



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO GENOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS
HEXÁNICO, ACETATO DE ETILO Y METANÓLICO
DEL FRUTO DE LA PLANTA MEDICINAL: *Annona
Montana* Macfad, MEDIANTE ENSAYO COMETA EN
LINFOCITOS HUMANOS”**

**Previo a la obtención del título
de Bioquímico Farmacéutico**

AUTORA:

Glenda Elizabeth Granda Soto

DIRECTORA:

Dra. Natalia Bailón Moscoso

Loja – Ecuador
2010

Dra.
Natalia Bailón Moscoso
DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el proyecto de investigación efectuado por la Srta. Glenda Elizabeth Granda Soto, previo a la obtención del Título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, Junio 2010

Dra. Natalia Bailón Moscoso
DIRECTORA

AUTORÍA:

Las ideas, conceptos y resultados desarrollados en el presente trabajo de investigación son de absoluta responsabilidad de su autor.

Glenda Elizabeth Granda Soto

DEDICATORIA

Quiero dedicar el presente trabajo en primer lugar a Dios y a la Santísima Virgen de El Cisne, ya que gracias a su voluntad pude llegar a culminar una etapa más de mi vida.

A mis queridos padres Mercedes y Cosme por ser el pilar fundamental en mi vida ya que con sus sabios consejos me pudieron guiar por el camino del bien.

A mis queridos hermanos Yhadina, Verónica y Cristhian por el apoyo desinteresado que han sabido brindar para mi superación personal y a mí querido sobrino que por su inocencia me impulso a seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en la persona del Ph. Dr. Luís Miguel Romero Fernández y ahora del Ph. Dr. José Barbosa, por su infinita bondad que me permitieron culminar mis estudios y así lograr una etapa muy importante en mi vida.

Al Centro de Biología Celular y Molecular, por haberme permitido aplicar mis conocimientos y desarrollar destrezas.

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia, bajo la Dirección de la Dra. Paula Torres B. y ahora del Ph. Dr. Omar Malagón, por prestar todo el apoyo necesario para felicitar el aprendizaje diario dentro de la vida universitaria.

A la Dra. Natalia Bailón M, por ser mi Directora de Tesis, con quien aprendí muchas cosas valiosas y por su exigencia continua y preocupación no solo en lo laboral, si no en lo personal.

A mi Madre y a mi Padre por ser mi pilar fundamental en mi vida, por su Ternura, Amor y Comprensión, por luchar junto a mí y sus eternas oraciones ya que así no me dejaron caer.

A mis hermanos por sus constantes preocupaciones y por su infinito apoyo, gracias a mi sobrinito, abuelita, tíos, y primos por su cariño y ayuda.

A mis compañeros del área de Genética Toxicológica, por tenerme mucha paciencia en aquellos días en donde el estrés podía más que yo. Gracias por su ayuda.

A María Isabel quien siempre estuvo presta a escucharme y ayudarme, por buscar junto a mí las respuestas a mil dudas, mil gracias por compartir tus conocimientos y amistad. De la misma manera a Henry, Junior y Cristhian por colaborar en la realización de este proyecto.

A todos los compañeros del aula por estar prestos a brindar todo el apoyo que se requiere en la vida estudiantil.

A mis mejores amigas, por estar siempre a mi lado en las buenas y las malas, gracias por su buen humor, y por levantarme el ánimo cuando a veces las cosas no salían bien.

Y a todas y cada una de las personas, que por la fragilidad de mi memoria no recuerdo en este momento, pero que siempre me apoyaron.

Muchas Gracias...

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS

Yo, Glenda Elizabeth Granda Soto 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”.

Glenda Elizabeth Granda Soto
TESISTA

Dra. Natalia Bailón M.
DIRECTORA DE TESIS

TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	II
AUTORÍA	III
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTO	V
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS	VII
TABLA DE CONTENIDOS	VIII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
OBJETIVOS	XVII
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 GENOTOXICIDAD	1
1.2 CARCINÓGENOS	4
1.2.1 Carcinógenos químicos	4
1.2.2 Radiaciones	5
1.2.3 Los virus	5
1.3 RELACIÓN ENTRE CARCINOGENESIS Y GENOTOXICIDAD	6
1.4 BIOMARCADORES	7
1.4.1 Biomarcadores de exposición	7
1.4.2 Biomarcadores de sensibilidad individual	8
1.4.3 Biomarcadores de efecto	8
1.5 ENSAYO COMETA	8
1.5.1 Tipos de Ensayo Cometa	9
1.5.2 Factores que Influyen en el Ensayo Cometa	10
1.5.3 Ventajas del ensayo	10
1.5.4 Aplicaciones del ensayo	11
1.6 FLORA, UNA FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	13
1.6.1 <i>Annona montana</i> MACFAD	14
1.6.1.1 Descripción del árbol	14
1.6.1.2 Los frutos	15
2. MÉTODOS	
2.1 Modelo biológico	17
2.2 Compuestos de prueba	17
2.2.1 <i>Annona montana</i> M.	17
2.2.2 Control positivo EMS	17
2.3 Viabilidad por captación de FDA-Br Et	18

2.4	Ensayo Cometa	19
2.5	Análisis Estadístico	21
2.5.1	Viabilidad por captación de FDA-Br Et	21
2.5.2	Ensayo Cometa	21
2.6	Esquema del Ensayo Cometa	22
3.	RESULTADOS	
3.1	Viabilidad por captación de FDA-Br Et	
3.1.1	Viabilidad con extracto hexánico del fruto de <i>Annona montana</i> M.	24
3.1.2	Viabilidad con extracto de Acetato de etilo del fruto de <i>Annona montana</i> M.	25
3.1.3	Viabilidad con extracto Metanólico del fruto de <i>Annona montana</i> M.	26
3.2	COMETA	
3.2.1	Largo de cola con extracto Hexánico del fruto de <i>Annona montana</i> M.	27
3.2.2	Largo de cola con extracto de Acetato de etilo del fruto de <i>Annona montana</i> M.	28
	Largo de cola con extracto Metanólico del fruto de <i>Annona montana</i> M.	29
3.3	CLASIFICACIÓN POR DAÑO DEL ADN DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO, ACETATO DE ETILO Y METANÓLICO DEL FRUTO DE <i>Annona montana</i> M.	30
3.4	COMPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO, ACETATO DE ETILO Y METANÓLICO DEL FRUTO DE <i>Annona montana</i> M. PARA OBSERVAR EL DAÑO GENOTÓXICO	32
4.	DISCUSIÓN	33
5.	CONCLUSIONES	36
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía N°1: Microfotografía de un Cometa	9
Fotografía N° 2: <i>Annona montana</i> M	14
Fotografía N° 3: Frutos de <i>Annona montana</i> M	15

ÍNDICE DE TABLA

Tabla N°1: Diseño de Tratamiento	18
Tabla N°2. Esquema del diseño experimental.	23

ÍNDICE DE DIAGRAMA

Diagrama N°1. Niveles de daño al ADN	21
--------------------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Batería de Ensayos Genotóxicos.	3
Figura N°2: Clasificación de los carcinógenos	4
Figura N°3: Usos del ensayo cometa en diferentes estados de biomonitorización.	12
Figura N°4: Ejemplos de tipos estructurales de acetogeninas de Anonáceas	16
Figura N°5: Imagen del ensayo de viabilidad. Células verdes (vivas) y rojas (muertas)	19
Figura N° 6: Esquema del Ensayo Cometa.	22

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N°1: Viabilidad con Extracto hexánico del fruto de <i>Annona montana</i> M.	24
Gráfico N°2: Viabilidad con Extracto de acetato de etilo del fruto de <i>Annona montana</i> M.	25
Gráfico N°3: Viabilidad con Extracto metanólico del fruto de <i>Annona montana</i> M.	26
Gráfico N°4: Largo de Cola con Extracto Hexánico del fruto de <i>Annona montana</i> M.	27
Gráfico N°5: Largo de Cola con Extracto de acetato de etilo del fruto de <i>Annona montana</i> M.	28
Gráfico N°6: Largo de Cola con Extracto metanólico del fruto de <i>Annona montana</i> M.	29
Gráfico N° 7: Clasificación de los niveles de daño del ADN del Extracto Hexánico del fruto de <i>Annona montana</i> M.	30
Gráfico N° 8: Clasificación de los niveles de daño del ADN del Extracto de acetato de etilo del fruto de <i>Annona montana</i> M.	31
Gráfico N° 9: Clasificación de los niveles de daño del ADN del Extracto metanólico del fruto de <i>Annona montana</i> M.	31
Gráfico N°10: Comparación de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico del fruto de <i>Annona montana</i> M.	32

RESUMEN

Annona montana M. conocida también como chirimoya de campo, pertenece a la familia Annonaceae. Se encuentra ubicada en las áreas tropicales de América y es nativa de los valles andinos del Ecuador, localizándola principalmente en el Cantón Catamayo de la Provincia de Loja. En la medicina tradicional se la utiliza para aliviar los síntomas la influenza e insomnio y en ciertos casos para el tratamiento de piojos a partir de la infusión de las hojas y frutos de la planta.

Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto genotóxico producido por los extractos hexánico, acetato de etilo y metabólico del fruto de *Annona montana* M. en linfocitos humanos mediante el ensayo cometa.

Las dosis empleadas fueron de 5, 15, 25 $\mu\text{g/ml}$ de los extractos y 0,1 μM del control positivo (EMS), sobre los linfocitos, con un periodo de exposición de 3 horas.

Los resultados del estudio muestran que existe un efecto genotóxico dosis dependiente de los diferentes extractos del fruto de *A. montana* M; ya que a medida que la concentración aumenta se observó mayor migración en el ADN; causando mayor daño el extracto hexánico y metanólico.

Palabras Claves: Ensayo cometa, extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Annona montana* M, genotoxicidad.

ABSTRACT

Annona montana M. also known as chirimoya mountain, it belongs to the Annonaceae family, it is found in tropical areas of America and it also is native to the Andean valleys of Ecuador. This plant is located mainly in the Catamayo canton of Loja's province. In traditional medicine the infusion of the leaves and its fruits are used in order to relieve the flu, insomnia and lastly in some cases for treatment of remove lice.

The aim of this project was the determination of the genotoxic effect produced by the: hexane, ethyl acetate and methanol extract of *Annona montana* M. fruits in human lymphocytes by means of the comet assay.

The doses used were 5, 15, 25 $\mu\text{g/ml}$ of the extract and 0.1 μM of the positive control (EMS), the treatment given to the cells was 3 hours.

The results showed a dose-dependent response of the extracts of *A. Montana* M. The higher the dose of the extracts, the longer the tail of the comet, causing further damage hexane and methanol extract

Key words: Comet assay, extracts of ethyl acetate, hexane and methanol from *Annona Montana* M, *genotoxic*.

OBJETIVOS

General:

- ❖ Evaluar el efecto genotóxico que puede ocasionar los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico del fruto de *Annona montana* M. en linfocitos humanos.

Específicos:

- ❖ Determinar el efecto genotóxico de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico del fruto de *Annona montana* M. en función a la migración del ADN de linfocitos humanos.
- ❖ Establecer la viabilidad del extracto expuesto en los linfocitos humanos para establecer las dosis subtóxicas a las que se probará la genotoxicidad.
- ❖ Correlacionar la actividad genotóxica de los extractos y su interacción con el ADN.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENOTOXICIDAD

La genotoxicidad es el resultado nocivo de la interacción de agentes químicos o físicos con el ADN, y se manifiesta como alteraciones genéticas y/o cambios en el número o estructura de los cromosomas, que pueden incorporarse en generaciones celulares subsecuentes induciendo las mutaciones (Cuenca, *et al.*, 2004).

La alteración del material genético de una célula puede adoptar tres formas:

- El cambio en la composición química del ADN se considera una mutación porque incluye la transformación en la constitución de algunas bases químicas que componen los genes.
- Alteración del ajuste físico del ADN: se considera un hecho clastogénico (inductor de rupturas cromosómicas).
- La adición o supresión de cromosomas: durante la formación de una célula da como resultado un número anormal de cromosomas, fenómeno conocido como aneuploidía (Zuluaga, *et al.*, 2009).

La determinación genotóxica ya sea en agua, aire, alimentos, contaminantes y compuestos naturales con fines terapéuticos, resultan una herramienta útil para la identificación de riesgos a la salud humana y poder desarrollar medidas de prevención y control ya que las mutaciones que alteran la expresión génica se consideran como un rasgo común de todos los tipos de cáncer, aunque muchas de ellas pueden ser ventajosas o neutras que no ocasiona manifestaciones patológicas (Hernández, *et al.*, 2005).

Las alteraciones genómicas asociadas con el cáncer pueden implicar cambios a pequeña escala, como la sustitución de un solo nucleótido, o a gran escala, como reordenaciones cromosómicas, ganancia o pérdida de cromosomas o incluso la interacción de genomas virales en el ADN (Hernández, *et al.*, 2005). Las pruebas de genotoxicidad son ensayos que evidencian las alteraciones causadas al material genético, de manera directa o indirecta, por agentes ambientales, tanto en células somáticas como germinales. La adecuada determinación de la actividad genotóxica exige la disponibilidad de métodos de detección específicos (Arencibia, *et al.*, 2003), hoy en día se recurre a la realización de una batería de test tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que parece claro que ningún único ensayo es capaz de detectar todos los posibles agentes cancerígenos como se observa en la figura N° 1. Entre estos ensayos tenemos: aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, ensayo de micronúcleos y el ensayo cometa (Laffon, *et al.*, 2004).

Cada uno de estos ensayos por sí solo constituye un método de tamizaje valioso para clasificar una sustancia como genotóxica o no, a la vez, la utilización simultánea de ellos permite profundizar en el conocimiento de posibles mecanismos de acción mutagénica (Sánchez, 1999).

BATERÍA DE ENSAYOS GENOTOXICOS

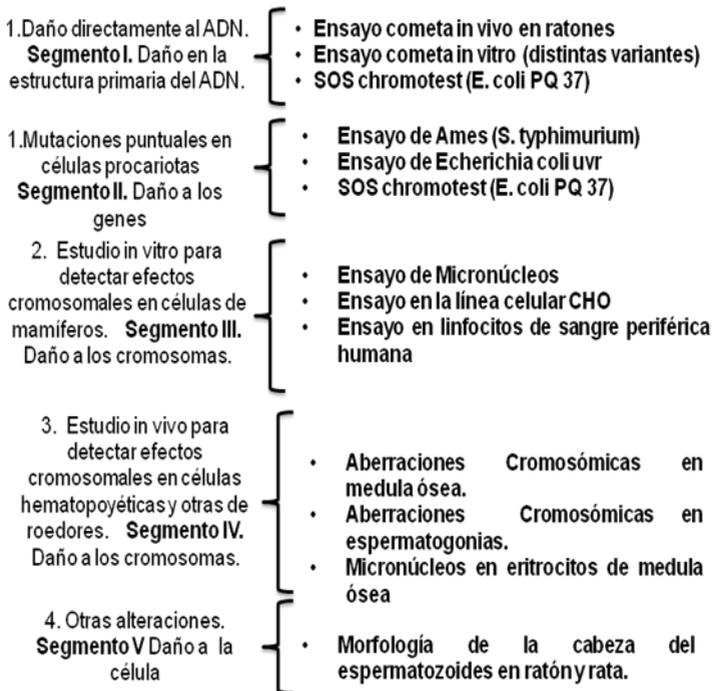


Figura N° 1 Batería de Ensayos Genotóxicos Fuente: Arencibia, *et al.*, 2003

1.2. Carcinógenos

Cada tipo de cáncer posee características que reflejan su origen; la mayoría deriva de una célula anormal (origen monoclonal); las células que conducen al cáncer pueden mostrar, en su mayoría, alteraciones en las secuencias del ácido desoxirribonucleico (ADN) que contienen una aberración heredable; también pueden existir cambios epigenéticos que no afectan directamente el ADN pero sí al patrón de expresión de un gen. En general, el cáncer no

es causado por un solo evento, sino, es el resultado de varios cambios independientes ocurridos en una célula con efectos acumulativos (Díaz, *et al.*, 1998).

Existe una clara relación entre carcinogénesis y mutagénesis inducidas por 3 clases de agentes, como se demuestra en la figura N° 2:

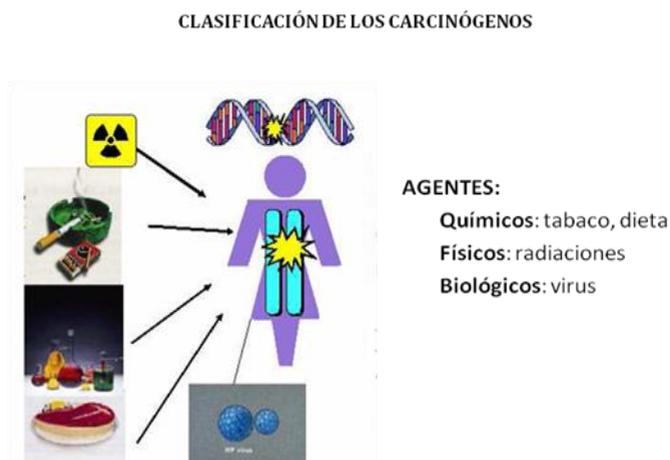


Figura N° 2 Clasificación de los carcinógenos

1.2.1 Carcinógenos químicos: causan cambios locales en la secuencia del ADN en forma de aductos. Son muchas las sustancias electrofilicas que reaccionan con el ADN formando productos de adición covalente (Díaz, *et al.*, 1998).

1.2.2 Carcinógenos Físicos: Las radiaciones ionizantes, la radiación ultravioleta y traumatismos e inflamaciones crónicas son capaces de causar cáncer. El mecanismo

de la carcinogénesis inducida por las radiaciones ionizantes incluye el daño al ADN y su posible reparación. La acción química de las radiaciones ionizantes puede ser directa o indirecta, según las ionizaciones que se produzcan en las mismas moléculas del material que se estudia o que sean los radicales radioinducidos los que causan transformaciones posteriores, provocando translocaciones y rupturas de cromosomas (Díaz, *et al.*, 1998).

1.2.3 Carcinógenos Biológicos: el 5 y 10% de la aparición de los virus producen cánceres en los seres humanos, estos introducen su ADN viral en el ADN de las células huéspedes. Entre los virus que se destacan por producir cáncer tenemos: Hepatitis B, el de Epstein-Barr, los virus herpes simplex, el herpes virus HHV8, y retrovirus como los de la leucemia de células T humanas (HTLV-I y II), el Papiloma Humano (VPH) y el de la inmunodeficiencia (VIH) (Díaz, *et al.*, 1998; Paz-y-Miño, *et al.*, 2003).

Algunos carcinógenos, fundamentalmente químicos, actúan directamente en las células o funcionan indirectamente después de haber sido transformados en metabolitos más reactivos, por ejemplo, en las reacciones electrofílicas sus metabolitos se unen covalentemente a proteínas celulares y al ADN, los compuestos son capaces de interactuar directamente con estas macromoléculas. Entre los carcinógenos humanos más conocidos sólo unos pocos productos químicos pertenecen a la clase de "carcinógenos directos". Por ejemplo, el óxido de etileno, bis (clorometil) éter y algunos derivados de la aziridina o de nitrógeno de la mostaza utilizados en la quimioterapia contra el cáncer (Luch, 2005).

Por otra parte, las reacciones nucleofílicas o compuestos químicamente inertes, como las aminas aromáticas y heterocíclicas, colorantes aminoazobenceno, hidrocarburos aromáticos policíclicos, N-nitrosaminas, olefinas halogenadas, y otros representan la gran mayoría de los carcinógenos humanos. Como estas sustancias no reaccionan directamente con los constituyentes celulares, estos requieren la conversión enzimática en su forma definitiva cancerígena, a lo que se denomina procarcinógenos (Luch, 2005., Díaz, *et al.*, 1998).

1.3. Relación entre Carcinogénesis y Genotoxicidad

Existe una correlación entre genotoxicidad y carcinogenicidad la cual se encuentra bien especificada por diversos datos indirectos. Cuya relación proporciona la base para la aplicación de los biomarcadores de genotoxicidad al control biológico como indicadores del peligro de cáncer.

Por ello los agentes genotóxicos se clasifican en mutagénicos, cancerígenos y teratogénicos.

Algunos de estos carcinógenos inducen mutaciones, amplificaciones genéticas, reorganizaciones cromosómicas y aneuploidías (Lauwerys, 2000).

Se debe considerar que no todos los agentes que contribuyen al desarrollo de cánceres humanos son genotóxicos. Un posible mecanismo de acción para estos carcinógenos no genotóxicos consiste en su capacidad de interferir con los mecanismos de reparación del ADN o de incrementar la respuesta mutagénica a otros agentes,

motivo por el cual se les suele designar con el término de comutágenos (Díaz, *et al.*, 1998).

La carcinogénesis implica mutaciones puntuales y las reorganizaciones cromosómicas activan los protooncogenes o inactivan genes supresores de tumores (Lauwerys, 2000).

El cáncer se asocia con los síndromes de inestabilidad y muchos de los cancerígenos generan intermedios electrófilos que se enlazan en forma covalente con el ADN en los puntos diana de los tumores. Los aductos del ADN inducen errores de codificación y pueden favorecer a las mutaciones (Swenberg, *et al.*, 2008).

1.4. BIOMARCADORES

Un biomarcador es un evento o estado biológico, una señal química, celular, molecular, inmunológica, genética o fisiológica, que puede medir el daño del ADN en un organismo, célula o material biológico.

Los marcadores biológicos o biomarcadores nos indican: exposición a sustancias tóxicas (en planos molecular o celular), efectos adversos en la salud o susceptibilidad a distintos agentes, ya que estos biomarcadores representan cambios en el organismo, o en la célula, y pueden ser cuantificados en diferentes sistemas biológicos (Pando, *et al.*, 2009).

Se considera que un marcador de efecto biológico representa un evento que puede correlacionarse con el daño a la salud y tiene posibilidad predictiva (Martínez, *et al.*, 2005). Los biomarcadores se pueden dividir en tres:

- 1.4.1. **Biomarcadores de exposición:** indican que el agente ha entrado en el organismo, proporcionando información cuantitativa sobre la exposición y

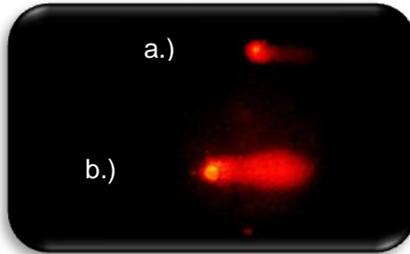
corroborando el ingreso de sustancias tóxicas en el organismo, estos también detectan la presencia de agentes mutagénicos y carcinógenos o sus metabolitos en diversos tejidos o secreciones corporales (Martínez 2005).

1.4.2. Biomarcadores de sensibilidad individual: estos se utilizan para identificar aquellos individuos dentro de una población, que por sus características genéticas, son más susceptibles a los daños causados por diversos agentes ambientales (Martínez 2005).

1.4.3. Biomarcadores de efecto: estos nos indican el estado avanzado del proceso de daño producido, cuando el organismo ya lo ha procesado, pudiendo ser cambios permanentes en la célula, órgano u organismo. De ahí la importancia de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético mediante: Aberraciones Cromosómicas (AC), el Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), Micronúcleos, Mutaciones Génicas a nivel del locus HPRT, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una sola célula (ensayo del cometa), entre otros (Carballo, *et al.*, 2005, Rojas, *et al.*, 2000).

1.5 ENSAYO COMETA

El Ensayo Cometa o electroforesis en gel de células individuales (fotografía N° 1.), es un método sensible, rápido y relativamente de bajo costo para cuantificar el daño en el ADN, este ensayo puede ser aplicado a cualquier célula eucariota y permite el análisis del daño genético a nivel de células individuales (Nadin, *et al.*, 1999, Prieto *et al.*, 1999).



Fotografía N°1. Demostración del Cometa. a.) Cometa daño basal. b.) Cometa con daño genotóxico.

1.5.1 Tipos de Ensayo Cometa

Para la utilización del ensayo cometa ha sido muy importante realizar algunas modificaciones las cuales nos permiten ver los efectos in vitro y explorar mecanismos de acción de agentes potencialmente genotóxico o genoprotectores; dentro de las variantes del ensayo cometa tenemos:

- **Ensayo Cometa neutro:** este método permite detectar rupturas de doble cadena del ADN (Wong, *et al.*, 2005).
- **Ensayo Cometa alcalino ($pH > 13$):** permite detectar roturas de doble y simple cadena, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos entre ADN/ADN o ADN/proteína asociados con sitios de reparación por escisión incompleta en células (Tice, *et al.*, 2000; Cossio, *et al.*, 2004).

1.5.2 Factores que influyen en el ensayo cometa.

La variación intra e interindividual de las muestras de sangre obtenidas de donantes pueden ser algunos factores que causan el daño a nivel del ADN en individuos sin tratamiento los cuales se describen a continuación:

- Edad
- La contaminación del aire
- Dieta
- Género
- Cigarrillo
- Enfermedades infecciosas
- Ejercicio
- Rayos solares (Moller, *et al.*, 2000).

1.5.3 Ventajas del ensayo

Las ventajas del ensayo cometa son: (Tice, *et al.*, 2000.; Wong, *et al.*, 2005.; Oshida, *et al.*, 2008):

- Demostrada sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN.
- Velocidad, simplicidad y bajo costo.
- Requiere de un pequeño número de células.
- Flexibilidad, en desarrollar diferentes combinaciones y condiciones de electroforesis y de elección de enzimas específicas.
- Aplicable a cualquier población de células eucariotas.

1.5.4 Aplicaciones del ensayo

- El Ensayo Cometa se ha empleado para evaluar la genotoxicidad de innumerables agentes físicos, químicos y biológicos tales como rayos U.V, rayos X, H₂O₂, acrilamida entre otros (Urrego, *et al.*, 2005., Nadin, *et al.*, 2001).
- Está técnica se la aplica para la detección de la hipoxia en los tumores de pacientes con cáncer de mama avanzado; para la radioterapia en las enfermedades de Hodgkin y no Hodgkin, linfomas, carcinomas de células escamosas o adenocarcinoma (Anderson, *et al.*, 1998). Además se lo utiliza en el biomonitoreo humano para observar la exposición a factores ambientales o agentes genotóxicos (Dusinska, *et al.*, 2008), como también para el análisis de sensibilidad a radiaciones, puede aplicarse en diferentes circunstancias, lo que lo hace elegible para estudios de campo. En la figura N° 3 demuestra el uso del ensayo cometa en las etapas de biomonitorización (Güerci, *et al.*, 2006; Prieto, *et al.*, 1999).

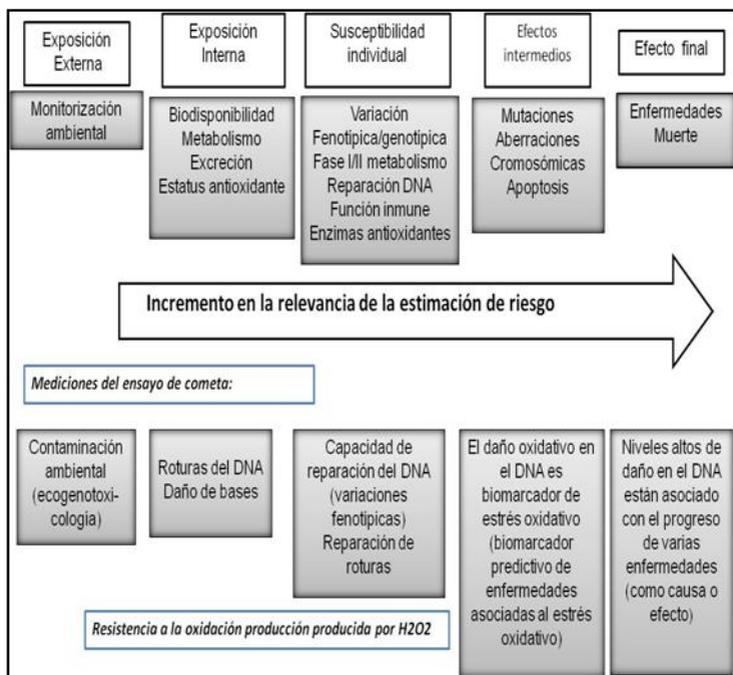


Figura N° 3. Usos del ensayo cometa en diferentes estados de biomonitorización. Fuente Zúñiga, 2009

- Actualmente el ensayo cometa cumple un papel muy importante en los estudios sobre los mecanismos de acción de nuevos fármacos a partir de plantas medicinales, así como el análisis de las interacciones entre los agentes antineoplásicos que actúan a nivel del ADN (Zúñiga, 2009).

1.6 FLORA, UNA FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Los seres humanos han dependido de la naturaleza para satisfacer sus necesidades básicas para la producción de alimentos, refugios, ropa, medios de transporte, los fertilizantes, los sabores, fragancias y los medicamentos (Gurib, 2006). La medicina ha estado vinculada al uso de compuestos provenientes de plantas, animales o microorganismos en las últimas décadas (Sánchez, *et al.*, 2004).

Las plantas han formado la base de sofisticados sistemas de medicina tradicional que existen desde hace miles de años y siguen prestando a la humanidad con nuevos recursos (Gurib, 2006), los avances en los métodos de aislamiento y purificación, así como los análisis espectrométricos, han permitido la caracterización de los principios activos para su uso farmacéutico, ya sea como productos naturales o como moléculas derivadas de ellos (Bruges, *et al.*, 2007).

En la composición de las plantas podemos encontrar metabolitos secundarios que pueden servir como agentes anticancerígenos, los cuales han sido categorizados de acuerdo al uso clínico en cuatro clases de componentes: Alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, taxanos y camptotecinas (Cragg, *et al.*, 2005). A partir de esto radica la importancia del estudio de plantas medicinales para encontrar nuevos anticancerígenos de uso humano.

1.6.1 *Annona montana* Macfad

Dentro de la flora Ecuatoriana encontramos a la familia Annonaceae que comprende cerca de 2500 especies agrupadas en 130 géneros, son importantes fuentes de frutos comestibles, aceite de fragancia. En

los últimos 15 años han sido muy investigadas debido al descubrimiento de las acetogeninas de las Annonaceae (Mootoo, *et al.*, 2000).

Annona montana M. (fotografía N° 2) conocida también como chirimoya de campo, pertenece a esta familia, constituidos por árboles, arbustos y lianas. Se la encuentra principalmente en las áreas tropicales de América, África y Sureste de Asia (Liaw, *et al.*, 2004), siendo nativa de los valles andinos de Ecuador a una altitud de 1500 a 2000 m s.n.m. (Cautín, *et al.*, 2005).



Fuente: Juan Carlos Romero

Fotografía N° 2. *Annona montana* M.

1.6.1.1 Descripción: *Annona montana* M. es un árbol de 10 a 15 metros con ramificaciones bajas muy parecidas a la guanábana. Tiene grandes hojas verdes coriáceas, estas son más resistentes al frío ($> 0^{\circ}$) que la guanábana, toleran una variedad de tipos de suelo y crece bien en condiciones secas. Los árboles producen sus frutos después de dos o tres años (Cautín, *et al.*, 2005). Los frutos son globosos de forma acorazonada, miden de 8 a 12

cm de largo, con la pulpa blanco de sabor dulce y las semillas negras (Fotografía N°3).



Fuente: Juan Carlos Romero

Fotografía N°3. Frutos de *Annona montana* M.

En la medicina popular de Bolivia y Trinidad se la utiliza para aliviar los síntomas de la influenza y el insomnio y en ciertos casos para el tratamiento para piojos, a partir de la infusión de las hojas y frutos de la planta (Mootoo, *et al.*, 2000).

La importancia de la familia *Annonaceae* es que se caracteriza por presentar metabolitos secundarios denominados acetogeninas que demuestran un amplio rango de actividad biológica como: antiparasitaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica y antitumoral. Todas estas características han dado un impulso primordial a las investigaciones bioquímicas y farmacológicas de estas moléculas (Liaw, *et al.*, 2004; Álvarez, *et al.*, 2008). Este tipo de metabolitos secundarios son considerados como uno de los compuestos más potentes antitumorales en los últimos años (Liaw, *et al.*, 2005).

Las acetogeninas son producto de un tipo especial de derivados de ácidos grasos de cadena larga (Wang, *et al.*, 2000), su actividad está relacionada con la capacidad inhibitoria del transporte de electrones a nivel del complejo mitocondrial I (NADH ubiquinona oxido-reductasa) (Zafra, *et al.*, 1996). Estructuralmente, la mayoría de las acetogeninas poseen una cadena alifática de 35 ó 37 átomos de carbono con uno, dos o tres anillos tetrahidrofuránicos (THF) adyacentes o no, así como sustituyentes oxigenados (hidroxilos, cetonas y epóxidos) localizados a lo largo de ésta (Andrade, *et al.*, 1990). En uno de sus extremos presentan un anillo lactónico metil sustituido, α , β insaturado, en ocasiones saturado o ubicado como cetolactona. También se han descrito compuestos con dobles enlaces en la cadena alifática, compuestos con anillos epoxi o tetrahidropirano (THP) así como lineales (Bermejo, *et al.*, 2005).

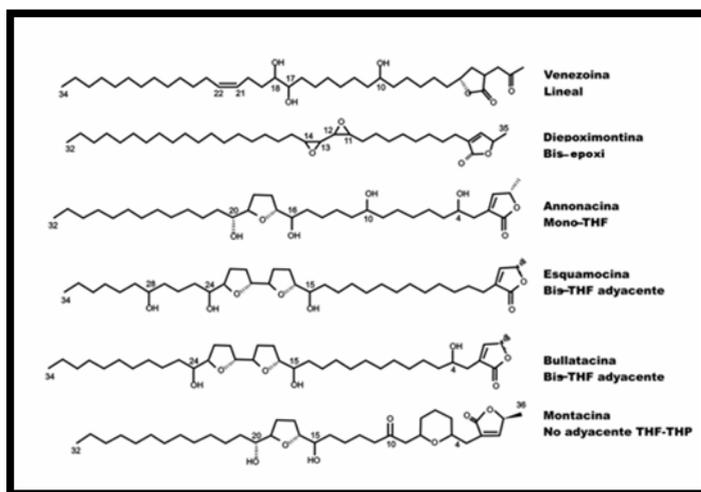


Figura N°4. Ejemplos de tipos estructurales de acetogeninas de Anonáceas. Fuente: Schlie, *et al.*, 2009

2. MÉTODOS

2.1 Modelo Biológico

Como muestra biológica se utilizó linfocitos humanos. Las muestras de sangre heparinizadas fueron obtenidas mediante vía intravenosa, los donantes se encontraban en un rango de edad comprendida entre 20 – 25 años, los cuales estuvieron en condiciones saludables y sin ningún tratamiento farmacológico previo o durante las semanas de muestreo.

2.2 Compuestos de prueba

2.2.1 Extractos del fruto de *A. montana* M.

Annona montana M. fue recolectado en Guayquichuma, ubicado en el Cantón Catamayo de la Provincia de Loja en Agosto del 2007.

Los extractos de acetato de etilo, metanólico y hexánico de *Annona montana* M. fueron donados por el Ing. Juan Carlos Romero del Instituto de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja.

2.2.2 Control Positivo EMS: para este control se utilizó el etil metanosulfonato (EMS) que es un poderoso agente alquilante monofuncional, el mismo que tiene afinidad al ADN (Burns, *et al* 1986). Utilizamos una concentración de 0,1 μ M

2.3 Viabilidad Celular por captación de FDA-Br. Et.:

Para establecer el porcentaje de células vivas en los ensayos, se realizó la técnica de doble tinción con una solución de Diacetato de Fluoresceín (FDA) – Bromuro de Etidio.

Para ello se realizó la siembra en tubos eppendorf con 908.6 μL de medio RPMI (Gibco) suplementado con antibiótico y antimicótico (Gibco) (Penicilina G sodio 100 UI/mL, Estreptomocina sulfato 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y anfotericina B 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), L- glutamina 2 mM (Gibco) y aminoácidos no esenciales al 1% (Gibco); 71,4 μL de sangre heparinizada. Se procedió a incubar a una temperatura de 37 °C con 5% de CO_2 en atmósfera húmeda, durante 3 horas, incluyendo el tratamiento correspondiente (Tabla N°1).

Tabla N°1. Diseño de tratamientos

	Sustancias	Concentraciones
Control negativo	Sangre + medio	-
Tratamiento	Extracto hexánico, acetato de etilo y metanólico + sangre + medio	5, 15, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Control Positivo	EMS	0.1 μM

Luego del tiempo de incubación se procedió a centrifugar durante 2 min a 10000 rpm, desechando el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 mL de RPMI. Seguidamente se centrifugó durante 2 min a 10000 rpm. Eliminando el sobrenadante y se procedió a resuspender el pellet. Paralelamente preparamos en un tubo eppendorf la solución de trabajo, para lo cual se colocaron 600 μL de PBS, 25 μL de Br. Et (Sigma) 0,2 mg/mL y 3.75 μL de Fluoresceín Diacetato (Sigma) 5 mg/ml se mezcló y se mantuvo en hielo.

Posteriormente se mezclaron 20 μL del pellet con 20 μL de la solución de trabajo, de esta mezcla se tomó 20 μl y se colocó en un portaobjetos por duplicado, en seguida se observó al microscopio de fluorescencia (Zeiss) con el objetivo de 40 X, evaluando 200 células entre vivas (verdes) y muertas (rojas) por placa y por duplicado. (Figura N° 5).

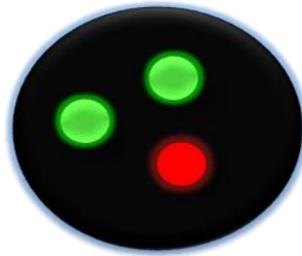


Figura N° 5: Imagen del ensayo de viabilidad. Células verdes (vivas) y rojas (muertas).

2.4 Ensayo Cometa Alcalino

Previamente las laminillas fueron preparadas con 150 μL de agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1 % y seguidamente se esparció uniformemente en un portaobjetos, se dejó secar durante 12 horas mínimo.

Con la suspensión del pellet obtenido anteriormente agregamos 150 μL de agarosa LMP (bajo punto de fusión) al 1 %, de toda esta mezcla se colocó 75 μL en cada laminilla y cubrimos inmediatamente con un cubreobjetos. Se realizaron 2 placas por cada tubo de siembra, luego de terminar todas las laminillas colocamos en refrigeración durante 5 min para así fijar la agarosa. Seguidamente retiramos el cubreobjetos de la laminilla y adicionamos 150 μL de agarosa LMP, se cubrió y refrigeró por 5 min adicionales.

Luego las laminillas fueron colocadas 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 h y máximo de 15 días.

Antes de realizar la corrida de electroforesis por 20 min se dejaron reposar las placas en el buffer de electroforesis alcalino (pH >13) (1 mM EDTA (Invitrogen) NaOH 300 mM (Merck)), hasta cubrir las completamente.

Culminado el 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 fueron deshidratadas con metanol para su posterior análisis.

Las laminillas fueron hidratadas en agua desionizada fría y teñidas con 60 μ L de Bromuro de etidio 1,5 μ g/mL cubriéndolas con una laminilla cubreobjetos.

Para evaluar la migración del ADN contabilizamos 25 cometas por cada laminilla, midiendo la longitud de cola, utilizando el microscopio de fluorescencia (Zeiss) con el objetivo 40X graduado.

2.5 Análisis Estadístico

2.5.1 Viabilidad Celular por captación de FDA-Br. Et.

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

2.5.2 Ensayo cometa

Para los datos del ensayo cometa previo a su estudio se realizó el test Shapiro–Wilk, para observar la normalidad de los datos, para determinar que los datos eran no paramétricos se los analizó con ANOVA utilizando el test Nonparamétrico, y post test Kruskal–Wallis para la comparación bilateral. Seguido se procedió a clasificar los datos en tres categorías: Daño bajo ($0 - 20 \mu\text{m}$), Daño Medio ($21 - 40 \mu\text{m}$) y Daño Alto ($41\mu\text{m}$ o más) (Monroy *et al.*, 2005). A continuación se detalla gráficamente los niveles de Migración del DNA.

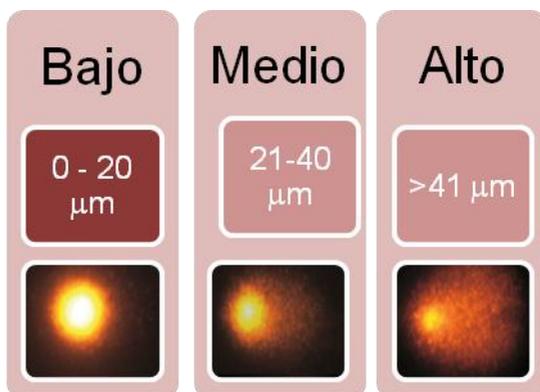


Diagrama N° 1. Clasificación de los diferentes niveles de migración del ADN de los linfocitos.

2.6 Esquema del Ensayo Cometa

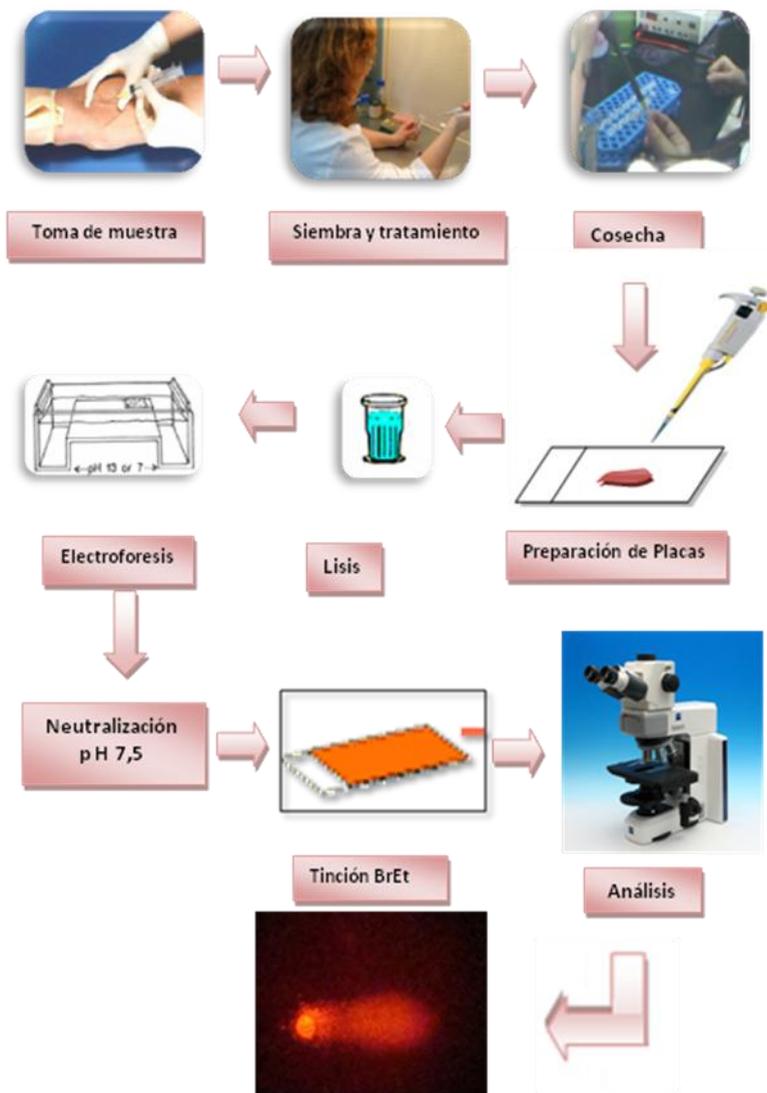


Figura N°6. Esquema del Ensayo Cometa

Tabla N°2. Esquema del diseño experimental.

	EXTRACTO 1		EXTRACTO 2		EXTRACTO 3	
Trata- miento	Experimento		Experimento		Experimento	
	R1*	R2	R1	R2	R1	R2
C -	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas
5 µg/ml	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas
15 µg/ml	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas
25 µg/ml	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas
C +	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas	25 cometas

Fuente: Autora

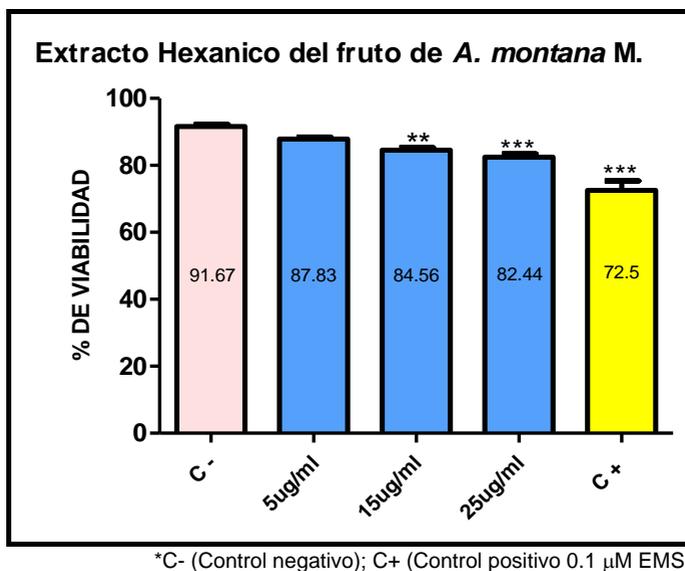
*R: número de repeticiones de cada experimento de tres donantes y cada uno por dos experimentos mas y cada uno de estos por duplicado.

3. RESULTADOS

3.1 Viabilidad Celular por captación de FDA-Br. Et.

3.1.1 Viabilidad con Extracto hexánico del fruto de *Annona montana* M.

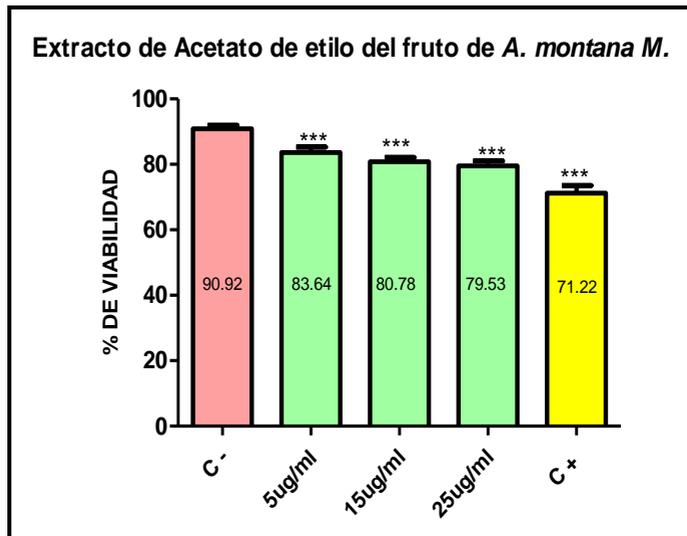
En la gráfica 1 se observa el porcentaje de los linfocitos expuestos a las diferentes dosis del extracto hexánico del fruto de *Annona montana* M; como también con sus respectivos controles, se observó una disminución con respecto al control negativo.



Gráfica 1. Porcentaje de linfocitos vivos, cada barra representa la media ± SEM obtenidos de tres experimentos independientes por duplicado de tres donadores diferentes (** P<0,001, ***P<0,0001).

3.1.2 Viabilidad con Extracto de acetato de etilo del fruto de *Annona montana* M.

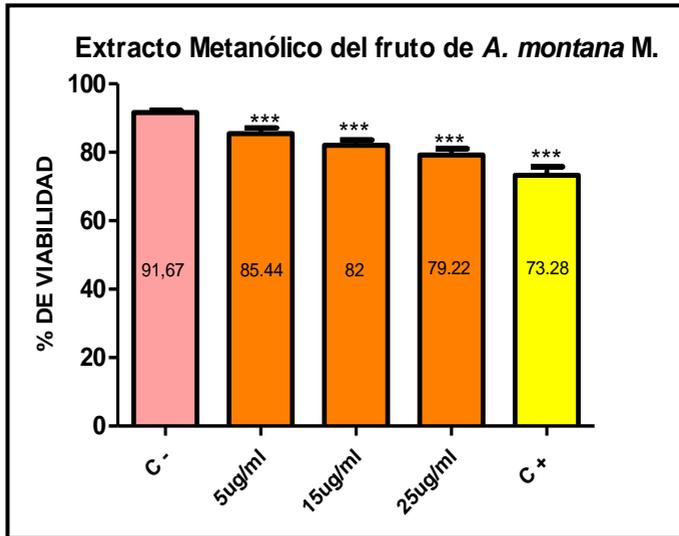
En la gráfica 2, se muestra la viabilidad de los linfocitos después de tres horas de exposición al extracto de acetato de etilo, demostrándose así diferencia significativa en las concentraciones comparadas con el control negativo, observándose el mismo efecto comparando el control negativo con el control positivo.



Gráfica 2. Viabilidad de linfocitos tratados con las diferentes concentraciones del extracto de acetato de etilo del fruto de *A. montana* M y los respectivos controles, las barras representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes por duplicado de tres donadores diferentes (***) $P < 0,0001$.

3.1.3 Viabilidad con Extracto de metanólico del fruto de *Annona montana* M.

La viabilidad de los linfocitos expuestos a éste extracto demuestra una respuesta dosis-dependiente, observándose una viabilidad mayor al 70% (Gráfica 3).

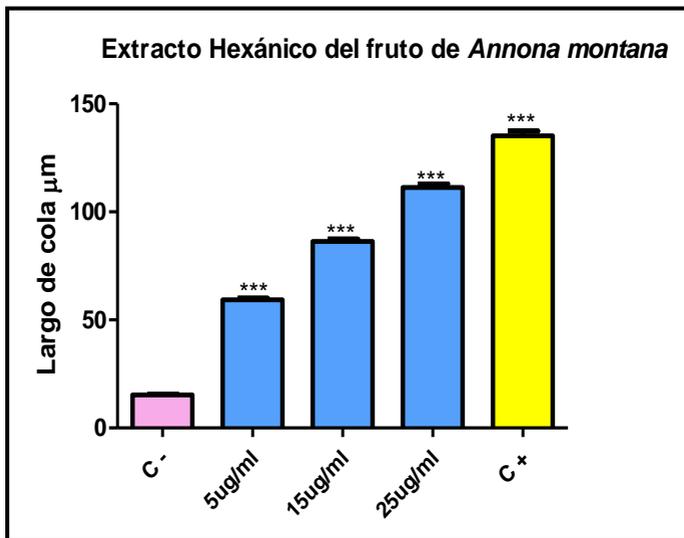


Gráfica 3. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos por duplicado de tres donadores diferentes, la viabilidad de linfocitos tratados con las diferentes concentraciones del extracto metanólico del fruto de *A. montana* M. y los respectivos controles (***) $P < 0,0001$).

3.2 COMETA

3.2.1 Largo de Cola con Extracto Hexánico del fruto de *Annona montana* M.

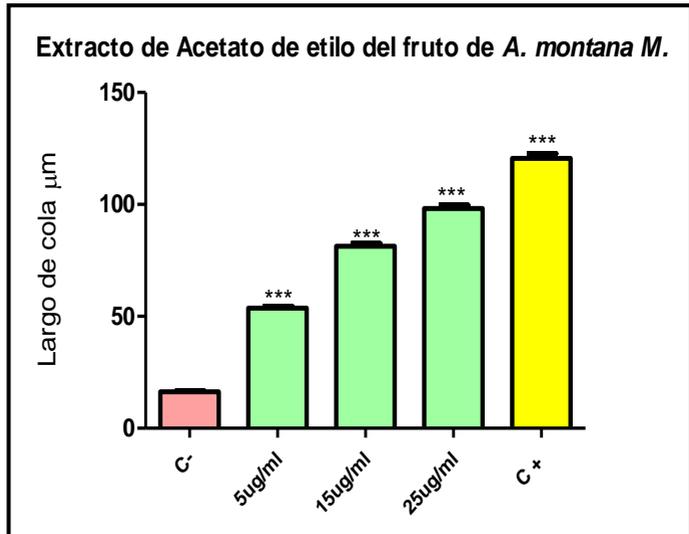
En la gráfica 4 los resultados muestran que a medida que aumentan las dosis analizadas se observa un mayor tamaño de Cola. Así mismo, se observa diferencia significativa en comparación con el Control Negativo.



Gráfica 4. Efectos de la actividad genotóxica del extracto hexánico del fruto de *A. montana* M observando la migración de la cola del cometa. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes de tres donantes y cada uno de estos por duplicado.

3.2.2 Largo de Cola con Extracto de acetato de etilo del fruto de *Annona montana* M.

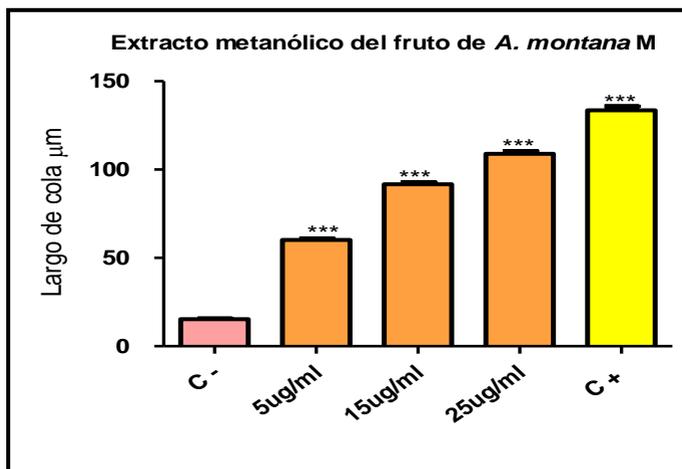
Los resultados obtenidos en la gráfica 5, se observa una respuesta dosis dependiente demostrándose que a mayor concentración existe mayor migración del ADN. De la misma manera existe una diferencia significativa en comparación con el Control Negativo.



Gráfica 5. Las barras demuestran la media \pm SEM de 3 experimentos independientes de tres donantes sanos y cada uno por duplicado, el daño genotóxico producido por las dosis del extracto de acetato de etilo expresado por el largo de la cola de los cometas (***) $P < 0.0001$).

3.2.3 Largo de Cola con Extracto metanólico del fruto de *Annona montana* M.

El daño inducido por las concentraciones probadas del extracto metanólico de *A. montana* M. se observa una diferencia estadísticamente significativa ya que a mayor concentración aumenta el tamaño de cola (Gráfica 6).

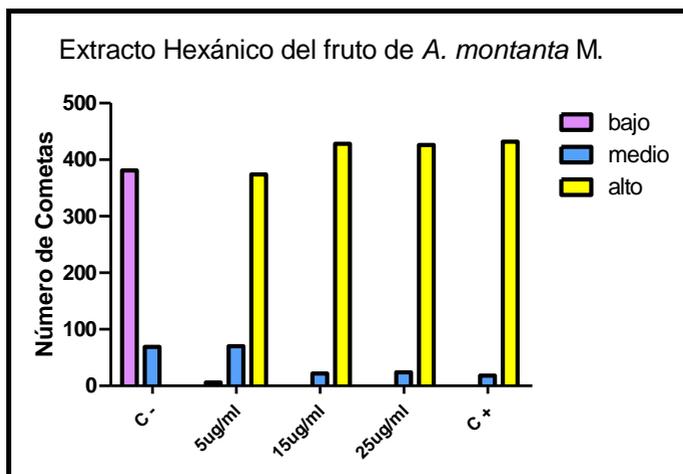


Gráfica 6. Efectos de la actividad genotóxica del extracto metanólico del fruto de *A. montana* M. observando la migración de la cola del cometa. Las barras presentan las medias \pm SEM de tres experimentos por duplicado de tres donadores diferentes (***) $P < 0.0001$).

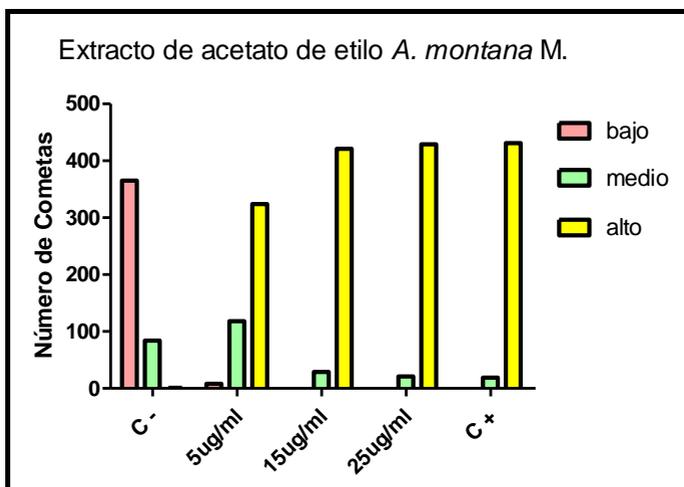
3.3 Clasificación de los cometas por daño del ADN de los Extractos Hexánico, Acetato de etilo y Metanólico del fruto de *Annona montana* M.

La clasificación de los cometas se la realizó de acuerdo a la migración del ADN, para ello tomamos en cuenta los parámetros citados en el diagrama N° 1.

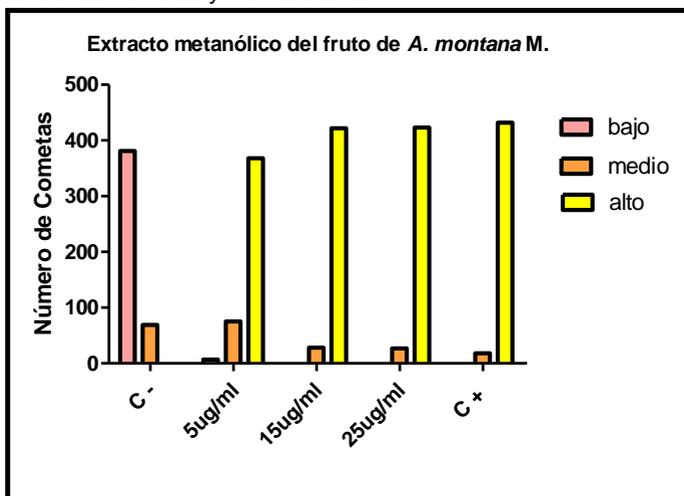
En las gráficas 7, 8 y 9 se pueden observar la clasificación de los cometas de acuerdo al nivel del daño. Encontrándose, las dosis probadas de los extractos (5, 15, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el control positivo, dentro del nivel alto, esto es, a medida que aumentan las dosis existe mayor daño en el ADN.



Gráfica 7. Clasificación de los niveles de daño del ADN según la migración, tratados con las diferentes dosis del extracto hexánico en linfocitos humanos con sus respectivos controles.



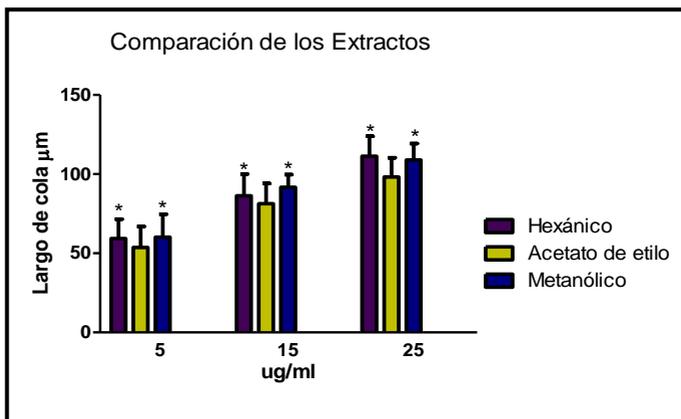
Gráfica 8. Clasificación de los cometas de acuerdo a los niveles de daño al ADN en cada una de las dosis del extracto de acetato de etilo y los controles.



Gráfica 9. Clasificación de los cometas de acuerdo a los niveles de daño bajo, medio y alto en cada una de las dosis del extracto metanólico de *A. montana* M., y sus controles.

3.4 Comparación de los cometas de los Extractos Hexánico, Acetato de etilo y Metanólico del fruto de *Annona montana* M.

Al comparar el efecto de los tres extractos entre sí como se puede observar en la gráfica 10, existe menor daño en el extracto de acetato de etilo, mientras que en los extractos metanólico y hexánico del fruto de *A. montana* M., se observó mayor daño.



Gráfica 10. Las barras presentan la media \pm SD de tres extractos de 3 donantes sanos y cada uno de estos por duplicado. La comparación de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico del fruto de *A. montana* M, observándose mayor efecto en los extractos metanólico y hexánico (* $P > 0.001$).

4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

De acuerdo a la OMS, el 80% de la población mundial utiliza a las plantas como su principal fuente de medicamentos, existe una alta correlación entre el uso de los productos naturales y su efecto farmacológico, el 25% de los fármacos actuales se han obtenido de metabolitos secundarios a partir de extractos vegetales, especies marinas y hongos (Beyra, *et al.*, 2004). Sin embargo, para algunas especies faltan estudios químicos, clínicos y epidemiológicos que confirmen su eficacia y sobretodo su seguridad.

En los estudios toxicológicos se incluyen los genotóxicos, debido a que muchos de los compuestos bioactivos son capaces de interactuar con el ADN modificándolo, lo cual, puede tener efectos genotóxicos así como: mutaciones relacionadas con procesos de diferenciación celular, teratogenicidad y alteraciones genéticas en la descendencia (Vizoso, *et al.*, 2000).

Dentro de las especies medicinales se encuentra la familia Annonacea que presenta una amplia actividad biológica como: citotóxico, insecticida, antiparasitario y efectos inmunosupresivos (Zafra, *et al.*, 1996, Cortés, *et al.*, 1993; Liaw, *et al.*, 2005), y muy probablemente esta actividad se deba a la presencia de una gran variedad de metabolitos secundarios, como las acetogeninas, aceites, terpenos, flavonoides y alcaloides (Liaw, *et al.*, 2004).

Annona montana M. perteneciente a esta familia, que es ampliamente utilizada en la medicina tradicional (Mootoo, *et al.*, 2000).

Dado el potencial medicinal de esta especie, se evaluó la genotoxicidad de varios de los extractos obtenidos del fruto de *A. montana*. Previo a la ejecución del test de genotoxicidad es

indispensable establecer la viabilidad celular, en nuestro caso se utilizó el ensayo de viabilidad mediante el test de doble tinción FDA-BrEt, la demostración de que el potencial citotóxico no está interviniendo en el efecto genotóxico es fundamental para cualquier estudio, pero tiene gran relevancia en el caso de los extractos de *Annonas*, ya que de estas especies se han aislados las acetogeninas, un grupo de compuestos más potentes conocidos hasta la fecha, es así que extractos de *Annona cherimolia* M, ricos en acetogeninas demostraron mayor citotoxicidad en líneas celulares de fibroblasto de ratón, alcanzando el 90 % de citotoxicidad en concentraciones de 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (García, *et al.*, 2008).

En las gráficas 1, 2 y 3 se observa el porcentaje de linfocitos viables luego de ser expuestos durante tres horas a los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico del fruto de *Annona montana* M. En todos los casos la supervivencia de los linfocitos humanos fue mayor al 70 %, observándose en el extracto hexánico unas diferencias significativas entre el control negativo y las dosis de 15 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual demuestra que la viabilidad de las células disminuye conforme aumenta las dosis del extracto, así mismo, con los extractos metanólico y de acetato de etilo se observó diferencia significativa en todas las concentraciones usadas con respecto al control negativo.

En nuestro estudio, se evaluó la genotoxicidad de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico del fruto de *A. montana* M. mediante el ensayo de cometa alcalino, este biomarcador permite detectar el daño a nivel del ADN, siendo ésta una técnica muy sensible (Cossio, *et al.*, 2004; Wong, *et al.*, 2005; Oshida, *et al.*, 2008).

En las gráficas 4-6 correspondientes al largo de cola de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico del fruto de

Annona montana M. respectivamente, se observó un efecto genotóxico. Las concentraciones usadas (5, 15, 25 $\mu\text{g/ml}$), presentan una diferencia significativa con respecto al control negativo con una $P < 0.0001$. Conforme se incrementaba la dosis se observó un aumento del daño genotóxico con respecto al daño basal.

De la misma manera en las gráficas 7-9 correspondientes a la clasificación de los cometas de acuerdo al daño del ADN de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico del fruto de *Annona montana* M, las células examinadas presentaron daño al ADN de acuerdo al nivel de clasificación del largo de cola del cometa, se observó un mayor número de cometas en nivel alto.

Este trabajo es el primero en informar la actividad genotóxica de extractos obtenidos del fruto de *Annona montana* M, sin embargo existen estudios similares realizadas con especies de la misma familia, siendo así el caso de los extractos obtenidos de semillas de *A. cherimolia*, que muestran que las acetogeninas en células de fibroblasto de ratón presentan un aumento significativo en la frecuencia en el número de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos (MNPE), a dosis superiores de 5 mg/kg (García *et al.*, 2008).

Nuestros resultados comparados con estudios realizados por Grover y colaboradores (2009) comprobaron la genotoxicidad de extractos de *A. squamosa* mediante el ensayo cometa, micronúcleos y pruebas de aberraciones cromosómicas, en leucocitos de ratas con 75, 150 y 300 mg/kg de *Annona squamosa* mostrando un daño alto en el ADN.

Así mismo, se realizó una comparación entre los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico del fruto de *Annona montana* M, para determinar cuál de los tres extractos

presenta mayor efecto genotóxico, lo que demostró tener un menor efecto el extracto de acetato de etilo, en cambio, los extractos hexánico y metanólico presentaron mayor daño al ADN en las dosis probadas respectivamente, en tres individuos sanos (Gráfica. 10).

Por otra parte, la obtención de los extractos que aquí evaluamos se las realiza por maceración sucesiva con el fin de ir haciendo una selección de los metabolitos secundarios por su afinidad a los disolventes. Los metabolitos con mayor interés en esta especie, como ya lo habíamos mencionado, son las acetogeninas (Álvarez, *et al.*, 2008, Bermejo, *et al.*, 2005). De acuerdo a la polaridad de las acetogeninas se esperaría tener mayor número de las mismas en el extracto metanólico del fruto de *Annona montana* M.

Según Liaw *et al.*, 2004 reporta que los extractos metanólicos de *Annona montana* M presenta mayor citotoxicidad en líneas celulares tumorales, debido a la presencia de acetogeninas.

En virtud que los extractos son una composición de varios metabolitos secundarios, es difícil establecer cuál de los compuestos encontrados provocan los efectos observados, por ello, es aconsejable realizar el fraccionamiento de los extractos.

Además, sería recomendable, aplicar otras pruebas genotóxicas, para poder confirmar los resultados obtenidos en el presente estudio, y, moderar el uso de esta planta en la medicina tradicional, para evitar riesgos en la salud de los seres humanos.

Sería importante llegar a realizar el fraccionamiento de los extractos metanólico y hexánico ya que presentaron mayor

daño genotóxico en linfocitos humanos y así obtener cual de los metabolitos es el causante de dicho efecto.

5. CONCLUSIONES:

- Las concentraciones usadas de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *A. montana* M (5, 15, 20 µg/ml) no afectan la viabilidad de los linfocitos humanos, ya que la supervivencia celular fue mayor al 70%.
- Los tres extractos (hexánico, acetato de etilo y metanólico), obtenidos del fruto de *Annona montana* M. presentan un efecto genotóxico, en los linfocitos humanos.
- El efecto observado es de tipo dosis respuesta, pero los extractos con mayor potencial genotóxico son los de hexano y metanol.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez O., Barrachina I., Ayala I., González C., Moya P., Neske A., Bardon A., (2008). Toxic effects of Annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. *J. Pest. Sci.* 81:85–89.
- Anderson D., Yu T., B.McGregor D., (1998). Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagénesis vol.13 no.6 pp.539-555*.
- Arencibia D., Rosario I., (2003). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*. *Retel revista de toxicología en línea.pag: 24-41*.
- Bermejo A., Figadere B., Zafra M., Barrachina I., Estornell E., Cortes D., (2005). Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat. Prod. Rep.* 22, 269– 303
- Beyra A., León M., Iglesias E., Ferrándiz D., Herrera R., Volpato G., Godínez D., Guimaraes M., Álvarez R., (2004). Estudios etnobotánicas sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61(2): 185-204.
- Burns P, Allen F, Glickman B. 1986. DNA sequence analysis of Mutagenicity and site specificity of ethyl methanesulfonate in Uvr+ and UvrB- strains of *Escherichia coli*. *Genetics Society of America.* 113, 811-819.
- Brugés K., Reguero M., (2007). Preliminary evaluation of *Sida rhombifolia* L. toxicity, genotoxicity and antimicrobial activity. *Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. IX No. 1: 5-13*
- Carballo M., Cortada C., Gadano A., (2005). Medicinal Herbs: Risks and Benefits in their uses. *Theoria, Vol. 14 (2): 95-108*.
- Cautín R., Agustí M., (2005). Phenological growth stages of the cherimoya tree (*Annona cherimola* Mill.). *Scientific Horticulturae*.

- Cossio M., González Y., García J., Prieto E., (2004). Uso del Ensayo Cometa para Evaluar el Efecto de la Temperatura sobre la Reparación del Daño Genético inducido por Peróxido de Hidrógeno y la Radiación Ultravioleta A en Células Sanguíneas Humanas. *Acta Farm. Bonaerense* 23 (3): 277-84.
- Cragg G., Newman D., (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 77, No. 1, pp. 7–24.
- Cuenca P., Ramírez V., (2004). Mutagénesis ambiental y el uso de biomarcadores para predecir el riesgo de cáncer. *Rev. biol. trop* v.52 n.3
- Department of Pharmacognosy., (2010). Disponible en <http://home.hiroshimau.ac.jp/shoyaku/photo/Phil/Annomo n.jpg> (consulta 08-03-2010)
- Di Giorgio M., Sardi M., Busto E., Roth B., Menéndez P., Bonomi M., Vallerga M., Taja M., Mairal L., (2003). Ensayos predictivos de la radiosensibilidad individual en linfocitos humanos. *VI Congreso Regional de Seguridad Radiológica y Nuclear. Lima.*
- Díaz T., Faxas M., Arango M., (1998). Factores etiopatogénicos y moleculares en la génesis del cáncer. *Rev. Cubana Oncol.*; 14 (1):42-50
- Dusinska M., Collins A., (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagénesis vol. 23 no. 3 pp. 191–205.*
- García k., Zepeda I., Ramón E., Álvarez I., Madrigal E. (2008). Genotoxic and cytotoxic effects produced by acetogenins obtained from *Annona cherimolia* mill. *Biol. Pharm. Bull.* 31(12) 2346—2349
- Grover P, Singh S., Prabhakar P., Reddy U., A. Balasubramanyam A., Mahboob M., Rahman M., Misra S., (2009). *In vivo* assessment of genotoxic effects of *Annona squamosa* seed extract in rats. Food and

Chemical Toxicology. *Volumen 47, Issue 8. Pages 1964-1971*

- Güerci A., Zúñiga L., Dauder R., (2006). Predictive value of the comet assay in the evaluation of individual radiosensitivity in peripheral blood. *Theoria, Vol. 15 (2): 41 – 52.*
- Gurib A., (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine 27:1–93.*
- Györfy E., Anna L., Kovács K., Rudnai P., Schoket B., (2007). Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen–DNA adducts. *Mutagénesis vol. 23 no. 1 pp. 1–18.*
- Harvey A., (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today - Volume 13*
- Hernández C., Díaz A., Cadena E., Moreno E., Ruiz L., Díaz-Barriga S., Madrigal E., (2005). Electroforesis unicelular (ensayo cometa) como Bioindicador de antigenotoxicidad inducida por *Amphipterygium adstringens*. *2° Congreso Nacional de Química Médica.*
- Laffon B., Pérez B., Méndez J. (2004). Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno. *An. R. Acad. Nac. Farm., 70: 95-123.*
- Lauwerys R. (2000). Control Biológico. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo.*
- Laza D., Rodríguez I., Sardiña G., (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev. Cubana Plant. Med. 8(3).*
- Liaw Ch., Chang F., Wu Ch., Chen S., Lee K., Wu Y., (2005). Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana* Planta *Med. 70: 948-959.*

- Liaw Ch., Chang F., Wu Y., Wang H., Nakanishi Y., Bastow K., Lee K., (2004). Montacin and *cis*-Montacin, Two New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona Montana*. *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 1804-1808
- Luch A., (2005). Nature and nurture- lessons from chemical carcinogenesis. *Nature: Cancer Volume 5*.
- Martínez V., (2005). Biomonitorización genotóxica de poblaciones humanas expuestas ambientalmente al arsénico. *Universidad autónoma de Barcelona. Mutad*.
- Møller P., Knudsen E., Loft S., Wallin H., (2000). The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-damaging Agents and Effect of Confounding Factors. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. Vol. 9, 1005–1015*.
- Monroy C., Cortés A., Sicard D., Groot H., (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica* 25:335-45.
- Mootoo B., Ali A., Khan A., Reynolds W., McLean S., (2000). Three Novel Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona montana*. *J. Nat. Prod.* 63, 807-811
- Nadin S., Vargas L., Ciocca D., (2001). A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. Volume 49(9): 1183–1186*
- Oshida K., Iwanaga E., Miyamoto K., Miyamoto Y., (2008). An in Vito comet assay of multiple organs (liver, kidney and bone marrow) in mice treated with methyl methanesulfonate and acetaminophen accompanied by hematology and/or blood chemistry. *J. Toxicol. Sci. Vol. 33, N° 5, 515-524*.
- Pando R., Lanz H. (2009). La importancia de la proteínica en la salud pública. *Salud Pública Mex. 51 supl. 3:S386-S394*.

- Paz-y-Miño C., Creus A., Cabré O., Leone P., (2003). Genética Toxicológica y Carcinogénesis. *BID-FUNDACYT-PUCE, Quito-Ecuador*.
- Prieto E., Llópiz N. (1999). Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa). *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 18(1):34-6.
- Rojas E., López M., (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 722: 225–254.
- Rojas E., Valverde M., López M., Naufal I., Sánchez I., Bizarro P., López I., Fortoul T., Ostrosky P., (2000). Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 468: 11-17.
- Sánchez A., (1999). Utilización de la línea celular CHO en los ensayos de genotoxicidad. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 18(1):19-21
- Sánchez A., Cápiro N., Fonseca G., (2004). Evaluación in vitro e in vivo de las propiedades genotóxicas de la especie endémica *Phyllanthus orbicularis*. *Rev. Cubana Invest. Biomed.:* 18(1):16-8.
- Schlie M., González A., Luna L., (2009). Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares Neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica Chile. Vol. 8, Núm. 4, pp. 245-257.
- Swenberg J., Fryar-Tita E., Jeong J., Boysen G., Starr T., Walker V., Albertini R., (2008). Biomarkers in Toxicology and Risk Assessment: Informing Critical Dose–Response Relationships. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 253–265.
- Tice R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J., Sasaki Y., (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for

- In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:206-221.
- Urrego R., Pareja A., Vásquez N., Márquez M., (2005). El Ensayo Cometa: una técnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos. *Rev. Col. Cienc. Pec. Vol. 18:3*.
 - Vilar JB., Ferreira FL., Ferri PH., Guillo LA., Chen L., (2008). Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol., 68(1): 141-147*.
 - Vizoso A., Ramos A., García A., Piloto J., Pavón V., (2000). Estudio genotóxico in vitro e in vivo del extracto fluido de *Cassia grandis* L. y el gel de Aloe Vera L. *Rev. Cubana Plant. Med* 5(3):91-6.
 - Wang L., Zhao W., Qi G., Cheng K., Yang R., (2000). Four novel annonaceous acetogenins from *Annona montana*. *Natural product letters. Vol. 13(2), pp. 83-90*.
 - Wong V., Szeto Y., Collins A., Benzie I., (2005). The Comet Assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Current Topics in Nutraceutical Research Vol. 3, No. 1, pp. 1-14*.
 - Zafra C., González C., Estornell E., Sahpaz S., Cortes D., (1996). Acetogenins from Annonaceae, Inhibitors of Mitochondrial Complex I. *Phytochemist. Vol. 42. No. 2, pp. 253-271*.
 - Zuluaga M., Valencia A., Ortiz I., (2009). Genotoxic and mutagenic effect of atmospheric pollutants. *Medicina* 28(1):33-41