



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DEL  
EXTRACTO HEXÁNICO Y LOS METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE *Clusia latipes* MEDIANTE EL  
ENSAYO COMETA EN LINFOCITOS HUMANOS”**

Tesis de grado previa a la  
obtención del Título de  
Bioquímico Farmacéutico

**AUTORA:**

Luisa Ivonne Celi Carrión

**DIRECTORA:**

Dra. Natalia Bailón

LOJA – ECUADOR

2009

Dra.

Natalia Bailón Moscoso

**DIRECTORA DE TESIS**

**CERTIFICA:**

Que una vez revisado el proyecto de investigación efectuado por la Srta. Luisa Ivonne Celi Carrión, previo a la obtención del Título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, Agosto 2009

Dra. Natalia Bailón Moscoso

**DIRECTORA**

## **AUTORÍA:**

Los resultados, ideas, conclusiones y demás contenidos vertidos en el desarrollo del presente proyecto de investigación son de absoluta responsabilidad de su autor.

Luisa Ivonne Celi Carrión

## **DEDICATORIA**

El presente proyecto de investigación va dedicado en primer lugar a Dios y a la Santísima Virgen de El Cisne, ya que gracias a su intersección pude llegar a culminar con éxito todas y cada una de la metas planteadas.

A mis papás: Luis y Victoria por el amor, cariño y apoyo que me han brindado siempre a lo largo de toda mi vida. Además por ser el soporte fundamental en la formación integral.

A mis hermanos Flor, Osman, Ernán y Richard por el apoyo desinteresado que han sabido brindarme para la superación personal.

Y de manera muy especial a Xavier y a mi hijo Alexander por ser la inspiración de mi vida en estos últimos meses.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en la persona del Ph. Dr. Luís Miguel Romero Fernández, por impulsar la investigación y formación integral de cada uno de sus estudiantes en la búsqueda del saber.

Al Centro de Biología Celular y Molecular, bajo la magnífica dirección de la Dra. Natalia Bailón, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación en el área de Genética Toxicológica.

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia, en la persona de la Dra. Paula Torres Bailón por brindar todo el apoyo necesario para superar todas y cada una de las barreras que se presentan dentro de la vida universitaria.

A la Dra. Natalia Bailón Moscoso, por la dirección y asesoramiento en la realización de este proyecto de investigación.

A la asesoría técnica para la realización de esta tesis a la Q.F.B. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis Papás, por ser el pilar fundamental de la formación como persona para así servir a la sociedad.

De manera muy especial a María Isabel Ramírez por su ayuda desinteresada e incondicional en la búsqueda de respuestas a todas y cada una de las dudas que se

presentaron en la realización de esta investigación y por su gran aporte en conocimientos.

A mis compañeros del área de Genética Toxicológica, por ayudarme a crecer en sabiduría y colaborar en la realización del presente proyecto de investigación: especialmente a Paulo, Diego y Xavier.

A todos los compañeros del Centro de Biología Celular y Molecular por estar prestos a brindar todo el apoyo que se requiere en la vida estudiantil.

A mis amigas (os), por estar en el momento en que más necesitaba de su apoyo tanto en las buenas como en las malas.

## **CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS**

Yo, Luisa Ivonne Celi Carrión concedora del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja Art. 67 acepto la disposición la misma que textualmente dice: “Forma parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Luisa Ivonne Celi  
**TESISTA**

Dra. Natalia Bailón  
**DIRECTORA DE TESIS**

## TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	I
AUTORÍA	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS	VI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
OBJETIVOS	XIV
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1 GENOTOXICIDAD</b>	1
<b>1.1.1</b> Relación entre Genotoxicidad y Carcinogenicidad	3
<b>1.1.2</b> Carcinógenos	5
<b>1.2 ENSAYO COMETA</b>	7
<b>1.2.1</b> Formas del Ensayo Cometa	9
<b>1.2.2</b> Aplicaciones	10
<b>1.2.3</b> Ventajas y Desventajas	11
<b>1.3 FLORA UNA FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS</b>	12
<b>1.4 TRITERPENOS CON ACTIVIDAD GENOTÓXICA</b>	14
<b>1.4.1</b> <i>Clusia latipes</i>	16
<b>1.4.2</b> Friedelina	19



1.4.3	β-amirina	20
<b>2.</b>	<b>MÉTODOS</b>	21
2.1	Modelo Biológico y Donadores	21
2.2	Compuestos de prueba	21
2.2.1	Extracto de <i>Clusia latipes</i> y metabolitos	
2.3	Controles	22
2.3.1	Control Positivo EMS	22
2.3.2	Control Negativo DMSO	22
2.4	Ensayo de Viabilidad (FDA)	22
2.5	Ensayo Cometa	24
2.6	Análisis Estadístico	25
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
3.1	<b>Viabilidad con FDA</b>	
3.1.1	Viabilidad con Extracto Hexánico de <i>Clusia latipes</i> .	29
3.1.2	Viabilidad con friedelina	30
3.1.3	Viabilidad con acetato de β -amirina	31
3.2	<b>Cometa</b>	
3.2.1	Largo de Cola con Extracto Hexánico de <i>Clusia latipes</i> .	32
3.2.2	Largo de Cola friedelina	33
3.2.3	Largo de Cola acetato de β -amirina	34
3.3	<b>Migración del ADN</b>	
3.3.1	Clasificación por daño del ADN Extracto Hexánico de <i>Clusia latipes</i> y sus metabolitos.	35
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	37
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	42
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	44
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b>	50

## **ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS**

Fotografía N° 1: Microfotografía de un Cometa.	8
Fotografía N° 2: Fotografía del ensayo de viabilidad. Células verdes (vivas) y rojas (muertas).	24
Fotografía N° 3: Nivel de daño al ADN expresado por el largo de la cola.	27

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla N° 1: Formas del Ensayo Cometa.	9
Tabla N° 2: Diseño de Tratamiento.	23
Tabla N° 3. Niveles de daño al ADN	26

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura N° 1: Relación entre el control medioambiental, biológico y de la exposición.	2
Figura N° 2: Interrelaciones entre genotoxicidad y carcinogenicidad.	4
Figura N° 3: Mutágenos provocan alteraciones en el ADN.	6

Figura N° 4: Principales fuentes de exposición de carcinógenos.	7
Figura N° 5: Aplicaciones del ensayo cometa.	11
Figura N° 6: Mapa de distribución del Género <i>Clusia</i> .	17
Figura N° 7: Estructura molecular de la Friedelina.	19
Figura N° 8: Acetilación de la molécula de $\beta$ -amirina para asegurar su estabilidad.	20
Figura N° 9: Diagrama del Ensayo Cometa.	28

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Viabilidad del Extracto de <i>Clusia latipes</i> .	29
Gráfico N° 2: Viabilidad con Friedelina.	30
Gráfico N° 3: Viabilidad con acetato de $\beta$ –amirina.	31
Gráfico N° 4: Largo de cola del Extracto de <i>Clusia latipes</i> .	32
Gráfico N° 5: Largo de Cola Friedelina.	33
Gráfico N° 6: Largo de Cola acetato de $\beta$ –amirina.	34
Gráfico N° 7: Clasificación de los cometas de acuerdo	35

al nivel de daño del Extracto de *Clusia latipes*.

Gráfico N° 8: Clasificación por daño del ADN de Friedelina.	36
Gráfico N° 9: Clasificación por migración del ADN tratados con $\beta$ -amirina.	37

## RESUMEN

El género *Clusia* se encuentra distribuido muy ampliamente por el país y América latina y específicamente formando parte de la flora endémica de la Provincia de Loja, la cual es muy variada, además esta especie es utilizada en la medicina tradicional. Del extracto hexánico de *Clusia latipes* se han aislado dos moléculas con actividad biológica como son la Friedelina y  $\beta$ -amirina.

Por ello el objetivo de este estudio fue determinar el efecto genotóxico producido por el extracto de *Clusia latipes* (planta medicinal) y sus metabolitos secundarios Friedelina y  $\beta$ -amirina, en linfocitos humanos mediante el ensayo cometa.

El tratamiento que se dió a las células fue de 3 horas y las dosis que se usaron fueron 25, 35 y 45  $\mu\text{g/ml}$  o  $\mu\text{M}$  respectivamente y los debidos controles negativo (DMSO 0,9 %) y positivo (EMS 0,1  $\mu\text{M}$ );

Los resultados del ensayo cometa muestran que existe un efecto genotóxico, medido por la migración de la cola del cometa dosis - dependiente tanto del extracto de *Clusia latipes* como de los compuestos: friedelina y acetato de  $\beta$ -amirina, sin embargo el daño es más significativo a las concentraciones mayores.

El consumo agudo de altas concentraciones del extracto de *Clusia latipes* produce efectos genotóxicos en linfocitos humanos.

**Palabras Clave:** Ensayo Cometa, *Clusia latipes*, metabolitos secundarios, friedelina, Acetato de  $\beta$ -amirina, daño al ADN.

## ABSTRACT

The genus *Clusia* is distributed very thoroughly specifically by the country and Latin America being part of the endemic flora of the Loja city, which is very varied, species is also it is used in the traditional medicine. Of the extract hexánico of *Clusia latipes* two molecules have been isolated with biological activity as the Friedelin and  $\beta$  - amirin.

For it the objective of this study was to determine the genotoxic effect produced by these substances in human lymphocytes by means of the comet assay.

The treatment that was given to the cells was of 3 hours and the doses that were used they were 25, 35 and 45 ug/ml or  $\mu$ M respectively and the negative (DMSO 0,9%) and positive control (EMS 0,1  $\mu$ M);

The results of the rehearsal make they show that an effect genotóxico exists, measured by the migration of the line of the comet dependent dose so much of the extract of *Clusia latipes*, as of the compounds: friedelin and  $\beta$  - amirin acetate, is the damage however more significant in the biggest concentrations.

The sharp consumption of high concentrations of the extract of *Clusia latipes* produces genotoxic effects in human lymphocytes.

**Key words:** comet assay, *Clusia latipes*, secondary metabolites, friedelina,  $\beta$ -amirina acetate, DNA damage.

## OBJETIVOS

### GENERAL:

- ❖ Determinar el efecto genotóxico del extracto hexánico de *Clusia latipes* así como de los metabolitos secundarios: Friedelina y Acetato de  $\beta$  –amirina en linfocitos humanos mediante el Ensayo Cometa.

### ESPECÍFICOS:

- ❖ Determinar la viabilidad de linfocitos humanos luego de exponer al extracto y sus metabolitos secundarios para establecer las dosis subtóxicas a las que se probará la genotoxicidad.
- ❖ Determinar la genotoxicidad mediante el ensayo cometa del extracto hexánico *Clusia latipes* y sus metabolitos secundarios: Friedelina y Acetato de  $\beta$  – amirina
- ❖ Evaluar el efecto genotóxico del extracto de *Clusia latipes* y sus metabolitos secundarios: Friedelina y Acetato de  $\beta$  –amirina, de acuerdo con el tamaño de cola.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 GENOTOXICIDAD

La genotoxicidad de los agentes químicos es una característica intrínseca, basada en el potencial electrofílico del agente para unirse a los campos nucleofílicos de macromoléculas presentes en las células tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN), el portador de la información hereditaria (IARC 1992).

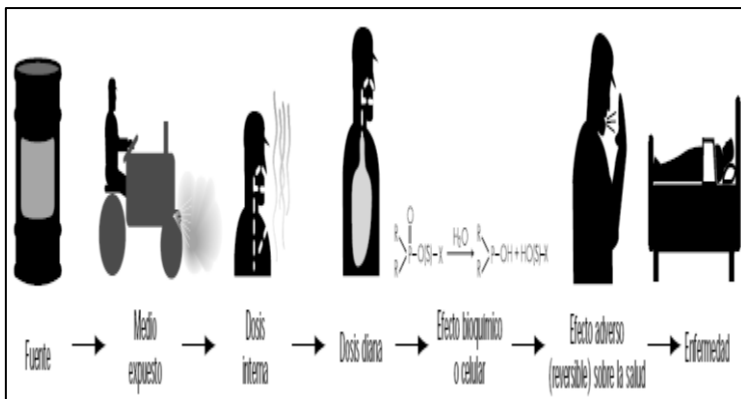
La genotoxicidad es, por tanto, la toxicidad que se manifiesta en el material genético de las células.

La definición de genotoxicidad es muy amplia, e incluye efectos tanto directos como indirectos sobre el ADN como por ejemplo los que a continuación se enumeran (IARC 1992):

1. Inducción de mutaciones (genéticas, cromosómicas, genómicas, recombinantes), que a nivel molecular son similares a los acontecimientos que se sabe están implicados en la carcinogénesis.
2. Acontecimientos indirectos importantes asociados a la mutagénesis como por ejemplo la síntesis de ADN no pautada e intercambio de cromátidas hermanas, y/o
3. Lesión del ADN como la formación de aductos, que pueden dar lugar finalmente a mutaciones.

En la Figura 1 se muestra la relación que existe entre la exposición a diversos agentes químicos por medio de diferentes vías, los cuales son causantes de enfermedades por medio de desequilibrios bioquímicos o celulares.





**Figura N° 1.** Relación entre el control medioambiental, biológico y de la exposición y vigilancia de salud.

**Fuente:** Lauwerys 2000.

Debido al papel de los cambios genéticos en el proceso de la carcinogénesis, ha sido necesario establecer biomarcadores que identifican sustancias capaces de provocar toxicidad genética e identificarlos como cancerígenos potenciales. Se han desarrollado diversos métodos de prueba a corto plazo que permiten detectar algunos de los criterios de valoración de genotoxicidad (Lauwerys 2000).

Se han llevado a cabo varios estudios para comparar la carcinogenicidad de sustancias químicas con los resultados obtenidos al examinarlas en pruebas a corto plazo. La conclusión general ha sido que, a falta de una prueba única validada que proporcione información sobre todos los criterios de evaluación genéticos antes mencionados, es preciso comprobar cada sustancia química en más de un ensayo y en varios modelos biológicos (Lauwerys 2000).

Asimismo, el valor de las pruebas de genética toxicológica a corto plazo para la predicción de carcinogenicidad química ha

sido debatido y revisado en repetidas ocasiones. De acuerdo con tales revisiones, un grupo de trabajo de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) llegó a la conclusión de que la mayor parte de los cancerígenos humanos dan resultados positivos en las pruebas a corto plazo utilizadas habitualmente. Sin embargo, es preciso tener en cuenta que los cancerígenos epigenéticos no se pueden detectar mediante las pruebas a corto plazo, las cuales sólo miden la actividad genotóxica intrínseca de una sustancia.

Entre las técnicas más usadas están: el ensayo cometa, prueba de micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas, las cuales son las herramientas más rápidas y eficaces para evaluar los efectos tóxicos primarios inducidos por agentes químicos y físicos (Garaj-Vrhovac *et al.*, 2009).

### **1.1.1 Relación entre Genotoxicidad y Carcinogenicidad**

La relación entre genotoxicidad y carcinogenicidad está bien demostrada por diversos datos indirectos de investigación, tal como se muestra en la Figura N° 2.

Esta correlación proporciona la base para la aplicación de los biomarcadores de genotoxicidad al control biológico como indicadores del peligro de cáncer.



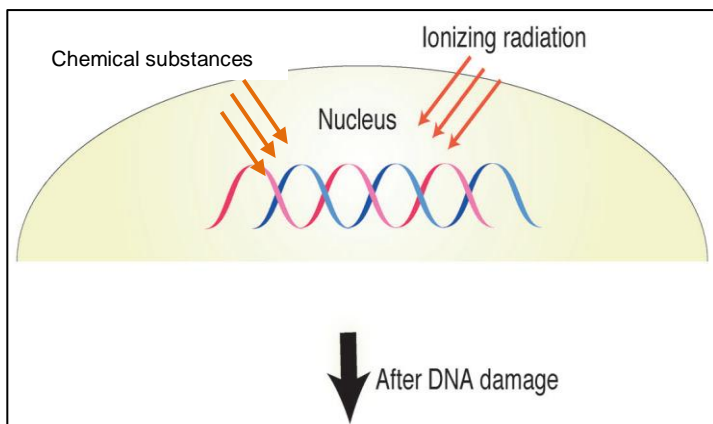
**Figura N° 2.** Interrelaciones entre genotoxicidad y carcinogenicidad.  
Fuente: IARC 1992.

### 1.1.2 Carcinógenos

La inducción del cáncer es un proceso que ocurre en etapas, la primera de las cuales se denomina de “iniciación” e implica un daño en el ADN que generalmente escapa a los mecanismos de reparación y que produce modificaciones de la información genética en él contenido.

La proliferación de células cuyos mecanismos de control han sido permanentemente alterados durante la etapa de iniciación, continúa con otros eventos llamados “promoción” y “progresión” Está científicamente comprobado que la etapa de iniciación se debe a la interacción del ADN con agentes químicos que se conocen con el nombre de *carcinógenos* (Gil *et al.*, 1997; Poirier M. C. (2004) Shimada *et al.*, 2008).

Algunos compuestos son carcinógenos directos y otros (precarcinógenos) necesitan una transformación previa para convertirse en carcinógenos. La gran mayoría de los carcinógenos son también agentes mutagénicos, es decir, que provocan alteraciones en el material genético (Figura N° 3). Una vez que el agente ha provocado la modificación química del ADN, las siguientes etapas –*promoción* y *progresión*– pueden tomar largo tiempo. De este modo, una lesión puede quedar dormida para sólo expresarse en forma de tumores después de 20 ó 30 años (Gil *et al.*, 1997; Poirier M. C. (2004) Shimada *et al.*, 2008).



**Figura N° 3.** Mutágenos provocan alteraciones en el ADN.

**Fuente:** Shimada *et al.*, 2008

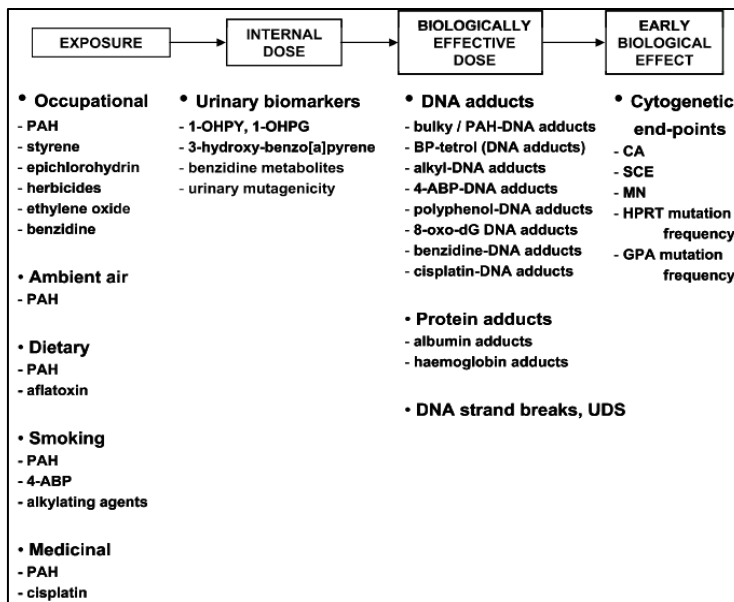
Diversos estudios han mostrado que el medioambiente juega un papel significativo en la generación del cáncer humano, aunque muchos de los agentes químicos específicos que lo provocan no han sido aún completamente identificados (Gyorffy *et al.*, 2008).

Los contaminantes del aire urbano son un factor en la incidencia de diversos cánceres del aparato respiratorio entre ellos están: monóxido de carbono, dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno, ozono, hidrocarburos aromáticos policíclicos y nitroaromáticos, benceno, acetaldehído, 1,3-butadieno, formaldehído, entre otros (Sanz-Gallén *et al.*, 1997).

Otro de los factores es el stress oxidativo (como causa o efecto) en muchas enfermedades, incluido el cáncer (Gyorffy *et al.*, 2008).

En resumen en la Figura N° 4 se indica los tipos de exposición principales ya sea ocupacionales y/o medioambientales

(incluso el aire, dieta y cigarro) y las exposiciones medicinales:



**Figura N° 4.** Principales fuentes de exposición de carcinógenos.

Fuente: Gyorffy *et al.*, 2008

## 1.2 ENSAYO COMETA

El ensayo cometa o también conocido como electroforesis en gel de una sola célula es una prueba genotóxica a corto plazo usada muy ampliamente para revelar un amplio espectro de agentes perjudiciales al ADN, capaces de inducir rotura doble o simple de la cadena de ADN, entrecruzamientos y sitios álcali-lábiles (Singh *et al.*, 1988; Fairbairn *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 1999). En relación a otras

técnicas el ensayo cometa es el protocolo de estudio genotóxico de más importancia y calidad debido a la aceptación científica que posee y por los resultados emitidos por el ensayo, los cuales tienen una alta veracidad (Brendler-Schwaab *et al*, 2005).



**Fotografía N° 1.** Cometa donde se distingue claramente su cabeza y cola.  
**Fuente:** Rojas *et al.*, 1999

### 1.2.1 Formas del Ensayo Cometa

En la tabla 1 se observan las diversas versiones existentes del ensayo cometa así como el tipo de daño que permiten evaluar.

Tabla N° 1. Fuente: Wong *et al.*, 2005

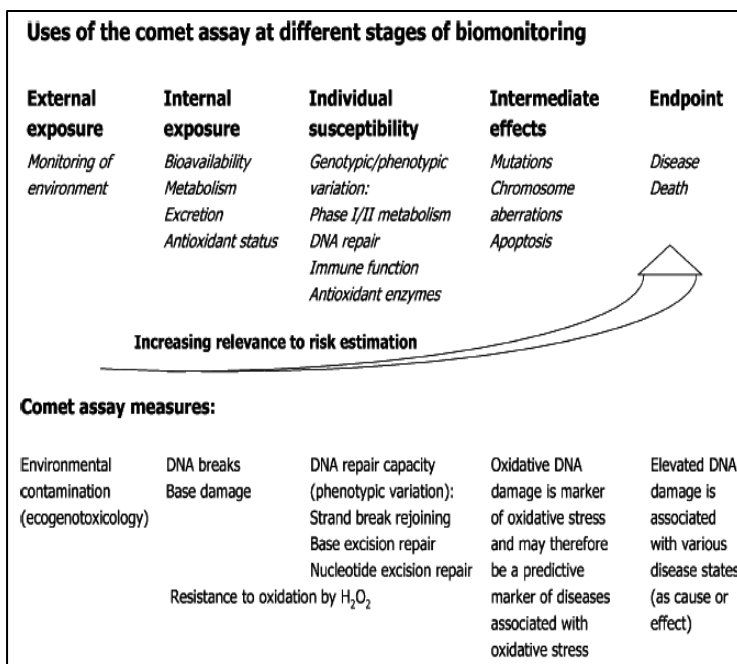
Versión	Características	Ventajas/aplicación	Referencia
<b>Ensayo cometa Neutro</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Lisis y electroforesis a pH 9,5</li> <li>✓ ADN menos pronunciado en las colas del cometa.</li> <li>✓ Detecta roturas de cadena simple y doble.</li> <li>✓ Menos sensible que la versión alcalina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Uso en situaciones que requiera menor sensibilidad.</li> <li>Por ejemplo cuando el daño inducido es alto.</li> </ul>	Ostling & Johanson 1984; Singh, 1988; Angelis <i>et al.</i> , 1999; Collins 2004
<b>Ensayo cometa Alcalino</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Lisis y electroforesis en pH &gt;13.</li> <li>✓ Detecta más tipos de daño al ADN como los sitios alcalilábiles, rotura de cadena doble, simple.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Se obtienen imágenes claras del cometa.</li> <li>✓ Se usan controles como ensayos modelo.</li> </ul>	Singh, 1988; Olive <i>et al.</i> , 1990; Angelis <i>et al.</i> , 1999 ;Tice <i>et al.</i> , 2000



## 1.2.2 Aplicaciones

Dentro de las aplicaciones del ensayo cometa tenemos:

- ❖ Esta técnica ha sido aplicada en el estudio genotóxico de muchos compuestos investigados que incluye metales, pesticidas, opioides, nitrosaminas, drogas anticáncer, aditivos de alimentos y medicamentos (Fairbairn *et al.*, 1995; Anderson D. *et al.*, 1998; Marzin, 1999; Rojas *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 1999; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005).
- ❖ Ecotoxicología (Belpaeme *et al.*, 1998; Cotelle y Ferard, 1999).
- ❖ Biomonitorio (Figura N° 8) humano de poblaciones expuestas a agentes genotóxicos de forma ocupacional o ambiental (Collins *et al.*, 1997; Kassie *et al.*, 2000; Moller *et al.*, 2000; Dusinska *et al.*, 2008).



**Figura N° 5.** Aplicaciones del ensayo cometa en diferentes fases de un biomonitoreo.

**Fuente:** Dusinska et al., 2008

- ❖ Radiobiología clínica (Olive *et al.*, 1990, 1998; Olive, 1999).
- ❖ Su versatilidad ha permitido la investigación de mecanismos de la reparación (Speit y Hartmann, 1995,; Alapetite *et al.*, 1997), la detección de apoptosis (Fesus *et al.*, 1991) y el estudio de agentes alquilantes, oxidantes y causantes de entrecruzamientos (Monteith y Vanstone, 1995; Gedik *et al.*, 1998; Pfuher y Wolf, 1996; Merk y Speit, 1999).

### 1.2.3 Ventajas y Desventajas

Como todo biomarcador este ensayo presenta tanto ventajas como desventajas, dentro de las cuales están:

- ❖ Las principales ventajas del ensayo es que es aplicable a una gran variedad de tejidos y tipo de células, requiere un número de muestra relativamente pequeña, y es muy sensible al daño al ADN (Brendler-Schwaab *et al*, 2005).
  
- ❖ Dentro de las desventajas del ensayo es que las condiciones de la electroforesis y el pH del ensayo fácilmente pueden variar los resultados obtenidos así como el hecho de que mecanismos indirectos relacionados como la citotoxicidad, pueden llevar a determinar efectos falsos positivos (Brendler-Schwaab *et al*, 2005).

### 1.3 FLORA: UNA FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

El uso de especies vegetales es muy popular a nivel mundial y común por sus ventajas como alimento, ropa y cosméticos; en la construcción de refugios y trampas; herramientas y armas; venenos para la caza de animales; y finalmente como medicinas y agentes protectores de la cosecha (Suffredini *et al*, 2006)

Existe una gran variedad de plantas con propiedades conocidas que abarca cerca de las dos mil especies

vegetales, que son muy usadas en los países en vías de desarrollo (Suffredini *et al.*, 2006).

A principio de este siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica desembocaron en la puesta en marcha por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales, creyendo en las acciones atribuibles a dichas sustancias, donde la cantidad de principio activo es superior al que posee la planta. Estudios revelan que muchos productos herbarios y sus compuestos aislados tienen efectos potencialmente dañinos (Andrade *et al.*, 2008; Pino *et al.*, 2008).

No debemos olvidar que los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades (Pino *et al.*, 2008).

#### **1.4 TRITERPENOS CON ACTIVIDAD GENOTÓXICA**

Los triterpenos son compuestos químicos que atraen mucha atención debido a sus actividades biológicas. Se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal formando

parte de los diferentes órganos de la planta (frutos, raíces, látex, semillas, hojas y partes aéreas en general) (Martín *et al.*, 2009).

Químicamente los triterpenos se forman a partir de un esqueleto de 30 carbonos, procedentes de la ciclación 3S-2,3-epóxido -2,3-dihidroescualeno o, más raramente, del mismo escualeno; casi siempre hidroxilados en 3 (debido a la apertura del epóxido). Los triterpenos presentan una gran unidad estructural: las principales diferencias se deben a su configuración y van unidas a la conformación adoptada por el epoxiescualeno (o el escualeno) antes de la ciclación; el catión que se produce en esta ciclación, puede sufrir a continuación una serie de desplazamientos 1,2 de protones y de metilos que justifican la existencia de los diferentes esqueletos tetra y pentacíclicos que caracterizan este grupo. Comprendiendo cinco o seis anillos (ursanos y oleananos) y uno – cinco anillos (lupanos), y como las moléculas son lipofílicas pueden penetrar la sangre, la barrera cerebral (Bruneton 2001; Martín *et al.*, 2009).

El interés terapéutico y el empleo industrial de triterpenos hace de este un grupo de metabolitos secundarios de gran importancia, a continuación se detallan algunas de sus utilidades (Bruneton 2001):

- Interés de los heterósidos cardiotónicos, a los que ningún producto sintético ha podido todavía sustituir completamente.
- Utilidad de las sapogeninas espirostánicas, del sitosterol o del estigmasterol que son materias primas muy útiles en procesos biotecnológicos. Siguen siendo indispensables para cubrir las

necesidades de la industria farmacéutica en medicamentos esteroideos (anticonceptivos, anabolizantes, antiinflamatorios).

- Interés terapéutico de numerosas drogas con saponósidos utilizados para la extracción de moléculas activas (escina, glicirricina), para la obtención de formas galénicas simples o preparados de fitoterapia.
- Importancia económica de regaliz, edulcorante poco calorígeno, muy utilizado en las industrias agroalimentarias.
- Importancia de los saponósidos en la medida en que su presencia puede disminuir de forma importante el valor nutritivo de forrajes o conferir a las plantas de nuestro entorno cotidiano una toxicidad digna de tener en cuenta.
- Potencialidades terapéuticas en los campos más diversos: citostáticos, antivirales, insecticidas, antiinflamatorios, molusquicidas, analgésicos.

Varios estudios sugieren que los triterpenos ácidos y alcohólico presentan actividades anti – tumorales y propiedades citotóxicas contra varias líneas celulares cancerígenas de diferentes tejidos (Martín *et al.*, 2009).

Actualmente, la medicina tradicional representa una opción importante de respuesta ante las necesidades de atención a la salud integral y, por lo tanto, presenta una visión muy adecuada a los problemas de salud. La medicina tradicional, sin embargo, es muchas veces todo lo que se tiene a la mano en las comunidades e incluso el único recurso disponible.

Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar sus experiencias en el empleo de los productos que de ellas se extraen en la realización de ensayos que determinen su eficacia, citotoxicidad y genotoxicidad.

#### **1.4.1 *Clusia latipes***

Dentro de la variada flora que se encuentra en el Sur del Ecuador, se encuentra un gran número de especies pertenecientes a la familia Clusiaceae, cuyo género más representativo e importante por su uso medicinal es *Clusia* (Mats *et al.*, 2007).

Entre los usos más destacados de las especies de esta familia en medicina popular están: el tratamiento de la lepra, cefalalgias y en aplicaciones tópicas; algunas de estas especies producen resinas aromáticas, aceites y pigmentos (Mats *et al.*, 2007).

Las plantas de esta familia se caracterizan por presentar látex en sus tejidos, característica que le da nombre a la familia. Está formada por alrededor de 1200 especies agrupadas en 45 géneros, dentro de los cuales el género *Clusia* es uno de los principales con alrededor de 300 especies como se observa en la Figura N° 6 (Mats *et al.*, 2007).



**Figura N° 6.** Mapa de distribución del Género *Clusia* y estimación del número de individuos.

**Fuente:** Mats *et al.*, 2007

Estudios fitoquímicos de plantas de este género revelan la presencia, fundamentalmente, de benzofenonas isopreniladas, además de otros metabolitos como flavonoides, terpenos, cumarinas, esteroides y dihidrofenantrenos (Mangas *et al.*, 2008).



Por otro lado, las especies de este género muestran una gran versatilidad en cuanto a actividades biológicas, lo que hace de ellas una fuente interesante de compuestos activos que pueden ser usados con diversos fines. En estas especies se han encontrado acciones farmacológicas tales como: actividad antimicrobiana de amplio espectro frente a una gran diversidad de bacterias, actividad quimiopreventiva del cáncer, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, actividad antihepatotóxica y acción inhibitoria del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Mangas *et al.*, 2008; Compagnone *et al.*, 2008).

Sin embargo, algunas especies de *Clusia* pueden ocasionar efectos tóxicos tales como: irritación del tracto gastrointestinal, náuseas, vómitos, diarrea, desequilibrio, cólicos y taquicardia (Gil *et al.*, 2006).

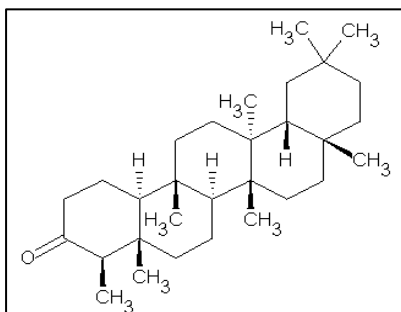
En el género *Clusia* se han identificado triterpenoides como  $\alpha$  y  $\beta$  amirinas, friedelina, aplotaxeno, ácido oleanólico,  $\alpha$  y  $\beta$  friedelinol y el (17 $\alpha$ ,20R)-dammara-12,24-dien-3 $\beta$ -ol que fue el primer terpenoide obtenido naturalmente con un esqueleto de este tipo (Mangas *et al.*, 2008).

A partir del extracto hexánico de *Clusia latipes* se aislaron dos metabolitos que de acuerdo con algunas características como peso molecular, punto de fusión y fórmula química los mismos que se identificaron como friedelina y  $\beta$ -amirina. Y a partir de la  $\beta$ -amirina se puede obtener el acetato de  $\beta$ -amirina, este compuesto junto con la friedelina y el extracto hexánico de *Clusia latipes* fueron estudiados en este trabajo.

### 1.4.2 Friedelina

La friedelina (figura N° 7) es un triterpeno que tiene un esqueleto de anillo básico denominado friedelano, el mismo que está oxigenado en la posición tres, generalmente como cetona (Valencia 1995).

La friedelina como tal aún no ha sido descrita en su actividad biológica pero lo que se conoce es que tendría injerencia en la actividad antiulcerogénica (Oliveira *et al.*, 1991; Pereira Soares *et al.*, 1992). Además la friedelina posee actividad citotóxica en las líneas celulares PC3 y U251, también ensayos in vitro indican la inhibición de la transcriptasa HIV-1 reversa (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004).

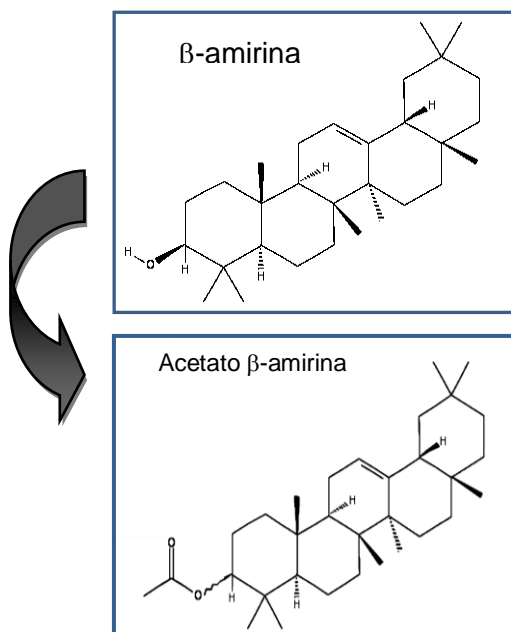


**Fig 7.** Estructura química de la Friedelina $C_{30}H_{50}O$ . Peso molecular 426.73 g/mol.

**Fuente:** Salama 1998

### 1.4.3 $\beta$ -amirina

Entre los triterpenos más importantes y ampliamente distribuidos en forma de glicósidos están las  $\alpha$  y  $\beta$  amirinas, de las cuales, la  $\beta$  amirina se encuentra constituida por un esqueleto de anillo básico denominado oleonano; la cual se diferencia por las insaturaciones y los grupos hidroxilo y carbonilo adicionados. Además las diferencias estereoquímicas juegan un papel importante en lo que se refiere a su actividad biológica (Valencia 1995) (Figura N° 8).



**Figura N° 8.** Acetilación de la molécula de  $\beta$ -amirina para asegurar su estabilidad.

**Fuente:** Valencia 1995

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. Modelo Biológico y Donadores**

Se utilizó como modelo biológico linfocitos humanos.

Las muestras de sangre heparinizadas fueron obtenidas vía intravenosa de los donantes sanos, los mismos que se encontraban en un rango de edad comprendida entre 20 – 25 años, y debieron cumplir con las siguientes condiciones: que no estuvieran bajo ningún régimen medicamentoso, ni hayan cursado algún cuadro sintomático durante el muestreo, debido a que estudios demuestran que la proliferación celular y variaciones en los resultados con el ensayo cometa intra e inter individuales puede verse alterados por factores externos como: edad, contaminación del aire, dieta, ejercicio, género, enfermedades infecciosas, rayos solares, cigarrillo (Moller, 2000).

### **2.2 Compuesto De Prueba**

#### **2.2.1 Extracto hexánico de *Clusia latipes* y metabolitos**

El extracto de *Clusia latipes* y los compuestos fueron donados por la Dra. Natalia Bailón del Centro de Biología Celular y Molecular.

### **2.3 Controles**

#### **2.3.1 Control Positivo**

Se utilizó el etil metanosulfonato (EMS) a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$ , ya que es un poderoso agente alquilante monofuncional, el mismo que no requiere de activación metabólica; tiene afinidad por el ADN, cuyo mecanismo comienza con la donación de un grupo etilo que reacciona con los sitios nucleofílicos dentro del ADN (Wyatt *et al.*, 2007; Rundell *et al.*, 2003; Meuth M., Arrand J. 1982).

Su toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad se ha observado en varios estudios toxicológicos y genotóxicos, y es por consiguiente un compuesto válido para usar en los estudios de esta naturaleza debido a sus efectos conocidos *in vitro*. Induce daño genético por medio de varios mecanismos moleculares que cambian la estructura de los genes, desapareamiento y cambio de bases en células de mamíferos por mecanismos aún desconocidos (Wyatt *et al.*, 2007; Rundell *et al.*, 2003; Meuth M., Arrand J. 1982).

### **2.3.2 Control Negativo**

Los compuestos a probar se disolvieron en DMSO; a una concentración máxima de 0,9 % (v/v), la misma que fue utilizada en el control negativo. (Çelik H. y Arinç E., 2008).

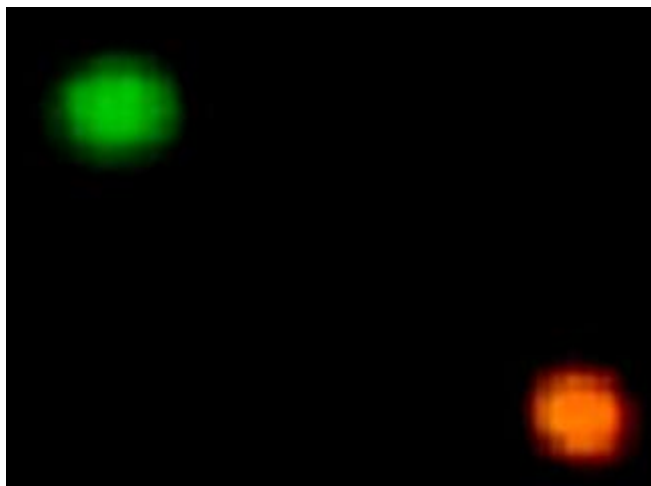
### **2.4 Ensayo de Viabilidad (FDA)**

La siembra se realizó en tubos eppendorf con 928.6  $\mu\text{l}$  de medio RPMI (Gibco) suplementado con antibiótico y antimicótico (Gibco), L- glutamina (Gibco) y aminoácidos no esenciales (Gibco) al 1 %; 71.4  $\mu\text{l}$  de sangre heparinizada. Se incubó a una temperatura de 37°C y humedad atmosférica del 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 3 horas, incluyendo el tratamiento correspondiente.

	<b>Sustancias</b>	<b>Concentraciones</b>
<b>Control Negativo</b>	DMSO	<b>0.9 %</b>
<b>Sustancias a Probar</b>	Extracto <i>Clusia latipes</i>	<b>25, 35 y 45 ug/ml</b>
	Friedelina	<b>25, 35 y 45 µM</b>
	β – amirina	<b>25, 35 y 45 µM</b>
<b>Control Positivo</b>	<b>EMS</b>	<b>0.1 µM</b>

**Tabla N° 2.** Diseño de Tratamiento.

Luego de 3 horas de incubación se homogenizaron los tubos y fueron centrifugados dos veces durante 2 min. a 10000 rpm. Del pellet obtenido se utilizó 20 µl para determinar el porcentaje de células viables mediante la técnica de doble tinción con una solución de Diacetato de Fluoresceína – Bromuro de Etidio, contando un total de 200 células (vivas de color verde y muertas de color rojo) (Mishell *et al.*, 1980).



**Fotografía N° 2.** Fotografía del ensayo de viabilidad. Células verdes (vivas) y rojas (muertas).

**Fuente:** El Autor

## **2.5 Ensayo Cometa**

Las laminillas fueron preparadas con una suspensión del pellet obtenido anteriormente con 150  $\mu$ l de agarosa LMP (bajo punto de fusión) y se colocó 75  $\mu$ l de esta mezcla en cada laminilla que contiene previamente agarosa NMP (normal punto de fusión) al 1 %, se cubrió inmediatamente. Se prepararon 2 placas por cada tubo de siembra. Después de preparar todas las laminillas se llevaron a refrigeración durante 5 min para fijar la agarosa. Luego se sacó el cubreobjetos de la laminilla y se colocó 150  $\mu$ l de agarosa LMP, se cubrió nuevamente y se refrigeró por 5 min adicionales.

Posterior a ello se colocaron las laminillas en solución de lisis (10% de DMSO y 1% de tritón X-100 2.5 M NaCl, 100 mM

EDTA, 10 mM Tris y pH 10), por un tiempo mínimo de 1 hora y máximo de 15 días.

Antes de realizar la corrida electroforética se dejó reposar las placas en el buffer de electroforesis pH 13 que contiene: 1 mM EDTA (Invitrogen) e hidróxido de sodio 300 mM (Merck) hasta cubrir las completamente.

Terminado este tiempo se realizó la corrida electroforética en forma horizontal, las condiciones usadas fueron: 25 V, 300 mA y 20 min. (Tice *et al.* 2000).

Luego de la electroforesis, las placas fueron sometidas al buffer de neutralización pH 7.5 (0,4 M tris), estas se deshidrataron con metanol para su posterior análisis.

Las laminillas fueron hidratadas en agua desionizada fría y teñidas con 60 µl de bromuro de etidio 1.5 µg/ml cubriéndolas con una laminilla cubreobjetos.

La migración del ADN se evaluó contabilizando 50 cometas por cada laminilla, midiendo la longitud de su cola en un microscopio de fluorescencia (Zeiss) con el objetivo 40x.

## **2.6 Análisis Estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos de viabilidad se utilizó la prueba de comparación múltiple ANOVA y una prueba posterior de Dunnett, usando el software estadístico GraphPad Prisma 5.

En cambio para los datos del ensayo cometa previo a su estudio se realizó el test Shapiro – Wik, para observar la normalidad de los datos, con lo cual se determinó que eran no

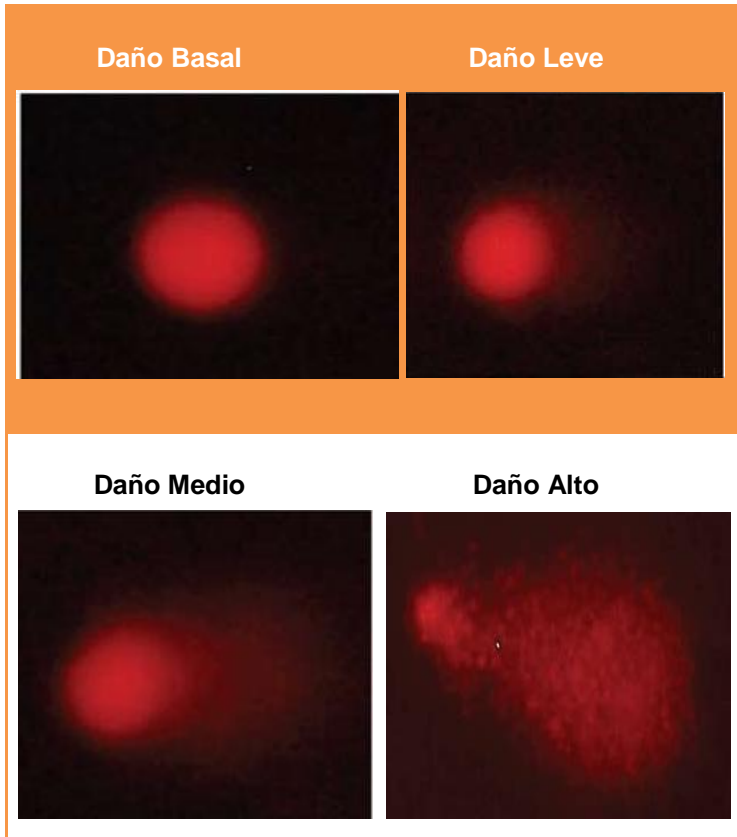


paramétricos y se los analizó con el test no paramétrico ANOVA, test Kruskal – Wallis para la comparación bilateral. Además para la clasificación del largo de la cola de los cometas se lo realizó en base a su frecuencia dentro de 3 categorías tomando en cuenta el nivel de daño al ADN (Albertini *et al.*, 2000):

- **0 – 20  $\mu\text{m}$  Daño Leve**
- **21 - 40  $\mu\text{m}$  Daño Medio**
- **41 o Más  $\mu\text{m}$ , Daño Alto**

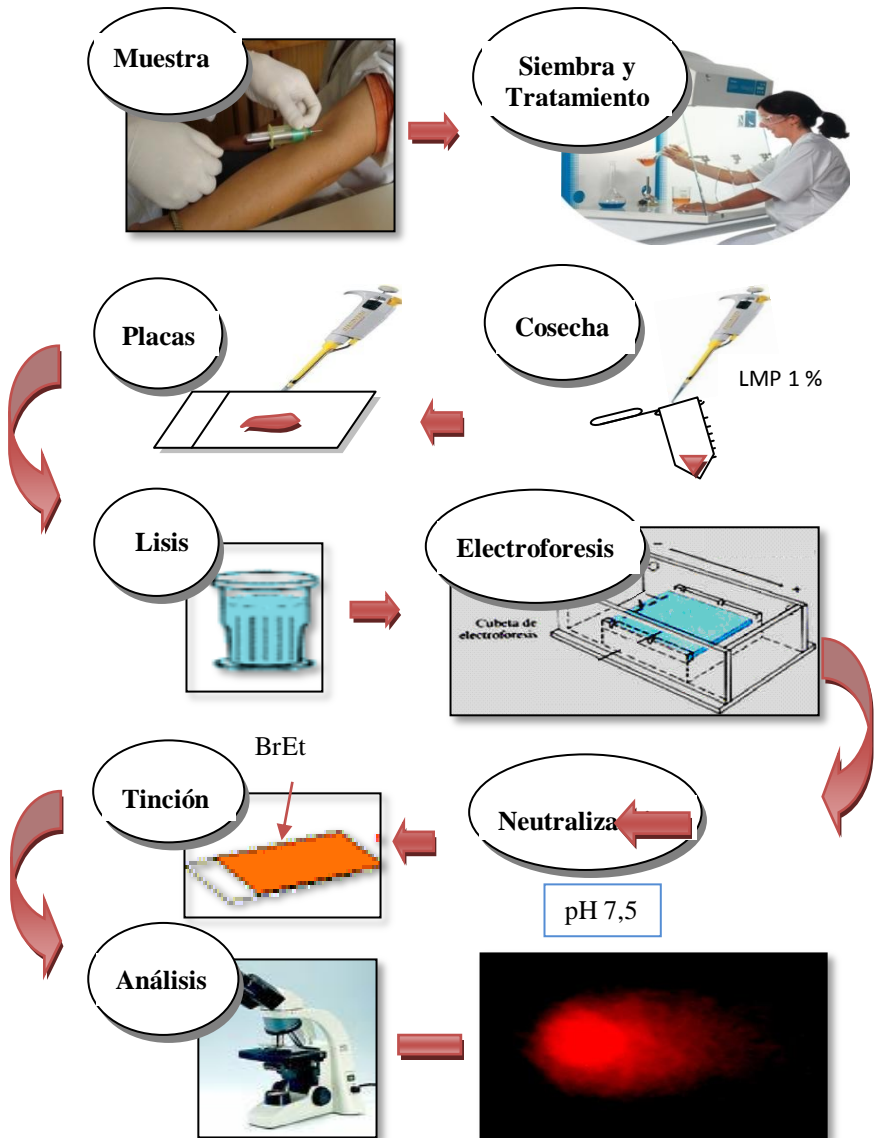
**Tabla N° 3.** Niveles de daño al ADN

**Fuente:** Albertini *et al.*, 2000



**Fotografía N° 3.** Nivel de daño al ADN expresado por el largo de la cola.  
**Fuente:** Yildiz *et al.*, 2008

## DIAGRAMA DEL ENSAYO COMETA



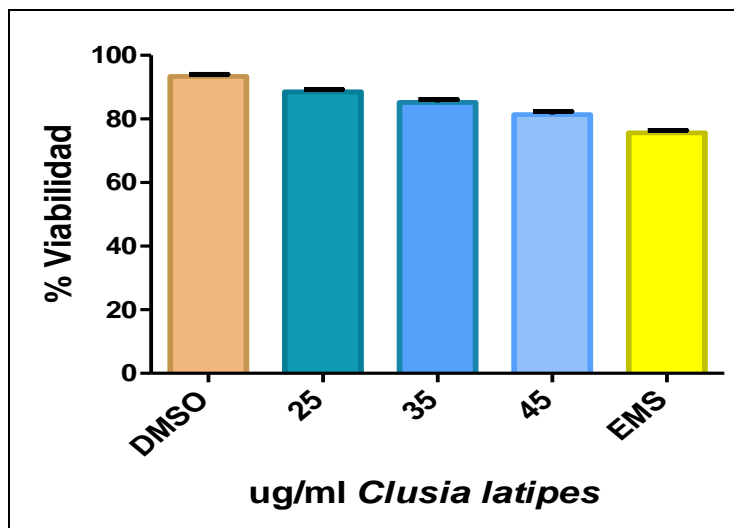
Elaborado por: El Autor

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 VIABILIDAD CON FDA

##### 3.1.1 Viabilidad con Extracto Hexánico de *Clusia latipes*

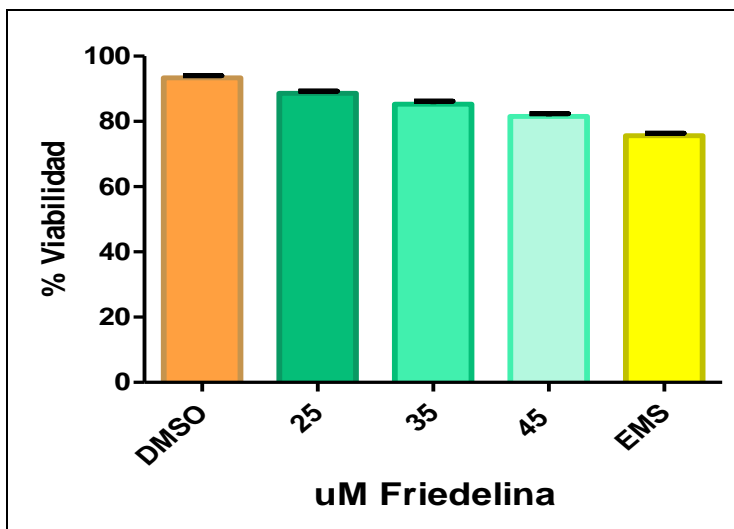
El ensayo de viabilidad con FDA nos sirvió para determinar el porcentaje de células vivas. En la gráfica 1 se observa el porcentaje de viabilidad de los linfocitos expuestos a las diferentes dosis del extracto hexánico de *Clusia latipes* así como los respectivos controles; no existe diferencia significativa de la viabilidad entre las diversas dosis del extracto y el control con DMSO.



**Gráfica N° 1:** Las barras representan el porcentaje de viabilidad  $\pm$  SEM obtenidos de tres experimentos independientes con tres diferentes donadores, test paramétrico ANOVA y como post test de Dunnett,  $p < 0.05$

### 3.1.2 Viabilidad con Friedelina

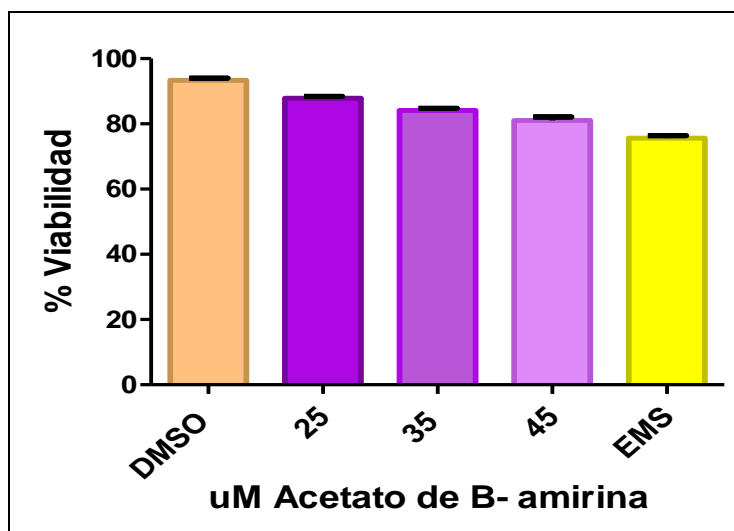
En la gráfica N° 2 se puede observar que la viabilidad de los linfocitos disminuye gradualmente a medida que aumentan las dosis de Friedelina, pero estadísticamente no existen diferencias significativas.



**Gráfica N° 2.** Porcentaje de linfocitos viables tratados con las diferentes concentraciones del metabolito secundario Friedelina y los correspondientes controles. Se utilizó el test paramétrico ANOVA y como post test de Dunnett,  $p < 0.05$

### 3.3.1 Viabilidad con acetato de $\beta$ -amirina

Los resultados obtenidos de los ensayos de viabilidad con FDA se muestran en la gráfica N° 3, la cual indica los porcentajes de viabilidad de los linfocitos expuestos a las diversas dosis de acetato de  $\beta$ -amirina los mismos que superan el 70%, además se indica que existe diferencia significativa entre las diversas dosis y el control positivo (EMS 0.1  $\mu$ M).

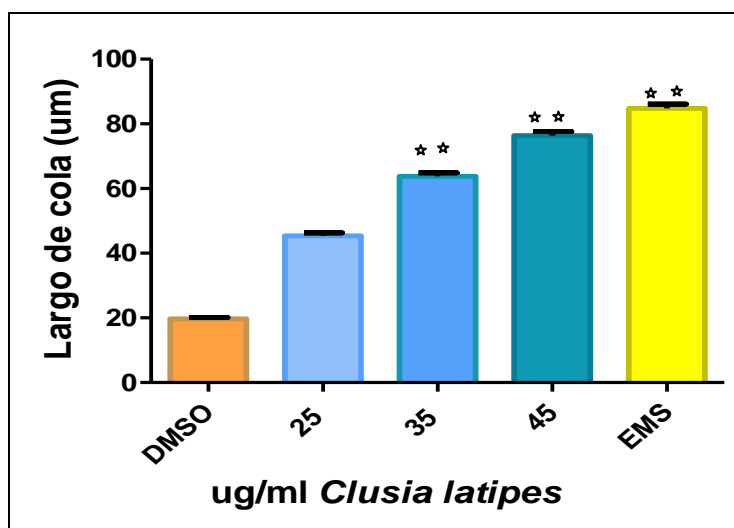


**Gráfica N° 3.** Porcentaje de linfocitos humanos vivos representados como la  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes y por duplicado con cada una de las concentraciones de acetato  $\beta$ -amirina. Test ANOVA y post test Dunnett.  $p < 0.05$

## 3.2 ENSAYO COMETA

### 3.2.1 Largo de Cola con Extracto Hexánico de *Clusia latipes*

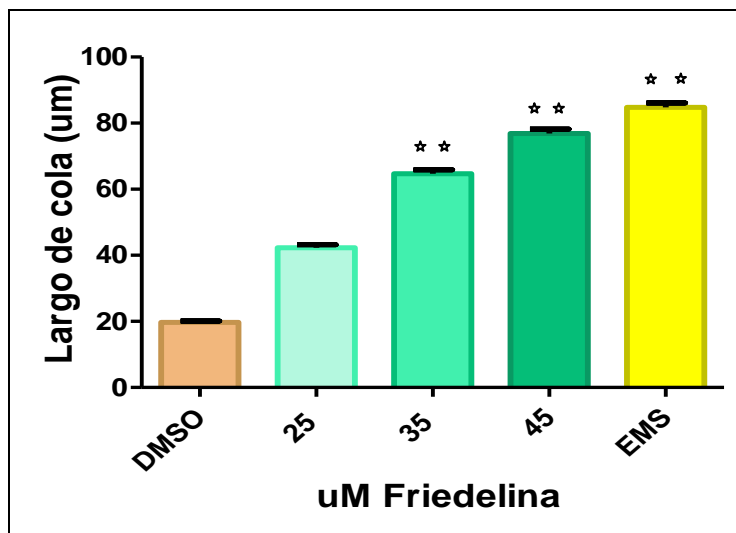
La gráfica N° 4 indica la migración del ADN mostrándose una relación dosis – dependiente de la concentración del extracto *Clusia latipes*.



**Gráfica N° 4.** Efectos del extracto de *C. latipes* en la migración de la cola del cometa. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, por duplicado de 3 experimentos independientes de 3 donadores. Los símbolos recalcan las diferencias estadísticas entre el control y cada concentración del extracto:  $p < 0.05$  – de acuerdo con la prueba Kruskal – Wallis

### 3.2.2 Largo de Cola Friedelina

Las concentraciones probadas de Friedelina inducen daño genotóxico en linfocitos humanos tal como se indica en la gráfica N° 5, ello expresado por el largo de cola de los cometas.

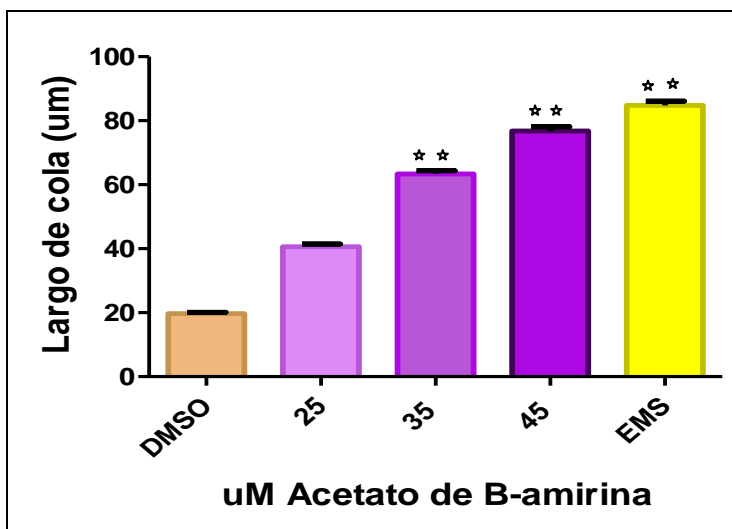


**Gráfica N° 5.** Las barras constituyen la  $\pm$  SEM de tres ensayos diferentes cada uno por duplicado, donde se muestra el daño genotóxico producido por las dosis de Friedelina expresado por el largo de la cola de los cometas. Test no paramétrico ANOVA y post test Mann Whitney ( $p < 0.05$ ).



### 3.3.2 Largo de Cola acetato de $\beta$ -amirina

La gráfica N° 6 indica el daño que producen las dosis probadas de acetato de  $\beta$ -amirina 25, 35 y 45uM con relación a los distintos controles tanto positivo (EMS 0.1  $\mu$ M) como negativo (DMSO 0.9 %).

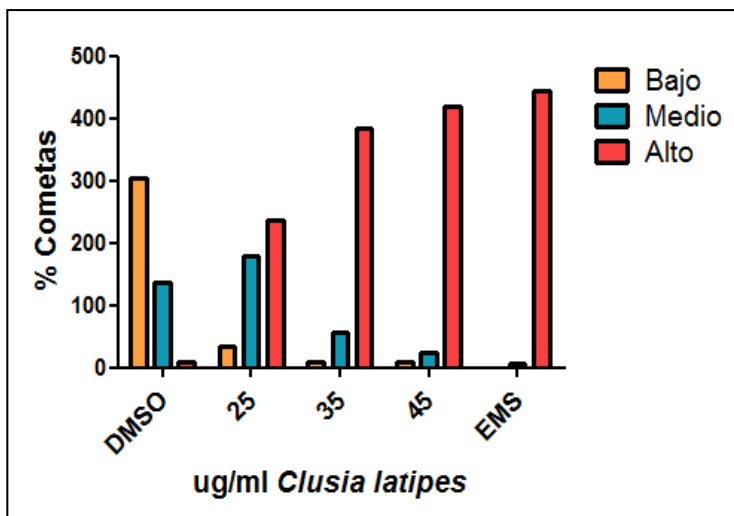


**Gráfica N° 6.** Efecto genotóxico producido en el ADN de los linfocitos por las dosis de acetato de  $\beta$ -amirina. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos por duplicado de 3 donantes. Según la prueba de Mann Whitney existe diferencia significativa (  $p < 0.05$ ).

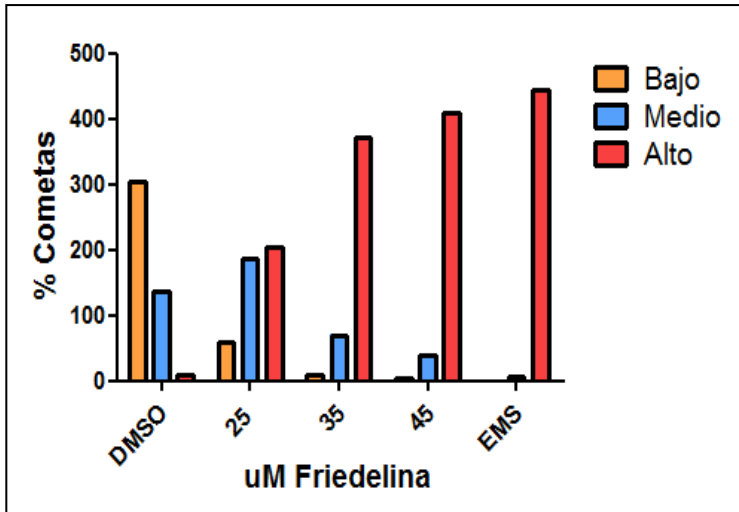
### 3.3 MIGRACIÓN DEL ADN

#### 3.3.1 Clasificación por daño del ADN Extracto Hexánico de *Clusia latipes* y sus metabolitos

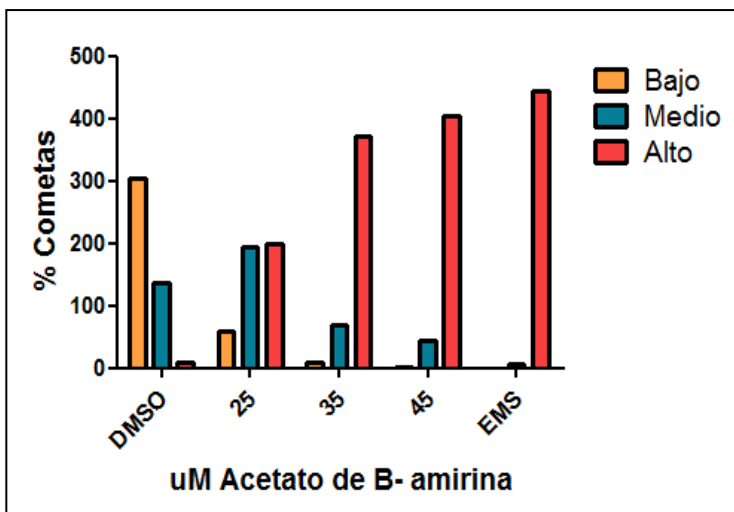
La clasificación de los cometas se realizó de acuerdo a los tres niveles de daño citados anteriormente en la tabla N° 3. En la gráficas N° 7, 8 y 9 se observa la frecuencia del número de cometas dentro del nivel alto a medida que aumentan las dosis de las sustancias probadas como son: extracto de *Clusia latipes*, Friedelina, acetato de  $\beta$ -amirina y el control positivo (EMS 0.1  $\mu$ M), evidenciando así que existe un marcado daño al ADN.



**Gráfica N° 7.** Clasificación de los cometas de acuerdo a los niveles de daño al ADN en cada una de las dosis del extracto de *Clusia latipes* y los controles.



**Gráfica N° 8.** Distribución de los cometas de acuerdo a los niveles de daño bajo, medio y alto en cada una de las dosis de Friedelina y controles.



**Gráfica N° 9.** Niveles de clasificación de los cometas según la migración del ADN de los linfocitos humanos sometidos a las diversas concentraciones de acetato de  $\beta$ -amirina y los correspondientes controles.

Cabe recalcar que los resultados vertidos en este estudio se presentaron en las Jornadas de Carteles del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Octubre 2009.

#### 4. DISCUSIÓN

En la búsqueda de nuevos fármacos los productos naturales obtenidos principalmente la flora, han sido de gran utilidad, dada a su riqueza y variedad de metabolitos secundarios presentes en ella. En esta búsqueda, la información proporcionada por las diferentes culturas, también conocida como medicina tradicional ha sido de gran importancia ya que ha permitido el desarrollo del conocimiento farmacéutico. (Higuchi *et al.*, 2008).

Por tanto, los estudios farmacológicos de extractos obtenidos de las plantas; así como de sus metabolitos secundarios además de los ensayos biodirigidos en gran medida han coincidido con el uso en la medicina tradicional, y han permitido el desarrollo de una gran cantidad de fármacos. Pero por otro lado, el hecho de que sean de este origen no significa que no puedan producir efectos adversos, entre ellos se encuentra el efecto genotóxico. Dada a la estrecha relación que existe entre el daño al ADN con el desarrollo de la carcinogénesis, y alteraciones de tipo genético en las siguientes generaciones, debido a ello se han implementado algunos biomarcadores que permiten estimar este riesgo (Moura *et al.*, 2008).

En este proyecto se evaluó la capacidad para inducir genotoxicidad, mediante el ensayo cometa, del extracto hexánico de *Clusia latipes* y dos metabolitos secundarios extraídos del mismo. El ensayo cometa *in vivo* (SCGE) es usado cada vez más en las pruebas de genotoxicidad, ya que con esta técnica se puede descubrir los diferentes tipos de daño al ADN como roturas simple y doble de la cadena de ADN, sitios álcali-labiles, entrecruzamientos de ADN-ADN y ADN-proteína (Moura *et al.*, 2008). Entre sus ventajas incluye la aplicabilidad a varios tejidos y/o tipos de células especiales, alta sensibilidad en la detección de niveles bajos de daño al ADN, y requerimiento de un número pequeño de células por muestra, entre otros (Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000).

Este tipo de pruebas puede detectar daño primario al ADN que no necesariamente refleja el efecto que el compuesto químico podría causar a la célula, ya que una fracción del daño podría ser reparado.

Los resultados obtenidos al exponer a los linfocitos humanos al extracto hexánico de *Clusia latipes* y sus metabolitos secundarios Friedelina y acetato de  $\beta$ -amirina mediante el ensayo cometa, indican tanto de forma cualitativa como cuantitativa que existen diferencias con el control negativo; es así que, al clasificar los cometas dentro de los tres niveles de daño: leve, medio y alto, la frecuencia del nivel alto se incrementó a medida que aumentaban las dosis (Gráfica N° 7 a 9).

Además existe un incremento en la migración de la cola del cometa estadísticamente significativo, tanto para el extracto como para los metabolitos secundarios Friedelina y acetato de  $\beta$ -amirina (Gráfica N° 4 a la 6). Como se esperaba, el control positivo induce un aumento significativo en la migración de ADN de los linfocitos humanos ( $p < 0.05$ ) y el control de DMSO no supera la 20  $\mu\text{m}$ .

Hasta el momento no se informó en la literatura sobre la composición fitoquímica y su actividad biológica de *Clusia latipes*; sin embargo, estos datos existen para otras especies de *Clusia* donde se conocen algunos componentes bioactivos con actividades antimicrobianas, antiinflamatorias, espasmolíticas, citotóxicas y antihipertensivas. Los metabolitos secundarios aislados principalmente de este género son benzofenonas isopreniladas, además de flavonoides, terpenos, cumarinas, esteroides y dihidrofenantrenos (Mangas *et al.*, 2008).

Los datos obtenidos en el presente estudio mostraron que el extracto de *Clusia latipes*, presenta un efecto genotóxico a las condiciones del ensayo al igual que el extracto etanólico de *Clusia alata*, que produce el mismo efecto medido con el ensayo cometa en ratones albinos suizos, a una

concentración de 1000, 2000 y 3000 mg/Kg (Moura *et al.*, 2008).

Dado a los resultados obtenidos sería importante confirmar el efecto genotóxico de la especie con otros ensayos a corto plazo para determinar su riesgo para la salud humana, ya que la especie es de consumo humano. Aunque, el consumo de esta especie es en tisanas, decocciones, maceraciones y aguas aromáticas y no es posible comparar las concentraciones de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hexánico, también es cierto que muchas de la veces el consumo de ellas es por un tiempo prolongado, lo que conllevaría a una exposición crónica, a los componentes del extracto. Por otro lado, se conoce que la exposición prolongada a un compuesto genotóxico, puede dar inicio a la enfermedad, de ahí la importancia de que se modere su consumo (Tene *et al.*, 2007; Pino *et al.*, 2008).

En la búsqueda de los metabolitos secundarios responsables del efecto observado en el caso del extracto de *Clusia latipes*, se evaluaron dos de los metabolitos secundarios. En el caso de la Friedelina que también en plantas del mismo género como *Clusia rosea*, *Clusia minor* L.; una vez más se demuestra la gran abundancia de este triterpeno en el género *Clusia*. Así como las plantas son fuente de moléculas bioactivas en su mayoría, también existen otras fuentes como por ejemplo se ha informado de la presencia de friedelina en algas, líquenes, musgos, carbón, y cera mineral. Y en el caso del acetato de  $\beta$ -amirina presente en otras especies como *Clusia minor* (Chandler *et al.*, 1979; Mangas Marín *et al.*, 2008).

Según Xie *et al.*, 200, la doble rotura de la cadena de ADN es la forma de daño más severo que incluso que puede producir la muerte celular, se conoce que la Friedelina puede inhibir el crecimiento de algunas líneas celulares tumorales humanas a dosis superiores a las probadas en nuestro estudio, además los datos de viabilidad obtenidos en los linfocitos humanos confirman que la Friedelina a las dosis probadas no tiene un efecto citotóxico (Gráfica N° 2) (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004).

Para el caso del acetato de  $\beta$ - amirina tampoco existe informes en la literatura sobre su efecto genotóxico. Pero al evaluar el efecto observado con el extracto y los dos de sus componentes, el efecto es muy similar a pesar que el extracto lo evaluamos a una concentración mayor, de ahí que los más probable es que existan otros metabolitos que estén modulando el efecto genotóxico.

## **5. CONCLUSIONES:**

- ✓ El ensayo cometa alcalino es la prueba más ampliamente aplicada hoy en día, para la evaluación de alteraciones genotóxicas en las células expuestas a agentes físicos y químicos; Las variaciones en el ensayo nos facilita la detección de diversos tipos de daño como: rotura simple y doble de la hebra de ADN, sitios álcali-lábiles, sitios de reparación incompleta, entrecruzamientos.
- ✓ El ensayo proporciona datos de los efectos genotóxicos en poblaciones expuestas por un lado. Y por otro proporciona la información fundamental sobre los mecanismos de genotoxicidad, respuestas



celulares, lo cual es crucial para la interpretación de los resultados de los biomonitoreos en lo que se refiere al riesgo de cáncer.

- ✓ A las dosis probadas del extracto de *Clusia latipes* y de los metabolitos secundarios, la viabilidad celular no es menor al 70 %, aunque si disminuye comparado con el control negativo.
- ✓ Tanto los metabolitos como el extracto hexánico de *Clusia latipes* están produciendo daño genotóxico, medido por el ensayo cometa. El efecto observado es una relación dosis – dependiente.
- ✓ Aunque los dos metabolitos: Friedelina y Acetato de  $\beta$ -amirina producen daño al ADN, el daño observado en el extracto es similar al de estos lo que implicaría que los otros componentes del extracto podrían estar disminuyendo el efecto genotóxico.
- ✓ La gran diversidad de componentes encontrados y sus diversos efectos biológicos demuestran que el género *Clusia* constituye una fuente importante de metabolitos secundarios.

## 6. REFERENCIAS

- 1992. *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. IARC Scientific Publications, No. 116, dirigido por H Vainio. Lyon: IARC.
- Andrade N.S., Perazzo F.F. and Maistro E.L. (2008) Lack of clastogenic/genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* extract on Swiss mouse peripheral blood cells. *Genetics and Molecular Research* 7 (4): 1414-1421
- Brendler-Schwaab S., Hartmann A., Pfuhrer S. and Speit G (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* vol. 20 no. 4 pp. 245—254
- Brunneton J, 2001. *Farmacognosia – Fitoquímica - Plantas Medicinales*. Segunda ed. Editorial Acriba. Zaragoza – España.
- Chandler R. F. and Hooper S. N. (1979) Friedelin And Associated Triterpenoids. *Phytochemistry*. Vol. 18, pp. 711-724.
- Çelik H. and Arinç E. 2008. Bioreduction of Idarubicin and Formation of ROS Responsible for DNA Cleavage by NADPH-Cytochrome P450 Reductase and its Potencial Role in the Antitumor Effect. *J Pharm Pharmaceut Sci* (www. cspCanada.org). Vol 11 (4): 68-82.
- Compagnone R. S., Castillo A., Leitao S. G., Delle F. 2008. Flavonoids, benzophenones and a new

euphane derivative from *Clusia columnaris* Engl.  
Brazilian Journal of Pharmacognosy. 18(1): 6-10

- Diaz-Carballo D., Hilger R. A., MalakS., Strumberg D. and Seeber S.. (2006) Antitumoral activity of the novel antitumoral compound CLU-502, isolated from *Clusia rosea*, in neuroblastoma and leukemia cell lines. Proc Amer Assoc Cancer Res, Volume 47.
- Dusinska M., and Andrew R. Collins. (2008) The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. Mutagenesis vol. 23 no. 3 pp. 191–205.
- Garaj-Vrhovac V. and Gajski G. (2009) Evaluation Of The Cytogenetic Status Of Human Lymphocytes After Exposure To A High Concentration Of Bee Venom *In Vitro*. Arh Hig Rada Toksikol. Vol 60:27-34
- Gil L., Adonis M., Silva M., Quiñones L. e Salazar I. (1991) Agentes Cancerígenos en el Smog de Santiago. Artículo resumido y editado por "Ambiente y Desarrollo" a partir del documento original de los autores "Riesgos Para la Salud Humana por la Exposición a Contaminantes de Alta Toxicidad en el Aire de Santiago", julio 1991. Investigadores del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile 64 Ambiente y Desarrollo.
- Gil Otaiza R., Carmona Arzola J. y Rodríguez Arredondo M. C. (2006) Estudio etnobotánico de especies tóxicas, ornamentales y medicinales de uso popular, presentes en el Jardín de Plantas Medicinales “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de

Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Boletín Antropológico. Año 24, Nº 68,. ISSN:1325–2610.

- Gyorffy E., Anna L., Kovacs K., Rudnai P. and Schoket B. 2008. Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen–DNA adducts \* Mutagenesis vol. 23 no. 1 pp. 1–18.
- Hemminki, K, A Dipple, D Shuter, EE Kadlubar, D Segerback, H Bartsch. 1993. DNA Adducts: Identification and Biological Significance. IARC Scientific Publication, No. 125. Lyon: IARC
- Higuchi C. T., Sannomiya M., Pavan F. R., Leite S. R. A., Sato D. N., Franzblau S. G., Sacramento L. V. S., Vilegas W. and Leite C. Q. F. (2008) Byrsonima fagifolia Niedenzu Apolar Compounds with Antitubercular Activity. eCAM Advance Access published. Page 1 of 5.
- Jorge R, Leite J, Oliveira A, Tagliati C. 2004. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of Maytenus ilicifolia. J. Ethnopharmacol. 94:93–100.
- Kelecom A., Reis G., Fevereiro P., Silva J., Santos M., Mello C., Gonzalez M., Gouvea R. And Almeida G. (2002) A multidisciplinary approach to the study of the fluminense vegetation. Anais da Academia Brasileira de Ciências. Vol 74(1): 171–181

- Mangas Marín R., Montes De Oca Porto R., Bello Alarcón A. & Nival Vázquez Lavín A.. (2008) Caracterización por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas del Extracto Apolar de las Hojas de *Clusia minor* L. *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (5): 747-51
- Mangas Marín R., Montes De Oca Porto R., Bello Alarcón A. & Nival Vázquez Lavín A. 2008. Caracterización por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas del Extracto Apolar de las Hojas de *Clusia minor* L. *Lat. Am. J. Pharm.* Vol 27 (5): 747-51.
- Martín R., Ibeas E., Carvalho-Tavares J., Hernández M., Ruiz-Gutierrez V., Nieto M. L. (2009) Natural Triterpenic Diols Promote Apoptosis in Astrocytoma Cells through ROS-Mediated Mitochondrial Depolarization and JNK Activation. *PLoS ONE*. Volume 4.
- Mats H. G. Gustafsson, Klaus Winter, and Volker Bittrich. 2007. Diversity, Phylogeny and Classification of *Clusia*. *Ecological Studies*, Vol. 194. U.Lüttge (Ed.)
- Møller P. (2006) Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutation Research*. Vol 612: 84–104
- Moura A.C.G., Perazzo F.F., and Maistro E.L. (2008) The mutagenic potential of *Clusia alata* (Clusiaceae) extract based on two short-term *in vivo* assays. *Genet. Mol. Res.* Vol 7 (4): 1360-1368

- Oliveira MGM, Monteiro MG, Macaubas C, Pereira Barbosa V, Carlini EA. 1991. Pharmacological and toxicological effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 34(1):29-41.
- Pino Perez O., Lazo F. J., León Díaz O., Khambay B., and Branford-White C. (2008) Cuban flora as a source of bioactive compounds. *The International Journal of Cuban Studies.* Vol 1.
- Queiroga C, Silva G, Dias P, Possenti A, De Carvalho J. 2000. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3-beta-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia*. *J. Ethnopharmacol.* 72:465-468.
- Rekhadevi P. V., Sailaja N., Chandrasekhar M., Mahboob M., Rahman M. F. and Grover P. (2007) Genotoxicity assessment in oncology nurses handling anti-neoplastic drugs. *Mutagenesis* vol. 22 no. 6 pp. 395–401
- Reyes-Chilpaa R., Estrada-Muñiza E., Ramírez Apana T., Amekrazb B., Aumelasb A., Jankowskib C. K., Vázquez-Torres M. (2004) Cytotoxic effects of mamea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences.* Vol 75; 1635–1647
- Robert Lauwerys (2000) Capítulo 27: Control Biológico, Herramientas y Enfoques. *Enciclopedia De Salud Y Seguridad En El Trabajo.*
- Salama A. M. 1998. Aislamiento de Friedelina y Friedelinol de la Corteza de *Clusia ellipticifolia* Cuatr. *Phytochemistry* 15, 427 – 429.

- Shimada M. and Komatsu K. 2008. Emerging Connection Between Centrosome and DNA Repair Machinery. *J. Radiat. Res. Advance Publication*. doi:10.1269/jrr.09039
- Suffredini I. B., Paciencia M. L., Nepomuceno D. C., Younes R. N., Varella A. D. 2006. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts – Clusiaceae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 101(3): 287-290
- Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C. and Sasaki Y.F. (2000). Single Cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Vol 35, 206 – 221.
- Tene V., Malagón O., Vita Finzi P., Vidari G., Armijos C., Zaragoza T. (2007) An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 111; 63–81
- Valencia C. 1995. *Fundamentos de Fitoquímica*. Editorial Trillas. México. Pág. 194 – 198.
- Wong V., Szeto Y.T., Collins A. R., and Benzie I. F. (2005) THE COMET ASSAY: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Current Topics in Nutraceutical Research* Vol. 3, No. 1, pp. 1-14

- Wyatt N. P., Falque-Gonzalez C., Farrar1 D., Tuffnell1 D., Whitelaw D., Knudsen L. E. and Anderson D. 2007. In vitro susceptibilities in lymphocytes from mothers and cord blood to the monofunctional alkylating agent EMS. *Mutagenesis* vol. 22 no. 2 pp. 123–127.
- Yıldız A., Gür M., Yılmaz R., Demirbağ R., Çelik H., Aslan M., Koçyiğit A. 2008. Lymphocyte DNA damage and total antioxidant status in patients with white-coat hypertension and sustained hipertensi3n. *Türk Kardiyol Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol*. Vol 36(4):231-238.
- Xie Y., Zhang H., Hao J-F. and Qiu R. 2008. Effect of *N*-acetylcysteine on 12C6+ ion Irradiation-inducedLymphocytes DNA Damages and ImmunityChanges in Mice. *J. Radiat. Res.*



## ANEXO 1

### **CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE *Clusia latipes*.**

Bailón N.<sup>ac</sup>, Celi L.<sup>a</sup>, Martínez-Vásquez M.<sup>b</sup>, Ramírez T.<sup>b</sup>, Sordo M.<sup>a</sup>, Salazar AM.<sup>a</sup>, Ostrosky-Wegman P.<sup>a</sup>. Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.<sup>b</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, <sup>c</sup> Universidad Técnica Particular de Loja-Ecuador.

Los metabolitos secundarios o los semisintéticos obtenidos de fuentes naturales constituyen cerca del 80% de todos los fármacos aprobados por FDA entre 1983 y 1994, lo que señala la importancia de estudiar a los productos naturales. El género *Clusia*, se distribuye en la zona tropical y subtropical de Centroamérica y Sudamérica, y se han aislado algunos metabolitos secundarios con actividad anticancerosa, anti-VIH, así como antifúngica. En Ecuador, la especie *Clusia latipes* es utilizada por la población para eliminar verrugas, por ello se considero estudiar el efecto citotóxico y genotóxico del extracto hexánico de *C. latipes*, y de los metabolitos secundarios obtenidos de ésta especie. Las hojas de *C. latipes* fueron recolectadas en Gonzanamá, provincia de Loja-Ecuador. Del material vegetal seco se obtuvo por maceración el extracto hexánico. La actividad inhibitoria del crecimiento de células tumorales fue evaluada mediante el modelo de sulforrodamina B. El extracto inhibió el crecimiento en todas las líneas celulares evaluadas. Por cromatografía en columna se obtuvo del extracto un compuesto cuyas características espectroscópicas permitió identificarlo como friedelina. La genotoxicidad del extracto y de la fiedelina fue evaluada mediante el ensayo cometa en linfocitos humanos. Ambos produjeron un incremento de la cola del cometa, pero la

friedelina no inhibió el crecimiento de las líneas tumorales. Lo que indica que la friedelina no es responsable de la actividad citotóxica del extracto de *C. latipes*, pero probablemente es uno de los responsables del daño al DNA producido por extracto hexánico de *C. latipes*.

## ANEXO 2

### Citotoxicidad y Genotoxicidad de *Clusia latipes*

Bailón Moscoso N.<sup>1,3</sup>, Celi L.<sup>3</sup>, Ramírez T.<sup>2</sup>, Martínez-Vázquez M.<sup>2</sup>, Sordo M.<sup>1</sup>, Salazar A.M.<sup>1</sup>, Ostrosky-Wegman P.<sup>1</sup>.



<sup>1</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. <sup>2</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, <sup>3</sup> Centro de Biología Celular y Molecular Universidad Técnica Particular de Loja-Ecuador.

#### Introducción



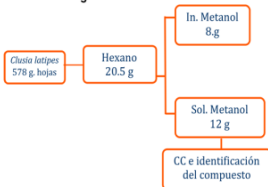
El género *Clusia*, se distribuye en las zonas tropical y subtropical de Centroamérica y Sudamérica, del que se han aislado algunos metabolitos secundarios con actividad anticancerosa, anti-VIH, así como antifúngica.

En Ecuador, la especie *Clusia latipes* es utilizada en medicina tradicional para eliminar mishas (verrugas)<sup>1</sup>, una de las patologías relacionadas con cáncer a la piel. Por ello, se consideró estudiar el efecto citotóxico y genotóxico del extracto hexánico de *C. latipes*, y uno de metabolitos secundarios obtenidos de esta especie (friedelina)

#### Metodología

**Recolección de la muestra:** Las partes aéreas de la especie fueron recolectadas en Gonzanamá en la Provincia de Loja-Ecuador.

**Métodos Químicos:** Mediante maceración se obtuvo el extracto de hexano, el cual se fraccionó con metanol. A partir de la fracción soluble en metanol, utilizando cromatografía en columna se aislaron algunos sólidos.



**Inhibición de la proliferación celular:** La inhibición del crecimiento celular se evaluó mediante el modelo de sulforodamina B en un panel de 6 líneas tumorales.

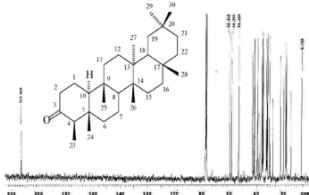
**Ensayo del cometa en linfocitos humanos:** La sangre entera, se cultivó en medio RPMI fue expuesta a los respectivos tratamientos durante 3 h a 37°C. Se siguió el procedimiento sugerido por Tice et. al.<sup>2</sup> Las laminillas obtenidas se fijaron con Bromuro de etidio. Se analizaron 3 experimentos de 3 donadores por triplicado. Los datos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica Mann Whitney.

#### Referencias

- Tene V, et al. (2007). J. of Ethnopharmacology 111 63-81
- TICE, . et al. (2000) Env. and Molecular Mutagenesis 35, 206-221.

#### Resultados

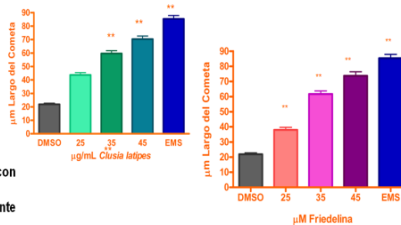
Del extracto hexánico por métodos espectroscópicos, se identificó y caracterizó a un triterpeno denominado Friedelina.



Los extractos tanto de hexano como la fracción soluble en metanol, tienen la capacidad de inhibir varias líneas tumorales humanas, no así, la friedelina cuya inhibición no es mayor al 10%.

Extracto	% de Inhibición del crecimiento por línea celular					
	SNC U251	Prostata PC-3	Leucemia K562	Colon HCT-15	Mama MCF-7	Pulmon SKLU-1
Hexánico	98	97	100	67	84	77
Hexánico in soluble en metanol	s.a	pend	s.a	12.2	3.61	25.43
Hexánico soluble metanol	100	pend	57.82	100	100	100
Friedelina	s.a	7.5	pend	s.a	2.7	6.2

Al exponer a los linfocitos humanos tanto al extracto hexánico como a la friedelina, se observa un incremento del daño al DNA, medido por la longitud de la cola del cometa. En ambos casos se observa una respuesta dosis dependiente (p<0,001)



Estos experimentos, demuestran que el efecto inhibitorio del extracto hexánico no se debe a la presencia de la friedelina, pero probablemente el efecto genotóxico sí está relacionado a ella.