

EVALUACION DEL POTENCIAL GENOTOXICO DE EXTRACTO ACUOSO Y
ACEITE ESCENCIAL DE *Carica candamarcensis* MEDIANTE EL TEST DE AMES
Y ENSAYO COMETA

CARMEN ELENA EMBUS CORDOBA
VIVIAN LORENA ROSERO RUIZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2008

EVALUACION DEL POTENCIAL GENOTOXICO DE EXTRACTO ACUOSO Y
ACEITE ESCENCIAL DE *Carica candamarcensis* MEDIANTE EL TEST DE AMES
Y ENSAYO COMETA

CARMEN ELENA EMBUS CORDOBA
VIVIAN LORENA ROSERO RUIZ

Trabajo presentado como requisito parcial para optar el Título de
Bióloga

Directora

M.S.c JAQUELINE MENA HUERTAS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2008

Nota de Aceptación

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, 11 Diciembre de 2008

Dedico este trabajo, en primer lugar a Dios por ser la fortaleza de mi vida, por guiarme siempre, por su inmenso amor presente en mí todos los días.

A mi madre Esperancita, quién es el orgullo de mi vida, infinitas gracias por el constante e incondicional apoyo brindado a lo largo de la carrera.

A mis hermanos Oscar, y Jhobanny, gracias por su apoyo, su comprensión, y sus consejos.

A M.S.c Jacqueline Mena, por su asesoría, dirección y colaboración en la realización de este trabajo de grado.

A mi familia en Medellín por su colaboración durante el transcurso de esta investigación.

A Lorenita, mi gran amiga y compañera de, por compartir conmigo su amistad y hacer gratificante esta experiencia de aprendizaje.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Con Afecto....

Carmen Elena Embus Cordoba

Agradezco primeramente a Dios por ser mi mejor amigo, mi fortaleza, darme todo lo que tengo y no dejarme caer nunca.

A la Magíster Jacqueline Mena por asesorarme a lo largo de la tesis y acompañarme en este camino que hoy culmina en el presente proyecto, por compartir su conocimiento conmigo e inspirar en mi mucha admiración.

A mi compañera de tesis Carmencita por estar conmigo durante todo el trabajo y brindarme su amistad.

A mi mamá y mi papá por ser los mejores y estar conmigo incondicionalmente, gracias porque sin ellos y sus enseñanzas no estaría aquí ni sería quien soy ahora, a ellos les dedico esta tesis.

A mis amigos porque gracias a ellos sé lo que es la amistad verdadera, valor importante en mi vida, gracias por estar conmigo, por aconsejarme, regañarme, compartir risas y llantos en todo este tiempo.

A mis amigos de la universidad por permitirme conocerlos y ser parte de su vida. Con especial cariño a Sandra Álvarez y Carolina Obando por ayudarme y estar conmigo a lo largo de la carrera, y aun después...

A mi abuelita Leonor, yo se que siempre estas orgullosa de mí.

Gracias a todos

Gracias por ayudarme a lograrlo.

Lorena Rosero

AGRADECIMIENTOS

Al Equipo de trabajo del Laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia, a su Directora, Isabel Cristina, a la Profesora Janeth Orozco, a la Bióloga Juliana Navarro, y demás personas que nos colaboraron en la fase de laboratorio de nuestra investigación.

Al Director de Biología de la Universidad de Antioquia el Doctor Jaime Calle por permitirnos realizar nuestra fase de laboratorio en las instalaciones de la Universidad y brindarnos su colaboración.

A la Directora del Programa de Biología de la Universidad de Nariño Luz Stella Lagos por todo su apoyo para realizar las gestiones necesarias con la Universidad de Antioquia.

A la Profesora Jacqueline Mena por acompañarnos en cada paso de nuestra investigación, por su constante apoyo.

A la Universidad de Nariño y en especial al Grupo de Cáncer de la Universidad de Nariño, a su Directora la Profesora Maria Clara Yépez por financiar nuestra investigación.

Al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño, a su Laboratorista Guido Villota.

Al Químico Juan Pablo Torres por prestarnos su colaboración en el proceso de elaboración de los Extractos.

Al Profesor Jhon Jairo Calderón por su colaboración en la parte estadística de la investigación.

Y a todos aquellos que hicieron posible la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. OBJETIVOS	21
2. JUSTIFICACION	22
3. PROBLEMA DE INVESTIGACION	25
4. MARCO TEORICO	26
4.1. GENOTOXICIDAD	26
4.1.1. Detección de Genotoxicidad: Electroforesis Alcalina de Células Individuales SCGE (Ensayo Cometa)	26
4.2. MUTAGENICIDAD	28
4.2.1. Mutágenos	28
4.2.2. Premutágenos	30
4.2.3. Detección de Mutagenicidad: Ensayo de Mutagenicidad con Preincubación y Activación Metabólica en <i>Salmonella typhimurium</i> (Test de ames)	30
4.2.3.1. Tipos de cepas mutantes de <i>Salmonella typhimurium</i>	31
4.2.3.2. Características de la cepa TA 100	32
4.2.3.3. Controles para determinación de Reversión Espontánea para la cepa TA100	32
4.2.3.4. Índice de Mutación	32
4.3. TOXICIDAD EN LINFOCITOS HUMANOS	32
4.4. <i>CARICA CANDAMARCENSIS</i>	33
4.4.1. Clasificación taxonómica	33

4.4.2. Características	33
4.4.3. Distribución de <i>C. candamarcensis</i>	34
4.4.4. Usos	34
5. ANTECEDENTES	35
6. METODOLOGIA	39
6.1. PREPARACION DEL MATERIAL VEGETAL	39
6.2. FILTRACION EXTRACTO ACUOSO	40
6.3. DILUCIONES DE LOS EXTRACTOS	40
6.4. DETERMINACION DE DOSIS A EVALUAR POR TOXICIDAD EN LINFOCITOS	41
6.5. ENSAYO DE MUTAGENECIDAD CON PREINCUBACION Y ACTIVACION METABOLICA EN <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> – TEST DE AMES	42
6.5.1. Controles para Determinación de Reversión Espontánea cepa TA100	42
6.5.2. Confirmación de Marcas	43
6.6. EJECUCION DEL ENSAYO DE MUTAGENECIDAD	43
6.7. ANALISIS ESTADISTICO TEST DE AMES	44
6.8. ELECTROFORESIS ALCALINA DE CELULAS INDIVIDUALES (SGCE) ENSAYO COMETA	45
6.9. ANALISIS ESTADISTICO ENSAYO COMETA	48
7. RESULTADOS	49
7.1. TOXICIDAD EN LINFOCITOS PARA DETERMINACION DE DOSIS TEST DE AMES	49
7.2. ENSAYO DE MUTAGENECIDAD – TEST DE AMES	50
7.2.1. Confirmación del Genotipo de la cepa TA100	50

7.2.2. Controles para determinación de reversión espontánea para la cepa TA100	50
7.3. ENSAYO DE MUTAGENECIDAD – TEST DE AMES	51
7.3.1. Índice de Mutación	53
7.4. TOXICIDAD EN LINFOCITOS PARA ENSAYO COMETA	55
7.5. ELECTROFORESIS ALCALINA DE CELULAS INDIVIDUALES (SGCE) ENSAYO COMETA	56
7.6. RECOMENDACIÓN DE DOSIS SEGURAS	59
7.7. OPTIMIZACION TEST DE AMES EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO	60
8. ANALISIS DE RESULTADOS	62
8.1. CITOTOXICIDAD EN LINFOCITOS DE DIFERENTES DOSIS DE EXTRACTO ACUOSO Y ACEITE ESENCIAL DE <i>CARICA CANDAMARCENSIS</i>	62
8.1.1. Extracto Acuoso	62
8.1.2. Aceite Esencial	62
8.2. ENSAYO DE MUTAGENECIDAD – TEST DE AMES	64
8.2.1. Extracto Acuoso	64
8.2.2. Aceite Esencial	65
8.3. ELECTROFORESIS ALCALINA DE CELULAS INDIVIDUALES (SGCE) ENSAYO COMETA	67
CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFIA	76
ANEXOS	86

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características Genéticas de las Cepas de <i>S. typhimurium</i> .	31
Tabla 2. Composición de Pulpa de <i>Carica candamarcensis</i> .	34
Tabla 3. Concentración de compuestos presentes en Aceite Esencial de Frutos Maduros de <i>Carica candamarcensis</i> mediante cromatografía de gases	38
Tabla 4. Toxicidad en Linfocitos de siete dosis de AE y 6 dosis de EA para Test de Ames (los datos se muestran como porcentajes de viabilidad de las dosis de AE y EA en seis horas de tratamiento)	50
Tabla 5. Valores de Reversión Espontánea	50
Tabla 6. Resultados de la Prueba de Ames en la cepa TA-100 de <i>S. typhimurium</i> después del tratamiento con AE (Micrométodo) y EA (Estándar), con y sin activación metabólica (S-9).	52
Tabla 7. Índice de Mutación de AE y EA \pm S9 en la Prueba de Ames para la cepa TA100 de <i>Salmonella typhimurium</i>	53
Tabla 8. Anova de una vía AE sin s9	54
Tabla 9. Anova de una vía AE con s9	54
Tabla 10. Anova de una vía EA sin s9	55
Tabla 11. Anova de una vía EA con s9	55
Tabla 12. Toxicidad en Linfocitos de tres dosis de AE y EA para Ensayo Cometa	56
Tabla 13. Interpretación de Longitud de Cometa	58
Tabla 14. Resultados del Efecto Genotóxico de tres dosis de AE y EA en Ensayo Cometa	59
Tabla 15. Kruskal Wallis en Ensayo Cometa	59
Tabla 16. Concentraciones Seguras	60
Tabla 17. Control de Marcas de la cepa TA100	60

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Frutos Maduros de <i>C. candamarcensis</i>	33
Figura 2. Equipo para Hidrodestilación Asistida por Radiación con Microondas (MWHD)	39
Figura 3. Esterilización por filtro de membrana	40
Figura 4. Diluciones Aceite Esencial	40
Figura 5. Diluciones Extracto Acuoso	41
Figura 6. A. Cámara de Neubauer y B. Campo Visual de la Cámara	42
Figura 7. Montaje Controles para Reversión Espontánea	43
Figura 8. Esquema Ensayo de Mutagenicidad	44
Figura 9. Baño María	45
Figura 10. Montaje de Tratamientos para Ensayo Cometa	46
Figura 11. Jarra Kooplin para lisis	47
Figura 12. Imágenes de un Control Negativo (A y B) en AE +S9 y – S9 y de Control Positivo (C) en AE –S9	51
Figura 13. A. Stock de AE +S9 y B. Stock del AE –S9	52
Figura 14. Resultados del Efecto Genotóxico de tres dosis de AE y EA en Ensayo Cometa	57
Figura 15. Imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia en el Ensayo Cometa para tres dosis de AE y EA durante una hora de tratamiento	57
Figura 16. Abundancia relativa de las diferentes familias de compuestos identificados en el AE de <i>C. candamarcensis</i> obtenido por MWHD	63
Figura 17. Esquema Siembra Marca 1	82
Figura 18. Esquema Marca 2	82
Figura 19. Esquema Marca 3	83
Figura 20. Esquema Marca 4	83
Figura 21. Esquema Montaje Ensayo de Mutagenicidad	84

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Normas de Bioseguridad	81
Anexo B. Chequeo de Marcas	87
Anexo C. Ejecución del Ensayo de Mutagenicidad	83
Anexo D. Ensayo de Mutagenicidad Test Ames	85
Anexo E. Electroforesis Alcalina de Células Individuales (SGCE) Ensayo Cometa	87
Anexo F. Preparación Medios y Soluciones para los ensayos	90

LISTA DE ABREVIATURAS

AE. Aceite Esencial

EA. Extracto Acuoso

MWHD. Hidrodestilación Asistida por Radiación con Microondas

RESUMEN

En la actualidad existe una creciente tendencia a consumir productos naturales, como alternativa a los tratamientos de las diversas enfermedades, creándose así un marcado interés en los estudios farmacológicos, toxicológicos y genotóxicos de los extractos de plantas medicinales que son empleados en terapias alternativas o complementarias para contrarrestar las enfermedades; para garantizar la inocuidad de estos productos es necesario estudiar sus posibles efectos mutagénicos y genotóxicos, ya que al tratarse de mezclas complejas es posible que alguno(s) de sus componentes pueda(n) dañar el material genético. El estudio de los fitomedicamentos está muy extendido, un ejemplo de esto es el látex de *Carica candamarcensis* (chilacuán o papayuela), que presenta actividad mitogénica favoreciendo la recuperación de tejidos y por lo tanto es recomendado en el tratamiento de cicatrizaciones, trastornos gastrointestinales y úlceras gástricas principalmente. Por otro lado, en el grupo de investigación “prevención de cáncer” de la Universidad de Nariño se demostró el efecto in vivo anti *H. pylori* de los extractos acuoso y aceite esencial de pulpa de frutos maduros de la misma planta; este trabajo contribuye a profundizar en el estudio de estos extractos puesto que su objetivo principal fue evaluar mediante el test de Ames y el ensayo cometa la mutagenicidad, genotoxicidad y citotoxicidad de estos. El Índice de Mutación en Ames se encuentra por debajo de 1.5, lo que demuestra que dichos extractos no parecen inducir efectos mutagénicos en este sistema, así mismo en el Ensayo Cometa la prueba de Kruskal Wallis indica diferencias significativas con respecto a la longitud de cola del cometa entre el control positivo y los tratamientos, señalando así que los extractos no parecen tener efectos genotóxicos; sin embargo, se confirma que el AE presenta actividad citotóxica en las dosis AE Stock al 10% y AE 5%. Los ensayos de mutagenicidad y genotoxicidad determinaron la inocuidad de los extractos en las diferentes concentraciones sin embargo es necesario profundizar en el estudio de citotoxicidad antes de recomendarlos para el tratamiento complementario de *H. pylori*

Palabras Clave: *C. candamarcensis*, Test de Ames, Ensayo Cometa, *H. pylori*, mutágenicidad, genotoxicidad, extractos acuosos, aceites esenciales.

ABSTRACT

Now days there is a growing tendency to consume natural products as an alternative for treatment of several diseases, creating a strong interest in pharmacological, toxicology and genotoxicity studies of extracts from medicinal plants which are used in alternative or complementary therapies to counteract the disease. To ensure the safety of these products is necessary to study their possible genotoxic and mutagenic effects, as in the case of complex mixtures is possible that some of their components might damage the genetic material. The study of phytomedicines is widespread, an example of this is the latex of *Carica candamarcensis* (chilacuan or papayuela), which presents mitogénic activity favoring the recovery of tissues and is therefore mainly recommended in the treatment of scar, gastric ulcers and gastrointestinal disorders. On the other hand, the research group "of cancer prevention at the University of Nariño showed the effect in vivo anti *H. pylori* from the aqueous extracts and essential oil of the pulp of ripe fruit of the same plant; This work helps to deepen the study of these extracts as its main objective was to evaluate through the Test of Ames and Test Comet the Mutagenicity , genotoxicity and cytotoxicity of these. The mutation rate in Ames is below 1.5, which demonstrates that these excerpts do not seem to cause mutagenic effects in this system, and in the same test Comet Kruskal Wallis test indicates significant differences with regard to the length of the tail of the comet between positive control and treatment, and noting that the extracts did not appear to have genotoxic effects, however, confirms that the AE presents cytotoxic activity in the AE Stock dose to 10% and 5% AE. The mutagenicity and genotoxicity tests determined the safety of the extract in different concentrations, however, it is necessary to deepen the study of cytotoxicity before recommending them for the treatment of *H. pylori*.

Keywords: *C. candamarcensis*, Test Ames, Test Comet, *H. pylori*, mutagenicity, genotoxicity, aqueous extract, essential oils.

INTRODUCCION

Aproximadamente la mitad de la población mundial está infectada por *Helicobacter pylori*, bacteria que esta fuertemente asociada al desarrollo de de gastritis crónica en el ser humano, desempeñando un papel causal importante en la úlcera gastroduodenal e incrementando el riesgo de padecer cáncer gástrico (González, 2005). Los factores asociados a la incidencia de la infección de *H. pylori* y desarrollo de cáncer se presentan con mayor frecuencia en países en vía de desarrollo que en países industrializados, lo que se ha asociado con el nivel sociocultural y económico de la población, tal patrón de infección se asocia con mecanismos de transmisión directa o indirectamente relacionados con la higiene ambiental, que son determinantes para la incidencia de la bacteria (Malaty, H. 1994).

Estudios realizados en el Departamento de Nariño han reportado una alta incidencia de la infección y la recurrencia de cáncer gástrico sobre todo en la zona andina; *H. pylori* se ha encontrado principalmente en personas de bajo desarrollo socioeconómico, donde las condiciones de higiene ambiental, el manejo de aguas y excretas no son las más adecuadas; además por ser una zona volcánica hace que se presente un medio ambiente con un alto contenido de nitratos en las aguas del subsuelo y en la dieta, hay marcada disminución de agentes antioxidantes como β -carotenos y vitamina E, baja ingesta de potasio, grasas, proteínas animales, legumbres, frutas frescas y alta ingesta de sal, generando un ambiente intragrástrico que favorece el crecimiento bacterial y la formación de compuestos N-nitrosos ampliamente reconocidos como carcinógenos (Cerón, *et al* 2004).

Teniendo en cuenta la importancia de la bacteria, se ha implementado una serie de terapias agresivas (combinación de un inhibidor de la bomba de protones, un compuesto a base de bismuto y dos o tres antibióticos) con el fin de lograr la erradicación de la misma, esas terapias “triples o cuádruples” han sido exitosas entre un 80 a 90% sin embargo, el abandono de terapias ha sido recurrente, por los efectos secundarios y por la interrupción debido a los altos costos, teniendo en cuenta que la población más afectada corresponde a personas de bajos recursos económicos, y esto genera una marcada resistencia a los antibióticos usados en el tratamiento (Salom A., 2006).

Actualmente se han llevado a cabo varios estudios que buscan terapias complementarias para el control de la bacteria, que ayuden a disminuir los efectos del tratamiento convencional, tales como: prebióticos, dietas ricas en antioxidantes y extractos de diversas plantas (Nostro, *et al* 2005). Con este propósito, el grupo de investigación de la Universidad de Nariño “Prevención de cáncer” realizo un estudio que ha revelado actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial y extracto acuoso de pulpa de frutos maduros de **Carica**

candamarcensis o “chilacúan” sobre ***H. pylori*** (Mena et al, 2005). Sin embargo, para verificar la inocuidad de los extractos de esta planta, y antes de hacer una posible recomendación como tratamiento complementario a la infección, comprobamos mediante el presente estudio si estos compuestos en alguna concentración pueden ser mutágenos, premutágenos y/o genotóxicos. Teniendo en cuenta que muchas sustancias (incluso naturales) presentan efectos mutagénicos y/o genotóxicos que ponen en riesgo nuestra salud, se evaluó inicialmente el potencial mutagénico de los extractos promisorios mencionados utilizando la cepa TA 100 his⁻ de ***Salmonella typhimurium*** donada por el Laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia y diseñada por Bruce Ames en 1970, que detecta un amplio rango de sustancias químicas que pueden producir daño genético sobre el hombre, específicamente esta cepa detecta mutaciones por sustitución de pares de bases (Ames et al, 1980).

Por otra parte, para detectar el efecto genotóxico de los extractos se siguió la metodología propuesta por Singh et al., 1988 y modificada por Rojas et al., 1999 y Tice et al., 2000, denominada Electroforesis Alcalina de Células Individuales (SGCE) Ensayo Cometa, prueba que detecta daños en el ADN. La intensidad del daño se estimó de acuerdo al parámetro “Longitud de cola del cometa”, es decir, la longitud de migración electroforetica de los fragmentos de ADN producidos por las rupturas o daños.

En esta investigación, los ensayos de mutagenicidad y genotoxicidad determinaron la inocuidad de los extractos en las diferentes concentraciones, en los dos sistemas de ensayo empleados. Los resultados obtenidos indican que los extractos no parecen tener efectos mutagénicos con y sin activación metabólica al no presentarse un incremento significativo de colonias revertantes, comportándose de igual manera que el control negativo, y genotóxicos ya que no se encontraron daños en el ADN. Los extractos tampoco presentan efectos citotóxicos en las concentraciones evaluadas, a excepción del Aceite Esencial (AE) que presenta actividad citotóxica en las dosis AE Stock al 10% y AE 5%.

Este trabajo se constituye en uno de los pioneros en las pruebas de tamizaje para considerar seguros e inocuos los extractos de *C. candamarcensis*, por lo que se hace necesario y de vital importancia probar con otros sistemas para así crear un fitofármaco seguro y de confianza confirmando así su calidad, antes de comercializarlo es necesario contar con la aprobación de las autoridades sanitarias correspondientes, respetando unas normas amplias y complejas y que son diferentes en cada país, demostrando que el fármaco es razonablemente seguro para su administración inicial en seres humanos por lo tanto pasa por una serie de revisiones medica, química, farmacológica, toxicológica, estadística y de seguridad además de estudios clínicos iniciales a pequeña escala, en donde se evalúan los efectos tóxicos y farmacológicos del fitofármaco a través de pruebas *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio, se hacen ensayos de genotoxicidad, mutagenicidad y también estudios de la absorción y metabolismo del fármaco,

toxicidad de los metabolitos del fármaco, toxicidad de metabolitos y la velocidad con que el fármaco y sus metabolitos se excretan del cuerpo. (Dan Luckabaugh, 1.999). El propósito de este trabajo fue el de obtener en primera medida suficientes datos que apoyen con cierto nivel de seguridad el uso de *Carica candamarcensis*.

1. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar mediante el Ensayo de Mutagenicidad con Preincubación y Activación Metabólica en *Salmonella typhimurium* Test de Ames y el Ensayo de Electroforesis Alcalina de Células Individuales (SCGE) Ensayo Cometa, el potencial mutagénico y genotóxico del aceite esencial y extracto acuoso de pulpa de frutos maduros de *Carica candamarcensis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer por medio del Test de Ames si los extractos de aceite esencial y acuoso de pulpa de *C. candamarcensis* son mutágenos y/o premutagénos.
- Recomendar concentraciones “seguras” para el uso humano de los extractos evaluados.
- Optimizar el protocolo del Test de Ames a las condiciones de laboratorio de la Universidad de Nariño.

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer gástrico es una de las más importantes causas de muerte constituyéndose en la segunda neoplasia maligna fatal más frecuente en el mundo. Su frecuencia de presentación varía entre diferentes zonas geográficas siendo Colombia uno de los países con mayor incidencia en el mundo, regiones como Nariño y Boyacá presentan una ocurrencia de 160 casos por cada 100.000 habitantes que es dos a tres veces mayor que en el resto del país. (Bravo *et al* 2003).

Múltiples factores han sido propuestos en la patogénesis del cáncer gástrico siendo los más importantes la dieta: ingesta de sal, componentes dietéticos, deficiencias de vitaminas y minerales, condiciones socioeconómicas, fuentes de agua (Buiatti *et al* 1989 & Gonzáles 1991) y en los años 90 se empezó a confirmar la asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* y el cáncer gástrico con un riesgo relativo que oscila entre 2.6 y 6% (Loffeld *et al* 1990).

Actualmente se trabaja en el desarrollo de una vacuna contra *H. pylori* que continúa estando en un plano hipotético. La vacuna profiláctica basa sus fundamentos en que la infección se adquiere en la niñez, y que las secuelas son el resultado de la infección crónica. Al mismo tiempo, el desarrollo de una vacuna terapéutica cobra validez al considerar que el 50% de la población mundial está infectada y que su utilización puede ser una alternativa frente a la falla del tratamiento evitando así la reinfección. (Harris., *et al* 2006). Esta investigación ya se encuentra en su segunda fase experimental, teniendo resultados favorables hasta el momento Sin embargo, este tipo de avances tecnológicos y el desarrollo de antibióticos de última generación por parte de los países desarrollados aún está lejos de implementarse en Colombia.

Para contrarrestar la infección por *H. pylori* en nuestra región se han venido efectuando terapias convencionales “erradicadoras” de la bacteria que incluyen medicamentos como antibióticos, sales de bismuto, bloqueantes de los receptores H2 de la histamina, y omeprazol. (García R., *et al* 2001). El objetivo del tratamiento es la erradicación del microbio, sin producir efectos secundarios y sin inducir resistencia bacteriana; este propósito no siempre es logrado con este tratamiento, debido a la resistencia a los antibióticos, y a los efectos secundarios que puede causar (Salom A., 2006).

Como en cualquier otro tipo de tratamiento antimicrobiano, el uso de antibióticos, además de posibles alergias, presenta una serie de efectos secundarios o adversos, que pueden ser una importante causa de abandonar el mismo y, por tanto, del fracaso de la erradicación. Los efectos adversos son especialmente frecuentes en la terapia triple clásica (bismuto, tetraciclina y metronidazol), 21%, y

más raros en otras en las que se utiliza el omeprazol, 6%. Estos efectos, sobradamente conocidos consisten habitualmente en cefaleas, náuseas, vómitos, sensación de mareo, etc.; teniendo en cuenta, sobre todo, la encefalopatía por bismuto y los problemas en el crecimiento de los huesos y del esmalte de los dientes producidos por el uso de tetraciclinas (García R., *et al* 2001), esto sumado a los elevados costos del tratamiento ha conllevado al abandono recurrente de las terapias.

Teniendo en cuenta los problemas que se derivan del uso inapropiado de antibióticos, debido al abandono, subdosificación o sobredosificación y factores relativos al paciente; manifestándose en el desarrollo de cepas resistentes es evidente la necesidad de buscar terapias complementarias que ayuden a disminuir estos efectos (Harris., *et al* 2006).

Un estudio previo ha demostrado que los Extractos de Aceite Esencial y Acuoso de pulpa de *Carica candamarcensis* inhiben el crecimiento *in vitro* de *H. pylori*, constituyéndose así en un potencial tratamiento complementario al habitual usado en la infección (Mena, J. *et al* 2.005). Para garantizar la inocuidad de los extractos de la planta, es necesario realizar entre otras pruebas genotóxicas, que permitan un mayor nivel de confiabilidad a la hora de sugerir su consumo en terapias de pacientes con antecedentes de infección de *H. pylori*; por esta razón se usará el Test de Ames. El Test de Ames fue desarrollado por Bruce Ames en 1.970. Al poco tiempo de implementarse, se presentó una alta correlación entre cáncer y los resultados positivos de esta prueba, lo que lo ha llevado a constituirse en el Test más importante para la detección de compuestos mutagénicos, llevándolo a un explosivo desarrollo en la industria (Motoe, K. 2005). El Ensayo Cometa desarrollado por Singh *et al.*, 1988 el cual consiste en el análisis de células individuales que son lisadas y se someten a una electroforesis, para así lograr que los fragmentos de cromosomas corran hacia el ánodo y se revelen como la cola de un cometa, esta prueba se utiliza para la evaluación genotóxica de diferentes sustancias extrañas al organismo, monitoreo genético y para determinar la capacidad de reparación del ADN ante el daño provocado por un xenobiótico. (Murray *et al.*, 2004).

Entre 1975 y 1980, la mayor parte de las empresas farmacéuticas y alimenticias de los países desarrollados al igual que Ministerios de Salud, Agricultura y Medio ambiente establecieron sus propias empresas del Test de Ames, las ventajas de esta prueba son economía, simplicidad y confiabilidad. Actualmente, los grandes mercados internacionales, tales como OECD (Organización para la Economía, Cooperativa y Desarrollo), U.S.A. EC, Japón y Canadá exigen para el registro: certificación, e implementación o licencia de productos, el Test de Ames, como test básico; según la normativa de sus respectivos organismos regulatorios, garantizando la inocuidad de los productos alimenticios y farmacéuticos, al mismo tiempo que protege a la población y medio ambiente de los riesgos de inducción de cáncer. (Motoe, K. 2005).

El Código Sanitario y los Reglamentos vigentes en Colombia, determinan expresamente que se debe garantizar la inocuidad de los productos alimenticios y farmacéuticos (Código Sanitario, Ley 9 de 1979); pero, no se realiza ningún tipo de Test tendiente a la detección de riesgos de cáncer potencialmente inducido por los productos alimenticios o farmacéuticos elaborados en nuestro país. Al ser *Carica candamarcensis* un potencial inhibidor de *H. pylori* es pertinente reconocer los efectos que dichas sustancias puedan tener sobre el hombre. Por lo tanto, es necesario realizar además estudios de genotoxicidad que permitan verificar si estos extractos interactúan en forma directa o no con el ADN, ya que la exposición prolongada a agentes modificadores del ADN puede producir acumulación de daños subletales (toxicidad crónica) que conllevan a cambios en la carga genética y aumentan potencialmente el desarrollo carcinogénico. (FDA, 1997).

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

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Estudios previos realizados por el grupo de investigación “Prevención de Cáncer” de la Universidad de Nariño, han demostrado que el aceite esencial y el extracto acuoso de pulpa de frutos maduros de *Carica candamarcensis* presenta efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori* causante del cáncer gástrico, esto los hace sustancias promisorias para el tratamiento complementario de la bacteria, sin embargo, para verificar su buen uso, se debe descartar la posibilidad de que estos compuestos en alguna concentración puedan ser mutágenos, premutágenos y/o genotóxicos y por lo tanto potenciales carcinógenos.

Con esta investigación se pretende determinar el potencial mutagénico y genotóxico del Extracto Acuoso y Aceite Esencial de *C. candamarcensis*, mediante la prueba de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* (Test de Ames) y la verificación del daño genético (Ensayo Cometa) en linfocitos humanos de sangre periférica, con el fin de explorar el potencial de dichas sustancias para utilizarse como posibles medicamentos.

4. MARCO TEORICO

4.1. GENOTOXICIDAD

Entre las sustancias con efecto tóxico merecen ser destacadas aquéllas que por su estructura son capaces de interaccionar con los ácidos nucleicos, presentando una posible actividad mutagénica y/o carcinogénica. La toxicidad que afecta al material genético y que manifiesta una expresión retardada en el tiempo se denomina genotoxicidad (Hofnung y Quillardet, 1986).

El daño inducido en el “material genético” incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula, ejemplos de esto último son las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y descondensación del ADN en los cromosomas, u otras estructuras como el huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular (Abrevaya., 2008).

Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos o xenobióticos y se clasifican en tres categorías de acuerdo a su origen: químicos, físicos y biológicos. La primera categoría está constituida por los compuestos químicos, la segunda incluye las radiaciones en todo su espectro y la última algunos parásitos, bacterias, hongos, vegetales o incluso virus. La acción o capacidad de inducir daño de estos xenobióticos está influida por la dosis recibida y el tiempo o vía de exposición, junto a la constitución genética del individuo que puede definir una susceptibilidad propia o particular (Abrevaya., 2008).

4.1.1. Detección de Genotoxicidad: Electroforesis Alcalina De Células Individuales SCGE (Ensayo Cometa). Ensayo de Cometa o electroforesis en gel de células individuales, es un método sensible, rápido y relativamente de bajo costo para cuantificar daño en el ADN de células individuales, puede ser realizado bajo condiciones neutras, detectando rupturas de doble cadena del ADN, o bajo condiciones alcalinas, detectando rupturas de cadena simple del ADN y sitios álcali lábiles. En esta técnica, las células son embebidas en un gel de agarosa en un portaobjetos, sometidas a lisis alcalina o neutra y luego corridas por electroforesis durante un corto tiempo bajo condiciones alcalinas (pH > 13) (pH= 8,4). Las células con mayor daño del ADN muestran una migración aumentada desde el núcleo hacia el ánodo. (Fairbairn, *et al*, 1995 & Olive, P.L. 1999).

Según Rojas *et al.*, 1999, su aplicación tanto *in vivo* como *in vitro* permite estimar el daño y la reparación en cualquier tipo celular eucariota, así como utilizar una metodología visual rápida y sensible. Este es un ensayo novedoso cuyas ventajas

lo hacen de elección entre el resto de los ensayos de genotoxicidad, estas ventajas son:

- Los datos que se obtienen son a nivel de una célula individual, lo que posibilita un análisis estadístico riguroso.
- No requiere de poblaciones celulares en proliferación ni de grandes cantidades de esta (< 10000).
- Posee alta sensibilidad para detectar el daño al ADN.
- Puede ser empleado en cualquier tipo celular eucariota.
- Utiliza pequeñas cantidades de sustancia de prueba.
- Tiempo corto de experimentación.

Las principales variables que pueden afectar la sensibilidad y poder de resolución de la técnica son:

- La concentración de la agarosa de bajo punto de fusión.
- La composición de la solución de lisis.
- La composición y pH de la solución de electroforesis.
- Las condiciones electroforéticas tales como el voltaje, el amperaje y el tiempo de duración de la electroforesis.

Las rupturas detectadas por el ensayo cometa dependen del pH que se utilice en la electroforesis, así: a pH de electroforesis neutro (pH 7), se detectan rupturas dobles originadas por el genotóxico. Cuando el pH de electroforesis es de 13 o mayor, se detectan rupturas de cadena sencilla producidas por reparación incompleta o las originadas por sitios lábiles al álcali. Estos sitios son AP (sitios abásicos) en el ADN, originados cuando el genotóxico daña una base causándole su pérdida por ruptura del enlace glicosílico entre la base y el azúcar. Cuando el núcleo de la célula expuesta al genotóxico se somete a electroforesis alcalina, los grupos OH^- de la solución, interactúan con los azúcares de los sitios AP, provocando la ruptura del enlace fosfoester entre el azúcar y el grupo fosfato. Al aumentar el número de rupturas se aumenta la migración de la cola del ADN, por lo tanto la intensidad del daño se mide por la longitud de migración de la cola del ADN. (Rojas *et al.*, 1999).

En cuanto a la preparación del ensayo se debe tener en cuenta la preparación de la lámina base, ya que para asegurar el éxito del mismo es necesario tener en cuenta la concentración de células dentro de la agarosa, como la concentración de la misma. El número óptimo de células (al menos para el análisis de imagen) son pocas por campo visual. Una densidad muy alta de células da lugar a cometas sobrelapados o superpuestos especialmente a niveles elevados de la migración del ADN. Concentraciones elevadas de agarosa pueden afectar la extensión de la migración del ADN (Sing N; McCoy Mc; Tice RR; Schneider, 1988).

4.2. MUTAGENECIDAD

4.2.1. Mutagenos. Los xenobióticos o genotóxicos también pueden clasificarse de acuerdo a su modo de acción en mutágenos, carcinógenos o teratógenos, dando lugar a tres tipos de procesos: mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis. La mutagénesis abarca los distintos tipos de alteraciones genéticas. Dichas alteraciones (mutaciones) pueden producirse a nivel de una unidad mínima de información (como por ejemplo un gen) o a nivel de unidades mayores como grupos estructurales (cromosomas) correspondiendo a lo que se denomina micromutación o macromutación respectivamente (Abrevaya, 2008).

La carcinogénesis es un proceso que involucra cambios (transformación celular) de tipo irreversible, a través de una serie de estadíos (iniciación, promoción y progresión), se ha observado que la mayoría de los carcinomas están asociados entre un 90-95% de los casos a agentes químicos, entre un 1-5% a agentes físicos (radiaciones) y entre un 1-2% a agentes de tipo biológico o virus. Por otra parte, la teratogénesis, implica el daño inducido sobre el organismo en desarrollo, es decir, en alguno de los distintos períodos de gestación.

Cuando ocurren cambios en el material genético del núcleo de las células, con la transmisión del cambio durante la división celular puede ocurrir mutación en células germinales y las consecuencias pueden ser productos no viables, y la muerte puede darse en etapas tempranas de la división embrionaria, afectar la embriogénesis temprana, el aborto o las malformaciones congénitas. En células somáticas implica mutación y herencia a células del mismo tejido por división mitótica. Las células cancerosas se producen por la acumulación de alteraciones génicas en células somáticas, estas alteraciones son producidas por elementos xenobióticos, los cuales entran al cuerpo humano desde el medio ambiente, y por elementos autobióticos los cuales se producen en el mismo cuerpo (Bastidas & Gómez, 1999).

Esta ampliamente demostrado que en el medio ambiente existen gran cantidad de agentes genotóxicos que pueden inducir cáncer y enfermedades hereditarias en el hombre, debido a que el 100% de la población esta expuesta directa o indirectamente a mutacarcinógenos; por exposición a agentes químicos presentes en el aire (principalmente combustión), agua (agroquímicos, desechos industriales, subproductos de la cloración, etc.), alimentos (procedentes de las malas prácticas de cocción), o agentes físicos (radiaciones) se incrementa el riesgo de contraer dichas enfermedades (James, J., *et al* , 2004).

Algunos mutágenos, como la radiación ionizante y la ultravioleta, pueden atacar al ADN directamente al igual que ciertos compuestos químicos, aunque algunos de ellos tienen que ser convertidos enzimáticamente en compuestos activos (Sidransky, 1995). La exposición a estos incrementa las frecuencias de mutación por encima de la basal, generalmente la frecuencia inducida está en proporción

directa a la dosis del mutágeno aplicado, aunque pueden presentarse patrones más complejos de dosis-respuesta. (Prescott *et al*, 1.999).

Entre los de acción indirecta hay muchos carcinógenos bien conocidos, su activación puede ser una consecuencia de los procesos de detoxificación que se llevan a cabo en los organismos. El que una célula expuesta a un mutágeno activo sobreviva, se reproduzca y su progenie porte mutantes, depende no sólo del número de cambios estructurales producidos en el ADN, sino también de su naturaleza y de la eficiencia celular para reparar el daño. (Prescott *et al*, 1.999).

Según Murray *et al.*, (2004) el complejo metabolismo de los xenobióticos se comprende en dos etapas: En la fase 1, la reacción principal implica la hidroxilación del compuesto, catalizada por miembros de la clase de enzimas conocidas como monooxigenasas o citocromo P450. La hidroxilación puede poner fin a la acción del fármaco, aunque este no siempre es el caso. Además de la hidroxilación, estas enzimas catalizan una amplia variedad de reacciones, incluyendo las de desaminación, deshalogenación, desulfuración, epoxidación, peroxigenación y reducción. En la fase 2, los compuestos hidroxilados y otros, productos de la fase 1, son convertidos por enzimas específicas en varios metabolitos polares mediante su conjugación con ácido glucorónico, sulfato, acetato, glutatión o ciertos aminoácidos, o mediante su metilación.

El objetivo final de estas dos fases del metabolismo de los xenobióticos constituye el incremento de su solubilidad en agua (polaridad) y su excreción del organismo. Los xenobióticos muy hidrofóbicos podrían permanecer en el tejido adiposo por periodos casi ilimitados si no fueran convertidos a formas más polares. En algunos casos, las reacciones de la fase 1 convierten los xenobióticos inactivos a compuestos biológicamente activos. Por lo anterior los xenobióticos antes eran conocidos como “profármacos” o “procarcinógenos”. En otros casos, reacciones adicionales en la fase 1 (p. ej., reacciones posteriores a la hidroxilación) convierten los compuestos activos a formas inactivas o menos activas, antes de su conjugación. En otros tantos casos, son las propias reacciones de conjugación las que convierten los productos activos de la fase 1 a especies inactivas o menos activas, las cuales serán excretadas después por orina o bilis. En muy pocos casos, la conjugación llega a incrementar la actividad biológica de un xenobiótico (Murray *et al* 2004).

Abrevaya en el 2008 y Murray *et al* en el 2004 describen el primer efecto tóxico de los xenobióticos causando daño celular (citotoxicidad), el cual puede resultar suficientemente grave y provocar la muerte celular. Uno de los mecanismos en que los xenobióticos ocasionan este tipo de daños, es la unión covalente a macromoléculas celulares de especies reactivas de xenobióticos producidas por el metabolismo de estos últimos; tales macromoléculas blanco incluyen ADN, ARN, y proteínas.

En Segundo lugar, las especies reactivas derivadas de un xenobiótico pueden unirse a una proteína alterando así su antigenicidad; el xenobiótico actúa entonces como un hapteno, es decir una molécula pequeña que por sí sola no estimula la síntesis de anticuerpos, si no que se combina con el anticuerpo una vez formado. Los anticuerpos producidos pueden así dañar la célula mediante varios mecanismos inmunológicos que afectan profundamente los procesos bioquímicos celulares normales.

En Tercer lugar, la reacción entre las especies activadas derivadas de carcinógenos químicos y el ADN es fundamental en la carcinógenesis química. Algunos químicos como el benzo [a]pireno requieren ser activados por monooxidasas localizadas en el retículo endoplásmico para volverse carcinógenos (carcinógenos indirectos). La actividad de las monooxigenasas y de otras enzimas metabolizadoras de xenobióticos presentes en el retículo endoplásmico determina si un compuesto se vuelve carcinógeno, o si será “destoxificado”. Otros químicos (p.ej., varios agentes alquilantes) pueden reaccionar directamente con el ADN sin someterse a activación química intracelular (carcinógenos directos).

4.2.2. Premutagéno. La mayoría de los compuestos no son biológicamente activos en su forma original, de manera que, al analizarlos en dicho estado, no se descubre su naturaleza cancerígena. Ha quedado claro que los procesos metabólicos normales, que transforman los alimentos en sustancias para que el organismo pueda absorber y eliminar, y convertir los compuestos dañinos en inofensivos, o transforman ciertas sustancias químicas del medio ambiente en metabolitos cancerígenos (Devoret, 1998).

Por esta razón en el Test de Ames se utiliza enzimas microsomales de hígado de ratón para simular el metabolismo humano en el sistema bacteriano ya que en el hígado se llevan a cabo los procesos metabólicos de detoxificación y toxificación de los compuestos químicos del cuerpo y en algunos casos, la acción de las enzimas del hígado pueden crear un compuesto tóxico o mutágeno a partir de una sustancia que originalmente no era peligrosa. (Griffiths, *et al* 2002).

4.2.3. Detección de Mutagenicidad: Ensayo De Mutagenicidad Con Preincubación y Activación Metabólica En *Salmonella Typhimurium* (Test De Ames). Ames (1973) plantea que existe una gran preocupación sobre las posibles propiedades mutagénicas de cualquier sustancia que entra en el cuerpo humano, ya sea por la piel, por el sistema digestivo, o por el aparato respiratorio. Aunque la mutagenicidad puede ensayarse en distintos organismos, como *Drosophyla*, ratones y células de mamíferos en cultivo, la prueba más común se realiza en bacterias y fue diseñada por Bruce Ames en 1975. El test de Ames, utiliza varias cepas modificadas de la bacteria *Salmonella typhimurium* seleccionadas por su especificidad y sensibilidad a la mutagénesis. Todas las cepas son incapaces, de sintetizar histidina para crecer (his-), la prueba mide la frecuencia de la reversión de la mutación, que producen bacterias silvestres (his+). Estas cepas se han

diseñado adicionalmente con otras mutaciones que eliminan el sistema de reparación por escisión y la barrera de lipopolisacáridos, que cubre y protege la superficie de la bacteria, con lo cual se logra una mayor sensibilidad (Maron & Ames, 1983)

Es muy interesante observar que muchas sustancias que entran en el cuerpo humano son relativamente inocuas hasta que se activan metabólicamente en productos químicos mutagénicos (McCann, 1998). Generalmente, esto sucede en el hígado. Así, el ensayo de Ames incluye un paso en el que el compuesto que se desea probar se incuba *in vitro* en presencia de un extracto de hígado de mamífero (fracción microsomal). Otra alternativa es inyectar los compuestos en ratones, que luego se sacrifican, para que las enzimas de su hígado los modifiquen (Ames, 1973). En la utilización inicial del ensayo de Ames, en la década de los 70, se examinó un elevado número de carcinógenos conocidos. Se vio que más del 80% son potentes mutágenos. La transformación de las células a un estado maligno se produce como resultado de alguna alteración del DNA, aunque una respuesta positiva como mutágeno no demuestra la característica carcinogénica de un compuesto, el ensayo de Ames es útil como mecanismo de reconocimiento (Adler, 1985).

4.2.3.1. Tipos de cepas mutantes de ***Salmonella typhimurium***. Según Maron & Ames (1983) hay varios mutantes de *S. typhimurium* que tienen mutaciones diferentes en su ADN, se acepta que en los diferentes estudios se usen hasta cinco cepas, pero con una sola cepa es suficiente para descartar mutagenicidad. La cepa TA100 ha sido una de las más empleadas para el descubrimiento de diferentes tipos de mutágenos, porque presenta el tipo de Alelo Blanco hisG46, el Genotipo Cromosómico hisG46 – rfa – uvrB, plásmidos y función genética: pKM101 (mucA-B- Δp^r) (Mortelmans, *et al* 2.000). Las cuales se detallan a en la Tabla 1.

Tabla No. 1. Características Genéticas de las Cepas de *S. typhimurium*.

CARACTERÍSTICA	RAZONES PARA INCLUIRLA EN EL TEST DE AMES
rfa	Causa perdida parcial de lipopolisacáridos de la pared bacteriana y confiere gran permeabilidad a los mutágenos
uvrB	Elimina el sistema de reparación por excisión y le confiere gran sensibilidad a muchos mutágenos
mucA	Aumenta la sensibilidad a algunos mutágenos actividad dependiente del procedimiento de reparación SOS de lesiones premutacionales.
B	Resistencia a la ampicilina otorgada por la presencia Del plásmido pKM101
Ap ^r	Confiere un pequeño incremento de reversibilidad del Gen hisD6610

Fuente: Maron & Ames, *et al* 1983.

4.2.3.2. Características de la Cepa TA 100. Para la detección de los Mecanismos de Reversión producidos en la cepa TA 100 de *S. typhimurium*, el alelo HisG46 es el resultado de la substitución de una leucina (GAG/CTC) por un prolina (GGG/CCC). Esta mutación es revertida al tipo salvaje por sustancias mutágenas que causan mutaciones de substitución de pares de bases principalmente en uno de los pares Guanina Citosina (Maron & Ames, *et al* 1983).

4.2.3.3. Controles para determinación de Reversión Espontánea para la cepa TA-100. Hay por lo general alguna variación cotidiana y de laboratorio a laboratorio en el número de colonias espontáneas revertantes, el tipo de solvente también puede afectar dicha frecuencia. Sin embargo, los valores obtenidos en cada laboratorio deben ser comparables con los reportados históricos a nivel mundial (Mortelmans, *et al*, 2000).

4.2.3.4. Índice de Mutación. El cálculo del índice de mutación o factor de mutagenicidad, es el cociente resultante de dividir el número de colonias revertantes de cada tratamiento entre las colonias revertantes del control negativo. Para determinar el Índice de Mutación o Factor de Mutagenicidad de los Extractos se empleó el criterio sugerido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cual clasifica cualquier compuesto químico como mutagénico si induce un aumento de dos veces la tasa de reversión espontánea y presenta un efecto dependiente de la dosis (Coulston, *et al.*, 1980), con lo que la estimación del índice se correspondería con las distintas anotaciones de cualidad:

N. M	= No mutagénico	Índice menor de 1.5
L.M	= Ligera mutación	Índice entre 1.5 - 2
M.P	= Mutación positiva	Índice mayor o igual a 2
T	= Efecto tóxico.	

4.3. TOXICIDAD EN LINFOCITOS HUMANOS

Antes de ejecutar el ensayo de mutagenicidad Test de Ames y ensayo de genotoxicidad Cometa se debe determinar las dosis de trabajo de los extractos a evaluar, para esto es necesario realizar estudios de citotoxicidad que determinen la capacidad de tales sustancias para alterar la homeostasis celular o inducir muerte y permitan por tanto obtener un indicativo de la toxicidad aguda *in vivo* siguiendo el método tradicional en gradiente de Hystopaque® (Boyum, 1968) en linfocitos humanos. Además se deben realizar pruebas de viabilidad de estas células mediante el método de exclusión de Azul de Tripaño en un hemocitómetro o cámara de Neubauer (ver detalle en metodología), ya que se ha reportado según (Forabosco, *et al.*, 1972) que la viabilidad requerida para realizar tratamientos *in vitro*, debe ser superior al 85 % y para estudios *in vivo* como biomonitoreo, casos y controles.

4.4. *CARICA CANDAMARCENSIS*

4.4.1. Clasificación taxonómica. La clasificación taxonómica corresponde a:

Reino: Plantae

Clase: Magnoliopsida

Orden: Violales

Familia: Caricaceae

Género: *Carica*

Especie: *candamarcensis*

Nombre vulgar: Papayo, Papayuela, Chilacuán.

4.4.2. Características. ***Carica candamarcensis*** es una planta herbácea (árbol ver Fig. 1), tiene de 3 a 6 metros de alto, su tronco es cónico, fibroso; su fruto es de forma oblonga a elíptico, truncado en la base y agudo en el ápice, es de color amarillo claro y muy aromático, presenta 5 costillas muy pronunciadas, de 8 a 11cm de largo, con 5 a 6cm de diámetro; las semillas son muy numerosas y se encuentran en la cavidad central del fruto, llegan hasta 1cm de largo, rugosas y con aristas envueltas por una membrana dulce, translúcida y gelatinosa. (García, 1992)

Figura 1. Frutos maduros de *C. candamarcensis*



Fuente: Gómez y Moran 2.005

Según las tablas de composición de Alimentos Colombianos del Ministerio de Salud Pública y el Instituto Nacional de Nutrición, Bogotá 1959; la composición de la pulpa (parte comestible), sin semillas es el 45% y contiene en 1400gr los componentes que se muestran en la Tabla 2 (García, 1992).

Tabla 2. Composición de Pulpa de *Carica candamarcensis*

Componente	Peso
Agua	93.5gr
Proteínas	0.7gr
Grasas	0.1gr
Carbohidratos	3.9gr
Fibra	1.2gr
Cenizas	0.6gr
Calcio	10mg
Fósforo	11mg
Hierro	0.3mg
Vitamina A	100 V.I
Tiamina	0.02mg
Rofoflavina	0.03mg
Niacina	0.6mg
Ácido ascórbico	70mg
Calorías	16

Fuente: García, 1992

4.4.3. Distribución de ***C. candamarcensis***. Esta planta es probablemente originada de los Andes de la América Meridional de Colombia o Perú. Se encuentra espontánea en Ecuador y Colombia en los climas fríos entre los 2.000 y 3.000 m.s.n.m; (García, 1992).

4.4.4. Usos. Todas las partes de la planta producen un látex lechoso que emana del tejido con facilidad cuando se les provoca alguna herida, el látex procedente de frutos verdes se ha utilizado como ablandador de carnes, en la clarificación de cerveza y curtiembre de pieles; además en la elaboración de goma de mascar, cosméticos y finalmente como remedio casero se emplea el látex en contacto con la piel para quitar verrugas y los mezquinos, en pinceladas sobre la garganta en las anginas y amigdalitis; la cáscara y la pulpa se utilizan para eliminar hematomas y por digestión la arteriosclerosis, como también para aliviar afecciones digestivas, artritis, asma, constipación, diarreas, úlceras, gripe, disentería y reumatismo, entre otras aplicaciones, por lo que en un principio se le conoció internacionalmente como fruta medicinal más que como fruta nutritiva. (Guzmán, 1998)

Normalmente se consume el fruto fresco y maduro debido a que su contenido de azúcares (10 % en promedio) le dan un sabor agradable, también puede prepararse en refrescos licuados o jugos y con un poco de procesamiento se puede obtener fruta cristalizada, encurtidos, vinos, vinagres, mermeladas, jaleas, pastas, siropes, confitados y hasta trozos en almíbar; las semillas han sido utilizadas como especia (García, 1992).

5. ANTECEDENTES

Frente a los clásicos ensayos de determinación de toxicidad a nivel genético, la tendencia actual es el empleo de ensayos a corto plazo que permiten la obtención de resultados en intervalos de tiempo relativamente cortos. A la rapidez hay que sumarle las ventajas de la economía y la de emplear grandes poblaciones en los ensayos. La mayoría de estas pruebas utilizan como elementos de experimentación a microorganismos, sobre todo bacterias, o a cultivos celulares (Venitt, & Parry JM, 1984).

El Test de Ames(1973) se usa ampliamente por las agencias reguladoras, instituciones académicas y compañías químicas para evaluar el potencial mutagénico de diversas clases de compuestos, es el test mínimo exigido como garantía de inocuidad genotóxica de productos consumidos por el ser humano por la mayoría de países desarrollados. Las agencias Regulatorias (EPA, FDA, EC 6th Amendment 79/831/EEC, MOHW, MAFF) de Estados Unidos (U.S.A.), Comunidad Europea (EC), Japón y Canadá exigen varios análisis de genotoxicidad, pero el mínimo exigido por todos ellos es el Test de Ames (Motoe, 2005).

Por otro lado En 1978 Rydberg y Johanson detectaron por primera vez el daño al ADN al someter células lisadas embebidas en gel de agarosa a electroforesis alcalina. La tinción con naranja de acridina permitió cuantificar por la aparición del color verde rupturas de cadena dobles y por la aparición de color naranja rupturas de cadenas simples. En 1984, Osttling y Johanson desarrollaron la técnica de electroforesis en microgel que comúnmente se conoce como Ensayo Cometa. Ellos lisaron las células con detergentes y sales, lo que conducía a la liberación de fragmentos de ADN durante la electroforesis. La migración de estos hacia el ánodo se observó por tinción con Bromuro de Etidio y el daño al ADN se valoró cuantificando los núcleos con y sin cola. Este protocolo, sin embargo, no detectaba las rupturas de cadena simple por lo que su utilidad era limitada. Fue hasta 1988 que Singh y colaboradores introdujeron una técnica en microgel bajo condiciones alcalinas, la cual es capaz de detectar rupturas de cadena simple, lesiones sensibles al álcali y reparación inducida por mutágenos y carcinógenos químicos a nivel de células individuales. (Tice, *et al.*, 2000)

Según la revisión bibliográfica, de la especie *C. candamarcensis* se han desarrollado diversas investigaciones en el campo de la bioquímica con respecto a la composición del látex que esta especie produce y a sus posibles aplicaciones médicas y en genética acerca del mejoramiento de *caricaceas*. A continuación se mencionan las investigaciones de mayor importancia.

Walreavens V. y colaboradores en 1993, realizaron el aislamiento y la caracterización preliminar de las enzimas obtenidas a partir del látex de *C.*

candamarcensis, buscando encontrar un sustituyente de la quimopapaina difícilmente aislada a partir de *C. papaya* y usada en el tratamiento de hernias discales.

Genelhu *et al* en 1998 describieron que el uso de una proteína del látex rica en cisteína aislada de la planta *C. candamarcensis* es un agente protector durante el aislamiento de ADN bacteriano. De 100 a 720 unidades de proteinasa (1 microgramo = 6 unidades) permitió la protección del ADN cuando se incubó con varios tipos de microorganismos.

Por otra parte, Pereira, *et al* 2001 purificaron la proteinasa rica en cisteína de látex de *C. candamarcensis*, designándola como CC23. La enzima se purificó por cromatografía de intercambio iónico y se comportó electroforéticamente como un monómero con un pH óptimo de 8.0, la eficacia catalizadora de CC23 es seis veces más alta que CC-1, otra proteinasa de la misma planta.

El látex de las Caricaceas contiene varias proteínas que se creyeron hacían parte de un mecanismo de defensa que protege a estas plantas de heridas. La evidencia anterior sugiere que algunos componentes de *Carica* actúen sanando heridas ulcerosas en mamíferos, esto fue demostrado por Silva *et al* en el 2.003 con un aislamiento cromatográfico de un fragmento de proteína de *C. candamarcensis* que estimula la proliferación de las células de mamífero.

Salas en el 2004 estudió las propiedades curativas de *C. candamarcensis*, elaborando un ungüento a base de látex que sana heridas. Estos investigadores señalan que el principio activo de la planta está en alguna proteasa, esta tiene funciones de ruptura, con el objetivo de activar o desactivar favoreciendo los mecanismos de proliferación celular. Estas proteasas también se probaron en lesiones gástricas demostrando mayor efectividad contra las úlceras que Omeprazol y Ranitidina.

La investigación realizada en Brasil por Gómez *et al* en el 2005 mostró que el látex contiene un fragmento de proteína que estimula la proliferación de células de mamífero, las proteinasas responsables son (P1, P2) con 23 kDa, que estimulan la proliferación de fibroblasto (P2 con un 60%) y células epiteliales. Su efecto celular se une a un aumento en la actividad de Erk2, un componente de la senda de quinasa de MAP. Esta fue la primera proteinasa conocida de la planta, que ejerce un efecto proliferativo en células de mamífero. Esta propiedad mitogénica es atribuida a la cistidina proteinasa purificada que explica algunas de las acciones terapéuticas atribuidas a estas enzimas.

En un reciente estudio realizado con látex de *C. candamarcensis*, se probó la eficacia de una fracción proteolítica, designada como P1G10 para proteger y curar úlceras gástricas químicamente inducidas en modelos experimentales de roedores. El efecto de curación de P1G10 fue estudiado después de la inyección

subserosa de ácido acético en ratas wistar. Los resultados muestran que P1G10 entre 0.1 y 10 mg/kg protege como la indometacina, sin embargo no protege úlceras gástricas inducidas por etanol. La protección máxima lograda fue del 67 % con 10 mg/kg de P1G10. La tasa de curación por 10 mg/kg de P1G10 que usa ácido acético ulcerogénico es similar a él de omeprazol (10 mg/kg) o ranitidina (100 mg/kg). El efecto de P1G10 en 10 mg/kg parece ser mediado por un aumento del contenido de mucosa en el 25% y estímulo de angiogénesis en el 64% en una manera similar a factores de crecimiento. Estos resultados confirman el papel protector y de curación por proteinasas de *C. candamarcensis* (Melloa., et al, 2007)

El estudio realizado por Mena *et al* en el 2005, trabajando con extractos acuosos y aceites esenciales de pulpa y semilla de *C. candamarcensis* sugiere que el aceite esencial de pulpa fue el más promisorio inhibidor del crecimiento de *Helicobacter pylori*, gracias al análisis químico preliminar mediante la técnica de Hidrodestilación asistida por radiación con microondas realizado por Gómez & Morán, 2005 (Tabla 3); los investigadores explican que esa inhibición posiblemente estaba asociada a la presencia de compuestos como el Linalool que según Friedman M, et al. (2004) presenta actividad antibacterial contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella enterica*; otro compuesto encontrado fue el Farnesol que ha sido bactericida y antiinflamatorio (Koo H. *et al* 2003); y además Heneicosanato que según Sun *et al* (2005) es un antimicrobiano utilizado para tratamientos de neumonía, además de otros compuestos como decanoato de butilo, ésteres y derivados que han demostrado diferente actividad biológica.

Sin embargo, también se encontraron algunos componentes como el tolueno cuya actividad deletérea ha sido ampliamente reportada (Ecotoxicol Eviron Saf, 2004), por lo tanto se requiere realizar evaluaciones de genotoxicidad y citotoxicidad al aceite esencial de pulpa de *C. candamarcensis* antes de iniciar pruebas *in vivo* para recomendar el extracto como un tratamiento terapéutico complementario para controlar la infección por *H.pylori* (Mena *et al*, 2005)

Tabla 3. Concentración de compuestos presentes en Aceite Esencial de frutos maduros de *C. candamarcensis* mediante cromatografía de gases.

FAMILIA		COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (mg/K material Vegetal húmedo)
Oxigenados		Hexadecanoato de butilo	295×10^{-3}
		Benzoato de butilo	178×10^{-2}
		1-octen-3-ona	342×10^{-3}
		Hexanoato de etilo	152×10^{-3}
		Caprilato de butilo	345×10^{-2}
		Acetato de hexilo	97×10^{-3}
		Furancarboxilato de etilo	581×10^{-3}
		Octanol	242×10^{-2}
		2-octenoato de etilo	702×10^{-3}
		Octanoato de metilo	341×10^{-2}
		Ácido octanoico	481×10^{-2}
		2-hidroxibenzoato de etilo	200×10^{-3}
		Octanoato de etilo	128×10^{-4}
		Ácido tetradecanoico	150×10^{-3}
		Decanoato de butilo	645×10^{-3}
		Hexadecanoato de etilo	308×10^{-3}
		9,12,15-octadecatrienoato de metilo	108×10^{-3}
		Caprilato de metilo	633×10^{-3}
Hidrocarburos	Insaturados	5-metil-1-hexeno	128×10^{-2}
		2-metil-1-penteno	671×10^{-2}
	Saturados	Heneicosano	180×10^{-3}
	Aromáticos	Tolueno	106×10^{-2}
Monoterpenos		Linalool	335×10^{-3}
Sesquiterpenos		Farnesol	76×10^{-3}
Nitrogenados		2-miristinol glicinamida	198×10^{-2}

Fuente: Gómez & Morán (2.005)

6. METODOLOGIA

Todos los procedimientos se realizaron bajo las normas de bioseguridad requeridas (Anexo A).

6.1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Para la obtención del Aceite Esencial (AE) y el Extracto Acuoso (EA) de pulpa de frutos maduros de *C. candamarcensis* se trabajó con el protocolo estandarizado por Gómez & Moran (2005), para esto se utilizaron frutos maduros y sanos de *C. candamarcensis* provenientes del Municipio del Encano, Departamento de Nariño. En primer lugar se lavaron con solución de hipoclorito al 2% para eliminar cualquier agente contaminante y luego se separo la pulpa de la semilla. La pulpa junto con la cáscara se dividió finamente y se la introdujo (2000 g) en un balón de 4 litros de capacidad, con 200 ml de agua destilada acoplando todo el sistema de acuerdo con el montaje de la Figura 2, que se encuentra en el laboratorio de extractos naturales de la Universidad de Nariño.

Para la extracción del AE y el EA de pulpa de *C. candamarcensis* se trabajó con la técnica estandarizada de Hidrodestilación Asistida por Radiación con Microondas (MWHD) descrita por Gómez & Moran (2005), para esta se utilizó un horno microondas LG, modelo B-314VG, con una potencia de 7 en un tiempo de extracción de 90 minutos. El AE se extrajo de la fase superior del producto obtenido, posteriormente se guardaron los extractos en viales estériles cubiertos con papel aluminio y se conservaron en nevera a 4°C. Este proceso de Extracción se trabajo en el Laboratorio de Química de Extractos Naturales de la Universidad de Nariño.

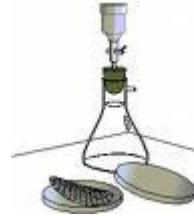
Figura. 2. Equipo para MWHD.



6.2. FILTRACION DEL EXTRACTO ACUOSO

Para esterilizar el EA puro y el agua destilada esterilizada (previamente por autoclave) se utilizo la técnica de Filtración por Membranas (Fig. 3), inicialmente se trabajo con un filtro de 0.22 μm , y posteriormente con un filtro de 0.45 μm . El AE por su escasa cantidad no pudo ser filtrado.

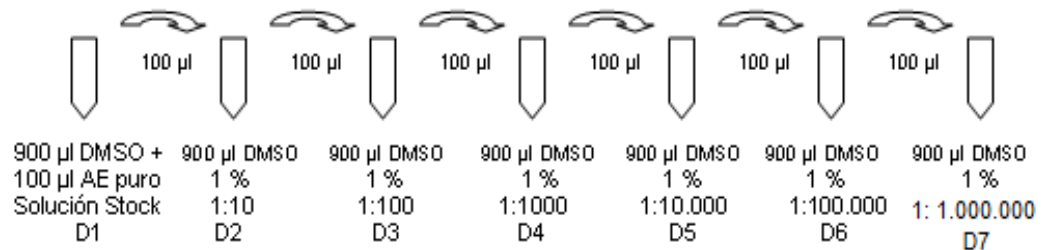
Figura 3. Esterilización por filtro de membrana



6.3 DILUCIONES DE LOS EXTRACTOS

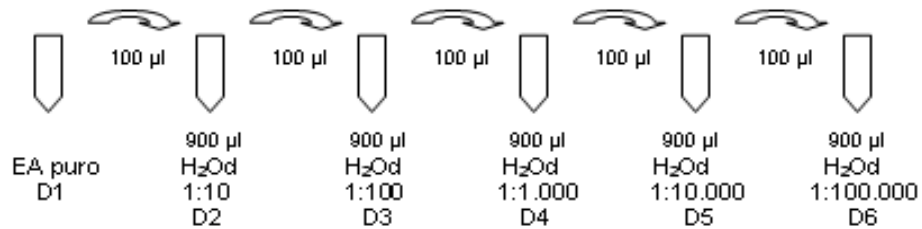
En el caso del AE se elaboro una solución Stock, con 100 μl de AE puro más 900 μl de DMSO puro este se fue agregando de 100 en 100 μl hasta que se formo una solución homogénea, a partir de esta solución se hicieron las diluciones en DMSO al 1% (muy diluido) como se muestra en la Figura 4.

Figura 4. Diluciones Aceite Esencial



Para el EA se trabajo con el extracto puro como primera dosis, en este caso las diluciones se hicieron con agua destilada esterilizada por autoclave y por filtro de membrana 0.45 μm . A partir del EA puro se elaboraron las siguientes diluciones (Fig. No. 5):

Figura 5. Diluciones Extracto Acuoso



Los tubos se envolvieron con papel aluminio para evitar que la luz altere los extractos y estos fueron guardados en nevera a 4 °C hasta su uso.

La filtración y las diluciones de los Extractos se realizaron en el Laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia.

6.4. DETERMINACION DE DOSIS A EVALUAR POR TOXICIDAD EN LINFOCITOS.

Para esta prueba se emplearon linfocitos humanos de sangre periférica de un donante sano no fumador, joven, que no haya ingerido alcohol y que no se encuentre en algún nivel de estrés. Los linfocitos se aislaron por el método tradicional en gradiente de Hystopaque® (Boyum, 1968) como se describe a continuación:

1. Obtención de Linfocitos de sangre periférica: Se extrajo 10 ml de sangre en un tubo Vacutainer con heparina de sodio como anticoagulante, se repartió la sangre en dos tubos (limpios y secos) y se mezcló con 5 ml de Buffer fosfato de sodio (PBS), en relación 1:1. En un tubo aparte se colocó 3 ml de Hystopaque® 1077 de Sigma (Boyum, 1968) y se agregó lentamente la mezcla anterior por las paredes, evitando turbulencia, para formar las dos capas, para este procedimiento se usó una pipeta Pasteur; se llenó un tubo con agua de igual volumen para la centrifugación. Seguidamente, se llevó a centrifugar los dos tubos durante 30 minutos a 2000 rpm, se extrajo la capa de linfocitos (nube blanca, encima de la capa de Hystopaque) con precaución y se pasó a otro tubo limpio y seco.

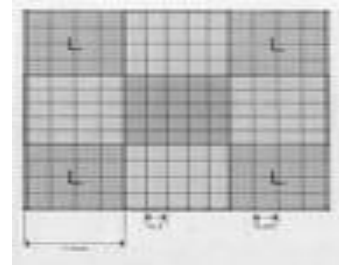
Se realizaron un total de tres lavados, con el fin de que la capa de linfocitos quede limpia, en donde se pasa la nube de linfocitos a un tubo con PBS con 5 ml, se llevó a centrifugar por 7 minutos a 1200 rpm, hasta que se observó que la nube de linfocitos no estuviera contaminada. Por último se descartó el PBS y se agregó un 1 ml de medio RPMI 1640 de sigma, se resuspendió muy bien y en un tubo ependorf se agregó 90 µl de azul de tripano y 10 µl de células para medir la viabilidad inicial.

2. Conteo de Células: La cantidad de células para cada tratamiento es de 100.000 células; para calcular que el número de células sea el indicado se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de células/ml} = (\text{Promedio de células de los 4 cuadrantes}) * 10^5$$

3. Viabilidad: La viabilidad y el número de linfocitos se determinaron mediante el método de exclusión de Azul de Tripano en un hemocitómetro o cámara de Neubauer (Fig. 6a), contando las células que se ubicaron en los cuadrantes de las cuatro esquinas (Fig. 6b), las células blancas se consideraron como vivas y las células teñidas de azul se consideraron como muertas. (Forabosco, *et al.*, 1972)

Figura 6. (A). Cámara de Neubauer. (B) Campo Visual de la Cámara



El porcentaje de viabilidad se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Viabilidad} = \text{células vivas} / \text{células totales} \times 100$$

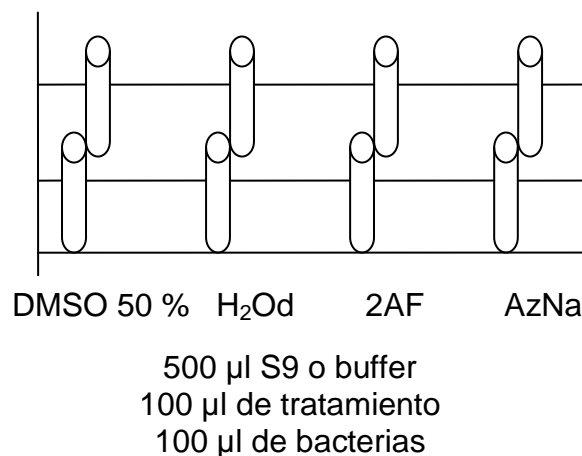
4. Tratamientos: En un vial limpio, seco y previamente marcado se agregó la cantidad de μl que contengan las 100.000 células, (en este caso, 50 μl) al tratamiento de prueba (diluciones) y por último el medio RPMI completando un volumen final de 250 μl , este volumen es para linfocitos. Se incubó a 37 °C durante 1 hora, se midió nuevamente viabilidad, y así sucesivamente durante 6 horas. Los tratamientos se prepararon en el siguiente orden, primero se agregó el medio RPMI, luego el tratamiento y por último las células. Se realizó además un control con la cantidad de μl que contengan las 100.000 células (50 μl) y con el medio RPMI, hasta completar el volumen final de 250 μl .

6.5 ENSAYO DE MUTAGENICIDAD CON PREINCUBACIÓN Y ACTIVACIÓN METABOLICA EN *Salmonella typhimurium* TEST DE AMES.

6.5.1. Controles para determinación de reversión espontánea para cepa ta-100. Antes de realizar la ejecución del ensayo de mutagénesis y para garantizar su validez, se probó que los valores de reversión espontánea estuviesen dentro del rango reportado a nivel mundial (Mortelmans, *et al.*, 2000).

Se siguió el protocolo descrito por Maron & Ames, 1983, el control negativo fue DMSO 50% y Agua Destilada Estéril y los controles positivos: 2 Aminofluoreno (2AF) con S9 y Azida de Sodio (AzNa) sin S9. Se incubó en caldo nutritivo una colonia de TA100, durante 17 horas a 37 °C. Al cumplir el tiempo de incubación se midió la densidad óptica a 650 nm, ya que, esta debe estar en el rango de 0.4 – 0.6 valores en los que se asegura que se esta trabajando por cada dosis cerca de 1×10^9 bacterias/ml. Se realizó el montaje como se muestra en la Figura 7, a cada tubo de ensayo estéril se le agregó: 500 μ l de S9 (con activación metabólica) o 500 μ l de Buffer (sin activación metabólica), más 100 μ l de tratamiento y por ultimo 100 μ l de caldo (1×10^9 bacterias/ml abs 650 nm).

Figura 7. Montaje Controles para Reversión Espontánea



Una vez terminado se cubrió la gradilla con papel aluminio para evitar contaminación, se agito y se llevo a incubar a 37 °C por 30 minutos. (Preincubación). Terminada la incubación, se agregó a cada tubo de tratamiento 3 ml de Top Agar se homogeniza en vortex por menos de 3 sg y se sirvió esta mezcla en cajas petri con Agar Mínimo (previamente rotuladas) estas se llevaron a incubar a 37 °C por 48 horas.

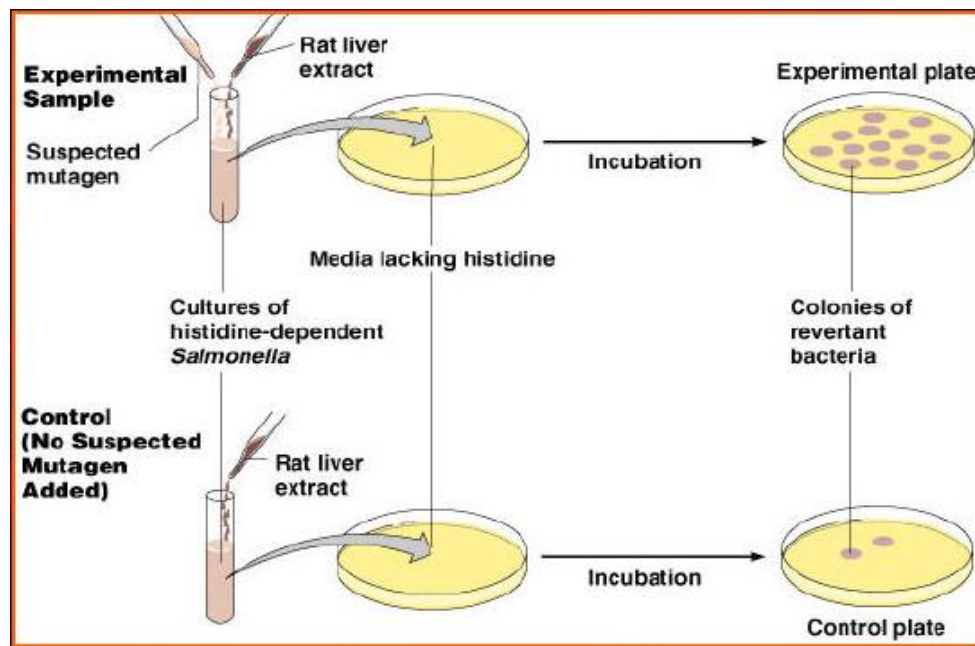
6.5.2. Confirmación de Marcas. Se realizó para confirmar el genotipo de la cepa TA100, una vez obtenidas las bacterias después de 16 horas de haberlas inoculado en caldo nutritivo a 37°C, se midió la densidad óptica y con el caldo que se encontraba dentro del rango recomendado ($\lambda=0.5$) se inició el chequeo de las marcas, según el protocolo descrito por Maron & Ames, 1983. (Anexo B)

6.6. EJECUCION DEL ENSAYO DE MUTAGENICIDAD.

Todos los materiales, soluciones, medios y equipos fueron esterilizados previamente. El Ensayo de Mutagenicidad consistió en la combinación de las dosis de los dos tipos de extractos con la cepa TA100 en presencia o ausencia de

S9 (para verificar si las sustancias son premutágenos), se incubó durante 30 minutos y posteriormente se mezcló con el Top Agar (Agar Blando), el cual sirve de vehículo para el crecimiento de las bacterias, esta mezcla se sirvió en Agar Mínimo (Figura 8). En el ensayo se incluyeron controles positivos en este caso se trabajó con 2 AF con S9 y A₂Na sin S9 y controles negativos cuando se trabajó con el AE el control negativo era DMSO al 50% y con el EA el control negativo era Agua destilada estéril (H₂O). Después se incubaron las cajas por 48 horas a 37 °C y se contaron las colonias revertantes. Siguiendo la metodología estandarizada por Maron y Ames., 1983 y con las modificaciones realizadas por el Laboratorio de Mutagénesis de la universidad de Antioquia. El detalle del procedimiento se relaciona en el Anexo C.

Figura 8. Esquema Ensayo de Mutagenicidad



Fuente: Mortelmans, *et al* 2.000

6.7. ANALISIS ESTADISTICO TEST DE AMES

Los resultados obtenidos en este procedimiento se analizaron usando el programa de análisis estadístico Past 2008, con un alfa de 0.01 y un valor de confiabilidad del 99%.

En el ensayo de Mutagenicidad Test de Ames, que comprende el análisis de EA ± S9 y AE ± S9 de *C. candamarcensis*, inicialmente se realizó un Análisis de Varianza - Anova de una sola vía, el cual nos permitió comprobar si existían diferencias entre promedios de las dosis o tratamientos y para ello se calculó el

valor de P. Una vez se encontró el valor de P se supo la diferencia entre los grupos, pero posteriormente se aplicó el Test de Medias de Tuckey y el Análisis de Kruskal Wallis para conocer entre cuales tratamientos existían dichas diferencias.

6.8. ELECTROFORESIS ALCALINA DE CÉLULAS INDIVIDUALES (SGCE) ENSAYO COMETA (Sing N; McCoy Mc; Tice RR; Schneider, 1988)

1. Preparación de Láminas Base: Se usaron portaobjetos nuevos, esmerilados o rayados con papel lija de agua, se sumergió cada portaobjetos en un beaker con metanol y se limpió posteriormente con una gasa impregnada del mismo con el fin de quitar la grasa. Luego, se sumergió cada portaobjetos en un beaker (20 ml) que contiene Agarosa de Punto de Fusión Normal (NMA) previamente disuelta en microondas y mantenida en Baño María a 60 °C, para evitar que se solidifique (Figura 9.)

Figura 9. Baño María



El portaobjetos debió quedar cubierto, posteriormente, se limpió por el lado opuesto al esmerilado, y se colocó en la estufa a 39 °C hasta que se solidificó; se guardaron en una caja a temperatura ambiente, hasta su uso. Es importante tener en cuenta que los portaobjetos se prepararon 24 horas antes de su uso.

2. Obtención de Linfocitos de Sangre periférica (Boyum, 1968): Se extrajo 10 ml de sangre de un tubo Vacutainer con heparina de sodio como anticoagulante, la sangre fue donada por una persona en dos ocasiones para el Cometa 1 y 3 y otra persona para el Cometa 2. Los donantes eran personas sanas, no fumadoras, jóvenes, que no hayan ingerido alcohol, que no hayan trasnochado y que no estuvieran estresadas.

Para el procedimiento se repartieron los 10ml de sangre en dos tubos (limpios y secos) y se mezcló con 5 ml de Buffer fosfato de sodio (PBS), en relación 1:1. En un tubo aparte se colocó 3 ml de Hystopaque® 1077 de Sigma (Boyum, 1968) y se agregó lentamente la mezcla anterior por las paredes, evitando turbulencia, para formar las dos capas, para este procedimiento se utilizó una pipeta Pasteur; se llenó un tubo con agua de igual volumen. Se llevó a centrifugar los dos tubos durante 30 minutos a 2000 rpm.

Seguidamente, se extrajo la capa de linfocitos (nube blanca, encima de la capa de Hystopaque) con precaución y se pasó a otro tubo limpio y seco. Se pasó la nube de linfocitos a un tubo con PBS de 6-8 ml, se llevó a centrifugar por 15 minutos a 1250 rpm, esto se hizo por tres veces más hasta que la capa de linfocitos estuviera limpia de contaminación. Por último se descartó el PBS, se homogenizó y se llenó con 1 ml de RPMI 1640 de sigma, y en un tubo ependolf se agregó 90 µl de azul de tripano y 10 µl de células para realizar el conteo y viabilidad inicial de las células antes y después de los tratamientos, siguiendo la siguiente fórmula:

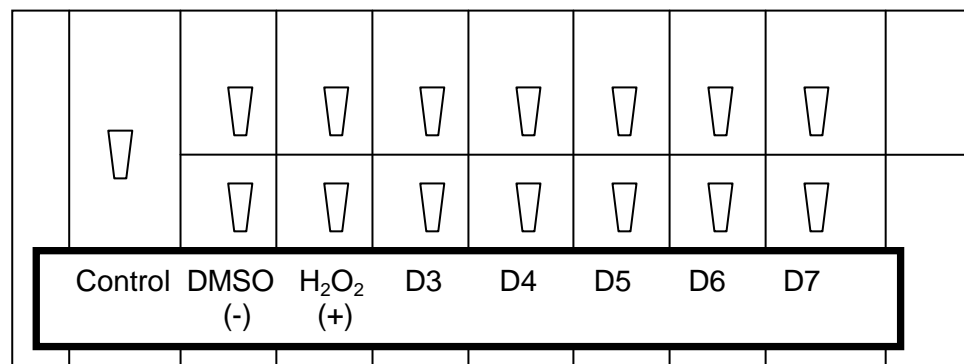
$$\text{Cantidad de células/ml} = (\text{Promedio de células de los 4 cuadrantes}) * 10^5$$

$$\% \text{ Viabilidad} = \text{células vivas} / \text{células totales} * 100$$

3. Tratamientos: En un vial limpio, seco y previamente marcado se adicionó la cantidad de µl que contengan las 100.000 células, (en este caso, 50 µl) al tratamiento de prueba (diluciones); se recomienda que en 50 µl de cada tratamiento se obtenga la concentración final requerida, es decir adicionar un volumen constante de tratamiento. Luego, se adicionó el medio de cultivo RPMI 1640 de sigma hasta completar el volumen final requerido, para linfocitos este volumen es de 250 µl. Por último se incubó a 37 °C durante 1 hora.

En la figura No. 10 observamos el esquema de los tratamientos, primero se adicionó el medio RPMI, luego el tratamiento y por último las células de la siguiente manera:

Figura 10. Esquema de Tratamientos para Ensayo Cometa



Control: 200 µl RPMI + 50 µl Células
D1: RPMI + Tratamiento (D1) + células

Siempre se deben incluir controles negativos y positivos. El control negativo fue el solvente dimetil sulfóxido (DMSO 1%) y el control positivo fue peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración final de 25 µl.

4. Preparación de las placas luego de los tratamientos: Se agregó 20 μl de cada tratamiento en viales limpios, secos y previamente marcados, de cada tratamiento se prepararon dos viales para obtener dos placas. Luego, se tomó 80 μl de Agarosa a Bajo Punto de Fusión (LMA) y 20 μl del vial que contiene las células que fueron sometidas a los diferentes tratamientos, se mezclaron y se colocaron sobre las placas que tienen Agarosa de Punto de Fusión Normal (NMA) y finalmente, se colocaron los cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

Las placas se llevaron a nevera (4°C) por 15 minutos para su solidificación, se retiraron los cubreobjetos (deslizándolos con cuidado de levantar la agarosa) y se agregó de nuevo 80 μl de agarosa LMA, se colocaron los cubreobjetos y se llevó a nevera por 15 minutos. Por último se retiró los cubreobjetos y se colocó en solución de lisis en una jarra kooplin (ver Fig. 11) por 24 horas.

Figura 11. Jarra Kooplin para lisis



5. Electroforesis. El siguiente procedimiento se trabajó en un cuarto oscuro, frío, bajo luz amarilla y utilizando soluciones frías. Las placas se lavaron con PBS libre de calcio y Magnesio durante 10 segundos por ambos lados sobre una bandeja (con cuidado de dejar caer la agarosa), se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal, la cámara se llenó con buffer de electroforesis hasta cubrir las placas. Se dejó por 20 minutos con la fuente de poder apagada tiempo suficiente para la desnaturalización del ADN. Seguidamente, se corrió la electroforesis a 25 voltios 300 miliamperios, durante 30 minutos, se sacaron las placas sobre una bandeja y se lavaron con solución neutralizante (con cuidado de dejar caer la agarosa) durante 10 segundos. Finalmente, en otra bandeja se agregó metanol con el fin de deshidratarlas, se dejó por 5 minutos y se secó con papel toalla, posteriormente se guardaron en una caja en la nevera.

6. Coloración: A cada placa se le agregó 50 μl de Bromuro de Etidio (BrEt) (0.02 mg/ml), se colocó un cubreobjetos y se contaron 40 células al azar por placa para su posterior análisis. El conteo de las células se realizó con ayuda de Microscopio de Fluorescencia de la CIU de la Universidad de Antioquia. Este proceso se realizó por triplicado en diferentes tiempos bajo las mismas condiciones de laboratorio.

6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENSAYO COMETA

Los resultados obtenidos en este procedimiento se analizaron usando el programa de análisis estadístico Past 2008, con un alfa de 0.01 y con un valor de confiabilidad del 99%.

En el análisis estadístico del Ensayo Cometa, en primer lugar se verificó si los datos se ajustaban a una distribución normal, como efectivamente se comprobó que no era así, se procedió a transformarlos de tal manera que siguieran una distribución normal mediante la prueba de Shapiro Wills (con un $p = 0.05$). Con la anterior prueba, tampoco fue posible transformar los datos, por tal razón se acudió a una prueba estadística que no se basa en ninguna suposición en cuanto a la distribución de probabilidad a partir de la que fueron obtenidos los datos, denominada prueba no paramétrica (*distribution free*) de Kruskal Wallis. También se investigó la presencia de heterogeneidad en los datos y de posibles valores atípicos o errores en los datos aplicando la prueba de Levene modificada.

El Test de Ames y el Ensayo Cometa se realizaron en el Laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia.

7. RESULTADOS

7.1. TOXICIDAD EN LINFOCITOS PARA DETERMINACION DE DOSIS EN TEST DE AMES

Se obtuvo un total de 72 células en los cuatro cuadrantes en la cámara de newbauer, con este valor se calculó la cantidad de células/ml que debieron ser empleadas para completar las 100.000 células requeridas para el procedimiento y posterior cálculo de viabilidad, en este caso la cantidad fue de 50 µl.

$$\text{Cantidad de células/ml} = (\text{Promedio de células de los 4 cuadrantes}) * 10^5$$

$$\text{Cantidad de células/ml} = 72/4 = 18 \times 10^5 = 1.800.000 \text{ células/ml}$$

$$\begin{array}{r} 1.800.000 \text{ células} \\ 100.000 \text{ células} \end{array} \quad \begin{array}{r} 1 \text{ ml} \\ x \end{array}$$

$$X = 55 \mu\text{l} \text{ aprox. } 50 \mu\text{l}$$

En la tabla No 4 se muestran los porcentajes de viabilidad de los diferentes tratamientos monitoreados hasta las seis horas. En los tratamientos con AE, en AE Stock 10% y AE 5% se observaron todas las células muertas en el ensayo de toxicidad con linfocitos humanos, por lo tanto estas dosis son citotóxicas y se eliminan del ensayo, por ende las dosis de trabajo se tomaron a partir de la dosis AE 0.5%, aumentando así el rango de evaluación hasta una dosis de AE 0.000005%. (Detalle de porcentajes Anexo F).

En el EA todos los porcentajes de viabilidad son superiores al 90% demostrando que este extracto no es citotóxico en ninguna dosis, por lo tanto las dosis escogidas fueron: EA 100%, EA 10%, EA 1%.

Tabla 4. Viabilidad en Linfocitos de siete dosis de AE y 6 dosis de EA para Test de Ames (los datos se muestran como porcentajes de viabilidad de las dosis de AE y EA en seis horas de tratamiento).

TOXICIDAD EN LINFOCITOS AMES						
Tratamientos / horas	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Control	100%	88.2 %	100%	89.7 %	88.2 %	100%
AE 50%	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
AE Stock 10%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
AE 0.5%	100%	75%	65%	89%	72%	87%
AE 0.05%	100%	94%	74%	100%	81%	91%
AE 0.005%	90.9%	100%	90.9%	95.655	100%	98.27%
AE 0.0005%	100%	83.3 %	100%	88.46 %	100%	100%
AE 0.00005%	90.9 %	100%	88%	100%	100%	100%
EA 100%	90.9 %	87.65 %	100%	77.27 %	100%	89.65 %
EA 10%	100%	87.5 %	100%	82.14 %	100%	98.64%
EA 1%	87.1 %	96.96 %	94.1%	96.77 %	100%	90.56%
EA 0.1%	92.3 %	88.77 %	93.47 %	100%	96.55%	100%
EA 0.01%	85.71 %	100%	90.9 %	100%	100%	100%
EA 0.001%	87.5%	100%	100%	81.48%	100%	100%

7.2. ENSAYO DE MUTAGENECIDAD TEST DE AMES

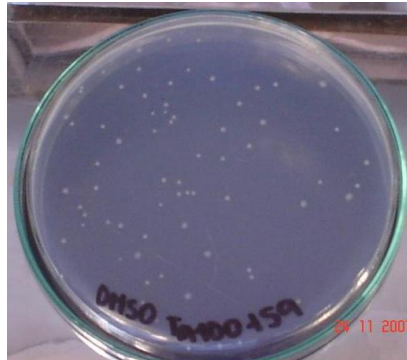
7.2.1. Confirmación del Genotipo de la Cepa TA-100. Todas las pruebas de marca para la confirmación del genotipo de la cepa dieron positivas, lo cual permitió verificar la calidad de la cepa.

7.2.2. Controles para determinación de Reversión Espontánea para la cepa TA-100. Los valores de reversión espontánea observados se encontraron dentro del rango estandarizado en el Laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia, como se puede observar en la Tabla No. 5 y en las Figura 12.

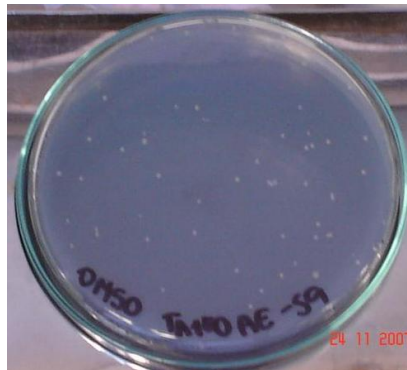
Tabla 5. Valores de Reversión Espontánea

Cepa		Reportado Mundial	Lab. U de A
TA100	+S9 y -S9	120 – 200	75 – 90

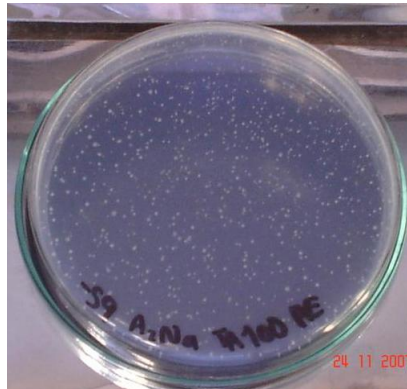
Figura 12. Imágenes de un Control Negativo (A y B) en AE + S9 y –S9 y de Control Positivo (C) en AE – S9.



A. Control Negativo DMSO + S9



B. Control Negativo DMSO - S9



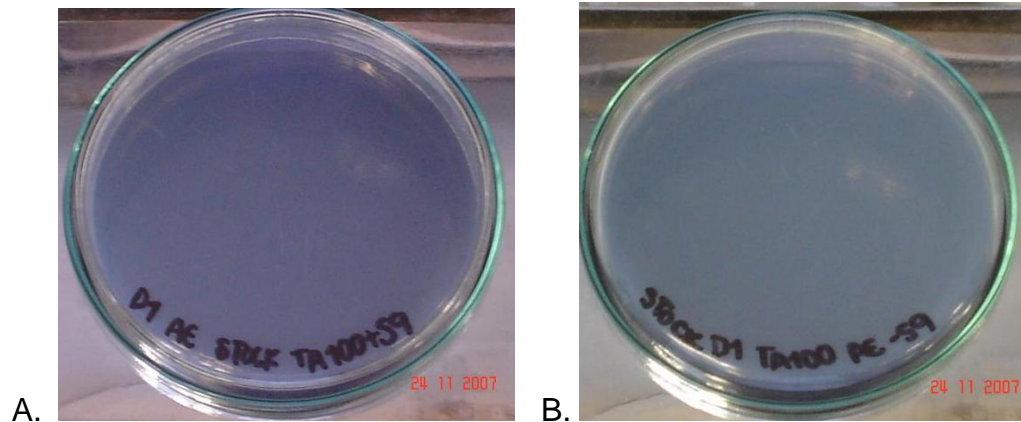
C. Control Positivo AzNa – S9

7.3. ENSAYO DE MUTAGENICIDAD TEST DE AMES

En un primer ensayo experimental con el método estándar de Test de Ames con AE se observó que en las dosis: AE Stock 10% y AE 5% no hubo crecimiento de la bacteria *Salmonella typhimurium* (Ver Figura 13.), presentando la misma actividad

citotóxica y confirmando los resultados obtenidos en la prueba de toxicidad en linfocitos humanos, por lo tanto se eliminaron estas dosis del experimento y se aumento la dosis de AE 0.000005% para tener un mayor rango de evaluación.

Figura 13. A. Stock de AE + S9 y B. stock del AE – S9



Los resultados de las medias del número de revertantes inducidos por los tratamientos con AE y EA para el ensayo de mutagenicidad con la cepa TA-100 en presencia y ausencia de S-9 se muestran en la Tabla 6. El número de revertantes/caja corresponde en realidad a la media de recuentos individuales, obtenidos de los tres experimentos independientes cada uno por duplicado (McCarm & Ames, 1977) (Ver detalle Anexo G).

Tabla 6. Resultados de la Prueba de Ames en la cepa TA-100 de *Salmonella typhimurium* después del tratamiento con AE (Micrométodo) y EA (Estándar), con y sin activación metabólica (S-9) (los datos se expresan como la media de revertantes/caja \pm Error estándar)

Tratamiento	TA-100	
	Sin S-9	Con S-9
Aceite Esencial AE		
c (-) DMSO (50%)	88.33	103.33
c (+) AzNa / 2AF	4072	1238
AE 0.5%	99.33	99.66
AE 0.05%	113.33	101.66
AE 0.005%	108.66	102.66
AE 0.0005%	113.66	102.33
AE 0.00005%	96.66	102.66
AE 0.000005%	99	100.66
Extracto Acuoso EA		
c (-) H2O	81	94
c (+) AzNa / 2AF	2477	3720
EA 100%	107.33	98.33
EA 10%	94	84.66
EA 1%	81	90.66

7.3.1. Índice de Mutación. En la Tabla 7. Se muestran los valores correspondientes al Índice de Mutación para los diferentes extractos evaluados de *Carica candamarcensis*, especificando su respectiva cualidad.

Tabla 7. Índice de mutación de AE y EA ± S9 en la Prueba de Ames en la cepa TA-100 de *Salmonella typhimurium*.

Tratamiento	TA-100			
	Sin S-9		Con S-9	
	Índice de Mutación	Cualidad	Índice de Mutación	Cualidad
Aceite esencial AE				
c (-) DMSO (50%)		N.M		N.M
c (+) AzNa / 2AF	46.09	M.P	11.98	N.M
AE 0.5%	1.12	N.M	0.96	N.M
AE 0.05%	1.28	N.M	0.98	N.M
AE 0.005%	1.23	N.M	0.99	N.M
AE 0.0005%	1.28	N.M	0.99	N.M
AE 0.00005%	1.09	N.M	0.99	N.M
AE 0.000005%	1.12	N.M	0.97	N.M
Extracto Acuoso EA				
c (-) H2O		N.M		N.M
c (+) AzNa / 2AF	30.58	M.P	39.57	M.P
EA 100%	1.32	N.M	1.04	N.M
EA 10%	1.16	N.M	0.90	N.M
EA 1%	1.00	N.M	0.96	N.M

De esta forma, los resultados del ensayo de mutagenicidad sugieren que no hubo incremento de dosis dependiente de la frecuencia de revertantes por colonia para la cepa TA 100 de *Salmonella typhimurium*, para el AE y EA de *C. candamarcensis* en presencia y ausencia de S9; el Índice de Mutación se encuentra por debajo de 1.5; por lo tanto los anteriores extractos no parecen inducir efectos mutagénicos en el sistema de ensayo.

Usando el análisis de varianza – anova de una sola vía (Tabla No.8) se encontró que en el AE sin activación metabólica (-S9) existen diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p = 6.054 \times 10^{-24}$ para un alfa de 0.005 entre los tratamientos. La prueba de medias de Tuckey indica que existen diferencias significativas entre el control positivo y los demás tratamientos. Entre las dosis y el control negativo no hay diferencias significativas por lo tanto este extracto sin activación metabólica no es mutágeno.

Tabla No. 8 Anova de una vía AE sin s9 F = 108.1, P value = 6.054 x 10⁻²⁴

0	DMSO	A2NA	AE 0,5%	AE 0,05%	AE 0,005%	AE 0,0005%	AE0,00005%	AE 0,000005%
DMSO	0	0,0001325	1	1	1	1	1	1
A2NA	29,52	0	0,0001325	0,0001325	0,0001325	0,0001325	0,0001325	0,0001325
AE 0,5%	0,08151	29,43	0	1	1	1	1	1
AE 0,05%	0,1852	29,33	0,1037	0	1	1	1	1
AE 0,005%	0,1507	29,37	0,06916	0,03458	0	1	1	1
AE 0,0005%	0,1865	29,33	0,105	0,001235	0,03581	0	1	1
AE0,00005%	0,06298	29,45	0,01852	0,1223	0,08768	0,1235	0	1
AE 0,000005%	0,07904	29,44	0,00247	0,1062	0,07163	0,1074	0,01605	0

De igual forma, se observó para el AE con activación metabólica (+S9) (Tabla No.9) en donde el análisis de varianza indica que existen diferencias significativas para los tratamientos con un $p = 4.85 \times 10^{-11}$. El análisis Kruskal Wallis demuestra que las diferencias se presentan entre el control positivo y los demás tratamientos con un $p = 0.002485$. En la prueba de medias de Tuckey no se encuentran diferencias entre las dosis y el control negativo.

Tabla No. 9 Anova de una vía AE con s9 F = 19.43, P value = 4.85 x 10⁻¹¹ y Kruskal p = 0.02485

0	DMSO	2AF	AE 0,5%	AE 0,05%	AE 0,005%	AE 0,0005%	AE0,00005%	AE 0,000005%
DMSO	0	0,0001325	1	1	1	1	1	1
2AF	12,45	0	0,0001325	0,0001325	0,0001325	0,0001325	0,0001325	0,0001325
AE 0,5%	0,04025	12,49	0	1	1	1	1	1
AE 0,05%	0,02012	12,47	0,02012	0	1	1	1	1
AE 0,005%	0,005489	12,46	0,03476	0,01464	0	1	1	1
AE 0,0005%	0,01281	12,46	0,02744	0,007318	0,007318	0	1	1
AE0,00005%	0,009148	12,46	0,0311	0,01098	0,003659	0,003659	0	1
AE 0,000005%	0,0311	12,48	0,009148	0,01098	0,02561	0,0183	0,02195	0

Para el EA sin activación metabólica (-S9), el análisis de varianza indica que existen diferencias altamente significativas con un $p = 1.74 \times 10^{-16}$, como se puede observar en la tabla No. 10. El análisis de Kruskal Wallis evidencia diferencias entre el control positivo y el resto de tratamientos con un $p = 0.0005879$. En la prueba de medias de Tuckey no se encuentran diferencias entre el control negativo y las tres dosis evaluadas.

Tabla No. 10 Anova de una vía EA sin s9 F = 60.4, P value = 1.74×10^{-12} y Kruskal p = 0.0005879

	0	DMSO	A2NA	EA 100%	EA 10%	EA 1%
DMSO		0	0,0001299	0,9999	1	1
A2NA	17,45		0	0,0001299	0,0001299	0,0001299
EA 100%	0,1905	17,26		0	1	0,9999
EA 10%	0,09467	17,35	0,09588		0	1
EA 1%	0,001214	17,45	0,1918	0,09588		0

El análisis de varianza para el EA con activación metabólica (+S9), evidencia diferencias estadísticamente significativas con un $p = 4.27 \times 10^{-12}$, como se observa en la tabla No. 11. El análisis de Kruskal Wallis demuestra que existen diferencias entre el control positivo y el resto de tratamientos con un $p = 0.003694$. En la prueba de medias de Tuckey no existen diferencias entre las tres dosis evaluadas y el control negativo.

Tabla No. 11 Anova de una vía EA con s9 F = 55.75, P value = 4.27×10^{-12} y Kruskal p = 0.003694

	0	DMSO	2AF	EA 100%	EA 10%	EA 1%
DMSO		0	0,0001299	1	1	1
A2NA	16,67		0	0,0001299	0,0001299	0,0001299
EA 100%	0,06545	16,6		0	0,9999	1
EA 10%	0,1406	16,81	0,206		0	1
EA 1%	0,04606	16,71	0,1115	0,09454		0

7.4. TOXICIDAD EN LINFOCITOS PARA ENSAYO COMETA.

$$\% \text{ Viabilidad} = \text{células vivas} / \text{células totales} \times 100$$

Se midió el porcentaje de viabilidad inicial que fue del 100 %.

Total células = 68

Cantidad de células para cada tratamiento 100.000

$$\text{Cantidad de células/ml} = 68/4 = 17 \times 10^5 = 1.700.000 \text{ células/ml}$$

$$\frac{1.700.000 \text{ células}}{100.000 \text{ células}} \times 1 \text{ ml}$$

$$X = 58 \mu\text{l} \text{ aprox. } 50 \mu\text{l}$$

El porcentaje de viabilidad se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ Viabilidad} = \text{células vivas} / \text{células totales} \times 100$$

En la tabla No. 12 se muestran los porcentajes de viabilidad de linfocitos humanos para las diferentes dosis de AE y EA durante 1 hora de tratamiento, requerido para los tres ensayos independientes de Cometa.

Tabla 12. Toxicidad en Linfocitos de tres dosis de AE y EA para Ensayo Cometa (los datos se muestran como porcentajes de viabilidad de las dosis de AE y EA en una hora de tratamiento).

Tratamiento	Toxicidad en Linfocitos/ 1 hora de tratamiento		
	Cometa 1	Cometa 2	Cometa 3
c (-) DMSO (1%)	100%	100%	88%
c (+) H ₂ O ₂	85%	53%	60%
Aceite Esencial AE			
AE 0.5%	58%	75%	82%
AE 0.005%	97%	85%	100%
AE 0.0005%	100%	96%	100%
Extracto Acuoso EA			
EA 100%	100%	77%	100%
EA 10%	100%	100%	100%
EA 1%	100%	94%	86%

7.5. ELECTROFORESIS ALCALINA DE CELULAS INDIVIDUALES (ENSAYO COMETA)

Los resultados para el análisis del efecto genotóxico de las tres dosis de AE y EA se muestran en las figuras 14 y 15. Se observó una longitud media de cola de 14.434 unidades arbitrarias (UA) (1h) para el DMSO 1% utilizado como control negativo. El control positivo (H₂O₂ 50µM), con una longitud de cola media de 40.029 UA (1 h), nos permite constatar la adecuada ejecución de la técnica puesto que estas medidas superan ampliamente las obtenidas para el DMSO 1%.

Figura 14. Resultados del Efecto Genotóxico de tres dosis de AE y EA en Ensayo Cometa.

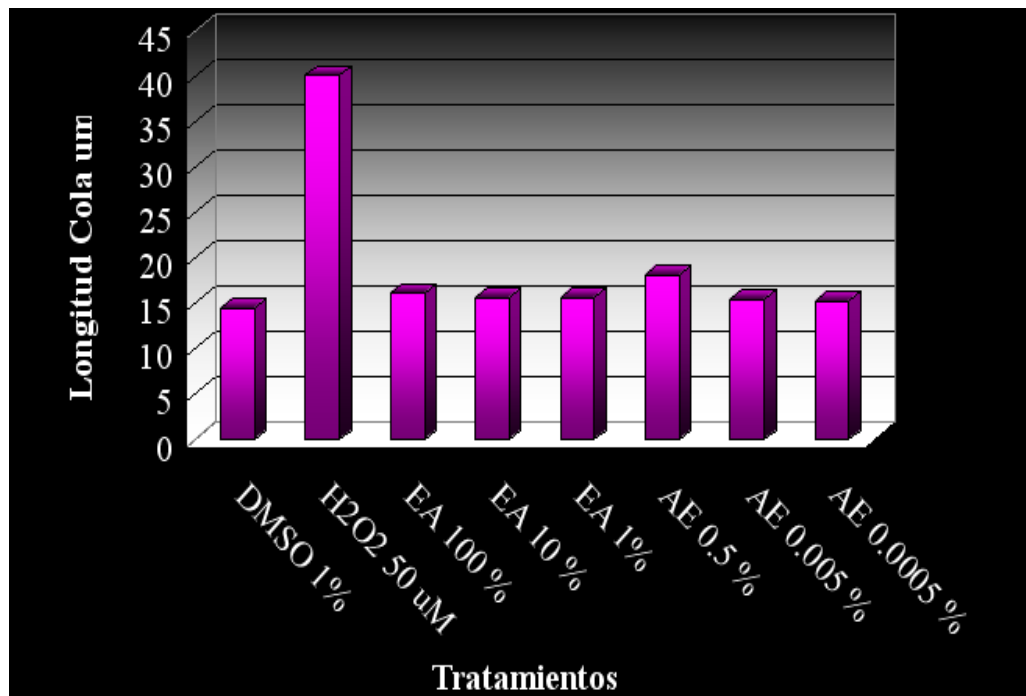
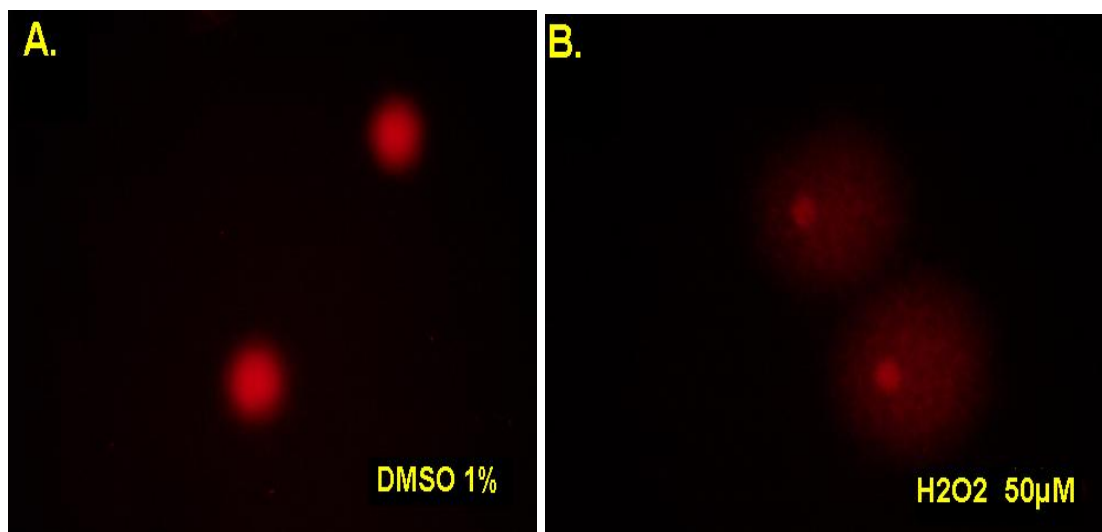
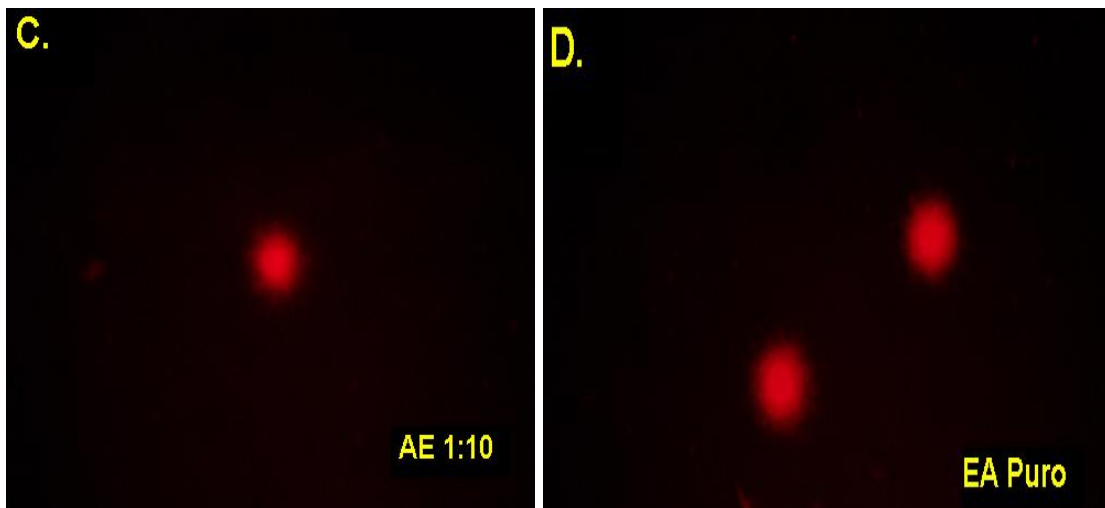


Figura 15. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia en el Ensayo Cometa para tres dosis de AE y EA durante una hora de tratamiento. A. Células tratadas con DMSO 1% (control negativo). B. Células tratadas con H₂O₂ 50µM (control positivo). C. Células tratadas con la dosis AE 0.05%. D. Células tratadas con la dosis de EA 100%.





La interpretación de los valores de longitud de cometa para el análisis del efecto genotóxico se realizó según el trabajo propuesto por Bruges & Reguero en el 2007, donde clasifican las medidas de longitud de cola del cometa en estadios para establecer rangos de genotoxicidad como se muestra en la Tabla No.13.

Tabla No 13. Interpretación de Longitud del Cometa

ESTADIOS	LONGITUD (um)	INTERPRETACION
O	Hasta 24	No genotóxico
A	25 – 32	Ligeramente genotóxico
B	33 – 40	Moderadamente genotóxico
C	41 – 53	Altamente genotóxico
D	Mayor de 53	Extremadamente genotóxico

Los resultados del ensayo de cometa arrojan valores que permiten concluir que tanto el AE y EA no inducen efectos genotóxicos en este sistema de ensayo, ya que según la interpretación de la longitud de cola de cometa obtenida, los extractos en su diferentes dosis se encuentran en estadio O (no genotóxico), como se muestra en la Tabla No. 14.

Los datos para ensayo cometa no se ajustaban a una distribución normal ni transformándolos con la prueba de Shapiro Wilk (con un valor de $p=0.05$), en la prueba de Levene modificada las varianzas no eran homogéneas; por lo tanto se utilizó la prueba de Kruskal Wallis que es una prueba no paramétrica, la cual indica diferencias significativas con respecto a la longitud de cola del cometa entre el control positivo y los tratamientos, como se muestra en la Tabla No. 15.

Tabla No 14. Resultados del Efecto Genotóxico de tres dosis de AE y EA en Ensayo Cometa (los resultados se expresan como la media de las longitudes de cola en tres experimentos independientes, detalle de valores Anexo I.)

Tratamiento	Placas	Media de Tres Experimentos		ESTADIO
DMSO 1%	1	15.16	14.434	O
	2	13.70		O
H ₂ O ₂ 50µM	1	41.425	40.029	C
	2	38.633		B
EA 100%	1	16.1491	16.095	O
	2	16		O
EA 10%	1	16.266	15.662	O
	2	15.058		O
EA 1%	1	15.433	15.587	O
	2	15.741		O
AE 0.5%	1	17.808	18.074	O
	2	18.341		O
AE 0.005%	1	15.358	15.416	O
	2	15.475		O
AE 0.0005%	1	14.566	15.183	O
	2	15.8		O

Tabla No. 15 Kruskal Wallis en Ensayo Cometa

0	DMSO	H2O2	EA 100%	EA 10%	EA 1%	AE 0.5%	AE 0.005%	AE 0.0005%
DMSO	0	3,22E-02	0,0727	0,3811	0,4677	3,22E-02	0,06046	0,8952
H2O2	63,59	0	3,22E-02	3,22E-02	3,22E-02	3,22E-02	3,22E-02	3,22E-02
T3	4,1	59,49	0	0,9955	0,988	0,0113	1	0,7573
T4	3,044	60,55	1,056	0	1	0,0006091	0,9925	0,9907
T5	2,858	60,74	1,242	0,1864	0	0,0003503	0,9817	0,9967
T6	9,039	54,55	4,939	5,995	6,181	0	0,0142	4,10E-02
T7	4,193	59,4	0,09319	1,149	1,336	4,846	0	0,7167
T8	1,853	61,74	2,247	1,191	1,004	7,186	2,34	0

7.6. RECOMENDACIÓN DE DOSIS SEGURAS

Para verificar la inocuidad de las dosis se realizaron las pruebas de Citotoxicidad en linfocitos, Test de Ames y Ensayo Cometa, con los resultados que arrojaron estos ensayos se determinó que todas las dosis probadas no inducen citotoxicidad, a excepción de el AE Stock al 10% y AE 5% que si resultaron citotóxicas y que mostraron el mismo resultado en Ames por lo tanto se eliminaron del ensayo.

Los dos extractos en las dosis evaluadas no presentaron mutagenicidad ni genotoxicidad por lo tanto se consideran seguras, las dosis se muestran en la tabla No. 16, sin embargo se deben realizar otras pruebas de este tipo para descartar cualquier tipo de daño que pueda causar, como ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas en mamíferos, ensayo *in vitro* de mutación génica en células de mamífero, ensayo de retromutación de bacterias, análisis de intercambio de cromátidas hermanas en espermatogonias, ensayo de síntesis no programada de ADN en células testiculares, ensayo *in vivo* de síntesis no programada de ADN en hígados de mamífero, intercambio de cromatidas hermanas de médula ósea de mamífero, entre otras pruebas.


Tabla No. 16 Concentraciones Seguras

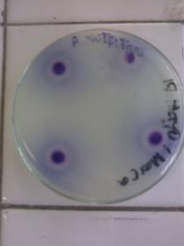


Extracto	Concentración
Aceite Esencial	0.5 %
	0.005 %
	0.0005 %
Extracto Acuoso	100 %
	10 %
	1 %

7.7. OPTIMIZACION TEST DE AMES EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO

Para estandarizar esta técnica a las condiciones de laboratorio de la Universidad de Nariño se evaluó el aceite esencial de *Ruta graveolens*, se trabajo con la cepa TA100 sin actividad metabólica conjuntamente con estudiantes de tercer semestre del programa de Biología de la Universidad de Nariño. Se siguieron los protocolos de la técnica obteniendo los siguientes resultados. En primera instancia, se realizaron congelados permanentes de la cepa que se conservan en nitrógeno liquido, se realizaron los chequeos de marca que se muestran en la tabla No. 17 los resultados confirmaron el genotipo de la cepa TA100.

Tabla 17. Control de Marcas de la cepa TA-100

Mutación	Imagen
Requerimiento Histidina+	
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> His- His+ </div>

Mutación <i>rfa</i>			
Mutación <i>uvrB</i>			
Factor R. Resistencia a la ampicilina			

Finalmente, de acuerdo a este preensayo, se encontró que los controles positivos y negativos generaron colonias bajo los parámetros del Test, y actualmente se está adelantando una investigación con otros extractos de plantas que fueron promisorias para el crecimiento in vitro de *Helicobacter pylori*.

8. ANALISIS DE RESULTADOS

8.1. CITOTOXICIDAD EN LINFOCITOS DE DIFERENTES DOSIS DE EXTRACTO ACUOSO Y ACEITE ESCENCIAL DE *C. Candamarcensis*.

8.1.1. Extracto Acuoso. La mayoría de los extractos acuosos de las plantas no inducen daño en el ADN o mutaciones, sin embargo se recomienda hacer una completa caracterización de los extractos, Sánchez *et al* 2002 considera que existen tres diferentes niveles de daño al ADN, el primer nivel es usando ensayos que detecten específicamente daño en el ADN primario, el segundo es por mutación en los genes, y el tercero mediante ensayos de citogenética.

En nuestro sistema de ensayo el extracto acuoso de pulpa de frutos maduros de *C. candamarcensis* resultó inocuo para los linfocitos humanos a las diferentes concentraciones estudiadas, como se observa en la Tabla no. 4, en este tipo de extracto la viabilidad celular supera el 90% lo que demuestra una actividad no citotóxica y no dosis dependiente.

8.1.2. Aceite Esencial. Ensayos fisicoquímicos *in vitro* han caracterizado aceites esenciales, en su mayoría como antioxidantes, sin embargo, trabajos recientes muestran que en las células eucarióticas, los aceites esenciales de plantas pueden actuar como prooxidantes, los cuales pueden generar subproductos del oxígeno del metabolismo al interior que afectan a las membranas celulares y orgánulos como las mitocondrias (Bakkali *et al* 2007). Según el tipo y la concentración, estos exhiben efectos citotóxicos en las células vivas, como se observó en las dos primeras dosis de Solución AE Stock 10 % y dosis AE 5% donde se presentó una mortalidad del 100%, resultando tóxicos para las células mononucleares de sangre periférica; es interesante comentar que en el presente estudio dentro de los componentes del aceite se encontraron alcoholes como linalool (Prashar *et al*, 2004) y farnesol (Roelofs, *et al*, 2007) cuya actividad citotóxica de los aceites esenciales es sobre todo debido a la presencia de este tipo de compuestos, estas observaciones están de acuerdo con lo propuesto por Bruni, *et al* 2005 quien comentó que estos compuestos afectan la estructura de la membrana plasmática y de los orgánulos celulares.

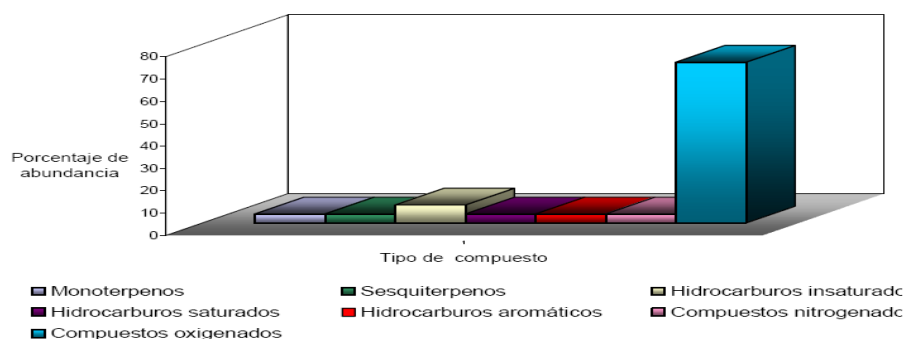
Aunque los mecanismos específicos de citotoxicidad se desconocen, éstos bien pudieran involucrar cambios en la permeabilidad de las membranas o en la actividad de enzimas mitocondriales que conducirían a la muerte celular. Por el gran número de componentes, los aceites esenciales no parecen tener objetivos celulares específicos (Carson, *et al*, 2002). Como lipofílicos típicos, pasan por la pared celular y la membrana citoplasmática, interrumpiendo la estructura de sus diferentes polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y su permeabilidad, causando la muerte celular por daño de la membrana (Di Pascua, *et al* 2007).

Según Bakkali *et al* 2007, los aceites esenciales pueden coagular el citoplasma dañando lípidos y proteínas; ocasionan también daño a la pared celular y la membrana que conduce al escape de macromoléculas y a la lisis celular, esto afecta la fluidez de la membrana, cambiando la permeabilidad a un modo anormal resultando así un escape de radicales, citocromo C, iones de calcio y proteínas, como en el caso de estrés oxidativo, llevando a la célula al fracaso bioenergético. La permeabilización de membranas externas e internas mitocondriales conduce a la muerte celular por apoptosis y necrosis. Parece que las reacciones en cadena de la pared celular o la membrana celular externa invaden la célula entera, por las membranas de diferentes organelos como mitocondrias y peroxisomas (Yoon *et al.*, 2000; Armstrong, 2006).

La actividad citotóxica del AE puro de chilacuán, se puede comprobar en el trabajo realizado por Mena, *et al* 2005, sobre aislamientos de *H. pylori*, indicando que este era su mejor tratamiento, ya que en dicho ensayo presentaba halos de inhibición promedio de 9,6 mm, mostrando diferencias altamente significativas en relación con el resto de tratamientos y resultando así como promisorio para continuar estudios sobre el y posiblemente establecerlo como una terapia complementaria al tratamiento convencional de *H. pylori*. Todos los extractos evaluados presentaban pH ácido; sin embargo, no encontraron ningún tipo de relación entre pH y actividad biológica indicando así que el efecto del extracto es resultado de alguno de sus componentes.

La caracterización preliminar del AE de frutos maduros de *C. candamarcensis* obtenido por MWHD mediante cromatografía de gases realizada por Gómez & Morán. (2005) indica la presencia de varias especies químicas y compuestos que se muestran en Figura 16, en donde predominan los compuestos oxigenados con un 72% y el 28% restante está conformado por hidrocarburos saturados, insaturados y aromáticos, monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos nitrogenados.

Figura 16. Abundancia relativa de las diferentes familias de compuestos identificados en el AE de *C. candamarcensis* obtenido por MWHD.



Fuente: Gómez & Moran 2005.

Algunos de los componentes del AE analizado son ampliamente reconocidos por sus propiedades biológicas: el linalool, farnesol y decanoato de butilo, presentan actividades específicas como la inhibición de ciertos agentes patógenos (hongos), actividad antimicrobiana, efectos antitumorales y la estimulación de hormonas en insectos (Fiedman et al, 2004). Dentro de los hidrocarburos se destaca el Heneicosano, donde existen varios reportes que señalan su actividad antimicrobial. (Sun et al 2005).

Según el trabajo realizado por Jahangir T., et al 2006 encontró que el Farnesol tiene propiedades quimiopreventivas, ya que este compuesto disminuye el daño oxidativo que causa el hierro en tejidos y órganos promoviendo la formación de tumores; aunque el farnesol actúa como protector restaurando significativamente los daños, Roelots, et al, 2007 reporta su actividad citotóxica, lo cual concuerda con el trabajo realizado por Brunni, et al 2007, que afirma que la citotoxicidad de los aceites esenciales se debe a la presencia de alcoholes. El Farnesol como sesquiterpeno es un compuesto ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y cosmética gracias a que presenta diferentes niveles de actividad biológica como: bactericida, fungicida, antiinflamatorio, y ha sido utilizado en productos como desodorantes, bases para maquillaje, entre otros (KooH, et al, 2003).

Prashar et al, 2004, estudio la citotoxicidad del aceite esencial de *Lavandula angustifolia* sobre células humanas de la piel encontrando que este es citotóxico en una concentración del 0.25 % en los tipos de células probados, sus componentes principales también fueron evaluados en condiciones similares independientemente, el linalool se encontró en un 35% y mostró la actividad del aceite entero, indicando que este compuesto puede ser el componente activo del aceite esencial de la planta. De linalool, también se tienen reportes de efectos antibacteriales tanto sobre organismos gram positivos como gram negativos (Fiedman et al, 2004).

En cuanto, a la citotoxicidad del AE puro de chilacuán, se puede afirmar que la acción combinada de sus compuestos y otros de los presentes en el extracto podrían ser la causa de la actividad citotóxica observada en los linfocitos humanos. Sin embargo, a partir de la dosis AE 0.5% y hasta la dosis AE 0.000005% los porcentajes de viabilidad celular fueron superiores al 90%, lo cual demuestra su efecto no citotóxico, esto se debe a que la concentración del AE está disminuyendo y por lo tanto sus componentes ya no se encuentran en las mismas concentraciones minimizando así su acción tóxica apta para realizar los ensayos de mutagenicidad y genotoxicidad.

8.2. ENSAYO DE MUTAGENECIDAD TEST DE AMES

8.2.1. Extracto Acuoso. Como se demuestra, el EA de chilacuán no induce efecto mutagénico en el Ensayo de Ames, la ausencia de mutagenicidad probablemente se debe a que los compuestos polares presentes en este tipo de extracto son

inocuos, y aunque no existe un estudio que reporte una caracterización sobre todos los compuestos presentes, con esto podemos afirmar que este tipo de extracto es inocuo en todas las dosis analizadas.

8.2.2. Aceite Esencial. En un primer ensayo experimental con el método estándar de Test de Ames con AE se observó que en las dosis: AE Stock al 10% y la dosis AE al 5% no hubo crecimiento de la bacteria *Salmonella typhimurium*, presentando el mismo comportamiento y confirmando con los resultados obtenidos en la prueba de toxicidad en linfocitos donde fueron citotóxicos. La ausencia completa de crecimiento bacteriano indica un alto nivel de toxicidad por la inhabilidad de la bacteria, una dosis tan tóxica no debe ser usada. (Mortelmans, *et al*, 2.000), por lo tanto se eliminaron estas dosis del experimento y se aumentó la dosis AE al 0.000005 % para tener un mayor rango de evaluación.

Según Oussalah, *et al*, 2007, los aceites esenciales y sus componentes son conocidos por su actividad contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias gram positivas y gram negativas, como se pudo observar en nuestro ensayo preliminar por el no crecimiento en las dos primeras dosis de *S. typhimurium* bacilo gram negativo. Esta actividad antimicrobial se le asigna debido a la presencia de un pequeño número de terpenoides y ésteres (Bakkali, *et al* 2007) tales como linalool, farnesol, heneicosano y decanoato de butilo presentes en el AE de *C. candamarcensis*.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que se pueden presentar diferencias sobre la actividad antimicrobial de los aceites en la misma planta, las razones para tal variabilidad se deben al crecimiento en diferentes zonas geográficas, temporada de cosecha, al genotipo, al clima, etc (Bergonzelli, *et al* 2003). Todas estas variables influyen en la composición química y en la concentración relativa de cada compuesto en los aceites esenciales, por esta razón siempre es necesario trabajar con plantas de la misma zona geográfica para evitar que estas variables influyan en la composición del aceite (Inouye, *et al* 2001).

Varios estudios con diferentes aceites esenciales o sus componentes principales han demostrado que, generalmente, en su mayoría no inducen mutaciones nucleares. La mayor parte de los aceites esenciales se han caracterizado por ser citotóxicos sin ser mutagénicos, es probable que también estén desprovistos de carcinogenicidad (Bakkali, *et al*, 2007); esto, concuerda con nuestros resultados. A pesar que se detectó efectos citotóxicos en dosis elevadas de AE, en ninguna dosis se encontró efecto mutagénico, a pesar de que los porcentajes de viabilidad aumentaron al 100%, como lo pudimos comprobar con los índices de mutagenicidad.

Existen algunas excepciones dentro de los estudios sobre los efectos biológicos de los aceites esenciales que deben ser distinguidas, aunque en el presente estudio se trabajó con la mezcla compleja del AE, las siguientes son las únicas

que se han encontrado en literatura: Por ejemplo, al hacer pruebas específicas sobre el compuesto mentone de aceite esencial de *Piper mentha* este, resultó positivo en la prueba de Ames (Anderson & Jensen, 1984), mentone también fue encontrado genotóxico en la prueba de SMART y en Linfocitos CA (Lazutka et al 2001). Anethol de aceites esenciales de hinojo y de anís es activo en la prueba de Ames (Nestman et al 1993; Hasheminejad et al 1994); sin embargo según (Gorelick, 1995) aunque fuera activo en este ensayo, este no era en el ensayo de linfoma (MLA) en ratón.

En el ensayo *in vitro* empleando la bacteria *Salmonella typhimurium* de la cepa TA100 no se detectó ningún efecto mutagénico en nuestras condiciones de ensayo. No obstante se debe señalar que entre los componentes químicos reportados en la literatura para el aceite esencial de chilacuán, se encuentra el tolueno, sustancia reportada como nociva, esta sustancia es la materia prima a partir de la cual se obtienen derivados del benceno, y por ende su toxicidad es muy inferior a la de este compuesto ya que el anillo aromático al que se atribuye el poder cancerígeno del benceno sólo se forman en una proporción inferior al 5 % en el tolueno (Buznego, et al 2005); este se comporta como depresor del sistema Nervioso Central, en niveles bajos o moderados pueden producir cansancio, confusión, debilidad, pérdida de la memoria, náuseas, pérdida del apetito y pérdida de la audición y la vista, estos síntomas generalmente desaparecen cuando la exposición termina (Riecher, et al, 1993).

El efecto mutagénico del tolueno es motivo de una gran discusión según Klaus, 2002, el tolueno puede producir cáncer a las personas que estén expuestas por un largo tiempo debido a su actividad oxidativa. Sin embargo, los estudios en trabajadores y en animales expuestos al tolueno son contradictorios, ya que generalmente indican que el tolueno no produce cáncer. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), el Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) y la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) no han clasificado al tolueno en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos. Según la IARC (Agencia internacional de investigación del cáncer) la evidencia es inadecuada en seres humanos para la carcinogenicidad del tolueno, y en los experimentos con animales hay evidencias que sugieren la falta de carcinogenicidad, en síntesis, según esta organización dicho compuesto no puede clasificarse como carcinogénico en seres humanos y está clasificado en el grupo 3.(ATSDR, 2008).

Sin embargo, la concentración de tolueno presente en AE de chilacuán es baja, y por lo tanto el efecto que este pueda generar es mínima; según Kim, et al, 1997 no se conocen propiedades carcinógenas del tolueno en su forma pura, pero otros componentes en una mezcla de solventes pueden tenerlas, ya que se ha reportado que existe un aumento de la incidencia del cáncer de piel inducido por el 7,12-dimetilbenzo[b] antraceno.

La ausencia de mutagenicidad *in vitro* pudiera deberse a las características fisicoquímicas de este tipo de aceite de chilacuán, así como a la variedad, condiciones de cultivo, clima y factores agronómicos asociados al crecimiento de la planta, los cuales pueden influir considerablemente en los procesos biosintéticos de sus metabolitos y que una o varias sustancias determinadas pueden estar presentes o no al variar esos parámetros (Bergonzelli, *et al*, 2003). Pero además, estos preparados constituyen mezclas complejas en las que se pueden encontrar compuestos con actividad antimutagénica, como monoterpenos y sesquiterpenos que según Rompelberg., *et al* 1995 pueden debilitar o inhibir el efecto genotóxico potencial.

Algunos componentes de los aceites esenciales pueden ser considerados como cancerígenos secundarios después de la activación metabólica, ejemplo de ello son los aceites esenciales de *Salvia sclarea* y *Melaleuca quinquenervia* que provocan secreciones de estrógeno que pueden inducir cánceres dependientes de estrógeno. Otros contienen moléculas que fotosensibilizan como flavinas, cianinas, porfirinas, hidrocarburos que puede causar eritema o cáncer de piel (Guba, 2001). De acuerdo a estos planteamientos, y con nuestros resultados obtenidos en el Test de Ames con y sin actividad metabólica, confirmamos que estos dos tipos de extractos no ejercen efecto mutagénico en las dos condiciones de prueba.

8.3. ENSAYO DE GENOTOXICIDAD ENSAYO COMETA

Según Bakkali, *et al* 2005, 2006 una ventaja grande de los aceites esenciales es el hecho que ellos son por lo general desprovistos de riesgos genotóxicos a largo plazo. Además, algunos de ellos muestran una capacidad muy clara antimutagenica que bien podría ser vinculada a una actividad anticancerígena.

Como se demuestra tanto el EA como el AE esencial de chilacuán en ninguna de las dosis evaluadas, no induce efecto genotóxico en este tipo de sistema empleado. Esta ausencia de genotoxicidad principalmente en el aceite esencial en donde se conoce la concentración de sus compuestos, pudiera explicarse por que en el AE de pulpa de frutos maduros de chilacuán se encuentran compuestos monoterpenos y sesquiterpenos los cuales se reportan como antígenotóxicos (Rompelberg., *et al* 1995), y es aún más interesante, la analogía echa por Kahkoren *et al*, 1999, donde afirma que existe una estrecha relación entre antioxidación y antígenotoxicidad.

Se ha encontrado que algunos monoterpenos presentes en los aceites esenciales son inhibidores efectivos de la carcinogénesis. Los monoterpenos con diferentes grupos funcionales tales como hidrocarburos, aldehídos y cetonas son inhibidores *in vitro* de las monooxigenasas CYP2B1, por lo que pueden alterar la biotransformación de sustancias tóxicas (De-oliviera, *et al*, 1999). Algunos modelos animales para cáncer han demostrado que varios monoterpenos poseen

propiedades anticarcinogénicas actuando a diferentes niveles moleculares y celulares (Loza, 1999).

Diversos estudios *in vitro* han demostrado que el linalool, monoterpeno presente en el AE de chilacuán es un agente antioxidante, el cual según Di Sotto *et al* 2008, estudió sus efectos mutagenicos y antimutagenicos, mediante el Ensayo de Ames con *S. typhimurium* en las cepas TA 98 y TA 100, y sobre *E. coli* con la cepa WP2uvrA; según los resultados linalool no muestra mutagenicidad, y actividad antimutagenica contra 2-nitrofluoreno (2NF), Azida de sodio (SA), Metano de Metilo sulfonate (MM) y 2-aminoantraceno (2AA). Sin embargo, Beric *et al*, 2008, determinó estudiando el AE de Albahaca y su componente principal Linalool, que estos redujeron la mutagénesis espontánea de las cepas de *E. coli* K12 del 27 – 44%; las pruebas del efecto antigenotxico eran comparables al modelo antioxidante de la vitamina E, que redujeron el número de cometas inducidos por H₂O₂ entre el 45 - 70% Linalool y la vitamina E del 80 al 93% sobre células de *S. cerevisiae* 3A, sus resultados indicaban que el potencial antigenotóxico de derivados de albahaca podría ser atribuido a sus propiedades antioxidantes.

Presumimos que por sus reportes, este compuestos o en conjunto con otros, puede (n) haber influido en que la respuesta haya sido negativa al antagonizar cualquier efecto genotóxico que pudiera inducir algún otro compuesto presente en el extracto, situación muy común en la mayoría de las especies vegetales y que contribuye a fundamentar la inocuidad de su uso en la medicina tradicional.

Particularmente, sobre el compuesto farnesol se ha reportado los efectos protectores, la disminución del daño oxidativo y el aspecto de marcadores de tumor causado por Fe-NTA en ratas, indicando de esta forma que dicho compuesto esta en desarrollo como un instrumento quimiopreventivo (Jahangir, *et al* 2006). En otro estudio, Rabizza, *et al* 2008, determinó que el compuesto linalool, inhibe moderadamente la proliferación de líneas celulares MCF7 y AdrR sobre el crecimiento de adenocarcinoma en mamas, este compuesto también, en combinación con doxorubicina en concentraciones subtóxicas induce citotoxicidad y efectos pro-apoptoticos en ambas líneas; el compuesto linalool es el que aumenta la acumulación de dexorubicina e induce una disminución en los niveles de Bcl-xL. Los resultados sugieren que el linalool puede mejorar el índice terapéutico de las antraciclinas en el tratamiento de cáncer de mama, sobre todo en tumores MDR.

En conclusión principalmente el AE de pulpa de frutos maduros de *C. candamercensis* con propiedades farmacológicas reconocidas no presenta efecto genotóxico en los sistemas ensayados. Los resultados obtenidos, nos hacen pensar la posible actividad antigenotóxica y antitumoral de este producto, el cual pudiera ser considerado como un agente potencial en la quimiopreención del cáncer. De ahí la importancia de continuar realizando más ensayos con este tipo

de extracto principalmente ensayo de antimutagenicidad con el mismo Test de Ames y antigenotoxicidad con ensayos Cometa.

CONCLUSIONES

- El Extracto Acuoso (EA) de pulpa de frutos maduros de *C. candamarcensis* resultó inocuo para los linfocitos humanos a las diferentes concentraciones estudiadas, lo que demuestra una actividad no citotóxica y no dosis dependiente. El EA de tampoco indujo efecto mutagénico en el Ensayo de Ames, probablemente se debe a que los compuestos polares presentes en este tipo de extracto son inocuos, y aunque no existe un estudio que reporte una caracterización sobre todos los compuestos presentes, con esto podemos afirmar que este tipo de extracto es inocuo en todas las dosis analizadas.
- El Aceite Esencial (AE) de *C. candamarcensis* resultó ser citotóxico en las concentraciones más altas de AE Stock 10% y AE 5% sobre células de linfocitos humanos, presentando una mortalidad del 100%, probablemente asociado a la presencia de alcoholes como farnesol y linalool de los cuales se ha reportado su actividad citotóxica. A partir de la dosis AE 0.5% y hasta la dosis AE 0.000005% los porcentajes de viabilidad celular aumentaron significativamente, esto se debe a que la concentración del AE está disminuyendo y por lo tanto sus componentes ya no se encuentran en las mismas concentraciones disminuyendo así el efecto citotóxico del AE puro.
- A pesar de que se detectó efectos citotóxicos en dosis elevadas de AE de *C. candamarcensis* en ninguna dosis se encontró efectos mutagénicos con y sin activación metabólica de acuerdo a los valores obtenidos en los índices de mutación, esta ausencia de mutagenicidad es fundamental para garantizar su inocuidad, y nos permite considerar este extractos para posteriores estudios tendientes al desarrollo de un posible tratamiento complementario en pacientes con infección de *H. pylori*.
- Para verificar la inocuidad de las dosis en los dos Extractos probados se realizaron las pruebas de Citotoxicidad en linfocitos, Test de Ames y Ensayo Cometa, con los resultados que arrojaron estos ensayos se determino que todas las dosis probadas no inducen citotoxicidad, a excepción de el AE Stock al 10% y AE 5% que si resultaron citotóxicas, los dos extractos en las dosis evaluadas no presentaron efecto mutagenico ni premutagenico, de igual manera no presentó efectos genotoxicos; por lo tanto y con base en estas pruebas todas las dosis evaluadas se consideran como seguras para el tratamiento anti *H. pylori*.
- Los dos tipos de extractos evaluados tampoco presentan efectos genotoxicos mediante el Ensayo Cometa, ninguno de los extractos causó daño sobre las células de linfocitos humanos, de acuerdo a los índices de cualidad del sistema, y los cometas obtenidos no presentaban diferencias con relación a su control probablemente asociado a la presencia de compuestos antígenotóxicos como

linalool, monoterpenos y sesquiterpenos protegiendo a las células antagonizando cualquier efecto genotóxico que pudiera inducir algún otro compuesto presente en los extractos. Esta es una situación muy común en la mayoría de las especies vegetales y que contribuye a fundamentar la inocuidad de su uso en la medicina tradicional.

RECOMENDACIONES

- Los dos extractos en las dosis evaluadas no presentaron mutagenicidad ni genotoxicidad por lo tanto se consideran seguras, sin embargo se deben realizar otras pruebas de este tipo para descartar cualquier tipo de daño que estos puedan causar, como ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas en mamíferos, ensayo *in vitro* de mutación génica en células de mamífero, ensayo de retromutación de bacterias, análisis de intercambio de cromátidas hermanas en espermatogonias, ensayo de síntesis no programada de ADN en células testiculares, ensayo *in vivo* de síntesis no programada de ADN en hígados de mamífero, intercambio de cromátidas hermanas de médula ósea de mamífero, entre otras pruebas, para confirmar o descartar si los extractos inducen daños relevantes sobre el ADN para contemplar, así, su posterior inclusión en el desarrollo de un fitofármaco de *C. candamarcensis* como tratamiento complementario en pacientes con antecedentes de infección de *H. pylori*.
- Se debe además realizar pruebas de citotoxicidad, mutagenicidad y genotoxicidad a los componentes principales de estos compuestos independientemente con el fin de encontrar los mecanismos específicos que dichos extractos puedan presentar, ya que en la mezcla compleja los componentes no reaccionan del mismo modo.
- Es conveniente realizar la caracterización del EA de *C. candamarcensis* con el fin de encontrar que compuestos polares hacen que este tipo de extracto no ejerza efectos tóxicos sobre las células mononucleares de sangre periférica, ni efectos mutagénicos ni genotóxicos.
- Se debe realizar otras pruebas como antagonismos *in vivo* del Extracto sobre *H. pylori* y posterior a esto hacer pruebas de mutagenicidad *in vivo* para descartar cualquier tipo de daño que puedan causar.

BIBLIOGRAFIA

- ABREVAYA, X., Genotoxicos o Xenobióticos. Intramed. Artículo original. Agosto de 2008. http://www.intramed.net/actualidad/art_1.asp?contenidoID=47111.
- ADLER, I., COLE, J., DANFORD, N., EHLING, U., PARRY, M., RODERICK, R., VENITT, S., VOGEL, W., WATERS, R. 1985. Guide to short-term Tests for Detecting Mutagenic and Carcinogenic Chemicals. *World Health Organization*. Geneva.
- AMES B., DURSTEN, W., YAMASAKI, E., & LEE, F.W. 1973. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)*, 70: 2281-2285.
- AMES, B., PROFET, M., GOLD, L. 1980. Sustancias Químicas, Naturales y Sintéticas, Toxicología Comparativa, División de Bioquímica y Biología Molecular, Barker Hall, Universidad de California, Berkeley, California 94720 - Estados Unidos.
- ANDERSEN, P.H., JENSEN, N.J., 1984. Mutagenic investigation of peppermint oil in the Salmonella/mammalian microsome test. *Mutat. Res.* 138, 17–20.
- ARMSTRONG, J.S., 2006. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *BioEssays* 28, 253–260.
- ATSDR 2008. Departamento de Salud y Servicios Humanos de EEUU. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades División de Toxicología y Medicina Ambiental 1600 Clifton Road NE, Mailstop F-32 Atlanta, GA 30333 Teléfono: 1-800-232-4636. FAX: 770-488-4178. <http://www.atsdr.cdc.gov/es/>.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., ZHIRI, A., IDAOMAR, M., 2005. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 585, 1–13.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK D., ZHIRI A., BAUDOUX, D., IDAOMAR, M., 2006. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8- MOP plus UVA and MMS. *Mutat. Res.* 606, 27–38.
- BAKKALI F. AVERBECK, S. AVERBECK D. IDAOMAR M. Biological effects os essential oils. 2007. Science Direct. Food and Chemical Toxicology.

BASTIDAS, N., GOMEZ, M. 1999. Evaluación del Potencial Mutagénico de Mezclas de Plaguicidas usadas en el Huila. Universidad Surcolombiana. Facultad de Ciencias de la Salud. Departamento de Ciencias Básicas. Neiva.

BERIC T, NIKOLIC B, STANOJEVIC J, VUKOVIC-GACIC B, KNEZEVIC-VUKCEVIC J. 2008. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food Chem Toxicol.* Feb;46(2):724-32.

BERGONZELLI, G., DONNICOLA, D., PORTA, N., CORTHESEY-THEULAZ, I. 2003. "Essential Oils as Components of a Diet-Based Approach to Management of *Helicobacter pylori*" *American Society for Microbiology.* VOL 47:N°10. 7 de Julio.

BOYUM A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation Supplement*, 97:77-89.

BRAVO, L., CORTEZ, A., CARRASCAL, E., JARAMILLO, R., GARCIA, L., BRAVO, P., BADEL, A., BRAVO, P. 2003. *Helicobacter pylori*: Patología y Prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colombia Médica.* Vol. 34 No. 3.

BRUGÉS K. , & REGUERO M,. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. In stituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Ciudad universitaria. Edificio Manuel Ancizar. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol IX No. 1. Julio de 2007. Pag. 5 – 13.

BRUNI, R., MEDICI, A., ANDREOTTI, E., FANTIN, C., MUZZOLI, M., DEHESA, M., 2005. Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional *Ecuadorian spice* from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chem.* 85, 415–421.

BUIATTI, E., PALI, D., DECARLI, A. 1989. A case - control study of gastric cancer and diet in Italy. *Int. J. Cancer* 44: 611-616.

BUZNEGO, M. CUBA, A. GARRIGA T. CUELLAR , A. PEREZ, H. 2005. Efecto de los extractos de cloroformo y tolueno de *Cestrum nocturnum* L. sobre la conducta exploratoria y pruebas de analgesia. *Revista cubana de Plantas Medicinales Med* 10(2).

CARSON, C.F., MEE, B.J., RILEV, T.V., 2002. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electrón microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1914–1920.

CERON C.; YEPEZ M., RIVAS G. 2004. Estilos de Vida y Factores protectores y de Riesgo para enfermedad gástrica. Municipio de Nariño. Colombia. En : *Universidad y Salud*. Año 4 Vol1 No. 5:9-25.

CÓDIGO SANITARIO, LEY 9 DE 1.979. Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios. Ministerio de Salud. República de Colombia, <http://www.superservicios.gov.co/basedoc/codigos.shtml?x=50204>.

COULSTON F, DUNNE JF. 1980. The potencial carcinogenicity of Nitroso Table Drugs. Pp. 8 – 14. En: *Ablex Publ. Corp.* World Health organization Symposium Geneva. Norwood (NJ), U.S.A.

COVE (Comité de Vigilancia Epidemiológica) 2003. Manual de Normas y Procedimientos de Bioseguridad. División de Talento Humano y Salud Ocupacional.

DAN LUCKABAUGH, John Emilio. 1.999. Manual del Centro para la evaluación e investigación de Fármacos (CDER). Ministerio de Salud y Servicios Sociales. Administración de Alimentos y Drogas. U.S Departamento of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Public health service.

DE-OLIVEIRA A, RIBEIRO, F, PAUMGARTTEN FJR. 1999. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compound. *Tox Lett*; 92: 39-46.

DEVORET, R. 1998. Tests Bacterianos de sustancias potencialmente cancerígenas, *Revista Investigación y Ciencia* No. 282 p 6-16 1998.

DI PASCUA, R., BETTS, G., HOSKINS, N., EEWARS, M., ERCOLINI, D., MAURIELLO, G., 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4863–4870.

DI SOTTO A, EVANDRI MG, MAZZANTI G. 2008. Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. *Mutat Res.* 2008 May 31;653(1-2):130-3. Epub 2008 Apr 22.

ECOTOXICOL ENVIRON SAF. 2.004. Residual toxicity after biodegradation: interactions among benzene, toluene, and choloform. *Feb: 57 (2): 162 – 7. PMID: 14759662 (PubMed – indexed for MEDLINE).*

FAIRBAIM, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. 1995. The Comet Assay: A Comprehensive Review. *Mutat. Res.* 339: 37-59.

FDA (Food and Drugs Administration). 1996. *Guideline for Industry. Specific aspects of regulatory genotoxicity test for pharmaceuticals*. ICH S2A. <http://www.fda.gov/cder/guidance/ichs2a.pdf>.

FORABOSCO A, ZAFFE D. TOSATO I. 1972. On the dye exclusion of test cell viability. I. Evaluation of the optimal concentration. *Bolletino della Società Italiana di Biología Sperimentale*, 48:33-36.

FRIEDMAN, M. 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J Agric food Chem*. 52(19):6042-8.

GARCIA, A., PAJARES, J. 2001. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Anales* Vol. 21 Suplemento 2.

GARCIA, H. 1992. Flora Medicinal de Colombia. *Botánica Médica*. 2º Tomo. Tercer Mundo Editores. Bogotá Colombia. p 270 – 271.

GENELHU, M., ZANINI, M., VELOSO, I., CARNEIRO, A., LOPES, M., SALAS, C. 1998. Use of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction. Departamento de Bioquímica, Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. *Braz J Med Biol Res*, 31(9), 1129 – 32.

GÓMEZ, M., MELLO, V., RODRIGUEZ, K., BEMGUERER, M., FACA, V., SALAS, C. 2005. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. Departamentos de Bioquímica e Inmunología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil. *Planta Med*. Mar; 71(3):244-8.

GÓMEZ, & MORÁN, N.;. 2005. Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica candamarcensis* Hooker *filius*. Departamento de Química. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto.

GONZALEZ, M. 2005. El problema de la erradicación del *Helicobacter pylori*, la infección bacteriana más difundida en el mundo. *Revista MGI*. Vol 18 No. 3.

GORELICK N.J., 1995. Genotoxicity of trans-anethole in vitro. *Mutat. Res*. 326, 199–209.

GRIFFITHS, A., MILLER, J., SUZUKI, D., LEWONTIN, R., GELBART, W. 2002. *Genética*. Séptima Edición. Mc Graw Hill Interamericana. Aravaca Madrid.

GUZMAN G,. 1998. *Carica papaya*. Costa Rica. http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_papaya.pdf.

HARRIS, P., SERRANO, C., VENEGAS, A., Vacunas en desarrollo: helicobacter pylori. Vaccinología. Rev Chil Infect 2006; 23 (3): 246-253

HASHEMINEJAD, G., CALDWELL, J., 1994. Genotoxicity of the alkenylbenzenes a- and b-asarone, myristicin and elimicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. Food Chem. Toxicol. 32, 223–231.

HOFNONG y QUILLARDET. 1986. Recent Developments in Bacterial Short-Term Tests for the Detection of Genotoxic. Mutagenesis.1986; 1: 319-330.

INOUE, S., TAKIZAWA, T., YAMAGUCHI, H.: 2001. “Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact” Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

JAHANGIR T, KHAN TH, PRASAD L, SULTANA S. 2006. Farnesol prevents Fe-NTA-mediated renal oxidative stress and early tumour promotion markers in rats. Hum Exp Toxicol. 2006 May;25(5):235-42.

JAMES J. SALAZAR, Y ZULETA M. 2004. Introducción a la Investigación en Mutagénesis. Universidad de Antioquia.

KAHKOREN MP, HOPIA AI, VUCRELA HJ, RAUHA J-P, PIHLAJA, KUJALA TS, HEINONEN M.199. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J. Agric. Food Chem ; 47: 3954-3962.

KIM, H. WANG, RS, ELOVAARA E., RAUNIO H, PELKONEN O., AOYAMA T., VAINIO H., NAKAJIMA J. 1997. Cytochrome P450 isozymes responsible for the metabolism of toluene and styrene in human liver microsomes, Xenobiotica 27 (1997) 657– 665.

KLAUS. 2002. Metabolite ratio of toluene-exposed rotogravure rinting plant workers reflects individual mutagenic risk by sister chromatid exchanges. Mutation Research 519 (2002) 171–177.

KOO, H. 2003. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemother* Nov; 52(5):782-9.

LAZUTKA, J.R., MIERAUSKIEN, J., SLAP, G., DEDONYT, V., 2001. Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. Food Chem. Toxicol. 39, 485–492.

LOFFELD, R.J., WILLEMS, I., FLENDING J. 1990. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. *Histopathology*; 17, 6: 537-541.

LOZA H.1999. Monoterpenes in essential oils. Biosynthesis and properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 464: 49-62.

MALATY, H. 1994. *Helicobacter pylori* infection genetic and environmental influences: as study of twins. *Annals of Internal Medicine*. Vol 120: 982- 986.

MARON, D. y AMES, B. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res.* Vol. 113, No. 3-4; p, 173-215.

MCCANN, J., CHOI, E., YAMASAKI, E., & AMES, B. 1998. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)*, 72: 5135-5139.

MELLOA, V.; GOMES, M.; LEMOSA, F.; DELFINO, J.; ANDRADE, S.; LOPESA, M.; SALAS, C.;. 2007. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine*. 18 June.

MENA, J., YEPEZ, M., SANTACRUZ, A., NOGUERA, E. 2005. Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de *Carica candamarcensis* sobre aislamientos de *Helicobacter pylori*. *Revista del Centro de Estudios en Salud*. Universidad de Nariño. Año5. Vol 5. No. 6, 13-21.

MORTELMANS KRISTIEN, EROOL ZEIGER. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay a *Molecular and Genetic Toxicology Program, SRI International. Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC 27709-2233, USA* Mutation Research 455 (2000) 29–60.

MOTOE KATO. 2005. Implementación del test de ames usando G.L.P en Chile para productos con expectativas de exportación, Universidad de Chile.

MURRAY R., GRANNER D., MAYES P., RODWEL V. 2004. Bioquímica Ilustrada de Harper. Edición 16ª . Editorial El Manual Moderno.

NESTMAN, E.R., LEE, E.G.H., 1983. Mutagenicity of constituents of pulp and paper mill effluent in growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 119, 273–280.

NOSTRO A., CELLINI L.; DI BARTOLOMEO S., DI CAMPLI E.; GRANDE R.; CANNATELLI M.; MARZO L.; ALONZO V. 2005. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. In: *Phytother Res.* 19 (3): 198-202.

OLIVE, P.L. 1999. DNA Damage and Repair in Individual Cells: Applications of The Comet Assay in Radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol*, 75(4): 395-404:

OUSSALAH, M., CAILLET, S., SALMIERI, S., SAUCIER, L., LACROIX, M., 2007. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* present in bologna and ham. *J. Food Prot.* 70, 901–908.

PEREIRA, M., LOPES M., MEIRA W., SALAS C. 2001. Purification of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* L. and cloning of a genomic putative fragment coding for this enzyme. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais, Brazil. *Elsevier. Protein Expr Purif.* Jul; 22(2):249-57.

PRESCOT, M., HARLEY, J., DONALD K.,. 1999. Microbiología. Cuarta edición. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid.

PURCHASE IF. 1982. International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC working paper 2/6. An appraisal of predictive tests for carcinogenicity. *Mutat Res.* Jul; 99 (1):53–17.

RICHER., CL., CHAKRABARTI S., SENEAL-QUEVILLON M., DUHR MA, ZHANG, TARDI R. Cytogenetic effects of low-level exposure to toluene, xylene, and their mixture on human blood lymphocytes. Département d'anatomie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada. *Int Arch Occup Environ Health.* 1993;64(8):581-5.

ROELOFS AJ, EDWARDS CM, RUSSELL RG, EBETINO FH, ROGERS MJ, HULLEY PA. Apomine enhances the antitumor effects of lovastatin on myeloma cells by down-regulating 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Jul;322(1):228-35. Epub 2007 Apr

ROJAS E, LOPEZ MC, VALVERDE M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 722 (1-2): 225-254.

ROMPELBERG CJM, STENHUIS WH, VOGEL N, OSENBRUGGEN VAN WA, SCHOUTEN A, VEHAGEN H. Antimutagenicity of eugenol in the rodent bone marrow micronucleus test. *Mutat Res* 1995;346:69-75.

ROSSMAN, LISS R. A. 1986. Genetic Toxicology of Environmental Chemicals. SALOM, A.,. 2006. Tratamiento sistémico de la infección por *Helicobacter pylori*. Centro Médico Docente Adaptógeno. Medicina Sistémica.

SALAS, E., PAZ, M., SCHNAIDERMAN, A. 2004. Papaya curativa. Universidad Federal de Minas Gerais.

SIDRANSKY, D. 1995. Molecular markers in cancer diagnosis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 17, 17-29.

SILVA, C., GOMES, M., FERREIRA, R., RODRIGUES, K., VAL, C., LOPES, M., MELLO, V., SALAS, C. 2003. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Brasil. *Planta Med.* Oct; 69(10):926-32.

SING NP; McCOY MC; TICE RR; SCHNEIDER, 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175: 184-191.

SUN, H., KUTI, J., NICOLAY, D. 2005. Pharmacodynamics of antimicrobials for the empirical treatment of nosocomial pneumonia: A report from the OPTAMA Program. *Crit Care Med.*; 33(10):2222-7.

TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B. 2000. Single cell gel/Comet assay: guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206-221

VENITT S, PARRY JM, eds. 1984. Mutagenicity Testing: A practical approach. Oxford: *IRL Press*. 187-232.

WALREAVENS V, JAZIRI M, VAN BEEUMEN J, SECHNEK AG, KLEINSCHMIDT T, LOOZE Y. 1993. Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook.

YOON, H.S., MOON, S.C., KIM N.D., PARK, B.S., JEONG, M.H., YOO, Y.H., 2002. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 151–156.

ANEXOS

Anexo A. Normas de Bioseguridad

Los elementos de protección personal son un complemento indispensable de los métodos de control de riesgos para nuestra protección colocando barreras en las puertas de entrada para evitar la transmisión de infecciones y evitar la contaminación de los recintos de trabajo (COVE, 2.003). De acuerdo con el procedimiento a realizar, se tuvo en cuenta el uso de elementos de protección específicos tales como:

- Uso de mascarilla buconasal: en todos los procedimientos para evitar la contaminación por la exposición de mucosas de boca, nariz y ojos de los reactivos empleados en cada prueba, es un elemento de protección personal y desechable por turno, protege desde el puente nasal hasta el inicio del cuello.
- Uso de guantes: Redujo el riesgo de contaminación por fluidos en las manos, el empleo de los guantes tiene por objeto proteger y no sustituir las prácticas apropiadas de control de infecciones, en particular el lavado correcto de las manos. Los guantes fueron de látex bien ceñidos para facilitar la ejecución de los procedimientos e impedir la transmisión de microorganismos a través de las manos.
- Bata de Laboratorio: Es un protector para el cuerpo; evita la posibilidad de contaminación por los diferentes reactivos (COVE, 2.003).

Las normas generales de bioseguridad que se aplicaron son:

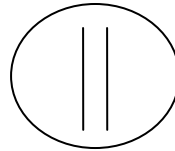
- Mantener el lugar de trabajo en óptimas condiciones de higiene y aseo.
- No consumir alimentos en el laboratorio.
- No guardar alimentos en las neveras ni en los equipos de refrigeración de sustancias contaminantes o químicos.
- Las condiciones de temperatura, iluminación y ventilación de los sitios de trabajo deben ser confortables.
- Se debe lavar las manos antes y después de cada procedimiento e igualmente si se tiene contacto con material patógeno.
- Evitar deambular con los elementos de protección personal fuera del área de trabajo.
- Mantener los elementos de protección personal en óptimas condiciones de aseo, en un lugar seguro y de fácil acceso.
- Aplicar en todo procedimiento asistencial las normas de asepsia necesarias.
- Utilizar las técnicas correctas en la realización de todo procedimiento.
- Realizar desinfección y limpieza a las superficies, elementos, equipos de trabajo, al final de cada procedimiento y al finalizar la jornada.

- En caso de ruptura del material de vidrio contaminado con sangre u otro líquido corporal los vidrios se deben recoger con escoba y recogedor; nunca con las manos.
- Los recipientes para transporte de muestras debe ser de material irrompible y cierre hermético. Debe tener preferiblemente el tapón de rosca.
- Restringir el ingreso a las áreas de alto riesgo biológico (cámaras de siembra y de rayos UV) al personal no autorizado, al que no utilice los elementos de protección personal necesarios, con el fin de la seguridad del personal y de evitar las contaminaciones de las pruebas a realizar (COVE, 2.003).

Anexo B. Chequeo de Marcas

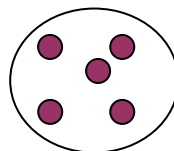
Marca 1: Confirmación de Requerimiento de histidina. En donde se observó que la cepa es his⁻, se sembró a partir del caldo de la cepa TA100 con un asa haciendo dos líneas paralelas como se muestra a continuación en cajas petri de Agar Mínimo Selectivo, Agar Mínimo/Biotina y Agar Mínimo/Histidina/Biotina, se hizo dos cajas de cada uno. Se llevó a incubar por 24 horas a 37 °C. En la caja de agar mínimo y de Biotina no hubo crecimiento y si en las cajas histidina/biotina.

Figura 17. Esquema Siembra Marca 1



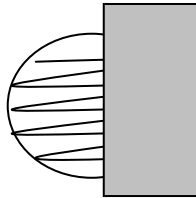
Marca 2: Confirmación de mutación rfa. Mutación en polisacáridos de la pared, sensibilidad al cristal violeta. El cristal violeta es un colorante tóxico de alto peso molecular, sólo penetra en bacterias muertas. Si la mutación rfa esta presente, las bacterias son sensibles al efecto letal del colorante ya que son permeables al mismo. Se agregó 100 µl de caldo a 2 ml de top agar (fundido a 45 °C en baño maría), se agita en vortex por 3 sg a velocidad baja y se siembra en Agar Nutritivo, se distribuye uniformemente en la caja, y se deja solidificar el top agar, con una pinza estéril se colocan discos de papel filtro, como se muestra a continuación, impregnados con 10 µl de cristal violeta (1mg/ml) se invierte la caja y se incuba por 24 horas a 37 °C. Se confirmó la presencia de esta mutación en la cepa porque se observó un halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco debido a que el cristal violeta penetró a la bacteria e inhibe su crecimiento.

Figura 18. Esquema Marca 2



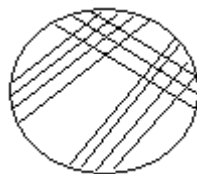
Marca 3: Confirmación de mutación uvrB. Sensibilidad a la luz ultravioleta (UV). A partir del caldo se sembró la cepa en cajas petri con Agar Nutritivo siguiendo el siguiente esquema, se cubrió la mitad de la caja con papel aluminio, luego se destapan las cajas y se irradiaron con lámpara UV a 33 cm durante 15 segundos, se taparon nuevamente, y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Después de dicho tiempo, en la parte cubierta con papel aluminio hay crecimiento y en la parte irradiada no hay crecimiento.

Figura 19. Esquema Marca 3



Marca 4: Confirmación del factor R. Resistencia al antibiótico Ampicilina. A partir del caldo se siembra la cepa en cajas petri con Agar Mínimo/Histidina/Biotina/Ampicilina, se hizo siembra francesa como se observa en figura No.20, se incubó durante 24 horas a 37 °C. Donde se observó efectivamente el crecimiento, ya que estas cepas son resistentes a la ampicilina. Estas son las cajas maestras y se guardaron pasado el tiempo de incubación en nevera a 4 °C, el tiempo de duración de estas cajas no debe sobrepasar los dos meses.

Figura 20. Esquema Marca 4



Anexo C. Ejecución del Ensayo de Mutagenicidad

En primer lugar, se toman colonias de la caja maestra de TA100 y se inoculan en caldos nutritivos, estos se llevan a incubar durante 16 horas a 37 °C, se agrega la solución histidina/biotina (10 ml por cada 100 ml) al top agar y se distribuye en alícuotas de 3 ml en tubos de ensayo. Se prepara y marca los tubos en gradillas (previamente esterilizados) para los diferentes tratamientos, tanto el cuarto, cubículo de trabajo y materiales deben estar muy bien estériles antes de iniciar cada tratamiento.

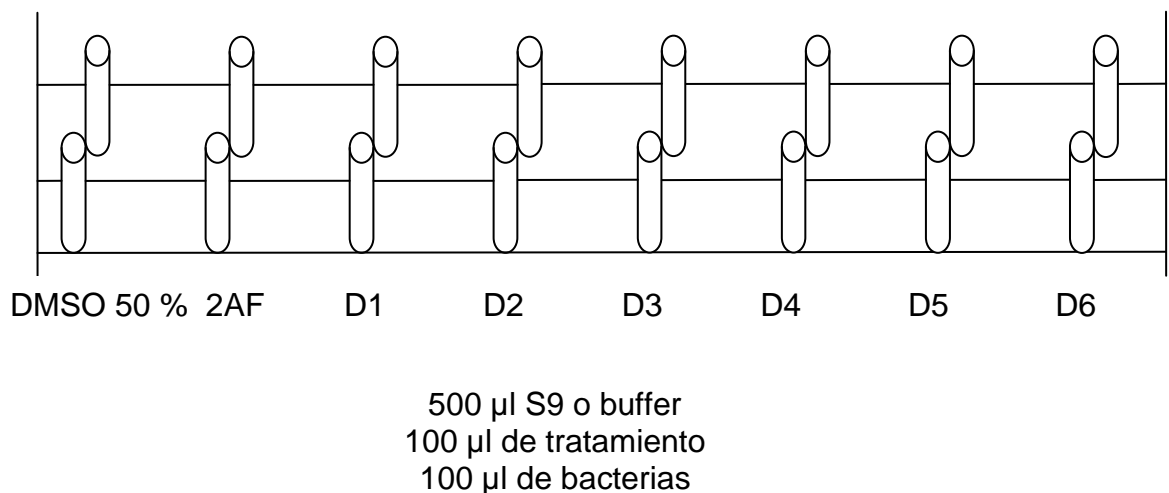
Previamente se esteriliza un frasco oscuro para preparar el S9, micropipetas con sus respectivas puntas de 1000 y de 100µl, descartador, y se debe tener un

frasquito con hielo seco. El Top Agar se esteriliza en autoclave a 15 lb por 15 minutos, luego se lleva a baño maría ajustado previamente a 50 °C. Se prepara independientemente la cantidad de mezcla de S9 concentrada requerida, esta mezcla se prepara fresca antes de cada ensayo y se debe mantener sobre hielo y con luz amarilla.

Cumplido el tiempo de incubación de la cepa se mide la densidad óptica para asegurarnos que la cepa esta en el rango recomendado a una longitud de onda de 650 nm, esta debe mostrar un valor entre 0.5 y 0.6, valor en el cual se asegura que se esta tratando por cada dosis cerca de 1×10^9 bacterias. Por lo tanto se selecciona el caldo con el valor más ajustado. Si la cepa no ha llegado al rango se puede esperar 1 hora más, no se recomienda utilizar cultivos bacterianos con más de 17 horas de incubación.

Se agregó a un tubo de ensayo estéril y en el siguiente orden 500 µl de S9 con activación metabólica +S9) o 500 µl de PBS (sin activación metabólica –S9), 100 µl de la sustancia de prueba (dosis o controles) y 100 µl de la cepa TA100 (1×10^9 bacterias/ml abs 650 nm 0.5). Esto se realiza por duplicado para cada tratamiento, como se puede ver en la figura No. 21.

Figura 21. Esquema Montaje Ensayo de Mutagenicidad



Al finalizar se cubrió la gradilla con papel aluminio para evitar la contaminación, se agita y se lleva a incubar durante 25 minutos a 37 °C. Se marcan las cajas con TA100, el tratamiento y la fecha. Cumplido el tiempo de incubación se agrega a cada tubo de tratamiento el top agar (50 °C), se agita en vortex por menos de 3 sg y se sirve esta mezcla en cajas de Agar Mínimo previamente rotuladas, se distribuye uniformemente, se deja solidificar por 10 minutos, se invierten las cajas y se las lleva a incubar por 48 horas a 37 °C en oscuridad. Pasado el tiempo se cuentan las colonias revertantes en cada caja controles y tratamientos, con ayuda

de un cuenta colonias, para su posterior análisis e interpretación. Este proceso se realizó por triplicado en tiempos diferentes bajo las mismas condiciones de laboratorio.

Anexo D. Ensayo de Mutagenicidad Test de Ames

1. Resultados del Primer Ensayo en la Prueba de Ames con la cepa TA-100 de *Salmonella typhimurium* después del tratamiento con AE (Micrométodo), con y sin activación metabólica (S-9) (los datos se expresan como número de revertantes/caja).

RESULTADOS TEST DE AMES MICROMETODO						
DOSIS	Ejecución: Nov. 29 / 07		Lectura: Dic 1/ 07		Ensayo No. 1	Extracto: AE
	TA 100					
	SIN S - 9			CON S - 9		
	CAJA 1	CAJA 2	PROMEDIO	CAJA 1	CAJA 2	PROMEDIO
c (-) DMSO (50%)	89	90	89	109	100	104
c (+) AzNa / 2AF	3216	2976	3096	735	357	546
D1 1:10	104	113	108	116	107	111
D2 1:100	101	115	108	111	95	103
D3 1:1000	122	124	123	108	97	102
D4 1:10000	113	120	116	120	117	118
D5 1:100000	92	111	101	87	117	102
D6 1:1000000	87	130	108	109	-	109

2. Resultados del Segundo Ensayo en la Prueba de Ames con la cepa TA-100 de *Salmonella typhimurium* después del tratamiento con AE (Micrométodo), con y sin activación metabólica (S-9) (los datos se expresan como número de revertantes/caja).

RESULTADOS TEST DE AMES MICROMETODO						
DOSIS	Ejecución: Nov. 30 / 07		Lectura: Dic 2/ 07		Ensayo No. 2	Extracto: AE
	TA 100					
	SIN S - 9			CON S - 9		
	CAJA 1	CAJA 2	PROMEDIO	CAJA 1	CAJA 2	PROMEDIO
c (-) DMSO (50%)	88	96	92	103	123	113
c (+) AzNa / 2AF	4032	3984	4008	1680	1008	1344
D1 1:10	122	79	100	75	94	84
D2 1:100	120	113	116	68	114	91
D3 1:1000	99	118	108	109	110	109
D4 1:10000	113	119	116	110	110	110
D5 1:100000	106	87	96	89	72	80
D6 1:1000000	96	98	97	111	80	95

3. Resultados del Tercer Ensayo en la Prueba de Ames con la cepa TA-100 de *Salmonella typhimurium* después del tratamiento con AE (Micrométodo), con y sin activación metabólica (S-9) (los datos se expresan como número de revertantes/caja).

RESULTADOS TEST DE AMES MICROMETODO						
DOSIS	Ejecución: Dic 4 / 07		Lectura: Dic 6/ 07		Ensayo No. 3	Extracto: AE
	TA 100					
	SIN S - 9			CON S - 9		
	CAJA 1	CAJA 2	PROMEDIO	CAJA 1	CAJA 2	PROMEDIO
c (-) DMSO (50%)	91	78	84	102	85	93
c (+) AzNa / 2AF	4752	5472	5112	1728	1920	1824
D1 1:10	80	100	90	97	111	104
D2 1:100	120	113	116	118	105	111
D3 1:1000	81	110	95	91	104	97
D4 1:10000	117	101	109	81	77	79
D5 1:100000	86	101	93	119	133	126
D6 1:1000000	95	90	92	95	101	98

4. Resultados del Primer Ensayo en la Prueba de Ames con la cepa TA-100 de *Salmonella typhimurium* después del tratamiento con EA (Estándar), con y sin activación metabólica (S-9) (los datos se expresan como número de revertantes/caja).

RESULTADOS TEST DE AMES ESTÁNDAR						
DOSIS	Ejecución: Nov 27 / 07		Lectura: Nov 29 / 07		Ensayo No. 1	Extracto: EA
	TA 100					
	SIN S - 9			CON S - 9		
	CAJA 1	CAJA 2	PROMEDIO	CAJA 1	CAJA 2	PROMEDIO
c (-) H2O	76	95	85	74	73	73
c (+) AzNa / 2AF	3456	3296	3376	1008	960	984
D1 EA Puro	81	126	103	81	70	75
D2 1:10	95	88	91	87	81	84
D3 1:100	80	81	80	82	91	86

5. Resultados del Segundo Ensayo en la Prueba de Ames con la cepa TA-100 de *Salmonella typhimurium* después del tratamiento con EA (Estándar), con y sin activación metabólica (S-9) (los datos se expresan como número de revertantes/caja).

RESULTADOS TEST DE AMES ESTÁNDAR						
DOSIS	Ejecución: Nov 28 / 07		Lectura: Nov 30 / 07		Ensayo No. 2	Extracto: EA
	TA 100					
	SIN S - 9			CON S - 9		
	CAJA 1	CAJA 2	PROMEDIO	CAJA 1	CAJA 2	PROMEDIO
c (-) H2O	72	63	67	90	99	94
c (+) AzNa / 2AF	2448	2192	2320	944	1088	1016
D1 EA Puro	118	125	121	115	98	106
D2 1:10	120	93	106	90	76	83
D3 1:100	92	79	85	91	106	98

	2	15	17	30	17	20	14	15	15	20	20	15	15	20	18	15	20	15	15	20	17	20	15	15	15
		20	22	15	17	15	18	15	15	14	20	15	14	14	14	15	14								
AE 1/10	1	11	12	13	15	12	50	12	24	12	12	12	25	25	26	25	25	10	25	15	11	11	15	40	15
		20	24	25	20	20	15	15	14	15	30	15	14	30	30	33	20								
	2	30	14	20	16	14	12	14	40	14	30	35	35	30	15	30	35	35	15	14	14	15	14	12	15
AE 1/1000	2	15	15	15	14	15	15	25	20	25	15	15	17	17	25	24	15								
	1	15	15	15	15	14	15	16	17	40	15	15	15	15	15	25	20	25	17	17	15	15	17	15	15
		20	15	20	15	15	17	15	15	20	15	15	14	14	15	14	14								
AE 1/100000	2	40	17	15	18	18	15	25	15	25	17	15	15	15	15	15	20	15	15	14	12	15	12	15	
		13	13	12	15	15	12	15	12	15	15	15	14	14	18	15	15								
	1	25	15	15	12	15	15	15	15	17	20	15	17	33	15	15	14	14	12	12	15	12	15	25	20
AE 1/1000000	1	15	15	15	14	14	14	13	12	15	15	12	13	15	13	13	13								
		15	25	15	13	13	30	30	20	17	20	17	15	16	15	28	20	17	22	22	30	25	20	20	22
	2	15	18	33	17	24	27	17	16	15	15	30	22	17	15	15	15								

2. Resultados del Segundo Ensayo Cometa, de tres dosis de AE y EA.

Fecha de Ejecución: Dic 5/07 pm

Nº de Experimento del Extracto (lectura)

Extracto: *Carica candamarcensis*

Fecha de Lectura:

Tipo de Extracto: Aceite Esencial y E. Acuoso

Donante:

TTO																									
DMSO 1%	1	10	20	12	15	14	12	15	12	14	14	12	12	12	13	13	13	13	12	13	13	13	12	14	
		13	13	13	13	15	13	13	13	12	14	15	12	15	13	13	13								
H2O2	1	20	40	40	40	30	40	50	30	40	50	60	25	60	40	40	40	40	40	40	40	40	43	45	38
		40	40	40	45	39	40	28	35	35	35	40	40	30	45	50	50								
EA Puro	1	30	25	20	15	15	15	20	15	22	15	15	14	15	22	20	20	15	17	20	15	20	22	15	17
		18	20	22	18	18	20	24	25	25	20	25	20	25	20	20	20								
EA 1/10	2	16	15	15	15	15	14	15	17	15	15	15	15	15	18	30	15	15	17	18	20	15	15	15	17
		14	17	15	15	15	25	18	18	16	17	20	20	15	20	15	14								
EA 1/100	1	15	15	15	14	14	12	13	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	18	16	15	15	15
		35	15	15	15	15	15	15	15	15	14	15	16	14	14	15									
AE 1/10	2	13	13	13	15	15	14	15	15	14	14	14	12	16	15	15	15	15	15	17	15	15	14	14	15
		15	14	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	16	15	17	15								
1/1000	1	15	15	15	15	14	15	15	14	13	17	20	15	20	17	14	14	14	14	15	15	15	15	15	14
		14	13	14	15	15	12	13	13	13	13	15	15	14	15	14	15								
1/10000	2	25	14	14	14	14	13	14	14	13	25	13	13	14	15	13	14	14	14	30	15	15	14	14	
		14	16	17	15	15	14	14	12	25	30	30	14	12	13	14	14								
1/100000	1	25	15	25	15	15	17	18	15	15	20	15	15	14	12	12	12	15	17	15	15	12	12	15	20
		15	15	30	14	12	12	12	12	15	15	30	15	15	17	17	15								
1/1000000	2	17	20	15	15	17	17	25	20	15	15	15	18	20	20	15	22	24	15	15	15	15	15	14	13
		12	20	28	25	15	20	25	23	30	20	15	15	15	17	20	15								
1/10000000	1	14	20	15	15	14	12	14	14	12	12	12	12	20	15	17	15	15	14	14	14	12	13	15	15
		15	15	12	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	13	13	13	14							

		20	20	15	15	20	15	19	20	22	22	15	15	14	15	14	14	15	25	14	14	14	14	14	15
	2	14	17	17	14	15	14	14	12	13	13	14	14	14	12	12	14								
AE 1/100000	1	15	15	14	14	17	14	14	13	15	14	13	13	14	13	13	14	14	13	13	13	13	13	14	15
		14	13	13	13	14	15	13	15	15	15	17	15	15	14	15	16								
	2	15	14	13	13	14	14	14	13	12	13	12	20	22	15	15	14	14	14	13	13	13	13	13	13
		13	14	14	15	15	15	19	15	15	13	13	13	13	13	13	13								

3. Resultados del Tercer Ensayo Cometa, de tres dosis de AE y EA.

Fecha de Ejecución: Dic 6/07 am

Nº de Experimento del Extracto (lectura)

Extracto: *Carica candamarcensis*

Fecha de Lectura:

Tipo de Extracto: Aceite Esencial y E. Acuoso

Donante:

TTO																									
DMSO 1%	1	15	15	15	15	13	14	13	17	18	15	15	20	20	22	15	15	15	15	17	15	15	15	15	14
		14	18	15	20	15	15	30	15	15	15	15	20	20	30	22	15								
	2	15	15	15	14	15	13	13	14	15	13	13	12	14	14	15	16	15	14	15	14	14	14	15	14
		15	20	15	15	15	12	13	14	13	14	12	14	15	30	15	15								
H2O2	1	35	40	30	40	40	40	35	42	40	40	30	35	33	50	35	25	30	30	30	40	30	30	40	35
		40	30	30	30	40	45	32	39	40	30	20	30	40	40	40	30								
	2	30	30	40	40	40	40	40	39	35	40	40	42	37	35	35	45	40	40	40	40	47	50	40	35
		40	40	35	40	40	40	35	35	40	35	30	30	30	30	40	30								
EA Puro	1	15	14	20	15	14	20	15	14	15	17	14	14	20	14	14	15	15	12	16	14	14	14	15	14
		15	12	13	13	12	13	12	13	12	14	12	12	13	14	13	14								
	2	13	12	12	12	13	14	14	12	14	14	14	12	14	14	14	14	14	14	15	15	14	15	15	16
		14	14	13	14	14	12	15	12	25	25	12	12	15	14	15	15								
EA 1/10	1	15	15	15	15	12	12	13	17	20	25	13	13	13	15	15	13	20	15	20	15	15	13	12	12
		14	14	14	20	17	15	15	15	22	15	20	15	12	12	13	15								
	2	15	15	15	12	13	17	15	15	14	12	15	12	14	14	15	17	13	12	14	15	15	12	13	15
		12	13	15	15	14	15	20	22	15	14	14	14	13	15	13	13								
EA 1/100	1	12	12	12	13	14	15	18	15	15	15	14	14	15	15	13	15	22	15	16	15	15	18	15	15
		14	13	22	12	13	13	13	13	14	13	13	15	12	12	12	13								
	2	15	14	12	15	15	15	14	17	22	15	14	14	12	12	12	11	15	15	12	20	15	15	17	15
		14	14	12	15	14	14	13	13	15	15	13	14	13	13	13	14								
AE 1/10	1	15	12	12	13	13	13	20	30	17	20	30	18	15	15	15	14	24	20	15	15	20	15	13	20
		30	30	23	19	15	12	12	15	25	20	15	15	15	14	14	14								
	2	15	14	22	16	15	13	22	17	15	18	15	14	13	13	12	12	13	16	12	30	12	28	23	25
		18	15	15	15	14	14	14	18	28	15	15	22	20	15	14	12								
AE 1/1000	1	22	15	15	15	15	15	15	14	15	20	15	14	15	15	16	15	15	14	14	14	12	14	14	14
		12	12	14	15	15	15	14	14	22	15	15	14	12	25	15	15								
	2	15	15	12	13	12	15	20	21	20	30	15	18	15	15	15	15	12	13	15	16	14	14	12	14
		13	15	14	14	15	15	14	14	12	12	12	12	13	14	14	14								
AE 1/100000	1	16	15	14	15	15	13	13	13	14	14	17	15	18	20	15	15	15	14	14	14	13	13	14	12
		13	15	14	13	12	17	13	13	11	12	13	13	13	14	15	12								
	2	15	15	12	13	13	14	13	13	13	13	13	13	14	13	15	12	12	13	14	13	13	13	13	13
		13	13	13	13	13	15	12	13	13	13	13	15	15	13	13	15								

ANEXO F. Preparación de Medios y Solución para los Ensayos

1. ENSAYO DE MUTAGENICIDAD CON PREINCUBACIÓN Y ACTIVACIÓN METABÓLICA EN *Salmonella typhimurium* (Test de Ames)

- Agar Mínimo Glucosa (Para chequeo de marcas)

<i>Reactivo</i>	<i>1000 ml</i>	<i>500 ml</i>	<i>400 ml</i>	<i>300 ml</i>	<i>200 ml</i>
Agar mínimo o bacteriológico	15 g (1.5%)	7.5 g	6g	4.5 g	3 g
Agua destilada	930 ml	465 ml	372 ml	279 ml	186 ml
Sales Vogel-Bonner 50X	20 ml	10 ml	8 ml	6 ml	4 ml
Glucosa 40 %	50 ml (2%)	25 ml	20 ml	15 ml	10 ml

Disolver el agar en agua destilada caliente y con agitador (no dejar regar). Esterilizar en autoclave durante 20 min., 121 °C. Cuando la solución este tibia adicionar la solución estéril de sales VB 50X y la solución estéril de glucosa al 40 %, una vez se prepara la mezcla de vierten 25 ml en cajas de petri estériles, se dejan reposar por 15 minutos, se empacan y se guardan en nevera a 4 °C hasta su uso.

Nota: Las salves VB y la glucosa se deben preparar y esterilizar por separado.

- Agar histidina/biotina (Cajas histidina/biotina) (Para cajas maestras de cepas sin factor R y para confirmar el requerimiento de histidina)

<i>Reactivo</i>	<i>1000 ml</i>	<i>500 ml</i>
Agar mínimo o bacteriológico	15 g	7.5 g
Agua destilada	914 ml	457 ml
Solución estéril Sales Vogel-Bonner 50X	20 ml	10 ml
Solución estéril Glucosa 40 %	50 ml	25 ml
Solución estéril de Histidina. HCl 2 g/400 ml H ₂ O	10 ml	5 ml
Solución estéril de Biotina 0.5 Mm	6 ml	3 ml

Mezclar y disolver el agar en agua caliente y con agitador. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos., 121 °C. Adicionar la solución de glucosa 40%, sales VB 50X y la histidina en la solución de agar todavía caliente, dejar enfriar y adicionar la biotina. Mezclar y servir en las cajas de Petri estériles, se dejan reposar por 15 minutos, se empacan y se guardan en nevera a 4 °C hasta su uso.

Nota: Las sales VB 50X, la biotina, la histidina y la glucosa se deben preparar y esterilizar por separado.

- Agar histidina. biotina, ampicilina (Cajas Ampicilina)(Para cajas maestras de cepas con plásmido pKM 101; plásmido pKM101+pAQ1 y para confirmar la resistencia a ampicilina)

<i>Reactivo</i>	<i>1000 ml</i>	<i>Concentración/Caja</i>
Agar mínimo o bacteriológico	15 g	1.5 %
Agua destilada	910 ml	N/A
Solución estéril Sales Vogel-Bonner 50X	20 ml	1X
Solución estéril Glucosa 40 %	50 ml	2 %
Solución estéril de Histidina. HCl 2 g/400 ml H ₂ O autoclavaza o filtrada	10 ml	260 µM
Solución estéril de Biotina 0.5 mM esterilizada en autoclave o filtrada	6 ml	3 µM
Solución estéril de ampicilina 8 mg/ml NaOH 0.02 N	3.15 ml	25 µg/ml

Mezclar y disolver el agar en agua caliente, esterilizar en autoclave durante 20 minutos., 121 °C. Adicionar la solución de glucosa 40 %, sales VB 50X y la histidina en la solución de agar todavía caliente, cuando este tibia (45°C), adicionar la biotina y la ampicilina. Esencial que la concentración sea exacta. Mezclar y servir en las cajas de Petri, se dejan reposar por 15 minutos, se empacan y se guardan en nevera a 4 °C hasta su uso.

Nota: Las cajas maestras duran aproximadamente 1 mes.

- Agar Nutritivo (Para chequeo de la mutación rfa y UvrABC)

<i>Reactivo</i>	<i>1000 ml</i>	<i>500 ml</i>	<i>300 ml</i>	<i>200 ml</i>	<i>100 ml</i>
Agar Nutritivo	25 g	12.5 g	7.5 g	5 g	2.5 g
Agua destilada	1000 ml	500 ml	300 ml	200 ml	100 ml

Mezclar y disolver el agar con agua destilada caliente, esterilizar en autoclave durante 20 minutos., 121 °C. Servir las cajas de Petri, dejar solidificar por 15 minutos, marcarlas, empacarlas y guardarlas en nevera a 4 °C hasta su uso.

- Caldo Nutritivo (Para el crecimiento de las bacterias)

<i>Reactivo</i>	<i>1000 ml</i>	<i>500 ml</i>	<i>300 ml</i>	<i>200 ml</i>	<i>150 ml</i>	<i>75 ml</i>
Caldo Nutritivo Oxoid # 2	25 g	12.5 g	7.5 g	5 g	3.75 g	1.87 g
Agua destilada	1000 ml	500 ml	300 ml	200 ml	150 ml	75 ml

Disolver con agitador, adicionando lentamente para evitar que se empaste, no requiere calentamiento. Antes de esterilizar, servir de 10 a 25 ml en erlenmeyers.

Nota: Se adiciona además ampicilina para seleccionar el crecimiento de las cepas y evitar posibles contaminaciones.

- Sales Vogel –Bonner 50X (Para preparar el agar)

<i>Reactivo</i>	<i>1 Litro</i>	<i>500 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>25 ml</i>
Agua destilada 45 °C	670 ml	335 ml	67 ml	16.76 ml
Sulfato de magnesio heptahidratado MgSO ₄ .7H ₂ O	10 g	5 g	1 g	0.25 g
Ácido Cítrico monohidratado	100 g	50 g	10 g	2.5 g
Fosfato de potasio bibásico K ₂ HPO ₄	500 g	250 g	50 g	12.5 g
Fosfato de sodio y Amonio NaH ₂ NH ₄ (PO ₄ .4H ₂ O)	175 g	87.5 g	17.5 g	4.37 g

Adicionar lentamente las sales en el orden indicado en agua destilada caliente (45°C) en un erlenmeyer en plancha caliente con agitador magnético, disolver completamente cada sal antes de adicionar la siguiente. Ajustar el volumen a 1 Litro. Distribuir en frascos de 100 ml, esterilizar en autoclave durante 20 min., 121 °C sin ajustar la tapa, cuando la solución se enfríe ajustar la tapa. Guardar en nevera a 4°C o temperatura ambiente.

- Solución de glucosa (40%) (Para preparar el agar mínimo)

<i>Reactivo</i>	<i>500 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>100 ml</i>
Glucosa anhidra	200 g	100 g	40 g
Agua destilada	500 ml	250 ml	100 ml

Disolver la glucosa en agua destilada, embasar y esterilizar en autoclave durante 20 minutos., 121 °C. Dejar enfriar y guardar a 4 °C.

- Solución histidina/biotina 0.5 mM

Nota: Se adicionan 10 ml de histidina/biotina a 100 ml de top agar para ejecutar el ames.

<i>Reactivo</i>	<i>250 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>50 ml</i>	<i>25 ml</i>
D-Biotina FW 247.3	30.9 mg	12.3 mg (0.0123 g)	0.00618 g	3.1 mg
L-Histidina.HCl FW 191.7	24 mg	9.6 mg (0.0096 g)	0.0048 g	2.4 mg
Agua destilada	250 ml	100 ml	50 ml	25 ml

Disolver la biotina calentando el agua a 95 °C. Esto puede hacerse en microondas. Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm o esterilizar en autoclave durante 20 minutos., 121 °C. Almacenar en botellas de vidrio y guardar en nevera a 4 °C.

- Solución Histidina

<i>Reactivo</i>	<i>100 ml</i>	<i>50 ml</i>
L-histidina.HCl FW 191.7	0.5 g	0.25 g
Agua destilada	100 ml	50 ml

Disolver y esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm o esterilizar en autoclave durante 20 minutos., 121 °C. Almacenar en botellas de vidrio y guardar en nevera a 4 °C.

- Solución Biotina 0.5 mM

<i>Reactivo</i>	<i>1 Litro</i>	<i>100 ml</i>	<i>50 ml</i>	<i>10 ml</i>
D-biotina	0.1236 g	0.0122 g	0.0061 g	0.00123 g
Agua destilada	1 litro	100 ml	50 ml	10 ml

Disolver calentando un poco el agua y esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm o en autoclave durante 20 minutos., 121 °C. Almacenar en botellas de vidrio y guardar en nevera a 4 °C.

- Top Agar sin histidina/biotina (Para chequear marcas)

<i>Reactivo</i>	<i>1 Litro</i>	<i>500 ml</i>	<i>100 ml</i>
Agar mínimo o bacteriológico	6 g (0.6%)	3 g	0.6 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g (0.5%)	2.5 g	0.5 g
Agua destilada	1000 ml	500 ml	100 ml

Disolver el agar en baño de vapor, microondas o autoclave por corto tiempo. Adicionar 3 ml en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave durante 20 minutos., 121 °C. Es conveniente prepararlo dos horas antes de hacer el test y ponerlo en un baño María (50 °C) hasta el momento de usarse para evitar que se solidifique.

- Top Agar con histidina/biotina (Para ejecutar Ames)

<i>Reactivo</i>	<i>1 Litro</i>	<i>500 ml</i>	<i>100 ml</i>
Agar mínimo o bacteriológico	6 g (0.6%)	3 g	0.6 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g (0.5%)	2.5 g	0.5 g
Agua destilada	1000 ml	500 ml	100 ml

Disolver el agar en baño de vapor, microondas o autoclave por corto tiempo. Adicionarle 10 ml de histidina/biotina por cada 100 ml de top que se prepare. Adicionar 3 ml en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave durante 20 min., 121 °C. Es conveniente tenerlo listo una hora antes de hacer el test y ponerlo en un baño María (50 °C) hasta el momento de usarse para evitar que se solidifique.

- Solución de Ampicilina (8mg/ml) (Para comprobar resistencia a la ampicilina y para hacer las cajas maestras)

Para confirmar resistencia al antibiótico ampicilina y para hacer cajas maestras de cepas con factor R.

<i>Reactivo</i>	<i>100 ml</i>	<i>10 ml</i>
Ampicilina trihidrato	0.8 g	8 mg
Hidróxido de sodio 0.02 N	100 ml	10 ml

Adicionar poco a poco la ampicilina hasta que se disuelva completamente, filtrarla a través de membrana de 0.22 μm y almacenarla en nevera a 4 °C en botella de vidrio oscuro.

- Solución Stock de NaOH (1N) (Para preparar la NaOH 0.02 N)

<i>Reactivo</i>	<i>10 ml</i>
NaOH	0.4 g
Hidróxido de sodio 0.02 N	10 ml

Disolver y guardar a temperatura ambiente.

- Solución de Trabajo de NaOH (0.02 N)(Para preparar la ampicilina)

<i>Reactivo</i>	<i>10 ml</i>
NaOH 1 N	2 ml
Agua destilada	98 ml

Mezclar, embasar, esterilizar en autoclave y guardar en nevera a 4 °C o a temperatura ambiente.

- Solución de Cristal Violeta

<i>Reactivo</i>	<i>100 ml</i>	<i>10 ml</i>
Cristal Violeta	100 mg	1 mg
Agua destilada	100 ml	10 ml

Disolver el cristal violeta y guardar la solución a 4 °C en frasco oscuro.

- Soluciones de mutágenos empleados como controles positivos

<i>Mutágeno</i>	<i>Tipo</i>	<i>Dosis/Caja</i>	<i>Stock</i>	<i>Solvente</i>	<i>Cepa</i>
2 Amino-fluoreno	Indirecto	10 μg	1 mg/ml	DMSO	TA98, TA100, TA102
Azida de sodio	Directo	5 μg	1 mg/ml	H ₂ O	TA100 y TA102

- 2-Aminofluoreno (2-AF)

Solución Madre

10 mg de 2-AF en 10 ml de DMSO → 1 mg/ml

Solución de Trabajo

100 µl de 2-AF (1mg/ml) + 900 µl de agua destilada estéril → 100 µg/1000 µl

- Azida de Sodio (AzNa)

Solución Madre

2 mg de azida de sodio en 20 ml de DMSO puro → 2 µg/20 µl

Solución de Trabajo

100 µl de azida de sodio (2 µg/20 µl) + 1900 µl de agua destilada estéril →

(100 µg/2000 µl) ó 1 µg/20 µl

2. ELECTROFORESIS ALCALINA DE CÉLULAS INDIVIDUALES (SGCE) ENSAYO COMETA.

Nota: Utilizar guantes para la preparación de las soluciones.

2.1. PBS LIBRE DE CALCIO (Ca²⁺) Y MAGNESIO (Mg²⁺)

<i>Reactivos</i>	<i>1 Litro</i>	<i>500 ml</i>
Agua desionizada		
Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g	4.0 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g	0.1 g
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2 g	0.1 g
Fosfato de Sodio		
Na ₂ HPO ₄	1.22 g ó	0.61 g
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	2.3 g ó	1.15 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	3.07 g	1.53 g

Se disuelven en este orden en agua desionizada, se empaca en alícuotas de 50 ó 100 ml y se almacena en nevera a 4 °C.

2.2. SOLUCIÓN DE LISIS

2.2.1. Solución Stock

<i>Reactivos</i>	<i>1 Litro</i>	<i>500 ml</i>	<i>200 ml</i>
Agua destilada			
Cloruro de sodio (NaCl) (2.5 M)	146.1 g	73.05 g	29.22 g
EDTA (100 mM)	37.2 g	18.6 g	7.44 g
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃) (10 mM)	1.2 g	0.6 g	0.24 g
NaOH (lentejas)	12 g	6 g	2.4 g
Lauryl sarcosinato de sodio	10 g	5 g	2 g

Se disuelven los tres primeros reactivos en la mitad del volumen de agua. Para ayudar a disolver el EDTA, se le agrega el NaOH. Se agita durante 60 minutos. Se ajusta el pH a 10.5.

El Lauryl sarcosinato de sodio se agrega poco a poco, sin parar la agitación., es muy insoluble, por lo tanto si es necesario se puede dejar agitando toda la noche. Se ajusta el pH a 10 y se completa el volumen con agua destilada. Se esteriliza por filtro de membrana de 0.45 µm, se almacena en un frasco oscuro y se guarda en nevera a 4 °C.

2.2.2. Solución de trabajo

Nota: Se prepara al momento de usar.

<i>Reactivos</i>	<i>100 ml</i>	<i>150 ml</i>	<i>200 ml</i>
Solución Stock	89 ml	133.5 ml	178 ml
Dimetil sulfóxido (DMSO)	10 ml	15 ml	20 ml
Tritón X-100	1ml	1.5 ml	2 ml

Esta solución se pone en jarras Coplin y se refrigera por mínimo 1 hora antes de utilizarla. Las jarras se envuelven en papel aluminio.

2.3. BUFFER NEUTRALIZANTE

<i>Reactivos</i>	<i>500 ml</i>	<i>1000 ml</i>
Agua destilada		
Tris hidroximetil aminometano (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	24.25 g	48.5 g

Se disuelve el Tris en agua destilada, se ajusta el pH a 0.75 (con HCl o NaOH). Se recomienda hacer este ajuste adicionando lentamente el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio, se almacena en frasco oscuro y se guarda en nevera a 4 °C.

2.4. BUFFER DE ELECTROFORESIS

2.4.1. Soluciones Stock. NaOH 10 N: 40 g para 100 ml de agua destilada. Esta solución dura sólo dos semanas. EDTA 200 mM: 7.445 g para 100 ml de agua destilada, se guarda en frasco oscuro.

Ambas soluciones se almacenan a temperatura ambiente.

2.4.2. Solución de trabajo.

<i>Reactivos</i>	<i>2000 ml</i>	<i>1700 ml</i>	<i>300 ml</i>
Agua destilada			
NaOH 10 N	60 ml	51 ml	9 ml
EDTA 200 mM	10 ml	8.5 ml	1.5 ml

Se agregan las dos soluciones a las $\frac{3}{4}$ partes del volumen de agua destilada, se agita con agitador magnético, se ajusta el pH a 13 y se completa con agua destilada el volumen requerido.

2.5. COLORANTE

Precaución: El Bromuro de Etidio es altamente cancerígeno. Debe manipularse con cuidado y con guantes.

2.5.1. Solución Stock (0.2 mg/ml). Disolver 10 mg de Bromuro de Etidio en 50 ml de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente en frasco oscuro cubierto con papel aluminio.

2.5.1. Solución de Trabajo (0.02 mg/ml). 1 ml de solución Stock + 9 ml de agua destilada. Se almacena en un recipiente oscuro y hermético.

2.6. AGAROSA DE PUNTO DE FUSIÓN NORMAL (NMA).

Type II.EEO = 0.16 – 0.19. Gel Point = 36 °C \pm 1.5

0.3 g de NMA en 30 ml de PBS

Disolver calentando en microondas por 60 segundos, tapar el beaker con papel aluminio y colocarlo en baño María (45-50 °C)

2.7. AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSIÓN (LMA).

Gelling Temperatura 34.5 a 37 °C

0.05 g de LMA en 10 ml de PBS

Disolver calentando en microondas por 30 segundos.