realizar estudios de citotoxicidad que determinen la capacidad de tales sustancias para alterar la homeostasis celular o inducir muerte, y permitan, por tanto, obtener un indicativo de la toxicidad aguda *in vivo*. Igualmente, es necesario realizar estudios de genotoxicidad que permitan verificar si la sustancia interactúa en forma directa o no con el ADN, ya que la exposición prolongada a agentes modificadores del ADN puede producir acumulación de daños subletales (toxicidad crónica) que conllevan a cambios en la carga genética y potencian el desarrollo carcinogénico (FDA, 1997).

Una de las primeras instancias que se abarca en el desarrollo de una sustancia terapéutica, es determinar los efectos tóxicos en sistemas bacterianos y en células de mamífero (FDA, 1997). Para esto se cuenta con pruebas reproducibles y validadas en la comunidad científica internacional, como el ensayo Cometa, para la evaluación de la genotoxicidad y el Test de Ames, desarrollado por Maron y Ames (1983) para detección de mutagenicidad.

Tanto el Test de Ames como el ensayo Cometa, se encuentran dentro de la batería de análisis recomendados por la *Food and Drugs Administration (FDA)* para la evaluación del potencial genotóxico de sustancias que pretenden registrarse como productos farmacéuticos (FDA, 1997).

Por lo tanto, en la presente investigación se pretende dilucidar el potencial mutagénico y genotóxico de extractos vegetales con actividad antiparasitaria promisorio, mediante la prueba de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* (Test de Ames) y la verificación del daño genético (Cometa) en linfocitos humanos de sangre periférica, con el fin de explorar el potencial de dichas sustancias para desarrollarse como medicamentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos naturales. Los extractos vegetales y fracciones cromatográficas estudiados se trabajaron dentro del marco del proyecto “*Búsqueda de antiparasitarios de la flora colombiana 1: Leishmaniosis y Chagas*” (Echeverri, 2003), desarrollado por varios grupos de investigación de la Universidad de Antioquia (Colombia). Estos extractos vegetales y fracciones cromatográficas fueron preparados en el Grupo de Química Orgánica de Productos Naturales; seleccionados como promisorios por su actividad anti-*leishmania* y anti-*trypanosoma* en los grupos de investigación PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales) y Chagas; y finalmente, clasificados en el grupo Inmunodeficiencias Primarias, de acuerdo con la estimación de la citotoxicidad (IC_{50}), considerando aquellas fracciones que presentaron un $IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$ como fracciones con citotoxicidad baja en células humanas. Estas últimas, fueron las fracciones de nuestro interés y posteriormente evaluadas para determinar la capacidad mutagénica y/o genotóxica.

Sistema celular. Se emplearon linfocitos humanos de sangre periférica de donantes sanos no fumadores, los cuales se aislaron por el método tradicional en gradiente de Histopaque® (Boyum, 1968). La viabilidad y el número de linfocitos se determinaron mediante el método de exclusión de Azul de Tripano en un hemocitómetro (Forabosco et al., 1972).

Tratamiento. Los linfocitos recién aislados se trataron con tres dosis diferentes de cada uno de los extractos, 3S-E y 3S-F, a 37 °C, 5% de CO_2 durante un periodo de 1 y 24 horas en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma). Las dosis se determinaron de acuerdo a la concentración citotóxica 10 (IC_{10}), la cual fue de 30 $\mu\text{g/ml}$ para ambas fracciones, y dos dosis menores en unidades logarítmicas: 0,3 y 3 $\mu\text{g/ml}$. Se empleo como control positivo H_2O_2 50 μM , un agente oxidante altamente genotóxico.

Detección de daño en el ADN por el Ensayo Cometa Alcalino. Para detectar el efecto genotóxico de los extractos se siguió la metodología propuesta por Singh et al. (1988) y modificada por Rojas et al. (1999) y Tice et al. (2000). La intensidad del daño se estimó de acuerdo al parámetro “longitud de cola del Cometa”, es decir, la longitud de migración electroforética de los fragmentos de ADN producidos por las rupturas. Para la cuantificación se empleó el programa “*Comet Assay Software Project*” (CASP, 2006; Kónca et al., 2003).

Detección de apoptosis. *Naranja de Acridina-Bromuro de Etidio (NA-BE)*. Esta técnica permite identificar tanto estadios tempranos como tardíos de la apoptosis y se basa en el aspecto morfológico y la permeabilidad de las células a los fluorocromos, “Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio, que tienen la capacidad de unirse al RNA o DNA. Posterior al tratamiento con los extractos 3S-E y 3S-F, se mezclaron 1 μl (= 100 $\mu\text{g/ml}$) de NA-BE con 25 μl de la suspensión celular en una lámina portaobjetos y se observaron con un aumento de 40X en un microscopio de fluorescencia (Nikon). Se contaron 100 células y se clasificaron según los parámetros descritos en el *Current Protocols in Immunology* (Martin et al., 1998).

May Grünwald-Giemsa. Esta coloración permite observar características representativas de estadios tardíos de la apoptosis, dentro de las que se incluyen hipercondensación de la cromatina, citoplasma uniformemente eosinofílico, fragmentación nuclear y/o citoplasmática, picnosis nuclear, desintegración nucleolar y núcleos “en roseta” o hendidos. Luego del tratamiento con los extractos 3S-E y 3S-F las células se fijaron con metanol sobre láminas portaobjetos, se colorearon con Wrigth durante 30 segundos y luego se colorearon con Giemsa 1:10 por 10 minutos. Se contaron 100 células que se clasificaron como apoptóticas o normales de acuerdo a las características morfológicas observadas en un microscopio óptico (Nikon) con un aumento de 100X (Javois, 1994).

Test de Ames. La actividad mutagénica de los extractos se evaluó con el método desarrollado por Maron y Ames (1983) y modificado por De Méo et al. (1996). Se utilizaron dos cepas de *Salmonella typhimurium*; la cepa TA-98 en la que se produce la reversión a *his*⁺ por ganancia o pérdida de un par de bases en el gen mutado y la cepa TA-100 en la cual se produce la reversión por sustitución de un par de bases. Se evaluó el efecto mutagénico en presencia o ausencia de enzimas activadoras (oxigenasas-P₄₅₀) contenidas en la fracción microsomal (S-9) de un homogenizado de hígado de rata macho, tras la inducción con Aroclor 1254 (Maron, 1983). Para determinar la mutagenicidad de los extractos se empleó el criterio sugerido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cual clasifica cualquier compuesto químico como mutagénico si induce un aumento de dos veces la tasa de reversión espontánea y presenta un efecto dependiente de la dosis (Coulston et al., 1980).

Análisis Estadístico. Todos los análisis se realizaron con el programa *Statistical Program for Social Sciences (SPSS)*. Para el ensayo Cometa se emplearon las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnov para verificar la homogeneidad de las varianzas y la normalidad de los datos respectivamente, para ambas pruebas se obtuvieron resultados negativos, $p \leq 0,01$; por lo cual se realizó una transformación logarítmica de los datos. Posteriormente, se realizó un ANOVA de un factor y se compararon las diferencias entre medias mediante la prueba de Tamhane.

La inducción de apoptosis se analizó mediante un ANOVA de un factor y la prueba de Bonferroni para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Para el ensayo de mutagenicidad en *S. typhimurium* se realizó la prueba de Levene sobre la igualdad de las varianzas, la cual mostró homogeneidad con un $p \geq 0,09$. Se comprobó la

normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, $p \geq 0,08$. Finalmente, se realizó un ANOVA de dos factores con interacción para establecer si existían diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

RESULTADOS

Se realizó la evaluación genotóxica de las fracciones 3S-E y 3S-F, las cuales se eligieron para este estudio de acuerdo a los parámetros descritos anteriormente. Estas fracciones se evaluaron sobre linfocitos humanos obtenidos a partir de sangre periférica de donantes sanos no fumadores, con un porcentaje de viabilidad inicial superior al 97%, y sobre las cepas TA-98 / TA-100 de *S. typhimurium*. La magnitud del daño genético y la capacidad mutagénica se determinó de acuerdo a la longitud de migración de los fragmentos de ADN (Longitud de cola del Cometa) y al número de revertantes respectivamente.

FRACCIÓN 3S-E. Ensayo Cometa. Los resultados para el análisis del efecto genotóxico de la fracción 3S-E se presentan en las figuras 1 y 2. Se observó una longitud media de cola de 23,38 unidades arbitrarias (UA) (1 h) - 9,85 UA (24 h) para el DMSO 1,5% utilizado como control negativo. El control positivo (H₂O₂ 50 μ M), con una longitud de cola de 77,28 UA (1 h) - 35,28 UA (24 h), nos permite constatar la adecuada ejecución de la técnica puesto que estas medidas superan ampliamente las obtenidas para el DMSO 1,5%.

Para la dosis de 30 μ g/ml la longitud media de cola fue de 31,99 UA (1 h) - 16,53 UA (24 h). En la dosis de concentración media (3 μ g/ml) las medidas de daño fueron 33,67 UA (1 h) - 13,35 UA (24 h). La menor concentración (0,3 μ g/ml) presentó una longitud media de cola de 25,93 UA (1 h) - 10,71 UA (24 h). En todos los casos la viabilidad celular post-tratamiento fue superior al 70%.

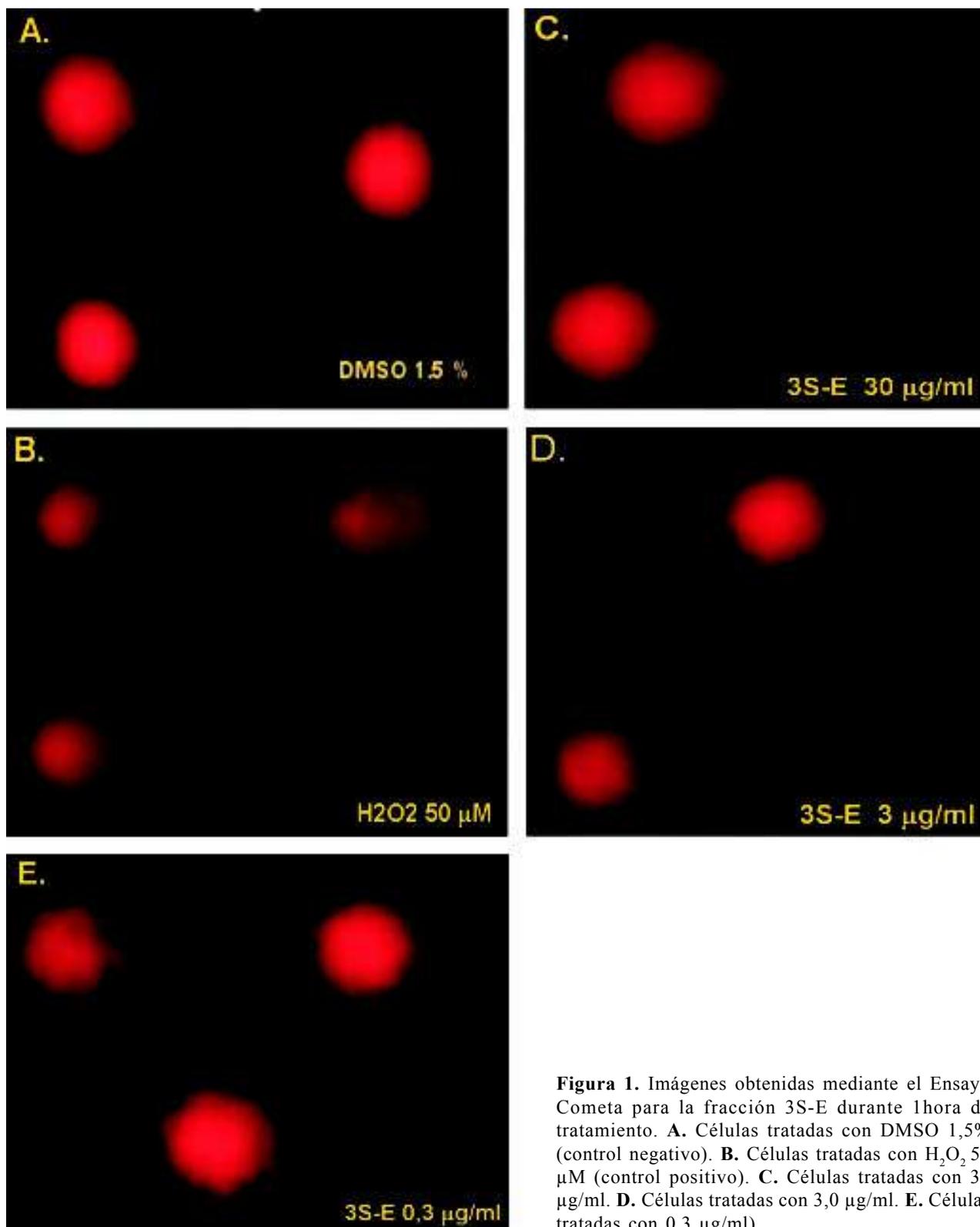


Figura 1. Imágenes obtenidas mediante el Ensayo Cometa para la fracción 3S-E durante 1 hora de tratamiento. **A.** Células tratadas con DMSO 1,5% (control negativo). **B.** Células tratadas con H₂O₂ 50 μM (control positivo). **C.** Células tratadas con 30 μg/ml. **D.** Células tratadas con 3,0 μg/ml. **E.** Células tratadas con 0,3 μg/ml)

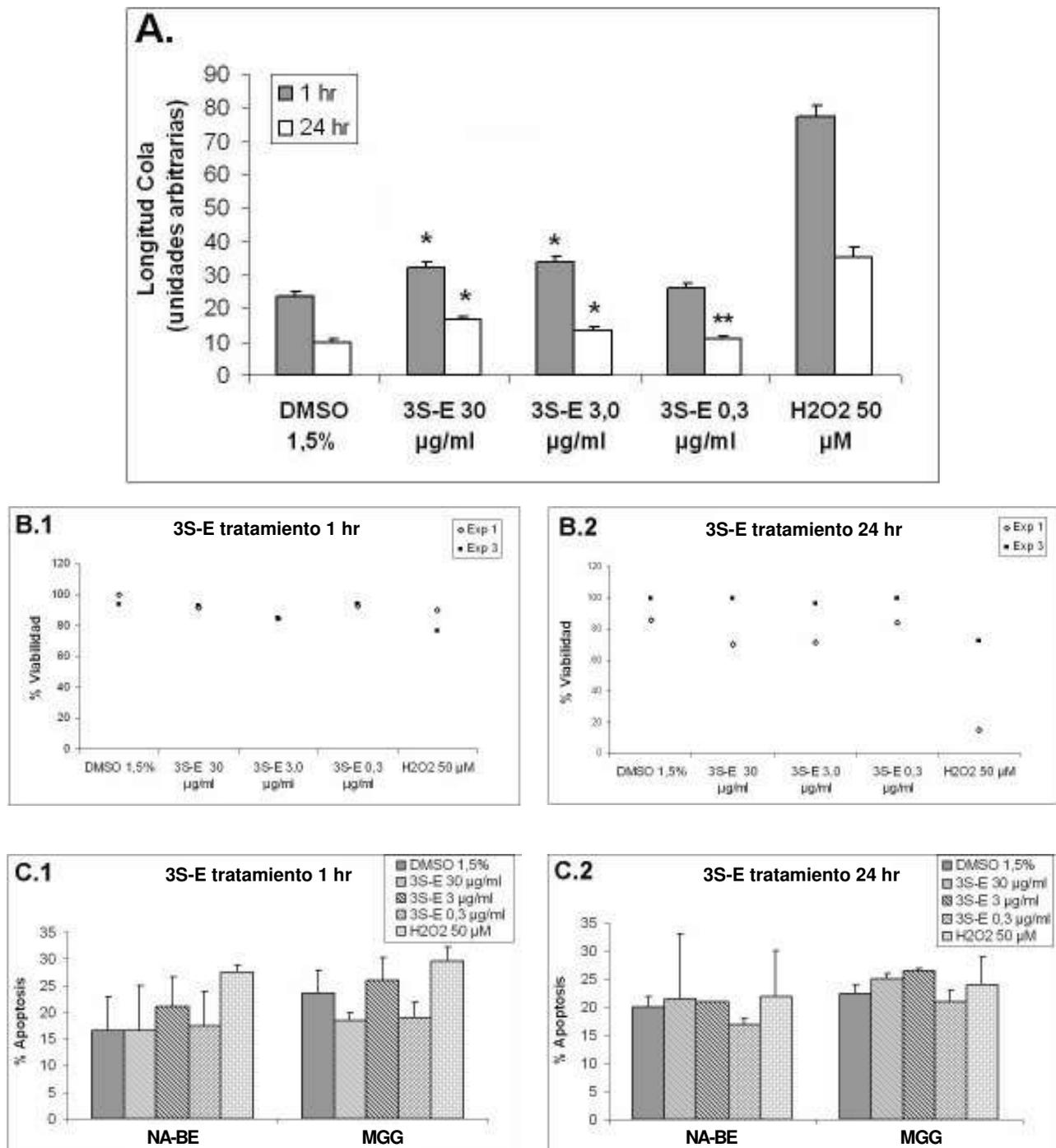


Figura 2. A. Actividad genotóxica de la fracción 3S-E en linfocitos humanos, los resultados se expresan como la longitud media de cola obtenida para cada tratamiento \pm error estándar (* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo. ** Diferencias estadísticamente significativas con respecto a la dosis de 30 μ g/ml). **B.** Porcentaje de viabilidad post-tratamiento obtenido a 1 h (**B.1**) y 24 h (**B.2**) por el método de exclusión de azul de Tripano. **C.** Porcentaje de apoptosis post-tratamiento observado a 1 h (**C.1**) y 24 hr (**C.2**) con las técnicas Naranja de Acridina-Bromuro de Etidio (NA-BE) y May Grünwald Giemsa (MGG).

Según los análisis estadísticos y tomando la longitud de cola observada después del tratamiento con Dimetilsulfóxido (**DMSO**) 1,5% como índice de daño celular basal, tanto la dosis de 3 $\mu\text{g/ml}$ como la de 30 $\mu\text{g/ml}$ presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo, a los dos tiempos de tratamiento analizados. Por el contrario no se observaron estas diferencias entre el **DMSO** 1,5% y la dosis de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ en ninguno de los dos tiempos. A las 24 h de tratamiento, la dosis de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ presenta diferencias significativas con respecto a la dosis de 30 $\mu\text{g/ml}$, lo cual es congruente con los resultados ya descritos. Caso contrario se presenta a la primera hora de tratamiento, en donde no hay diferencias estadísticas importantes entre las tres dosis evaluadas; sin embargo, se puede observar que la dosis de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ tiene una longitud media de cola más cercana a la del control negativo que a las dosis de 3 y 30 $\mu\text{g/ml}$.

Detección de apoptosis. Los análisis sobre la inducción de apoptosis por las fracciones 3S-E y 3S-F en linfocitos humanos, se llevaron a cabo mediante las técnicas de coloración Naranja de Acridina-Bromuro de Etidio (NA-BE) y May Grünwald-Giemsa (**MGG**); las cuales permiten observar cambios morfológicos característicos

de células en estadios tardíos de apoptosis. Los resultados obtenidos para la fracción 3S-E con la concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ muestran un mayor porcentaje de células apoptóticas, del 21% a 1 h y 24 h con la técnica de NA-BE y del 26% a 1 h y 26,5% a 24 h con la técnica (**MGG**), que las concentraciones de 30 $\mu\text{g/ml}$, donde el porcentaje de células apoptóticas fue de 16,5% a 1 h y 21,5% a 24 h con la técnica de NA-BE y del 18,5% a 1 h y 25% a 24 h con la técnica **MGG**; y la concentración de 0,3 $\mu\text{g/ml}$, para la cual el porcentaje de células apoptóticas fue del 17,5% a 1 h y 17% a 24 h con la técnica de NA-BE y del 19% a 1 h y 21% a 24 h con la técnica **MGG** (figura 2). Se puede apreciar también, que los datos obtenidos con cada una de las técnicas para cada tratamiento no difieren significativamente entre sí, lo cual fue verificado tras el análisis estadístico de los resultados, donde no se encontraron diferencias significativas ni entre las dos técnicas empleadas, ni entre las diferentes dosis de la fracción 3S-E y el control negativo.

Tests de Ames. Los resultados del número de revertantes inducidos por la fracción 3S-E para el ensayo de mutagenicidad con la cepa TA-98 y TA-100 en presencia y ausencia de S-9 se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la prueba de Ames en las cepas TA-98 y TA-100 de *Salmonella typhimurium* después del tratamiento con la fracción **3S-E**, con y sin activación metabólica (**S-9**) (los datos se expresan como la media de revertantes/caja \pm Error estándar)

Tratamiento	TA-98		TA-100	
	sin S-9	con S-9	sin S-9	con S-9
DMSO 1,5%	10,33	17,00	105,5	123,83
3S-E, 0,3 $\mu\text{g/ml}$	21,67	13,00	130,3	143,30
3S-E, 3 $\mu\text{g/ml}$	15,83	12,67	131,6	132,30
3S-E, 30 $\mu\text{g/ml}$	18,33	12,67	135,3	123,00

La tasa de reversión espontánea obtenida para la cepa TA 98 utilizando DMSO 5% como control negativo fue de 10,33 y 17 revertantes en ausencia y presencia de enzimas activadoras (S-9) respectivamente, datos que concuerdan con el número de revertantes espontáneos reportado en la literatura mundial para esta cepa (Maron et al., 1983; Mortelmans et al., 2000).

Las medias del número de revertantes para las dosis de 0,3, 3 y 30 µg/ml en la cepa TA-98 fueron: 21,67 (-S9) - 13 (+S9) para la menor dosis; 15,83 (-S9) - 12,67 (+S9) para la dosis intermedia; y 18,33 (-S9) - 12,67 (+S9) para la dosis máxima. El análisis estadístico utilizado para comparar los valores de las medias, nos indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el número de revertantes promedio para cada dosis evaluada y el DMSO 5% con y sin adición de la fracción microsomal S-9 e igualmente no se presentan diferencias significativas entre las dosis.

Por otro lado, la prueba de mutagenicidad realizada empleando la cepa TA-100 de *S. typhimurium*, no muestra diferencias estadísticas relevantes cuando se comparan las medias obtenidas para las diferentes dosis y el control negativo. El número de revertantes obtenido al tratar las bacterias con las dosis de 0,3, 3 y 30 µg/ml fueron: 130,3 (-S9) - 143,3 (+S9) para la menor dosis empleada; 131,6 (-S9) - 132,3 (+S9) para la dosis intermedia; y 135,3 (-S9) - 123 (+S9) para la dosis máxima. Para el DMSO 5% se obtuvo un número de revertantes de 105,5 (-S9) y 123,83 (+S9), los cuales se encuentran entre los rangos reportados en la literatura para esta cepa (Maron et al., 1983; Mortelmans et al., 2000).

FRACCIÓN 3S-F. Ensayo Cometa. Los resultados obtenidos para el análisis del efecto genotóxico de la fracción 3S-F se presentan en las figuras 3 y 4. Al igual que lo observado para 3S-E, las longitudes de cola del control positivo

(H₂O₂ 50 µM) superaron cerca de 2,5 veces las obtenidas para el control negativo, H₂O₂ 50 µM 45,25 UA (1 h) -24,41 UA (24 h) y DMSO 1,5% 18,27 UA (1 h) - 8,78 UA (24 h).

Las medias para la longitud de cola de las dosis evaluadas fueron: 22,07 UA (1 h) - 12,88 UA (24 h) para 30 µg/ml. A la primera hora 3 µg/ml presenta una medida de 21,18 UA y 3,48 UA a 24 h, y los valores obtenidos para 0,3 µg/ml fueron 13,35 UA (1 h) y 9,74 UA (24 h). Se presentaron diferencias significativas entre la dosis de 30 µg/ml y el control negativo y entre esta dosis y la de 3 µg/ml a las 24 h de tratamiento. A la primera hora de tratamiento ninguna de las dosis evaluadas fue estadísticamente diferente del DMSO 1,5%. Aunque las dosis de 30 y 3 µg/ml presentaron diferencias entre ellas a este tiempo, estas últimas no son de relevancia puesto que no fueron diferentes del control negativo.

Detección de Apoptosis. Los resultados obtenidos para la fracción 3S-F con la concentración de 30 µg/ml mostraron un mayor porcentaje de células apoptóticas, del 16% a 1 h y 22% a 24 h con la técnica de NA-BE y del 17% a 1 h y 26% a 24 h con la técnica MGG, que las concentraciones de 3 µg/ml, donde el porcentaje de células apoptóticas fue de 12% a 1 h y 20% a 24 h con la técnica de NA-BE y del 16% a 1 h y 26% a 24 h con la técnica MGG, y 0,3 µg/ml, para la cual el porcentaje de células apoptóticas fue del 16% a 1 h y 23% a 24 h con la técnica de NA-BE y del 14% a 1 h y 22% a 24 h con la técnica MGG (figura 4). Igual que en el caso de la fracción 3S-E, la comparación entre las dos técnicas empleadas y las diferentes dosis, entre ellas y con el control negativo, no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Test de Ames. Los datos obtenidos del número de revertantes inducidos por las diferentes dosis de la fracción 3S-F en el ensayo de mutagenicidad con la cepa TA-98 y TA-100 se muestran en la tabla 2.

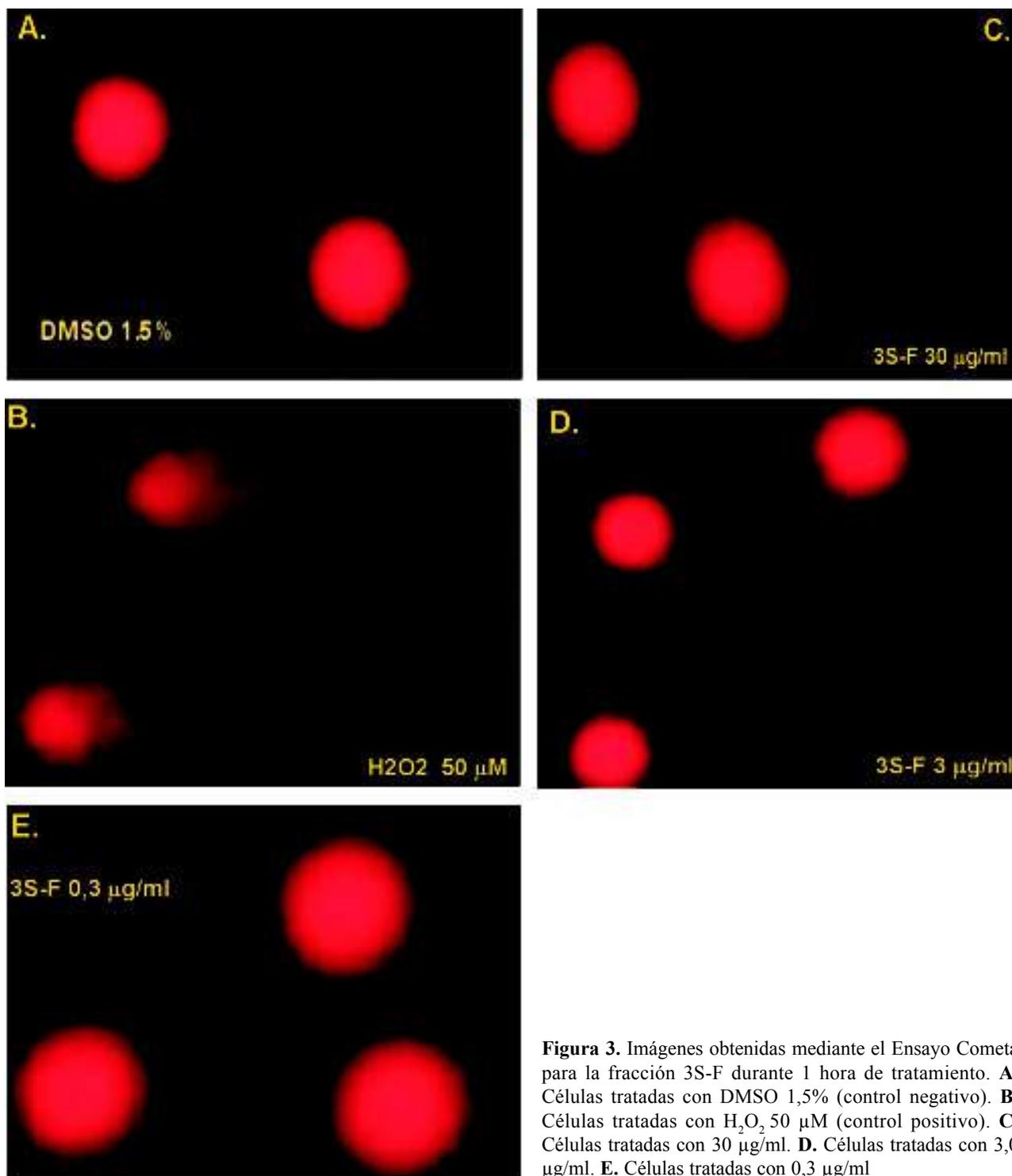


Figura 3. Imágenes obtenidas mediante el Ensayo Cometa para la fracción 3S-F durante 1 hora de tratamiento. **A.** Células tratadas con DMSO 1,5% (control negativo). **B.** Células tratadas con H₂O₂ 50 μM (control positivo). **C.** Células tratadas con 30 μg/ml. **D.** Células tratadas con 3,0 μg/ml. **E.** Células tratadas con 0,3 μg/ml

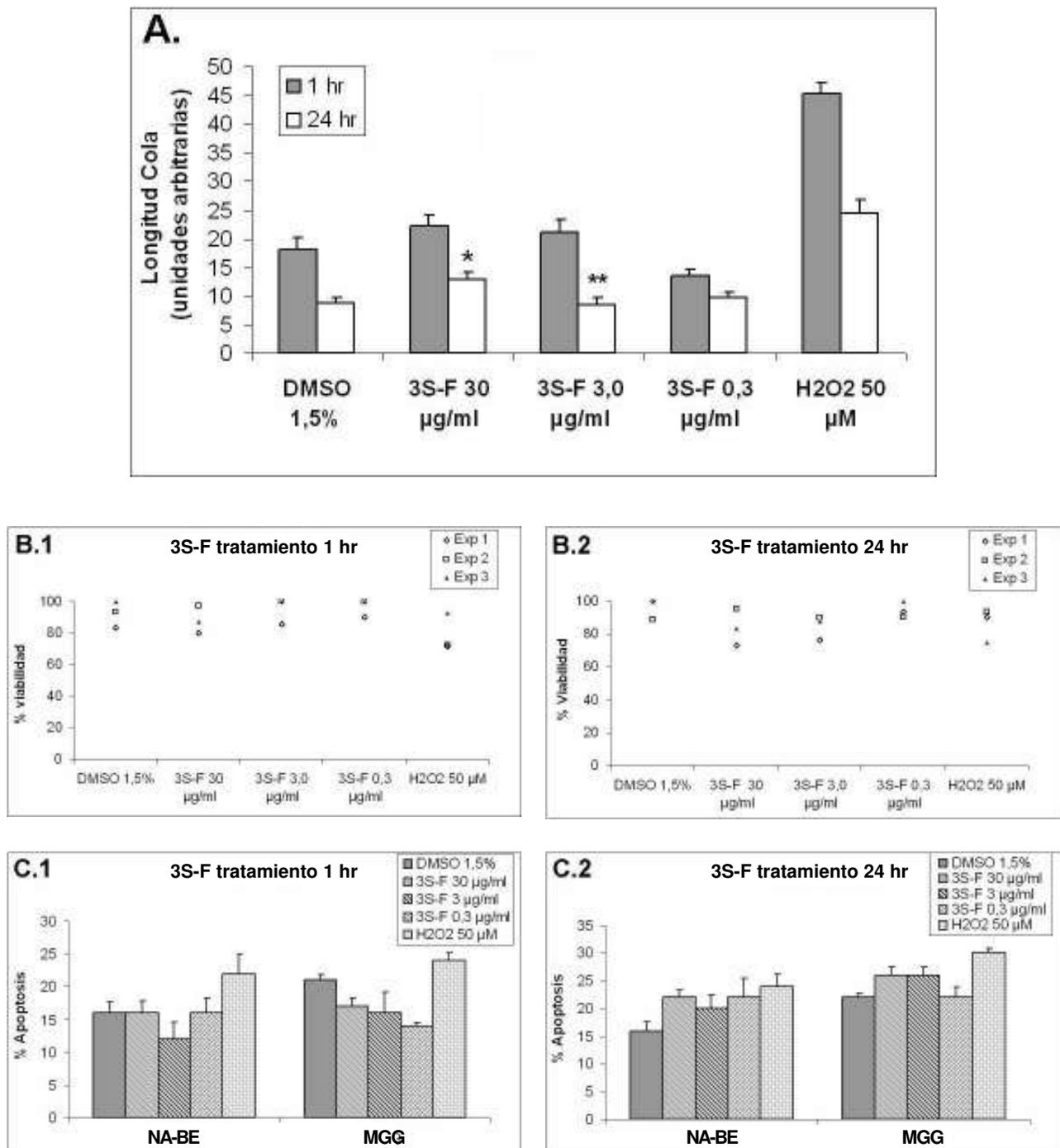


Figura 4. A. Actividad genotóxica de la fracción 3S-F en linfocitos humanos, los resultados se expresan como la longitud media de cola obtenida para cada tratamiento ± error estándar (* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo. ** Diferencias estadísticamente significativas con respecto a la dosis de 30 µg/ml). **B.** Porcentaje de viabilidad post-tratamiento obtenido a 1 h (**B.1**) y 24 h (**B.2**) por el método de exclusión de azul de Tripano. **C.** Porcentaje de apoptosis post-tratamiento observado a 1 h (**C.1**) y 24 h (**C.2**) con las técnicas Naranja de Acridina-Bromuro de Etidio (**NA-BE**) y May Grünwald Giemsa (**MGG**).

Tabla 2. Resultados de la prueba de Ames en las cepas TA-98 y TA-100 de *Salmonella typhimurium* después del tratamiento con la fracción 3S-F, con y sin activación metabólica (S-9) (Los datos se expresan como la media de revertantes/caja \pm Error estándar)

Tratamiento	TA-98		TA-100	
	sin S-9	con S-9	sin S-9	con S-9
DMSO 5%	10,33	14,17	73,63	77,13
3S-F, 0,3 μ g/ml	14,67	9,83	73,75	83,80
3S-F, 3 μ g/ml	12,00	12,50	69,50	69,88
3S-F, 30 μ g/ml	11,67	13,50	67,50	87,30

Al utilizar como control negativo DMSO 5% la tasa de reversión espontánea (**rev**) para la cepa TA-98 fue de 10,33 rev (-S9) y 14,17 rev (+S9), y para la cepa TA-100 73,63 rev (-S9) - 77,13 rev (+S9), datos dentro de los rangos reportados para esta cepa en el Test de Ames. (Maron et al., 1983; Mortelmans et al., 2000).

Se obtuvieron los siguientes datos para cada dosis analizada en la cepa TA-98: 11,67 rev (-S9) - 13,5 rev (+S9) para la dosis de 30 μ g/ml; 12 rev (-S9) - 12,5 rev (+S9) cuando se trató con la dosis de 3 μ g/ml y 14,67 rev (-S9) - 9,83 rev (+S9) para la dosis de 0,3 μ g/ml. En la cepa TA-100 se obtuvo un número de revertantes de 67,50 (-S9) - 87,3 (+S9) para la dosis de 30 μ g/ml; 69,5 (-S9) - 69,88 (+S9) para 3 μ g/ml y para 0,3 μ g/ml, 73,75 (-S9) - 83,8 (+S9). El análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre el número de revertantes promedio para cada dosis evaluada y el DMSO 5%, tanto en la cepa TA-98 como en la TA-100, cuando se adiciona o no la mezcla de activación metabólica (S-9). De igual forma, no se observan diferencias estadísticas importantes entre las dosis evaluadas.

DISCUSIÓN

Para determinar el posible efecto genotóxico de fitoproductos autóctonos con actividad anti-*trypanosoma* y anti-*leishmania*, se utilizó el ensayo

de migración electroforética de células individuales (Cometa), el cual fue recientemente aceptado por la FDA y el "European Centre for the Validation of Alternative Methods" (ECVAM), entidades que regulan la evaluación genotóxica de productos farmacéuticos tanto *in vitro* como *in vivo* (Hartmann et al., 2001). Es una de las técnicas más usadas en la actualidad para determinar genotoxicidad y es altamente sensible, ya que el daño causado por el tratamiento puede ser detectado en cada una de las células tratadas, además, es rápida y económica.

El análisis genotóxico de los extractos vegetales se realizó sobre linfocitos humanos de sangre periférica. Estas células presentan una serie de características que las hace especialmente apropiadas para su utilización en técnicas que evalúan daño genético, entre estas se cuentan: fácil disponibilidad, gran cantidad y amplia distribución en el organismo que las hace apropiadas para reflejar los efectos de una exposición en cualquier área del cuerpo (Solans et al., 1994). En su aislamiento, los linfocitos pueden sufrir daños en el ADN inducidos por el mismo procedimiento; sin embargo, en todos nuestros ensayos, se garantizó la nulidad de este hecho al obtener viabilidades celulares superiores al 97% en la población celular inicial. Además, con miras a reducir al máximo las posibles fuentes de genotoxicidad inherentes al diseño de la prueba, las células se sometieron a tratamiento inmediatamente después de ser aisladas, puesto que en cultivo

pueden acumular daños genéticos inducidos por componentes del metabolismo mezclados con su medio de cultivo (Ladeira et al., 2005) o reparar aquellos ocasionados por la sustancia en evaluación. Así mismo, el uso de linfocitos recién aislados permite hacer una aproximación de lo que podría suceder con estas y otras células en el organismo humano, tras la exposición a xenobióticos, puesto que no han sufrido transformación ni cambios.

Las dosis de las fracciones analizadas, 3S-E y 3S-F, fueron elegidas de acuerdo a la concentración citotóxica 10 para cada una de ellas y dos unidades logarítmicas menores. Estos parámetros son congruentes con los sugeridos por el “*International Workshop on Genotoxicity Test Procedures*” para la realización de análisis toxicológicos de sustancias con posible actividad genotóxica (Tice et al., 2000). Dichos procedimientos se basan en que, a una concentración capaz de causar un índice de citotoxicidad elevado en una población celular, los daños producidos en el material genético de la población no serían de relevancia puesto que estos no permanecerían en el individuo ya que se induciría muerte celular. Aquellos sucesos causados por dosis capaces de mantener una viabilidad superior al 70%, son importantes puesto que la generación y la acumulación de daños subletales, inducen mutaciones que aumentan la carga genética y potencian el desarrollo de procesos carcinogénicos (Tice et al., 2000).

Los resultados obtenidos para la fracción 3S-E con el Ensayo Cometa mostraron que existen diferencias significativas de las dosis de 3 y 30 $\mu\text{g/ml}$ con respecto al control negativo, lo cual nos indica la capacidad de esta fracción para interactuar directamente con el material genético a partir de dosis de 3 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, dado que la menor dosis empleada (0,3 $\mu\text{g/ml}$) no presenta una diferencia estadística importante con respecto al control negativo (DMSO 1,5%) sugiere que el extracto podría emplearse como antiparasitario dentro de un rango de concentración menor. Por lo tanto, es pertinente evaluar, en posteriores

estudios, un rango de dosis entre 0,3 y 3 $\mu\text{g/ml}$ para detectar la máxima concentración no genotóxica a la cual 3S-E pueda ser administrada.

Para la fracción 3S-F los resultados mostraron diferencias significativas entre la dosis de 30 $\mu\text{g/ml}$ y el control negativo a las 24 h de tratamiento, y entre esta misma dosis y la de 3 $\mu\text{g/ml}$ al tiempo mencionado. Esto indica que a la concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ esta fracción puede ejercer cambios sobre el material genético; pero la dosis de 3 $\mu\text{g/ml}$ no presenta diferencias estadísticamente importantes con respecto al DMSO 1,5%, indicando que no es genotóxica. Sería conveniente entonces, analizar las concentraciones entre 3 y 30 $\mu\text{g/ml}$ para identificar la dosis máxima no genotóxica a la cual 3S-F pueda ser empleada como tratamiento.

Las diferencias entre la longitud media de cola obtenida a los dos tiempos de exposición analizados fueron evidentes y generalizadas para todos los tratamientos. Estas diferencias no se consideraron en el análisis estadístico puesto que la reducción en la longitud de cola que se observa a las 24 horas es común a todos los tratamientos, incluyendo controles positivos y negativos. Por lo tanto, este efecto no es atribuible a las fracciones evaluadas. Por el contrario, podría ser debido a procesos de reparación efectuados por las células y visibles en el tiempo o la eliminación de células afectadas (Belloni et al., 2005).

De acuerdo a los resultados del análisis estadístico y considerando que la genotoxicidad de un compuesto se acepta si existe una respuesta dependiente de dosis y un aumento de dos veces la longitud de cola obtenida para el control negativo (Tice et al., 2000), se puede decir que, bajo las condiciones de este ensayo, la fracción 3S-F no induce daños en el ADN de linfocitos humanos de sangre periférica.

De la misma manera, siguiendo esos parámetros (Tice et al., 2000), el efecto de la fracción 3S-E podría considerarse no genotóxico; sin embargo, los análisis estadísticos muestran que existen

diferencias significativas con respecto al control. Por lo tanto, no se puede descartar categóricamente su capacidad para interactuar con el ADN y se hacen necesarios estudios posteriores en otros modelos celulares y con concentraciones bajas que precisen el comportamiento de dicha fracción.

Las rupturas en el ADN, que son la evidencia del daño genético detectado por el ensayo Cometa, pueden ser originados también por sucesos relacionados con la apoptosis, sesgando así la interpretación de los resultados obtenidos por esta técnica (Roser et al., 2001). Varios laboratorios han reportado que los procesos de apoptosis pueden dar imágenes con aspecto y parámetros de valor en longitud de cola del mismo orden que aquellas células con daño moderado de ADN, sugiriendo que las imágenes de Cometa no pueden ser interpretadas como un indicativo de genotoxicidad cuando el riesgo de apoptosis esta presente (Florent et al., 1999; Choucroun et al., 2001). Por lo tanto, para medir y estimar cuantitativamente el impacto de tales sucesos en la interpretación de datos del Ensayo Cometa, son necesarias pruebas adicionales que permitan diferenciar las rupturas inducidas por genotoxicidad de aquellas producidas por apoptosis. Se ha reportado, que cuando se realiza Cometa conjuntamente con un ensayo para estimar apoptosis se obtiene una alta sensibilidad y especificidad que permiten un grado de concordancia con pruebas para determinar carcinogenicidad en roedores (Lee et al., 2003). Por lo tanto, en el presente estudio, se determinó el porcentaje de células apoptóticas inducido por las diferentes dosis de las fracciones 3S-E y 3S-F, paralelamente al análisis genotóxico. Los resultados obtenidos nos muestran que ninguna de las tres concentraciones evaluadas para cada fracción, es capaz de inducir una respuesta apoptótica significativa diferente del control negativo. Igualmente, con el fin de minimizar falsos positivos debidos a citotoxicidad se siguió el criterio de Henderson et al., (1998), el cual sugiere evaluar solo aquellas sustancias que permitan una viabilidad celular post-tratamiento superior al 70%. Lo

anterior, sumado a la ausencia de apoptosis, nos permite garantizar que los datos obtenidos mediante el ensayo Cometa para cada tratamiento corresponden a efectos genotóxicos y no a efectos relacionados con citotoxicidad.

El promedio de revertantes obtenido para cada cepa luego de ser tratadas con las diferentes dosis de las fracciones 3S-E y 3S-F en presencia o ausencia de activación metabólica, no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo (DMSO 5%) ni entre ellas. De acuerdo a estos resultados, podemos concluir que ninguna de las fracciones evaluadas son mutágenos directos o indirectos, puesto que, el criterio de la Organización Mundial de la Salud (Coulston et al., 1980) para clasificar cualquier compuesto químico como mutagénico es que induzca un aumento de dos veces la tasa de reversión espontánea y presente un efecto relacionado con la dosis. Empleando el criterio anterior en este trabajo, se encuentra que no hay aumentos importantes en el número de revertantes cuando ambas cepas bacterianas son tratadas con cualquiera de las dosis de cada extracto. Igualmente, no se observan aumentos en el número de colonias revertantes relacionadas con la dosis tanto en presencia o en ausencia de la fracción microsomal activadora (S-9).

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que la fracción 3S-F no es genotóxica en células mononucleares humanas de sangre periférica y no es mutagénica en las cepas evaluadas de *S. typhimurium*. Este hecho permite considerar esta fracción para posteriores estudios tendientes al desarrollo de un posible tratamiento contra la Leishmaniosis y la enfermedad de Chagas.

Se requieren estudios adicionales que permitan confirmar o descartar si la fracción 3S-E induce daños relevantes sobre el material genético de células humanas, para contemplar, así, su

posterior inclusión en el desarrollo de productos terapéuticos de las enfermedades tropicales Leishmaniosis y Chagas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los siguientes grupos de investigación: Química Orgánica de

Productos Naturales, PECET y Chagas, adscritos al proyecto “*Búsqueda de antiparasitarios de la flora colombiana, I. Leishmaniosis y Chagas*”, por permitirnos participar en el proyecto y al Dr. Abel Díaz por su asesoría en los análisis estadísticos. El proyecto fue financiado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación de la Universidad de Antioquia (CODI).

REFERENCIAS

- Belloni P, Meschini R, Czene S, Harms-Ringdahl M, Palitti F.** 2005. Studies on radiation-induced apoptosis in G₀ human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 81(8):587-599.
- Boyum A.** 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation Supplement*, 97:77-89.
- CASP.** 2006. *Programa: “Comet Assay Software Project”*. WEB: <<http://www.casp.of.pl>>.
- Choucroun P, Gillet D, Dorange G, Sawicki B, Dewitte JD.** 2001. Comet assay and early apoptosis. *Mutation Research*, 478:89-96.
- Coulston F, Dunne JF.** 1980. The potential carcinogenicity of Nitroso Table Drugs. Pp.8-14. En: Ablex Publ. Corp. *World Health Organization Symposium Geneva*. Norwood (NJ), U.S.A.
- De Meo M, Laget M, Di Giorgio C.** 1996. Optimization of the *Salmonella* / mammalian microsome assay for urine mutagenesis by experimental designs. *Mutation Research*, 340:51-65.
- Echeverri F.** 2003. *Búsqueda de antiparasitarios de la flora colombiana, I. Leishmaniasis y Chagas*. Convocatoria Nacional Proyectos de Investigación Ciencia y Tecnología de la Salud. COLCIENCIAS. Bogotá, Colombia.
- FDA (Food and Drugs Administration).** 1996. *Guideline for Industry. Specific aspects of regulatory genotoxicity test for pharmaceuticals. ICH S2A*. <<http://www.fda.gov/cder/guidance/ichs2a.pdf>>. Fecha de consulta: 10 de diciembre de 2005.
- Florent M, Godard T, Ballet JJ, Sola B.** 1999. Detection by the Comet assay of apoptosis induced by lymphoid cell lines after growth factor deprivation. *Cell Biology and Toxicology*, 15:185-192.
- Forabosco A, Zaffe D, Tosato I.** 1972. On the dye exclusion of test cell viability. I. Evaluation of the optimal concentration. *Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, 48:33-36.
- Hartmann A, Suter W.** 2001. The Comet Assay: the test of choice as the second in vivo test for in vitro positive pharmaceuticals. *Proceedings*

- of International Comet Assay Workshop* (Ulm, Germany), 22:22-24.
- Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S.** 1998. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13:89-94.
- Javois LC (ed.).** 1999. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Humana Press. Totowa (NJ), U.S.A.
- Kónca K, Lankoff A, Banasik A.** 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the Comet assay. *Mutation Research*, 534:15-20.
- Ladeira MS, Rodrigues MA, Freire-Maia DV, Salvadori DM.** 2005. Use of Comet assay to assess ADN damage in patients infected by *Helicobacter pylori*: comparisons between visual and image analyses. *Mutation Research*, 586:76-86.
- Lee M, Kwon J, Chung MK.** 2003. Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing Comet assay and apoptotic assay in combination. *Mutation Research*, 541:9-19.
- Maron D, Ames B.** 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113:173-215.
- Martin D, Lenardo M.** 1998. *Current Protocols in Immunology*. 3.17.1-3.17.39. John Wiley & Sons. New York, U.S.A.
- Mortelmans K, Zeiger E.** 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455:29-60.
- Rojas E, López MC, Valverde M.** 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 722(1-2):225-254.
- Roser S, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G.** 2001. Contribution of apoptosis to responses in the Comet assay. *Mutation Research*, 497:169-175.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** 1988. A simple technique for quantitation of low levels of ADN damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:184-191.
- Solans LX, Hernández MR.** 1994. *Biological monitoring of genotoxic exposures: Citogenetic techniques*. Ministerio de trabajo y asuntos sociales de España. <http://internet.mtas.es/insht/ntp/ntp_e10.htm>. Fecha de consulta: 13 de noviembre de 2005.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B.** 2000. Single cell gel/Comet assay: guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206-221.
- Trouiller P, Olliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N.** 2002. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *The Lancet*, 359(9324):2188-2194.
- WHO (World Health Organization).** 2005. *Special Program for Research and Training in Tropical Diseases*. <www.who.int/health-topics>. Fecha de consulta: 13 de noviembre de 2005.