



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE MAGISTER EN ANÁLISIS BIOLÓGICO Y
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Evaluación genotóxica del extracto de acetato de etilo de *Eriotheca
ruizii*

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Maldonado Vivanco, Valeria Katerine

DIRECTORA: Bailón Moscoso, Natalia Catalina, Ph D.

LOJA-ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctora

Natalia Bailón Moscoso

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

Que el presente trabajo de titulación: Evaluación genotóxica del extracto de acetato de etilo de *Eriotheca ruizii*, realizado por Valeria Katerine Maldonado Vivanco, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Diciembre del 2017.

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Valeria Katerine Maldonado Vivanco declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Evaluación genotóxica del extracto de acetato de etilo de *Eriotheca ruizii*, de la Maestría en Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio, siendo Natalia Bailón Moscoso PhD directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman 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”.

f).....

Autor: Valeria Katerine Maldonado Vivanco

Cédula: 1718466194

DEDICATORIA

A la memoria de mi amada madre Ligia Emerita.

A mi familia, y amigos que han sido mi apoyo durante mi formación profesional, este trabajo va dedicado con mucho cariño.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Particular de Loja por la formación de excelencia recibida, a todos los docentes y administrativos, quienes formaron parte de esta experiencia académica.

A la Dra. Natalia Bailón Moscoso, por compartir sus conocimientos, por su apoyo y paciencia durante la ejecución de mi trabajo de fin de titulación.

A la Bq. Gabriela González y a los compañeros de Laboratorio de Biología Celular y Genotoxicología, por toda su ayuda y por tantas horas de trabajo compartidas.

A mi familia y amigos que siempre estuvieron pendientes, gracias por sus buenos deseos y sus cuidados.

INDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	5
1.1 Genética toxicológica	6
1.1.1 Daño del material genético	6
1.1.2 Genotoxicidad	7
1.2 Evaluación genotóxica.....	8
1.2.1 Ensayo de micronúcleos.....	9
1.2.2 Ensayo del cometa	12
1.3 Genotoxicidad y su utilidad	14
1.3.1 Productos naturales y genotoxicidad	14
CAPITULO II. OBJETIVOS DEL PROYECTO	16
2.1 Objetivo general del proyecto.	17
2.2 Objetivos específicos del proyecto.	17
CAPITULO III. MÉTODOS	18
3.1 Extracto vegetal en estudio	19
Control positivo.....	19
Control negativo.....	19
Viabilidad por FDA/bromuro de etidio.....	19
Ensayo de micronucleos.....	20
Ensayo del cometa	20
CAPITULO IV. RESULTADOS	23
CAPITULO V. DISCUSIÓN	31
CONCLUSIÓN	34
RECOMENDACIONES	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formación de MN y NPB	10
Figura 2 . Fotomicrografías de las células anotadas en el ensayo de CBMN.....	12
Figura 3. Estructura de un cometa	13

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Viabilidad celular.....	24
Gráfica 2. Prolifereción celular.....	25
Gráfica 3. Índice de división nuclear.....	26
Gráfica 4. Frecuencia de micronucleos.....	27
Gráfica 5. Longitud de la cola.....	28
Gráfica 6. Intensidad de la cola.....	29
Gráfica 7. Índice de daño genotóxico.. ..	30

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATP: adenosín trifosfato

CBN: células bi-nucleadas

CHO: células de ovario de hámster chino

CMN: células mono-nucleadas

CPL: células poli-nucleadas

DAP: diámetro a la altura del pecho

DMSO: dimetilsulfóxido

EMS: etilmetanosulfonato

FDA: diacetato de fluoresceína

ID: índice de daño

MMC: mitomicina C

MN: micronúcleos

MNCB: micronúcleos con bloqueo de la citocinesis

NPB: puentes nucleoplasmáticos

MPT: transcripción de la permeabilidad mitocondrial

NAD: dinucleótido de nicotinamida y adenina

NBUD: brotes nucleares

RESUMEN

Los estudios de genotoxicidad permiten la evaluación toxicológica de origen sintético y vegetal. Se sabe que en la composición química de las plantas existen metabolitos secundarios, de los cuales algunos de ellos pueden causar efectos adversos; como toxicidad general incluida a genotoxicidad. *Eriotheca ruizii*, es una especie arbórea representativa de los bosques secos del sur del Ecuador, la cual se usa en el tratamiento de enfermedades como cataratas y cicatrización de heridas. A partir del tubérculo de *E. ruizii* se han venido realizando estudios en el Área Biológica y Biomédica de la Universidad Técnica Particular de Loja, del cual se han obtenido un total de 15 extractos. El extracto de acetato de etilo de *Eriotheca ruizii* obtenido a partir de la epidermis (EPIAET-01) produjo toxicidad en líneas tumorales. En este estudio al exponer las células CHO-K1 a las diferentes dosis de EPIAET-01 (5, 15, 30, y 45 µg/ml) se pudo determinar mediante el test de micronúcleos y cometa, que el extracto no produce genotoxicidad en relación al control negativo con DMSO al 0.5%.

PALABRAS CLAVE: Genotoxicidad, micronúcleos, ensayo cometa, *Eriotheca ruizii*.

ABSTRACT

Genotoxicity studies allow the toxicological evaluation of synthetic and vegetable origin. It is known that in the chemical composition of plants there are secondary metabolites, some of which can cause adverse effects; as general toxicity including genotoxicity. *Eriotheca ruizii* is an arboreal species representative of the dry forests of southern Ecuador, which is used in the treatment of diseases such as cataracts and wound healing. From the tubercle of *E. ruizii* studies have been carried out in the Biological and Biomedical Area of the Technical University of Loja, from which a total of 15 extracts have been obtained. The ethyl acetate extract of *Eriotheca ruizii* obtained from the epidermis produces toxicity in tumor lines. In this study, when the CHO-K1 cells were exposed to the different doses of EPIAET-01 (5, 15, 30, and 45 $\mu\text{g} / \text{ml}$), it was determined by the micronucleus and comet test, that the extract does not produce genotoxicity in relation to to negative control with 0.5% DMSO.

KEYWORDS: Genotoxicity, micronucleus, comet assay, *E. ruizii*

INTRODUCCIÓN

La genotoxicidad se define como el daño al material genético de una célula tanto ADN como ARN, afectando de esta manera su integridad (Shah, 2012). Se conoce que el ADN sufre cerca de 10^5 lesiones espontaneas por día, en donde los mecanismos de reparación detectan daños y perturbaciones durante el crecimiento y división celular. Las células cuentan con mecanismos complejos de vigilancia de la integridad del ADN, para lo cual activan mecanismos de reparación cuando hay deficiencias o errores durante la replicación. Una consecuencia potencial de los daños, son las alteraciones permanentes en la estructura del ADN que pueden generar proceso de mutación, transformación carcinogénica y muerte celular (Tafurt Cardona & Marin Morales, 2015).

Existen sustancias de diversas clases que actúan como genotoxinas causando mutaciones, tales como las radiaciones ionizantes y no ionizantes, sustancias químicas como: productos farmacéuticos, plaguicidas, entre otras (Gollapudi, 2017; Tafurt Cardona & Marin Morales, 2015). Las genotoxinas pueden ser carcinógenos o agentes cancerígenos, mutágenos o agentes causantes de mutaciones, o teratógenos, agentes causantes de defectos de nacimiento. Durante el proceso de mutación la información genética puede ser duplicada, borrada o insertada.

Determinar el daño al material genético causado por diferentes sustancias que inducen al proceso de genotoxicidad, es posible mediante la genética toxicológica, en la cual una serie de pruebas permite la evaluación genotóxica. El objetivo principal de estas pruebas es proteger a los seres humanos de la exposición de agentes mutágenos del medio ambiente.

Las evaluación genotóxica comprende pruebas "*in vitro*" e "*in vivo*" que permiten detectar el daño genético por diversos mecanismos (ICH, 2012). La mayoría de las pruebas de genotoxicidad, han sido diseñadas de tal manera que sean especialmente sensibles para detectar agentes genotóxicos.

Dentro de la pruebas que pueden ser aplicadas en genética toxicológica están: el Test de Ames, frecuencia de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, test de micronúcleos, ensayo del cometa, entre otros (Mudry & Carballo, 2006).

Los estudios de genotoxicidad constituyen un paso importante en la evaluación toxicológica de los medicamentos de origen sintético y vegetal; durante los últimos años se ha hecho evidente que la genotoxicidad no solamente es una propiedad de ciertas sustancias artificiales sino que esta actividad también está ampliamente distribuida entre los productos químicos naturales. Se sabe que en la composición química de las plantas existen

sustancias conocidas como metabolitos secundarios, de los cuales algunos de ellos pueden causar efectos adversos; muchas plantas contienen sustancias citotóxicas y genotóxicas, que podrían causar daño resultantes del uso a largo plazo (Laffita & Castillo, 2011).

De acuerdo con el Organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente un 80% de la población mundial depende de plantas medicinales para su atención primaria de salud (Sponchiado et al., 2016)

El Pasallo (Loja), Chirigua, Chirigoyo , nombre científico *Eriotheca ruizii*, forma parte de las plantas útiles del Ecuador y entre algunos de sus usos, las semillas molidas se utilizan para tratar cataratas y la resina para cicatrizar heridas (MAE, 2012).

Eriotheca ruizii, es una especie arbórea representativa de los bosques secos del sur del Ecuador, pertenece a la familia *Bombacaceae*; es un árbol caducifolio, de entre 10 - 20 m de altura y 30 - 50 cm de diámetro a la altura del pecho (DAP).

A partir del tubérculo de *E. ruizii* se han venido realizando estudios en Área Biológica y Biomédica de la Universidad Técnica Particular de Loja, del cual se han obtenido un total de 15 extractos a través de extracción en hexano, acetato de etilo, y metanol de las diferentes partes del tubérculo (Romero Serrano, 2016). Dado al uso medicinal de la especie es necesario conocer las propiedades genotóxicas de la especie *Eriotheca ruizii*, por lo cual se lleva a cabo dos ensayos: ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis y ensayo cometa; con el fin de determinar actividad genotóxica; para este ensayo se utilizó el extracto de acetato de *Eriotheca ruizii* (EPIAET-01) que se obtiene a partir de la epidermis del tubérculo, usando como modelo biológico la línea celular CHO-K1 (células de Ovario de Hámster Chino).

Tras la exposición de las células CHO-K1 a las diferentes dosis de EPIAET-01 (5, 15, 30, y 45 µg/ml) se pudo determinar mediante el test de micronúcleos y cometa, que este extracto no produce genotoxicidad en relación al control negativo con DMSO al 0.5%.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Genética toxicológica

Los avances sin precedentes durante los últimos años han dado lugar a nuevas subdisciplinas como la Genética Toxicológica, que comprende un componente esencial en la evaluación de sustancias que podrían causar daño al material genético, convirtiéndose así en una herramienta en la evaluación de los riesgos carcinogénicos y heredables (Eastmond, 2017; Gollapudi, 2017).

La Genética Toxicológica surge de la integración de diferentes conceptos; por una parte la Genética es la ciencia que estudia acerca de la transmisión, evolución y expresión de los genes; mientras que la Toxicología se encarga del estudio de los efectos xenobióticos (Mudry & Carballo, 2006). Las pruebas de Genética Toxicológica son esenciales en la evaluación del daño potencial al material genético causado por agentes físicos, químicos y biológicos.

1.1.1 Daño del material genético

Se sabe que el daño del material genético no es simplemente la reacción del ADN a un agente dado, existe una serie de procesos que le permiten a las células de los seres vivos por un lado identificar y corregir daños en el ADN, pero en ocasiones se produce la expresión de daño genético ocasionando mutaciones, lo que se define como un cambio transmisible permanente en la cantidad o estructura del material genético (Eastmond, 2017; Herráez, 2012).

Las mutaciones son un componente en la evolución de los seres vivos, lo que ha dado como resultado heterogeneidad en las especies, pero este término "mutación" involucra el proceso por el cual un cromosoma sufre un cambio estructural, lo que puede ser ocasionado por diferentes factores como: radiación UV o ionizante, agentes físicos como el calor; sustancias químicas y biológicas, entre otros (Mudry & Carballo, 2006). Las mutaciones tienen lugar en todo el genoma, incluyendo las secuencias codificantes o no, del genoma nuclear o mitocondrial, en células germinales (heredable) o somáticas (no heredable) (Herráez, 2012). La acción de diferentes mutágenos puede causar tres procesos:

1. Mutación (mutagénesis)
2. Transformación celular (carcinogénesis)
3. Daño a células embrionarias (teratogénesis)

Además existen tres modos diferentes de expresión de fallas de la información genética de las células involucradas: la aneuploidización, la clastogénesis y la mutagénesis.

Las aneuploidias se caracterizan por la ganancia o pérdida del cromosoma entero. Es un proceso de cambio genético que aparece como macromutación permitiendo el cambio en número o estructura cromosómica, incrementando o disminuyendo en uno o más su número de cromosomas en el cariotipo (Herráez, 2012; Mudry & Carballo, 2006).

La clastogénesis se ocupa de estudiar la estructura cromosómica, así las anomalías detectables son: *gaps* de una o ambas cromátides, roturas de una o ambas cromátides, estructuras dicéntricas, o figuras de intercambio (Mudry & Carballo, 2006).

El proceso de mutagénesis involucra la sustitución de pares de bases (transiciones o trasversiones) o la adición o delección de pares de base de una secuencia, que modifican la actividad biológica de la molécula (Mudry & Carballo, 2006).

Es así que las mutaciones pueden tener ventajas, ser neutras o manifestar patologías en lo que se incluye padecimientos congénitos y cáncer.

1.1.2 Genotoxicidad

Es importante evaluar el daño y establecer la relación riesgo-beneficio de los elementos que se encuentran en el ambiente que nos rodea, para ello evaluar la genotoxicidad de un posible mutágeno, mediante pruebas biológicas constituye un componente esencial en la valoración de daño al material genético.

Los estudios de las modificaciones producidas directamente al ADN permiten estimar a corto plazo, que puede ocurrir cuando un compuesto dado llegue a tener acceso al material genético "*in vivo*", elucidando así los mecanismos más probables implicados en el proceso mutagénico. De acuerdo al tipo de tejido, el daño podría o no ser reparado, cuando el mecanismo de reparación se altera, nos encontramos ante un ADN modificado, lo que podría desencadenar un proceso de carcinogénesis, teratogénesis o de descendencia precoz e incluso procesos de apoptosis (Mudry & Carballo, 2006).

En los últimos 50 años se han desarrollado más de 150 sistemas de ensayo para detectar cambios en el ADN. Muchos de estos ensayos son de corto plazo (*Short term tests* STT), lo que permite realizar numerosos y diferentes tipos de bioensayos que se pueden aplicar al mismo tiempo como una batería de pruebas o en forma secuencial (Eastmond, 2017; Mudry & Carballo, 2006).

Se aceptan cuatro niveles de evaluación de daño genético, contemplando estudios tanto *“in vitro”* como *“in vivo”*.

Nivel primario.- conocido como bacteriano o molecular, permite la detección de mutaciones puntuales valiéndose de la utilización de ensayos en procariontes. Ejemplo el “Test de Ames” (Mudry & Carballo, 2006).

Nivel secundario.- o nivel celular, aquí se utiliza cultivo de células ya sea en monocapa o en suspensión, con el objeto de caracterizar el daño genético en líneas celulares establecidas. Los cultivos en monocapa utilizados son: células CHO, VERA, Hela, entre otras. Mientras que las células en suspensión son linfocitos que se obtienen a partir del cultivo de sangre periférica. Es aquí donde se conjuga la Citogenética con la Genética Toxicológica, y dentro de los ensayos que pueden ser aplicados están: frecuencia de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, test de micronúcleos, entre otros. Todos estos ensayos están basados en la utilización del microscopio y en el trabajo con diferentes estadios del ciclo celular (Mudry & Carballo, 2006).

Nivel terciario.- nivel orgánico, se aplica en plantas y animales incluido el ser humano, en este caso se evalúa al individuo como un todo. Los estudios son exposiciones de tipo laboral, ocupacional, accidental o medicamentosa. Cuando se trabaja *“in vivo”* algunos autores prefieren trabajar con plantas, otros en animales (ratas, ratones, cobayos, conejos, perros y monos) o incluso en seres humanos que han sido expuestos en forma accidental, laboral o terapéutica (Mudry & Carballo, 2006).

Nivel cuaternario.- nivel epidemiológico, utiliza los análisis de carácter prospectivo y retro-prospectivo de poblaciones expuestas en forma accidental, laboral o por estilo de vida (Mudry & Carballo, 2006).

1.2 Evaluación genotóxica

La evaluación genotóxica puede definirse como pruebas *“in vitro”* e *“in vivo”* diseñadas para detectar el daño genético por diversos mecanismos (ICH, 2012). La mayoría de las pruebas de genotoxicidad, han sido diseñadas de tal manera que sean especialmente sensibles para detectar agentes mutagénicos y genotóxicos.

1.2.1 Ensayo de micronúcleos

La acción clastogénica de agentes xenobióticos, puede inducir a la formación de aberraciones cromosómicas estructurales o numéricas, que se puede determinar mediante el ensayo de Micronúcleos (MN).

En ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis permite medir el daño del ADN, citostasis y citotoxicidad. Los eventos de daño del ADN se puntualizan específicamente en células binucleadas una vez divididas (BN). Los micronúcleos (MN) y otras anomalías nucleares como los puentes nucleoplásmicos (NPB) y los brotes nucleares (NBUD) son biomarcadores de eventos genotóxicos e inestabilidad cromosómica. Estos eventos de daño del genoma se pueden medir simultáneamente en el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN). La formación de estas anomalías nucleares comúnmente se ven en el cáncer y son indicativos de eventos de daño del genoma que podrían aumentar el riesgo de enfermedades degenerativas (M. Fenech et al., 2011; Michael Fenech, 2007).

1.2.1.1 Micronúcleos (MN)

Los MN puede originarse durante la anafase, donde los fragmentos de cromosomas acéntricos, fragmentos de cromátidas acéntricos o cromosomas enteros no se incluyen en los núcleos de las células hijas al completar la telofase durante la mitosis, esto se debe a que no se fijaron adecuadamente con el huso durante el proceso de segregación (Thomas & Fenech, 2011). Los MN son morfológicamente idénticos pero más pequeños que los núcleos. Los criterios de identificación de MN son:

1. El diámetro de MN en los linfocitos humanos suele variar entre 1/16 y 1/3 del diámetro medio de los núcleos principales.
2. Los MN no son reparables, y por lo tanto pueden distinguirse fácilmente de artefactos, tales como partículas de tinción.
3. Los MN no están vinculados o conectados a los núcleos principales.
4. Los MN puede tocar, pero no se superponen los núcleos principales y el límite micronuclear debe distinguirse de la frontera nuclear.
5. Los MN normalmente tienen la misma intensidad de tinción que los núcleos principales, pero ocasionalmente la tinción puede ser más intensa.

1.2.1.2 Puentes Nucleoplásmicos

Los puentes nucleares (NPB) se originan de cromosomas dicéntricos que pueden ser causados por malas reparaciones de rupturas de ADN de doble hebra o fusiones de extremos de telómeros. Estos eventos sólo pueden observarse en las células que completan la división nuclear, que se reconocen por su aparición binucleada después de la citocinesis bloqueando con citocalasina-B (M. Fenech et al., 2011).

Los NPB se originan durante la anafase cuando los centrómeros de los cromosomas dicéntricos se tiran a polos opuestos de la célula durante la mitosis. En ausencia de rotura del puente de la anafase, la membrana nuclear rodea eventualmente los núcleos de la célula hija y el puente de la anafase y de esta manera, se forma un NPB, como se observa en la Figura 1. Los NPB se rompen normalmente durante la citocinesis, pero se pueden acumular en células bloqueadas por citocinesis utilizando citocalasina-B como inhibidor de citocinesis (M. Fenech et al., 2011).

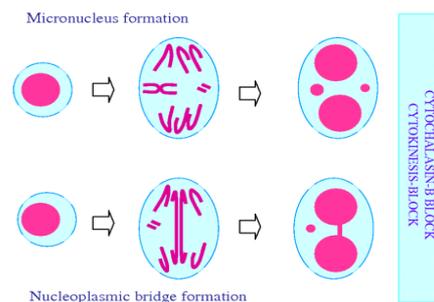


Figura 1. Formación de MN y NPB
Fuente: (M. Fenech et al., 2011)
Elaboración: (M. Fenech et al., 2011)

Los NPB tienen las siguientes características:

1. El ancho de un NPB puede variar considerablemente, pero usualmente no excede 1/4 del diámetro de los núcleos dentro de la célula.
2. Los NPB también deben tener las mismas características de tinción que los núcleos principales.
3. En raras ocasiones, se puede observar más de un NPB dentro de una célula binucleada.
4. Una célula binucleada con NPB puede contener uno o más MN.
5. También pueden observarse células binucleadas con uno o más NPB y sin MN.

1.2.1.3 Brotes nucleares

Otra anomalía nuclear única conocida como brotación nuclear (NBUD) se ha asociado con eventos de inestabilidad cromosómica. El ADN amplificado se localiza selectivamente en sitios específicos en la periferia del núcleo y se elimina por brotación nuclear durante la fase S del ciclo celular. El ADN amplificado puede ser eliminado de los cromosomas a través de la recombinación entre regiones homólogas dentro de las secuencias amplificadas que forman mini-círculos de ADN acéntrico y atelomérico. Los NBUD se caracteriza por tener la misma morfología que un MN, con la excepción de que están conectados al núcleo por un tallo estrecho o ancho de material nucleoplasmático, dependiendo de la etapa del proceso de brotación (M. Fenech et al., 2011). Para identificarlos hay que tomar en cuenta que:

1. Los NBUD son similares a los MN en apariencia, con la excepción de que están conectados con el núcleo a través de un puente que puede ser ligeramente más estrecho que el diámetro del brote o por un puente mucho más delgado dependiendo de la etapa del proceso de extrusión.
2. Los NBUD generalmente tienen la misma intensidad de tinción que MN.
3. Ocasionalmente, los NBUD pueden aparecer ubicados dentro de una vacuola adyacente al núcleo (Didenko, 2011).

1.2.2 Resultados citostáticos y frecuencia de micronúcleos

En el ensayo de CBMN mediante el índice de división nuclear (IDN) es posible medir el efecto citostático por el cual se proporciona una medida del estado progresivo de la fracción celular viable, por lo tanto, constituye un indicador de los efectos citostáticos y, en el caso de los linfocitos, es también una medida de la respuesta mutagénica, que es útil como biomarcador de la función inmune. La forma óptima de puntuar las placas en un ensayo de CBMN es determinar primero la frecuencia de células viables mono, bi y multi-nucleadas así como las células necróticas y apoptóticas en un mínimo de 500 células, utilizando la fórmula:
$$IDN = (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4) / N$$

Donde M1-M4 representa el número de células con 1-4 núcleos, y N es el número total de células viables anotadas (excluyendo células necróticas y apoptóticas).

El valor de IDN más bajo posible es 1,0, cuando todas las células viables no han podido dividirse durante el período de bloqueo de la citocinesis y, por lo tanto, están todas mononucleadas. Si todas las células viables completaron una división nuclear y, por lo tanto,

son todas binucleadas, el valor de IDN es 2,0. Un valor IDN sólo puede ser mayor que 2,0 si una proporción sustancial de células viables han completado más de una división nuclear durante la fase de bloqueo de citocinesis y por lo tanto contienen más de dos núcleos. Por ejemplo, si el 50% de las células viables son bi-nucleadas, 10% tri-nucleadas y 10% cuadrinizadas, el valor IDN es 2,2 (Didenko, 2011).

La frecuencia de las células bi-nucleadas (CBN) con MN, NPB o NBUD proporciona una medida del daño del genoma o inestabilidad cromosómica, el recuento de MN, NPB y NBUS se realiza en al menos 1.000 CBN. Las células que deberán ser anotadas en el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) se muestran en la Figura 2.

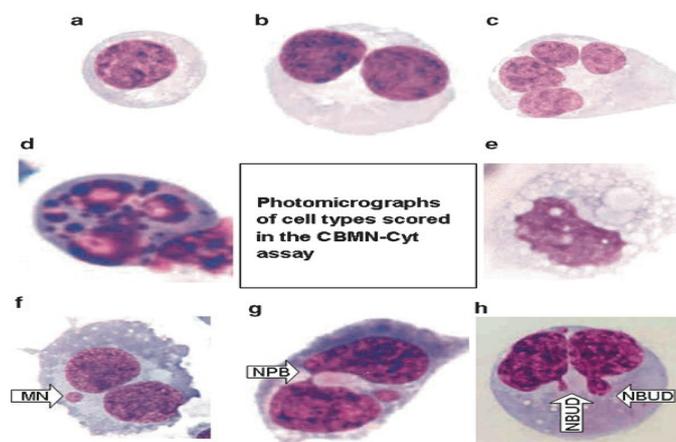


Figura 2. Microfotografías de las células anotadas en el ensayo de CBMN. A) Célula mononucleada; (B) célula BN; (C) célula multinucleada; (D) célula necrótica temprana; (E) célula apoptótica tardía; (F) célula BN que contiene uno o más MN; (G) célula BN que contenga un NPB y un MN; (H) célula BN que contiene NBUD.

Fuente: (Didenko, 2011)

Elaboración: (Didenko, 2011)

1.2.2 Ensayo cometa

El ensayo cometa o SCGE (electroforesis en gel de una sola célula) es un método que permite determinar genotoxicidad a nivel de ADN tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”, detectando rupturas de una sola hebra como daño inicial y las desarrolladas a partir de sitios alcalinos lábiles en condiciones alcalinas (pH>12,6). La prueba se basa en una electroforesis de células individuales en una matriz de agarosa, lisis celular y el desenrollado del ADN. En el campo eléctrico, el ADN migra hacia el ánodo conduciendo a una mayor tasa de migración para fragmentos más cortos de ADN. Después de la tinción por fluorescencia, las células con rupturas de la cadena de ADN aparecen en forma de un "cometa", que consiste en una

"cabeza cosechada" que representa el contenido de ADN no dañado del núcleo y los fragmentos resultantes de las rupturas de ADN simple o doble apareciendo como una cola de cometa como se observa en la Figura 3 (Kawaguchi, Nakamura, Yamamoto, Honda, & Sasaki, 2010; Ritter & Knebel, 2009).

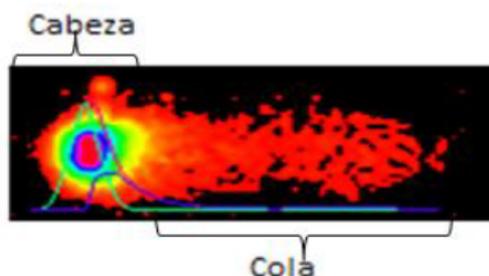


Figura 3. Estructura de un cometa
Fuente: (Olive & Banáth, 2006)
Elaboración: (Olive & Banáth, 2006)

Durante la electroforesis, el ADN intacto permanece en el núcleo, pero los fragmentos más pequeños con rupturas en sitios álcali lábiles se mueven desde el núcleo hacia afuera asumiendo la forma de un cometa donde la longitud de la cola respecto a la cabeza refleja el número y tamaño de los fragmentos de ADN resultantes (Neira F, Vera A, & Escobar, 2016).

La ventaja del ensayo cometa radica en la sensibilidad de detectar los daños del ADN en un número bajo de células requeridas (<10.000 células). Según Collins (1997), las células se puntúan de 0 (sin daños) a 4 (máximo daño) según la intensidad de la cola del cometa, lo que resulta en el puntaje de daño del ADN (índice de daño) para cada grupo. El índice de daño (ID) del grupo varía de 0 (completamente sin daños - 100 células × 0) a 400 (daño máximo - 100 células × 4)(Fagundes et al., 2017).

Los rangos establecidos de clasificación de daño se encuentran distribuidos en cinco categorías.

0 = sin daño

1= < 25

2= 25 y <50

3= 50 y <75

4= >75

El índice de daño (ID) se calcula de acuerdo a la fórmula propuesta por Jaloszynski (1997): $ID = (clase\ 1 \times 1) + (clase\ 2 \times 2) + (clase\ 3 \times 3) + (clase\ 4 \times 4) / \text{total de células analizadas}$ (Neira F et al., 2016). Se debe excluir la categoría 0, obteniendo una puntuación de 100 a 400 UA (Unidades arbitrarias), lo que está relacionado con la frecuencia de roturas del ADN (Simoniello, Kleinsorge, & Carballo, 2010).

1.3 Genotoxicidad y su utilidad

Las pruebas de genotoxicidad son un componente importante en la evaluación de sustancias: como productos farmacéuticos, productos químicos industriales, plaguicidas, materiales de contacto con alimentos y productos para el cuidado personal, que se caracterizan por afectar la integridad del ADN de los seres vivos provocando genotoxicidad. El objetivo principal de las pruebas utilizadas como biomarcadores para medir el daño al genoma a estado encaminado por muchos años a proteger a los seres humanos de la exposición a agentes mutágenos del medio ambiente, como sustancias sintéticas, con poca atención en sustancias naturales, como las sustancias tóxicas de las plantas (Gollapudi, 2017; Mauriz T. & Martínez P., 2014).

1.3.1 Productos naturales y genotoxicidad

El conocimiento sobre las plantas medicinales simboliza muchas veces el único recurso terapéutico en comunidades o grupos étnicos (Mendoza-Meza & España-Puccini, 2016). Las plantas medicinales son consideradas como un rico recurso de ingredientes que pueden ser utilizados en el desarrollo y síntesis de fármacos. Existe medio millón de plantas alrededor del mundo, y la mayoría de ellas aún no se han investigado (Rasool Hassan, 2012).

Durante muchos años el énfasis ha sido encaminado al estudio de sustancias sintéticas con poca atención a los productos químicos naturales, tales como sustancias tóxicas de las plantas (Eastmond, 2017). Se sabe que en la composición química de las plantas existen sustancias conocidas como metabolitos secundarios, de los cuales algunos de ellos pueden causar efectos adversos; muchas plantas contienen sustancias citotóxicas y genotóxicas, que podrían causar daño resultantes del uso a largo plazo (Mattana et al., 2014; Vargas, Guidobonot, & Henriques, 1991).

1.3.2 *Eriotheca Ruizii*

El Pasallo (Loja), Chirigua, Chirigoyo , nombre científico *Eriotheca ruizii*, forma parte de las plantas útiles del Ecuador y según (MAE, 2012) entre algunos de sus usos “las semillas molidas se utilizan para tratar cataratas y la resina para cicatrizar heridas”.

Es una especie arbórea representativa de los bosques secos que se encuentra distribuida en Ecuador y Perú y pertenece a la familia Bombacaceae; es un árbol caducifolio, de entre 10 - 20 m de altura y 30 - 50 cm de diámetro a la altura del pecho (DAP) (Romero Serrano, 2016).

A partir del tubérculo de *E. ruizii* se han venido realizando estudios en el Área Biológica y Biomédica de la Universidad Técnica Particular de Loja, del cual se han obtenido un total de 15 extractos a través de extracción en hexano, acetato de etilo, y metanol de las diferentes partes del tubérculo (Romero Serrano, 2016). El extracto de acetato de etilo de *Eriotheca ruizii* (EPIAET-01) que se obtiene a partir de la epidermis; se utilizó en el presente proyecto en la evaluación de genotoxicidad, debido a que estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación demostraron que este extracto tiene actividad citotóxica en líneas tumorales.

CAPITULO II. OBJETIVOS DEL PROYECTO

2.1 Objetivo general del proyecto.

Determinar el daño genotóxico del extracto de acetato de etilo de *Eriotheca ruizii* en células CHO K-1, utilizando ensayos de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNCB) y cometa.

2.2 Objetivos específicos del proyecto.

- Establecer dosis a las cuales la viabilidad celular sea mayor al 70% posterior a la exposición con extracto de acetato de etilo de *Eriotheca ruizii* mediante FDA/Bromuro de Etidio.
- Determinar el efecto genotóxico del extracto de acetato de etilo de *Eriotheca ruizii*, mediante ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en células CHO-K1.
- Determinar el efecto genotóxico del extracto de acetato de etilo de *Eriotheca ruizii*, en células CHO-K1 mediante el ensayo cometa.

CAPITULO III. MÉTODOS

3.1 Extracto vegetal en estudio

El extracto de acetato de etilo de *Eriotheca ruizii* (EPIAET-01) usado en el ensayo, fue donado por el Dr. Juan Carlos Romero del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja. El extracto fue obtenido a partir de la corteza del bulbo de la variedad *Eriotheca ruizii*. Para realizar los diferentes ensayos se lo disolvió en DMSO obteniendo una concentración de 10.000 µg/ml, y a partir de esta concentración se realizaron las diluciones con medio HAM-F12 para el tratamiento celular.

Control positivo

Como control positivo para el ensayo de MN se utilizó Mitomicina C a una concentración de 1µM agente antineoplásico que interfiere en la síntesis de ADN. Para el ensayo de cometa se usó como control positivo Etilmetanosulfonato (EMS) a una concentración de 2µM.

Control negativo

Se usó DMSO (Dimetilsulfóxido) al 0.5%.

Modelo biológico

Línea celular CHO-K1

Su cultivo y mantenimiento se realizó con medio HAM-F12 (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO), antibiótico antimicótico al 1% (GIBCO), l-glutamina (GIBCO) al 1%, en incubación a 37°C, a una atmosfera húmeda con el 5% de CO₂.

Viabilidad por FDA/bromuro de etidio

A partir de un cultivo de confluencia del 80% de células CHO-K1 (Frasco Roux de 25 cm²), se realizó la siembra de $1.5 \text{ cel.} \times 10^3$ (tiempo de replicación celular cada 16 horas) en 100 µl de medio HAM-F12 por cada pocillo (caja de 96 pocillos). Se incubó por 24 horas a 37°C al 5% de CO₂ en atmosfera húmeda. Se dio tratamiento en dosis de 5, 15, 30 y 45 µg/ml a partir de una concentración inicial de 10.000 µg/ml EPIAET-01. Se incubó por 24 horas a 37°C al 5% de CO₂ en atmosfera húmeda. Se realizó el proceso de tripsinización.

Sobre una placa portaobjetos se colocó 20 µl de la suspensión celular más 20 µl de FDA/Bromuro de etidio, se procedió a contar 100 células (vivas y muertas) en el

microscopio de fluorescencia ZEISS-Axioskop 2 plus, con el filtro N° 9 (color de fluorescencia verde para FDA).

Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (BCMn)

Se realizó la siembra de 70.000 células CHO-K1 re-suspendidas en 2 ml por cada cubre-objetos, en cajas Petri plásticas de 3.5 cm de diámetro. Se incubaron durante 24 horas a 37°C, con concentración al 5% de CO₂.

Transcurrido las 24 horas de cultivo, se eliminó el medio, se expuso a las células a concentraciones de 5, 15, 30, y 45 µg/ml de extracto EPIAET-01, se usó como control negativo DMSO al 0.5% y como control positivo Mitomicina C, además a cada cultivo se agregó Citocalacina B a una concentración de 4.5 µg/ml. Se incubó por 24 horas a 37°C, con concentración al 5% de CO₂.

Se retiró el medio de cada pocillo y se añadió 1ml de HAM-F12 más 2 ml de cloruro de potasio. Se incubó por 20 min. en la estufa a 37°C al 5% de CO₂.

Para la fijación se eliminó el medio, se añadió gota a gota 2 ml del fijador de Carnoy (Metanol/ácido acético glacial relación 3:1). Se mantuvo en movimiento constante durante 10 min. Se eliminó el fijador y se lavó 3 veces con PBS (2ml x 5 min. cada lavada). Se agregó 2ml de la solución Triton (Promega) al 0.1%, se dejó actuar por 15 min. Se eliminó la solución Triton y se lavó con PBS 3 veces (2ml x 5 min. cada lavada). Se adicionó 2ml por 10 min de DAPI. Se lavó con PBS. Finalmente se retiró las láminas una a una y colocó sobre portaobjetos cada una, de modo que entren en contacto las células con glicerol contenido en la placa. Se selló los extremos con barniz.

El recuento de micronúcleos (MN) fue en 1000 células bi-nucleadas en el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) con el filtro N° 1 (Fluorescencia azul). Además se realizó el recuento de células mono-nucleadas (CMN), bi-nucleadas (CBN), y poli-nucleadas (CPL), con el fin de evaluar el efecto citostático para lo cual se utilizó el Índice de División Nuclear (Didenko, 2011), que se calculó con la siguiente ecuación.

$$IDN=[CMN+2(CBN)+3(CPL)/200]$$

Ensayo cometa

Se sembró las células CHO- K1 en placas de 24 pocillos, se incubaron durante 24 horas a 37°C, con concentración al 5% de CO₂.

Luego de 24 horas de cultivo, se eliminó el medio y se dio tratamiento a cada pocillo con concentraciones de 5, 15, 30, y 45 µg/ml de EPIAET-01, como control negativo se utilizó DMSO (SIGMA) al 0.5% y como control positivo etilmetanosulfonato (EMS) a 2µM. Se incubó por 24 horas a 37°C, en atmósfera húmeda con concentración al 5% de CO₂. Las células fueron transferidas a un tubo de 1.5 ml, se centrifugó por 5 min a 10000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió en 1 ml de medio HAM-F12, se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 4 µl.

Preparación de placas para la lectura de Cometa

Se preparó portaobjetos con 150 µl de agarosa de normal punto de fusión al 1% (INVITROGEN), se adicionó 20 µl de la suspensión de la cosecha y se mezcló con 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (SIGMA). A partir de esta mezcla se tomó 75µl y colocó en las placas portaobjetos, se cubrió con una lámina cubre objetos y se refrigeró por 10 min. Transcurridos los 10 min se retiró la lámina cubre objetos y agregó 130 µl de agarosa de bajo punto de fusión (SIGMA) en cada placa, se cubrió con cubre objetos y refrigeró por 10 min más. Se retiró los cubreobjetos y transferió las placas a la solución de lisis que contiene 1% de Tritón X-100 (SIGMA), 10% de DMSO (SIGMA), 2.5 M de NaCl (MERCK), 100 mM de EDTA (INVITROGEN), 10 mM TRIS (INVITROGEN) y pH 10, por un tiempo mínimo de 1 hora y máximo 15 días.

Electroforesis

Se dejó reposar las placas en la cubeta de electroforesis con buffer que contiene 300 mM NaOH y 1 mM de EDTA (INVITROGEN) durante 20 min y luego se procedió a realizar la electroforesis en condiciones de 25V y 300mA durante 20 min. Se retiró las placas y colocó en buffer neutro ajustado a un pH de 7.5 (0,4 M Tris) y luego se deshidrató con metanol para su posterior análisis.

Lectura

Se hidrató las placas con agua desionizada fría y se tiñó con 60 µl de bromuro de etidio (30 µl/ml). Se observó las placas en el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus). La observación de cometa se realizó en 100 células, el daño del ADN se midió por la longitud de la cola de los cometas el cual se visualizó gracias al Software Comet Assay IV.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Viabilidad por FDA/ Bromuro de Etidio

Para el análisis de viabilidad celular se usó el programa estadístico GraphPad Prism 5, mediante el test de ANOVA.

Ensayo de micronúcleos (MN)

En el análisis de la frecuencia de micronúcleos se realizó en el programa estadístico GraphPad Prism 5, aplicando el test de ANOVA, con post test de Dunnett.

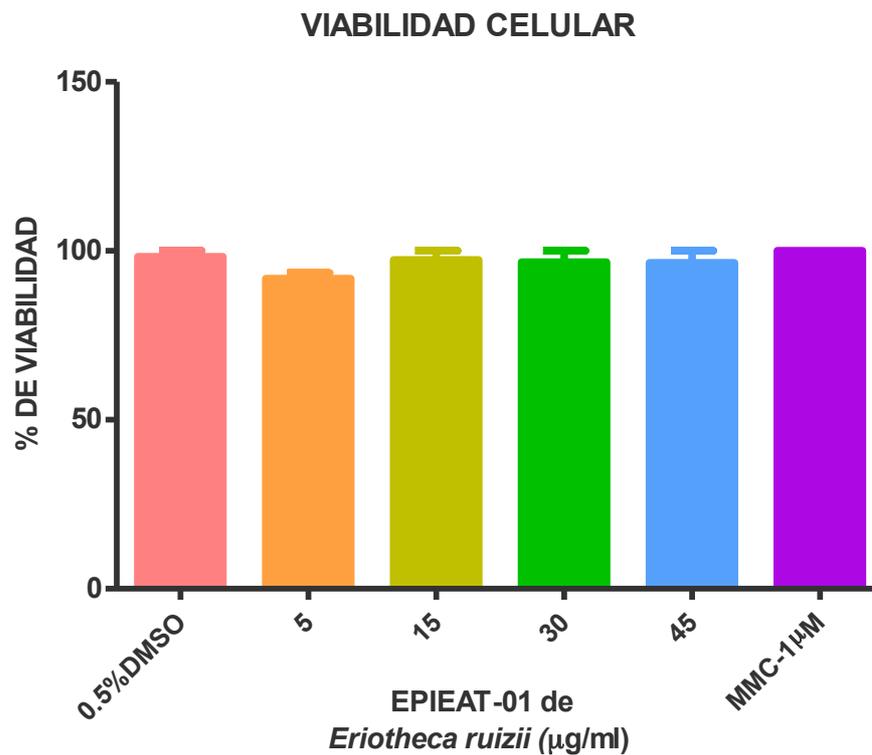
Ensayo cometa

Los datos obtenidos en el programa Comet Assay IV, se procesaron en el programa GraphPad Prism 5, se utilizó el test de Shapiro Wilk para evaluar si los datos tienen una distribución normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis, con pos test de Bonferroni.

CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1 Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio

Una vez expuestas las células CHO-K1 a dosis de 5, 15, 30 y 45 $\mu\text{g/ml}$ EPIAET-01, control negativo al 0,5% de DMSO y control positivo con Mitomicina C durante 24 horas, se determinó la viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio. En la Gráfica 1 se observa que la viabilidad celular es mayor al 90% en todas dosis probadas, e inclusive en control positivo, datos necesarios para evitar el incremento de genotoxicidad por muerte celular.

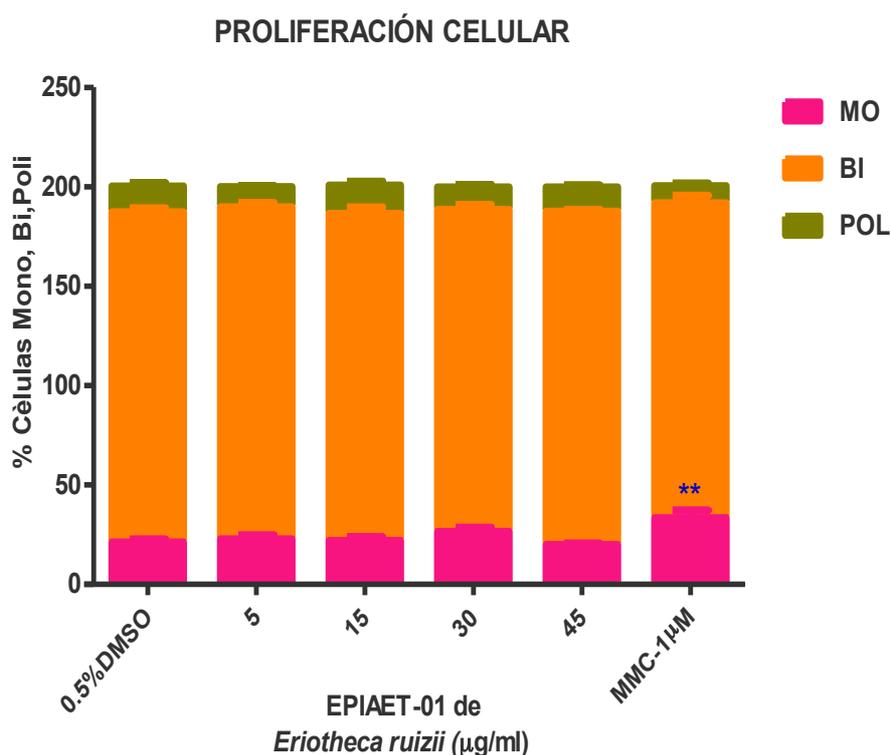


Gráfica 1. Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio. Células CHO-K1 expuestas a dosis de 5, 15, 30 y 45 $\mu\text{g/ml}$ de EPIAET-01, control negativo DMSO al 0.5% y control positivo Mitomicina C. Los resultados muestran la media \pm EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado (N=6). Fueron analizados mediante ANOVA.

Fuente: Autor

Elaboración: Autor.

Posteriormente se procedió con los ensayos de genotoxicidad, mediante el ensayo de MNCB, en el cual se estableció la proliferación de las células, como se puede observar en la Gráfica 2, el EPIAET-01 no produce modificaciones en la cantidad de células mono, poli y bi-nucleadas con respecto al control negativo a diferencia de la Mitomicina C (control positivo), en donde existe un mayor número de células mono-nucleadas ($p < 0,0027$).

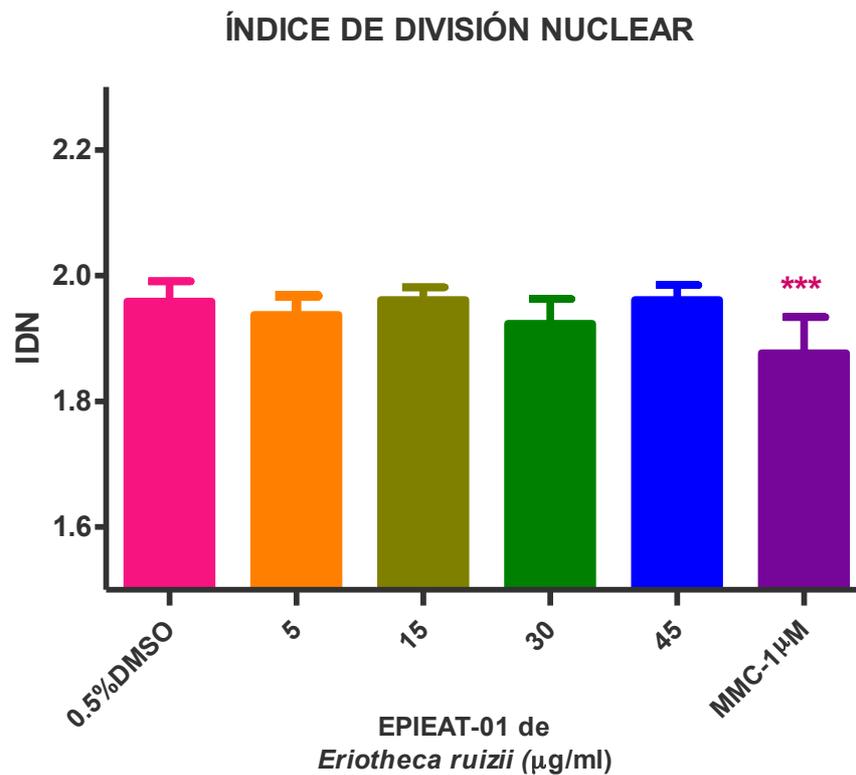


Gráfica 2. Proliferación celular. Porcentaje de células Mono, Bi y Poli; control negativo DMSO al 0.5% y control positivo Mitomicina C (1 μM). Los resultados muestran la media \pm EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado (N=6). Se analizó mediante ANOVA con un post-test de Dunnett. ** $p < 0.0027$.

Fuente: Autor

Elaboración: Autor.

El índice de división nuclear permite medir el efecto citostático, en las células expuestas a las diferentes dosis de EPIAET-01 (Gráfica 3) no existe este efecto a diferencia del control positivo que de acuerdo al test de Dunnett hay una diferencia significativa en comparación con el control positivo ($p < 0,0003$).

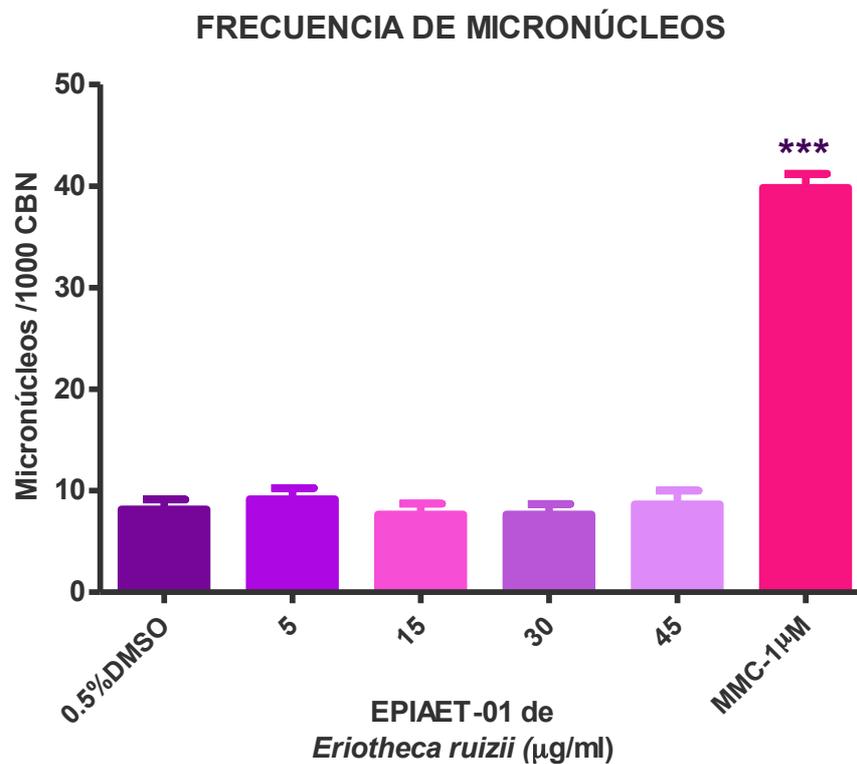


Gráfica 3. Índice de división nuclear de las diferentes dosis de *Eriotheca ruizii*, control negativo DMSO al 0.5% y control positivo Mitomicina C. Los resultados muestran la media \pm EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado (N=6). Se usó el Test de Dunnett. *** ($p < 0,0003$).

Fuente: Autor

Elaboración: Autor.

En cuanto al daño genotóxico medido por la frecuencia de micronúcleos no hubo incremento de micronúcleos en ninguna de las dosis probadas. Si existió diferencias del control positivo con Mitomicina C con respecto al control negativo con un $p < 0.0001$. (Gráfica 4). Efectos similares se observó con brotes y puentes nucleares.

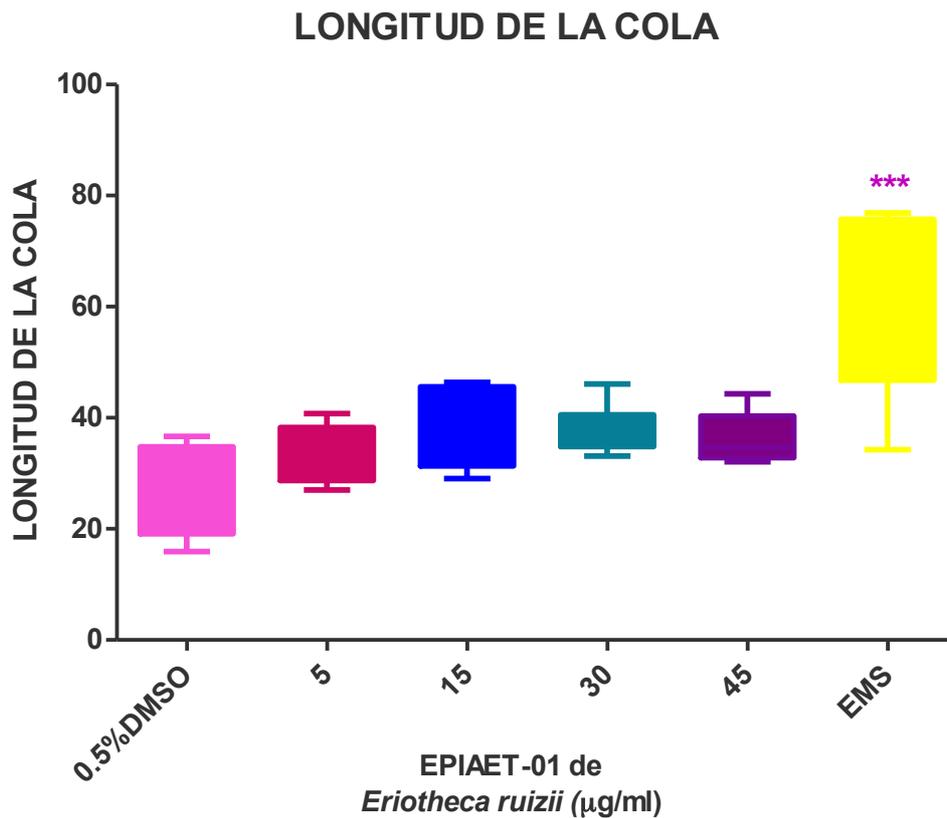


Gráfica 4. Frecuencia de MN en células CHO-K1 expuestas a diferentes concentraciones de *Eriotheca ruizii*. Se empleó como control negativo DMSO al 0.5% y como control positivo mitomicina C. Los resultados muestran la media \pm EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado (N=6). Se usó el Test de Dunett. *** $p < 0.0001$.

Fuente: Autor

Elaboración: Autor.

El análisis genotóxico también fue llevado a cabo con la prueba del ensayo cometa. En la Gráfica 5 se puede observar que no hay daño genotóxico en relación de la longitud de la cola de las células expuestas a las diferentes dosis del extracto EPIAET-01 y el control negativo. Se puede apreciar una diferencia significativa entre el control positivo vs el control negativo.

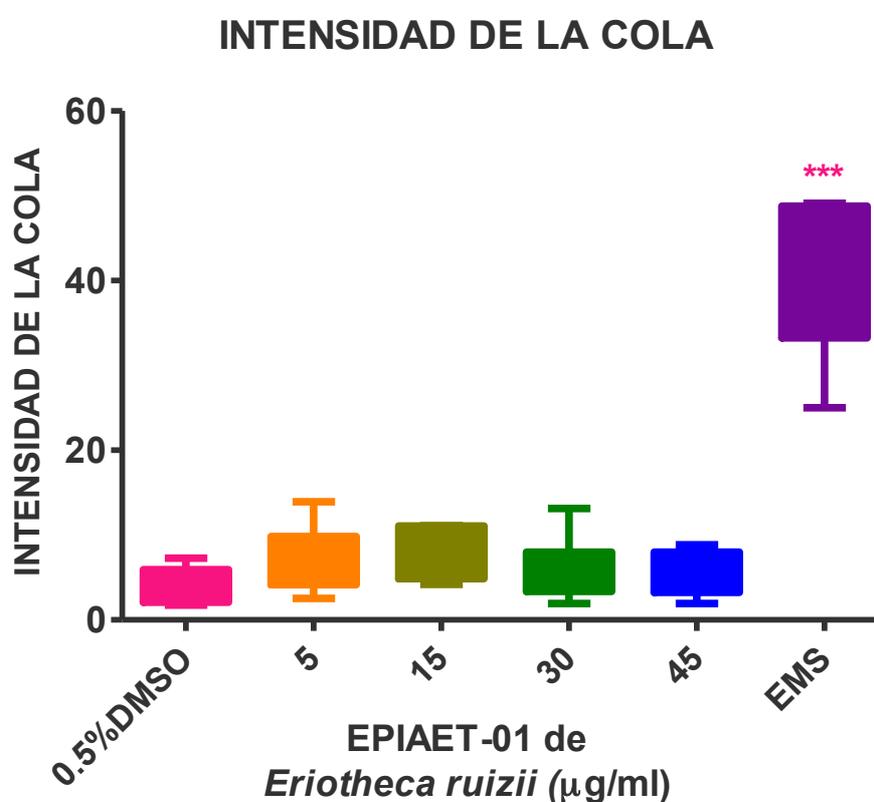


Gráfica 5. Longitud de la cola de células CHO-K1 en ensayo Cometa expuestas a diferentes concentraciones de EPIAET-01. Se empleó como control negativo DMSO al 0.5% y como control positivo EMS al 2 μM . Los resultados muestran la media \pm EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado (N=6). Se usó el test Kruskal-Wallis con pos test de Bonferroni *** ($p < 0.0001$)

Fuente: Autor

Elaboración: Autor.

Otro parámetro del ensayo cometa es la intensidad de la cola en donde tampoco se observó daño genotóxico en relación de la intensidad de la cola de las células CHO-K1 expuestas a las diferentes concentraciones de EPIAET-01. En la Gráfica 6, se puede apreciar que no hay diferencia significativa entre las dosis probadas y el control negativo, presentando menor actividad genotóxica en comparación con el control positivo con EMS.

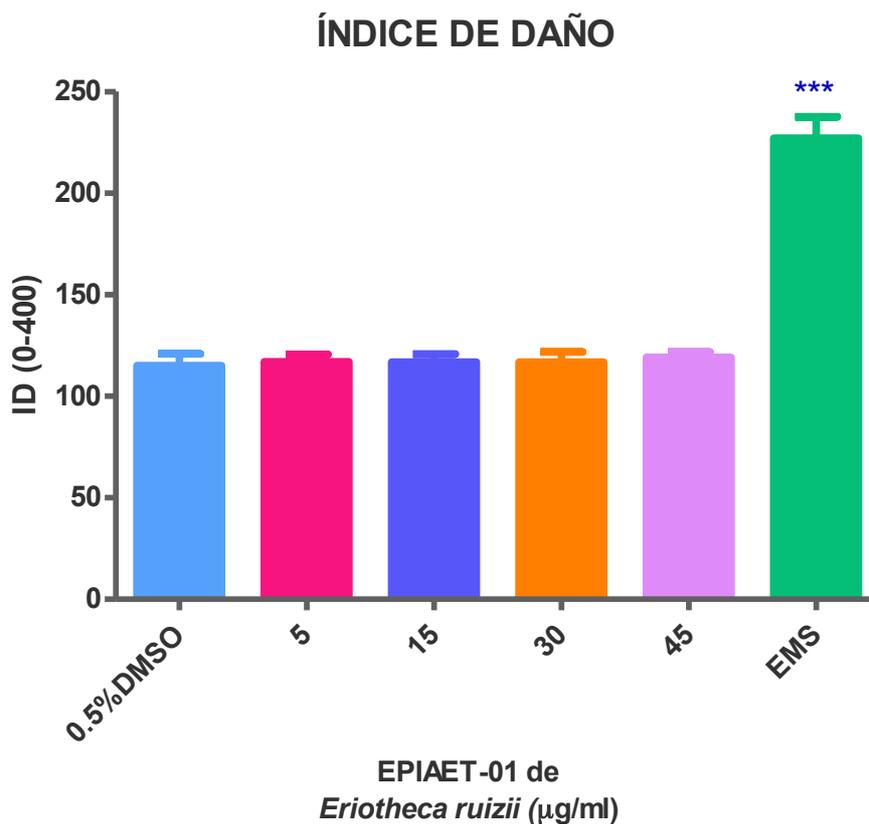


Gráfica 6. Intensidad de la cola de células CHO-K1 en ensayo Cometa expuestas a diferentes concentraciones de EPIAET-01. Se empleó como control negativo DMSO al 0.5% y como control positivo EMS al 2 μM . Los resultados muestran la media \pm EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado (N=6). Se usó el test Kruskal-Wallis con un pos test de Bonferroni *** ($p < 0.0001$)

Fuente: Autor

Elaboración: Autor.

En la Gráfica 7 se puede observar que mediante el cálculo del Índice de daño planteado por Collins, tampoco se observa daño genotóxico en las dosis probadas en comparación al control negativo.



Gráfica 7. Índice de daño genotóxico. Células CHO-K1 en ensayo Cometa expuestas a diferentes concentraciones de EPIAET-01. Se empleó como control negativo DMSO al 0.5% y como control positivo EMS al 2µM. Los resultados muestran la media ± EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado (N=6). Se analizó mediante ANOVA con un post-test de Dunnett. *** $p < 0,0001$.

Fuente: Autor

Elaboración: Autor.

CAPITULO V. DISCUSIÓN

Las plantas medicinales son conocidas por sus compuestos biológicamente activos los cuales han sido utilizados durante muchos años en el tratamiento de enfermedades, y a pesar de que las plantas medicinales aun representan una fuente importante de nuevas identidades moleculares (Sponchiado et al., 2016), se conoce que ciertos compuestos fitoquímicos son causantes de enfermedades, metabolitos de los cuales hoy se sabe interactúan con el ADN causando daño, como por ejemplo el *Ginkgo biloba* que según Grollino et al., 2017, el extracto de las hojas de esta planta induce cáncer de hígado en base a modelos experimentales recientes, lo que sugieren un mecanismo genotóxico en el proceso de carcinogénesis; otra especie que se sabe que produce daño genotóxico es la *Crataegus oxycanta* que en concentraciones menores a 10 µg/ml induce un incremento significativo de micronúcleos en células binucleadas, tanto en linfocitos de sangre periférica como en células HepG2 (Oliveira de Quadros et al., 2017); ciertas especies de *Aristolochia* (usadas para bajar de peso) poseen actividad genotóxica, debido a que forma de aductos de ADN en células renales (Ekor, 2014). Sin embargo el extracto de *Eriotheca ruizii* probado no induce genotoxicidad a las dosis probadas.

Los resultados indican que no hay daño genotóxico según el test de micronúcleos, prueba que constituye un biomarcador de ruptura cromosómica o pérdida cromosómica completa, además que permite descartar procesos carcinógenos como rezago de los cromosomas (Michael Fenech et al., 2016; Thomas & Fenech, 2011); y el hecho de que en el ensayo cometa (ensayo de alta sensibilidad), el cual permite la determinación de acción genotóxica al detectar el daño en el ADN, sobre todo por las rupturas de cadena, la formación de sitios lábiles o álcalis, los entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas (Rodríguez R., Noris-García, & Fundora Torres, 2016), e incluso medir el estrés de tipo oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ROS), implicados en el daño de ADN (Manas et al., 2013), demuestran que el extracto no estaría interactuando con el material genético por lo que las rutas involucradas en el proceso de muerte celular serían otras. Estos resultados nos dan una mayor seguridad de que estamos frente a un extracto que no induce a daño genotóxico y al que se le puede dar otros usos medicinales.

Se conoce que los agentes que provocan daño al ADN son potentes inductores de muerte celular por apoptosis, si las células detectan daño en el material genético activan tres posibles vías como: reparación del ADN, control del ciclo celular y apoptosis, esta última activada por p53; por lo que si el daño no es reparable se genera un proceso de apoptosis

(muerte celular programada) (Roos & Kaina, 2013). El extracto de *Eriotheca ruizii* probado induce citotoxicidad en líneas celulares tumorales en concentraciones <50µg/ml, pero al no producir daño genotóxico, probablemente se encuentra activando otras vías de muerte celular independientes de daño al ADN, como podría ser necrosis que se caracteriza por la rápida pérdida del potencial de membrana, esto como consecuencia de depleción de la energía celular, daño en los lípidos de membrana y/o pérdida de la función de bombas iónicas o canales homeostáticos (Bonora et al., 2015). La depleción de energía basada en falla mitocondrial, se produce por alteración de la permeabilidad de la membrana, lo que conduce a muerte celular independientemente de la actividad de caspasas (apoptosis). La transcripción de la permeabilidad mitocondrial (MPT) es un mecanismo de tipo necrótico, que causa muerte celular por colapso energético (Bonora et al., 2015; Tait & Green, 2010). Otro proceso que podría estar activado es el agotamiento ATP lo que desencadena en la pérdida de la homeostasis de la membrana plasmática resultando en muerte celular causada por una pérdida de NAD (Del Nagro, Xiao, Rangell, Reichelt, & O'Brien, 2014).

Según Refaat et al., 2014, a la familia *Bombacaceae* a la cual pertenece el extracto en estudio se le han venido realizando investigaciones de las cuales se sabe que poseen valiosa actividad biológica con bajos perfiles de toxicidad, con este estudio reforzamos este postulado al no inducir daño genotóxico, lo que queda demostrado incluso con una prueba tan sensible como es el ensayo del cometa (Rodríguez R. et al., 2016), al menos en lo que respecta al extracto de *Eriotheca ruizii*. Otra especie que ha sido estudiada, es la *Chorisia speciosa*, especie que pertenece a la familia *Bombacaceae*, el extracto *Chorisia speciosa* tiene marcadas actividades farmacológicas antimicrobianas, antipiréticas y antiinflamatorias (Khan, Asadsaeed, Chaudhary, Ahmad, & Ansari, 2016).

Estos resultados son el principio de una serie de pruebas que se deben llevar a cabo con el fin de determinar, que vía de muerte celular estaría activando el extracto EPIAET-01 en las líneas celulares tumorales, para cual se podría utilizar el ensayo de potencial de membrana mitocondrial y evaluación de los niveles de ATP (Bonora et al., 2015).

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación podemos decir que estamos frente a un extracto que puede ser utilizado en el tratamiento de enfermedades por su baja toxicidad y que además podría ser la base para desarrollar compuestos que sirvan en el tratamiento anticancerígeno.

CONCLUSIONES

El extracto de acetato de etilo de la corteza del bulbo de *Eriotheca ruizii* (EPIAET-01) mostró efecto citotóxico sobre la línea celular CHO-K1 menor al 10% incluso en la dosis más alta probada de 45 µg/ml.

De acuerdo con el índice de división nuclear, en las dosis probadas, EPIAET-01 no tiene efecto citostático sobre la línea celular CHO-K1.

El extracto EPIAET-01 no generó daño genotóxico sobre las células CHO-K1, medido por el test de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, y también utilizando los parámetros de longitud y también utilizando los parámetros de longitud de cola, intensidad de cola e índice de daño genotóxico del ensayo cometa.

RECOMENDACIONES

Debido al uso medicinal del extracto y la posible actividad citotóxica en líneas tumorales además que de su baja genotoxicidad, se recomienda realizar ensayos complementarios como el ensayo de potencial de membrana mitocondrial y evaluación de los niveles de ATP, para determinar la ruta de muerte celular que el extracto EPIAET-01 estaría activando en las líneas tumorales.

También sería recomendable comprobar la ausencia de generación de daño genotóxico del extracto en otros modelos biológicos como células humanas normales así como otros test de genotoxicidad como el test de Ames, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromáticas hermanas entre otras.

BIBLIOGRAFÍA

- Bonora, M., Wieckowski, M. R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L., & Pinton, P. (2015). Molecular mechanisms of cell death: Central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene*, *34*(12), 1475–1486. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.96>
- Del Nagro, C., Xiao, Y., Rangell, L., Reichelt, M., & O'Brien, T. (2014). Depletion of the Central Metabolite NAD leads to oncosis-mediated cell death. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(51), 35182–35192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.580159>
- Didenko, V. (2011). *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo Methods and Protocols*. (V. Didenko, Ed.). Huston, Texas: www.springer.com/series/7651. Retrieved from www.springer.com/series/7651
- Eastmond, D. A. (2017). Recommendation for the evaluation of complex genetic toxicity data sets when assessing carcinogenic risks to human. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1002/em>
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Neurology*, *4* JAN(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>
- Fagundes, G. E., Damiani, A. P., Borges, G. D., Teixeira, K. O., Jesus, M. M., Daumann, F., ... Moraes De Andrade, V. (2017). Effect of green juice and their bioactive compounds on genotoxicity induced by alkylating agents in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, *80*(13–15), 756–766. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1357307>
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Methods in Molecular Biology*, *5*, 1084–1104. <https://doi.org/10.1038>
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., ... Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, *26*(1), 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., ... Kirsch-Volders, M. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo

- and ex vivo in humans. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 770, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.04.008>
- Gollapudi, B. B. (2017). An ongoing journey toward a risk-based testing in genetic toxicology. *Current Opinion in Toxicology*, 3, 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.06.012>
- Grollino, M. G., Raschellà, G., Cordelli, E., Villani, P., Pieraccioli, M., Paximadas, I., ... Pacchierotti, F. (2017). Cytotoxicity, genotoxicity and gene expression changes elicited by exposure of human hepatic cells to Ginkgo biloba leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, 109(October), 486–496. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.09.042>
- Herráez, Á. (2012). *Biología molecular e ingeniería genética*. (Elsevier, Ed.) (2 Edición). España.
- ICH. (2012). *Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use*. (Vol. 2).
- Kawaguchi, S., Nakamura, T., Yamamoto, A., Honda, G., & Sasaki, Y. F. (2010). Is the Comet Assay a Sensitive Procedure for Detecting Genotoxicity? *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 1–8. <https://doi.org/10.4061/2010/541050>
- Khan, A., Asadsaeed, M., Chaudhary, M. A., Ahmad, Q., & Ansari, F. (2016). ANTIMICROBIAL , ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIPYRETIC ACTIVITY OF CHORISIA SPECIOSA LEAVES . (BOMBACACEAE), (December 2015).
- Laffita, O., & Castillo, A. (2011). ACTUALIZACIÓN DE TEMA: Avances en la caracterización farmacotológica de la planta medicinal Curcuma longa Linn. *Medisan*, 16(1), 97–114.
- MAE. (2012). Especies Forestales. *Bosques Secos En Ecuador Y Su Diversidad*, 162–187. Retrieved from <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/10/Bosques-Secos4.pdf>
- Manas, F., Peralta, L., Ugnia, L., Weyers, A., Garcia Ovando, H., & Gorla, N. (2013). Oxidative stress and comet assay in tissues of mice administered glyphosate and ampa in drinking water for 14 days. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics*, 24(2), 67–75.
- Mattana, C. M., Cangiano, M. A., Alcar??z, L. E., Sosa, A., Escobar, F., Sabini, C., ... Laciari, A. L. (2014). Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of acacia aroma leaf extracts. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/380850>
- Mauriz T., I., & Martínez P., J. M. (2014). AGENTES GENOTÓXICOS: Métodos de

detección y evaluación, 66, 1–11.

- Mendoza-Meza, D. L., & España-Puccini, P. (2016). CYTOTOXIC AND GENOTOXIC ACTIVITY OF PHENOLIC FRACTIONS FROM *Uromoides dermestoides* FAIRMAIRE, 1893 (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE), IN HACAT CELLS. *Tip*, 19(2), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.001>
- Mudry, M. D., & Carballo, M. A. (2006). *GENÉTICA TOXICOLÓGICA*. (D. L. C. VIENTOS, Ed.). Buenos Aires- Argentina.
- Neira F, L. F., Vera A, A. M., & Escobar, P. (2016). Genotoxicidad del nifurtimox en diferentes líneas celulares utilizando el ensayo cometa. *Revista Médica de Risaralda*, 22(1), 3–8. <https://doi.org/10.22517/25395203.13601>
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>
- Oliveira de Quadros, A. P., Christofolletti Mazzeo, D. E., Marin-Morales, M. A., Perazzo, F. F., Rosa Pires, P. C., & Maistro, E. L. (2017). Fruit extract of the medicinal plant *Crataegus oxyacantha* exerts genotoxic and mutagenic effects in cultured cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 80(3), 161–170. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1272517>
- Rasool Hassan, B. A. (2012). Medicinal Plants (Importance and Uses). *Pharmaceutica Analytica Acta*, 3(10), 4172. <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000e139>
- Refaat, J., Y. Desoukey, S., A. Ramadan, M., & S. Kamel, M. (2014). Bombacaceae Between the Ethnomedical Uses and Pharmacological Evidences: A Review. *The Natural Products*, Volume 4, 254–270(17). Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/npj/2014/00000004/00000004/art00004>
- Ritter, D., & Knebel, J. (2009). Genotoxicity testing in vitro - Development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. *Toxicology in Vitro*, 23(8), 1570–1575. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.007>
- Rodríguez R., A., Noris-García, E., & Fundora Torres, M. T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 35(2), 184–194.
- Romero Serrano, C. S. (2016). *Efectos alelopáticos de Eriotheca ruizii sobre cultivos de importancia agronómica*. Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL).
- Roos, W. P., & Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters*, 332(2), 237–248.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007>

- Shah, S. U. (2012). Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(2), 43–54.
- Simoniello, M. F., Kleinsorge, E. C., & Carballo, M. A. (2010). Biochemical evaluation on rural workers exposed to pesticides. *Medicina*, 70(6), 489–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163734>
- Sponchiado, G., Adam, M. L., Silva, C. D., Silva Soley, B., De Mello-Sampayo, C., Cabrini, D. A., ... Otuki, M. F. (2016). Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 178(December), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.026>
- Taufert Cardona, Y., & Marin Morales, M. (2015). MAIN REPAIR MECHANISMS FOR DAMAGES IN THE DNA MOLECULE, 13(2), 95–110.
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 621–632. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>
- Thomas, P., & Fenech, M. (2011). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. *Methods in Molecular Biology*, 682, 217–234. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-409-8_16
- Vargas, V. M. F., Guidobonot, R. R., & Henriques, J. A. P. (1991). GENOTOXICITY OF PLANT EXTRACTS Aqueous extracts of seven species used in Brazilian popular medicine (*Achyrocline satureoides* , (*Salmonella* / microsome). Positive results were obtained for A . *satureoides* , B . *anomala* and L . of A . *satureoides* extract, 86, 67–70.