

Estudio del efecto genotóxico y potencial antigenotóxico de extractos supercríticos (SFE) de especies vegetales de las familias piperaceae, verbenaceae y turneraceae frente a radiación ultravioleta tipo B

Diego Alberto Contreras García

Trabajo de grado para optar el título de Biólogo

Director

Jorge Luis Fuentes Lorenzo

Ph.D en Ciencias Agrícolas

Codirector

Adriana García Forero

Bióloga

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

Bucaramanga

2017

Agradecimientos

Agradezco a mi madre Elvia María García, gracias a su ayuda incondicional, esfuerzo, paciencia y apoyo constante se hizo posible este logro.

Agradezco al Doctor Jorge Luis Fuentes, por concederme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto con el cual aprendí tanto.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental, por su compañía, guía, colaboración y comprensión durante la realización de mi proyecto.

Agradezco a mis amigos quienes siempre estuvieron a mi lado prestándome su apoyo y guía.

Contenido

	Pág.
Introducción	10
1. Competencias desarrolladas en la pasantía de investigación	12
2. Materiales y métodos	13
2.1 Reactivos, sustratos y medio de cultivo	13
2.2 Material Biológico	13
2.3 Principio del ensayo SOS Chromotest.....	14
2.4 Condiciones de cultivo e irradiación.....	15
2.5 Ensayo de genotoxicidad	16
2.6 Ensayo enzimático	16
2.6.1 Ensayo para β -galactosidasa	16
2.6.2 Ensayo para Fosfatasa Alcalina	17
2.6.3 Factor de inducción (FI).....	17
2.7 Ensayo de antigenotoxicidad	18
2.7.1 Porcentaje de inhibición de la Genotoxicidad (%IG)	19
2.8 Análisis estadístico.....	20
3. Resultados y Discusión	20
4. Conclusiones	27
5. Recomendaciones	28

Referencias Bibliográficas	29
----------------------------------	----

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Extractos de plantas usados en el estudio. Se hace referencia a su código, especies y familias a las que pertenecen.	14
Tabla 2 Valores promedio del Factor de Inducción SOS (FI) obtenidos para los extractos de las familias Piperaceae (A), Verbenaceae (B) y Turneraceae(C).....	21

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) frente a la UVB de los extractos de la familia Piperaceae en el rango de concentración estudiado. La línea de puntos discontinuos significa que todos los valores de %IG fueron significativamente diferente ($P < 0.05$ en el test de Dunnet) respecto al valor del control irradiado (% IG=0).....	23
<i>Figura 2.</i> Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) frente a la UVB de los extractos de la Verbenaceae en el rango de concentración estudiado. La línea de puntos discontinuos significa	

que todos los valores de %IG fueron significativamente diferente ($P < 0.05$ en el test de Dunnet) respecto al valor en el control irradiado (%IG=0) 25

Figura 3. Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) frente a la UVB de los extractos de la familia Turneraceae en el rango de concentración estudiado. La línea de puntos discontinuos significa que todos los valores de %IG fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$ en el test de Dunnet) respecto al valor en el control irradiado (%IG=0). 26

Resumen

Título: Estudio del efecto genotóxico y potencial antigenotóxico de extractos supercríticos (SFE) de especies vegetales de las familias piperaceae, verbenaceae y turneraceae frente a radiación ultravioleta tipo B*

Autor: Diego Alberto Contreras García**

Palabras claves: Antigenotoxicidad, Extracción de fluidos (CO₂) supercríticos, Fotoprotección, UVB, SOS Chromotest, Piperaceae, Turneraceae, Verbenaceae

Descripción:

El cáncer de piel se ha convertido en un problema de salud pública de gran preocupación con el paso de los años, debido a que cada vez podríamos estar más expuestos a la radiación UV por la posible alteración de la capa de ozono, destacándose la radiación UV tipo B (UVB) por poseer la mayor energía del espectro ultravioleta que llega a la tierra. El uso de protectores solares a base de extractos de plantas tradicionalmente medicinales se ha posicionado como la mejor estrategia de fotoprotección, debido a que poseen propiedades que las hacen importantes candidatas como fotoprotectoras y quimioprotectoras, así como múltiples mecanismos de acción que los protectores químicos no poseen. En este trabajo se evaluó el efecto genotóxico y potencial antigenotóxico de doce extractos de plantas; cinco pertenecientes a la familia Piperaceae, cinco de la familia Verbenaceae y dos de la familia Turneraceae; mediante el uso de co-tratamientos por dilución de estos extractos y por medio del ensayo SOS Chromotest con la enterobacteria *E. coli* de la cepa PQ37, frente al daño causado al ADN por exposición a UVB. Ninguna de las especies de plantas evaluadas presentó efecto genotóxico para este modelo de estudio. Y cuatro de los extractos correspondientes a las familias Piperaceae y Turneraceae fueron los que obtuvieron mejor resultado en el ensayo de antigenotoxicidad, destacándose de entre estos el extracto correspondiente a la fracción uno de *Turnera diffusa* que obtuvo resultados para este ensayo desde una concentración menor a los demás.

* Trabajo de grado

** Facultad de ciencias, Escuela de Biología. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo, Microbiólogo Ph. D.

Abstract

Title: Study of the genotoxic effect and antigenotoxic potential of supercritical extracts (SFE) from vegetal species of the families piperaceae, verbenaceae and turneraceae against ultraviolet b radiation *

Author: Diego Alberto Contreras García **

Key words: Antigenotoxicity, Supercritic(CO₂) fluids extraction, Photoprotection, UVB, SOS Chromotest, Piperaceae, Turneraceae, Verbenaceae.

Description:

Skin cancer has become a public health problem of great concern over the years, because we could be increasingly exposed to UV radiation due to the possible alteration of the ozone layer, highlighting the type B UV radiation (UVB) by having the highest energy of the ultraviolet spectrum that reaches the earth. The use of sunscreens based on extracts of traditionally medicinal plants has been positioned as the best photoprotection strategy, due to properties that make them important candidates as photoprotective and chemoprotective, as well as multiple action mechanisms that chemical protectors do not possess. In this work, the genotoxic effect and antigenotoxic potential of twelve plant extracts were evaluated; five of these extracts belong to the Piperaceae family, five from the Verbenaceae family and two from the Turneraceae family; through the use of co-treatments by dilution of these extracts and by means of the SOS Chromotest assay with the enterobacteria *E. coli* corresponding to PQ37 strain, against the damage caused to the DNA by exposure to UVB. None of the evaluated plant species presented a genotoxic effect for this study model. And four of the extracts corresponding to the families Piperaceae and Turneraceae were the ones that obtained a better result in the test of antigenotoxicity, standing out among these the extract of *Turnera diffusa* fraction one, which showed results for this assay from a lower concentration.

* Degree Project

** Science Faculty, Biology School. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo, Microbiologist, Ph. D.

Introducción

La sobreexposición a la radiación ultravioleta (R-UV) tiene efectos negativos en la piel, presentando un alto factor de riesgo al actuar como iniciador del proceso cancerígeno (Zaidi *et al.*, 2008; Rivas *et al.*, 2015) siendo de las principales preocupaciones de salud pública. (Purdue *et al.* 2008; Linos *et al.* 2009). La radiación ultravioleta del tipo B (UVB) posee la mayor energía del espectro ultravioleta que llega a la tierra. La alteración de la capa de ozono atmosférico; podría incrementar los niveles de exposición a la UVB (Soriano-Melgar *et al.*, 2014). La R-UV induce daño en el ADN, principalmente a causa de fotoproductos como el ciclobutano de pirimidina (CPD) y la (6-4) pirimidina pirimidona (6-4PP), causando mutaciones (Ikehata & Ono, 2011) que conllevan a respuestas inflamatorias, inmunosupresión y cáncer de piel (Vink & Roza 2001; Ichihashi *et al.*, 2003; Zaidi *et al.*, 2008).

En el reporte anual de cáncer presentado por la Sociedad Americana del Cáncer; el cual analizó datos desde 1975-2012, se observa que el cáncer de piel se encuentra entre los tipos de cáncer cuya incidencia sigue en aumento (Ryerson *et al.*, 2016). Debido a la necesidad de disminuir los efectos negativos provocados por la sobreexposición a la radiación solar, se han desarrollado estrategias de prevención por medio del uso de agentes químicos naturales y sintéticos para revertir o suprimir la carcinogénesis y prevenir el desarrollo de cánceres invasivos, sin embargo, los filtros solares químicos, absorben los rayos ultravioleta (Rai *et al.*, 2012), en muchos casos generando productos de foto-degradación los cuales reaccionan e interactúan con moléculas cutáneas, manifestándose como irritación de la piel o fotodermatitis y reacciones alérgicas, generando consecuencias

toxicológicas a largo plazo (Nash & Tanner; 2014). Científicos en todo el mundo, se han concentrado en el uso de productos naturales por su mayor tolerabilidad e insignificante impacto ambiental (Nichols & Katiyar, 2010) siendo las plantas medicinales de gran importancia por generar por vías metabólicas, compuestos fitoquímicos protectores según su exposición a la radiación UV (Zhang & Björn, 2009; Kumari & Prasad, 2013), y poseer buenas propiedades anti-oxidantes, anti-inflamatorias, anti-fungicas, anti-virales, entre otras; considerándolas potenciales candidatas para actuar como quimioprotectoras y fotoprotectoras (Afaq & Katiyar, 2011; Agrawal, *et al.*, 2016,).

Algunas especies pertenecientes a la familia Piperaceae, especialmente las de género *Piper*, son utilizadas en la medicina popular para tratar múltiples enfermedades por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, cicatrizantes, estimulante, entre otras. (Duke, 2008). Así mismo, estudios recientes reportan que estas tienen alta actividad antioxidante y anti-fúngica (Mosquera, 2016). Las especies de la familia Verbenaceae, se han investigado por sus propiedades antiinflamatorias y digestivas (Delaporte *et al.*, 2002). Por su parte, la familia Turneraceae, especialmente la especie *Turnera diffusa*, ha sido utilizada por mucho tiempo en la medicina tradicional por sus propiedades afrodisiacas y tranquilizantes (Estrada-Reyes *et al.*, 2013) además de poseer propiedades antienvjecimiento (Duke, 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de esta pasantía de investigación, fue evaluar las potenciales propiedades antigenotóxicas frente a radiación UVB, de 12 extractos obtenidos por SFE, 5 de especies de Piperaceae, 5 de especies de la familia Verbenaceae y 2 de una especie de Turneraceae, usando el ensayo SOS Chromotest.

1. Competencias desarrolladas en la pasantía de investigación

1. Desarrolló habilidades y destrezas en la ejecución de ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad utilizando el SOS Chromotest.
2. Evaluó extractos de plantas para determinar su actividad genotóxica y antigenotóxica frente a la radiación ultravioleta.
3. Adquirió habilidades en el desempeño de la práctica experimental, manejo de equipos, preparación de los medios de cultivos y soluciones necesarias para el desempeño de cada práctica.
4. Fortaleció las habilidades de escritura con fines de difusión de resultados científicos.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos, sustratos y medio de cultivo

El medio Luria-Bertani (LB) y los sustratos para las enzimas β -galactosidasa (2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, ONPG) y fosfatasa alcalina (4-nitrofenilfosfato, PNPP), fueron adquiridos de la casa comercial Amresco (Solon, Ohio, USA). El mutágeno 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) de la casa comercial Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA); los demás reactivos fueron obtenidos de las casas comerciales J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) o Merck (Kenilworth, NJ, USA).

2.2 Material Biológico

Los doce extractos obtenidos por SFE en el estudio, fueron obtenidos a partir de diferentes familias de plantas como sigue: cinco (5) de especies de la familia Piperaceae, cinco (5) de especies de la familia Verbenaceae y dos (2) de una especie de la familia Turneraceae. Los códigos, especies y familia a la que corresponden se encuentran especificados en la Tabla 1. Todos los extractos fueron suministrados por el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL) y obtenidos en el marco del proyecto Bio-Red-CO-CENIVAM No. RC-0572-2012 Estos extractos fueron obtenidos de las hojas y flores frescas por medio de la técnica de extracción de fluidos supercríticos (CO₂) (Stashenko, *et al.* 2013). Las extracciones fueron realizada a presión de 500 bar pero en el caso de

las fracciones F1 y F2 se realizaron a 40 y 80 bar respectivamente. Cada extracto se diluyó en metanol a razón de 30mg/ml como concentración stock y se conservó a 8°C en tubos Eppendorf siempre protegidos de la luz.

Tabla

1.

Extractos de plantas usados en el estudio. Se hace referencia a su código, especies y familias a las que pertenecen.

Familia	Código	Especie
Piperaceae	BIO-PParS01E-F2	<i>Piper eriopodon</i>
Piperaceae	BIO-PPsaS05E	<i>Piper eriopodon</i>
Piperaceae	BIO-PPsaS11E	<i>Piper dilatifolium</i>
Piperaceae	BIO-PPsaS13E	<i>Piper subflavum</i> v. <i>espejuelanum</i>
Piperaceae	BIO-PPvcV09E-F2	<i>Piper subflavum</i>
Turneraceae	BIO-TUsaV06E-F1	<i>Turnera diffusa</i>
Turneraceae	BIO-TUsaV06E-F2	<i>Turnera diffusa</i>
Verbenaceae	BIO-VEsaS23E	<i>Lippia micromera</i>
Verbenaceae	BIO-VEsaS25E	<i>Lippia americana</i>
Verbenaceae	BIO-VEsaS27E	<i>Lippia canescens</i>
Verbenaceae	BIO-VEarS02E-F1	<i>Lippia organoides</i>
Verbenaceae	BIO-VEarS02E-F2	<i>Lippia organoides</i>

2.3 Principio del ensayo SOS Chromotest

El ensayo SOS chromotest es un ensayo colorimétrico basado en la respuesta de emergencia celular bacteriana SOS, la cual se activa ante agentes que producen daño en el ADN (genotóxicos), tales como el mutágeno (4NQO) o la exposición a UV, bloqueando la replicación y la división celular, lo cual produce la acumulación de daño en la cadena de ADN sencilla (Quillardet et al., 1982). La cepa PQ37 del genotipo (*F⁻, thr, leu, his-4, pyrD, thi, galE, galK o galT, lac ΔU169, srl300::Tn10, rpoB, rpsL, rfa, trp::Muc⁺ sfiA::Mud(Ap, lac)cts*) contiene una fusión transcripcional (*sulA::LacZ*) en el que el gen estructural de la enzima β-galactosidasa se expresa bajo el control del promotor

del gen *sulA* regulado por la respuesta SOS. En consecuencia, la actividad específica de la β -galactosidasa es un indicador de la respuesta SOS e indirectamente del daño inducido en el ADN. Además, esta cepa cuenta con un par de mutaciones adicionales: 1) una en el gen *uvrA* que la hace deficiente a la reparación por escisión de nucleótidos, aumentando su sensibilidad a múltiples mutágenos y, 2) una mutación *rfa* la cual hace que la célula sea deficiente de lipopolisacáridos de membrana, aumentando así la permeabilidad de diferentes compuestos a través de su membrana celular (Quillardet & Hofnung, 1985).

2.4 Condiciones de cultivo e irradiación

La cepa *E. coli* PQ37m del genotipo (F^+ , *thr*, *leu*, *his-4*, *pyrD*, *thi*, *galE*, *galK* o *galT*, *lac* Δ U169, *srl300::Tn10*, *rpoB*, *rpsL*, *rfa*, *trp::Muc+* *sfiA::Mud(Ap, lac)cts*) se cultivó durante toda la noche en 20ml de medio Luria- Bertani suplementado con ampicilina (100 μ g/mL) y tetraciclina (34 μ g/mL), a una temperatura de 37 °C con agitación permanente (170 rpm). Al día siguiente y al cabo de 16 horas, el cultivo se diluyó en medio fresco y se dejó crecer bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente hasta que alcanzó una $DO_{600nm} = 0.4$.

Se agregó 1 ml de la mezcla de cultivo con cada cotratamiento, en cajas Petri de 5cm de diámetro, las cuales fueron irradiadas en oscuridad usando una cabina de irradiación UVA/UVB BS-02, la cual está equipada con un controlador de irradiación UV-MAT (Opsytec Dr. Groebel, Ettlingen, Baden-Würtemberg, Alemania). Este controlador regula el tiempo de irradiación asegurando una dosis absorbida precisa en una región espectral de UVB. La dosis de irradiación utilizada para el ensayo de antigenotoxicidad fue 0.001 J/m².

2.5 Ensayo de genotoxicidad

Se diluyó 1ml de cultivo en fase exponencial ($DO_{600nm}=0,4$) en 9ml de medio fresco y se dispuso a razón de 150 μ l en cada uno de los tubos tipo Eppendorf que contenían 5 μ l de solución con las diferentes concentraciones del extracto a evaluar; 5 μ l del mutageno 4-Nitroquinolina 1-oxido (4NQO) preparado a 2.34 μ M/ml (control positivo) o 5 μ l de agua destilada esteril (control negativo). Los tratamientos fueron incubados durante 30 minutos a 8°C para la incorporación del compuesto a la célula y luego durante 2 horas a 37 °C y 300rpm en el Thermomixer Comfort (Eppendorf, Alemania) para la recuperación celular e inducción del gen reportero. Por último, se realizó el ensayo enzimático. En todos los casos, se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno.

2.6 Ensayo enzimático

El ensayo enzimático se realizó en una microplaca de 96 pozos (Brand GMBH, Alemania), verificando la inducción de las enzimas β -galactosidasa (β -gal) y fosfatasa alcalina (FA). Este procedimiento, así como, el cálculo del Factor de Inducción (FI) fueron desarrollados según Quintero et al. (2012).

2.6.1 Ensayo para β -galactosidasa Para realizar este ensayo, se dispuso de las filas A, B, C y D de la microplaca Brand, en cada pozo se dispensaron 135 μ l de buffer Z (3.22g Na_2HPO_4 ; 1.1g $NaH_2PO_4 \times H_2O$; 0,15g KCl; 0.05g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.2g SDS; 0.54ml β -mercaptoetanol; pH 7.0), a los cuales posteriormente se les añadió 15 μ l del contenido celular de los tubos Eppendorf que

estuvieron en incubación. Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para que ocurriera la lisis celular. Para iniciar la reacción se añadieron 30µl de la solución stock del sustrato β-galactosidasa ONPG (orto-nitrofenil-β-D-galactosidasa) a todos los tratamientos y controles; en el caso específico de la columna correspondiente al blanco se reemplazó el ONPG por el mismo volumen de agua destilada. Al cabo de 40 minutos de incubación a temperatura ambiente, se detuvo la reacción enzimática añadiendo 100µl de Na₂CO₃ (1M) para finalizar el ensayo y se realizó la correspondiente lectura de la microplaca en el espectrofotómetro de UV/visible Thermo Scientific Multiskan GO a DO_{420nm} .

2.6.2 Ensayo para Fosfatasa Alcalina Para realizar este ensayo, se dispuso de las filas E, F, G y H de la microplaca Brand, en cada pozo se dispensaron 135 µl de buffer T (Tris + SDS pH8,8), a los cuales se les añadió 15 µl del cultivo celular. Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para que ocurriera la lisis celular. Transcurrido este tiempo, y para iniciar la reacción se añadieron 30µl de la solución de fosfatasa alcalina PNPP (4-nitrofenil fosfato) a todos los tratamientos y controles; al igual que el ensayo anterior, en la columna correspondiente al blanco se reemplazó el PNPP por el mismo volumen de agua destilada. Al cabo de 40 minutos de incubación a temperatura ambiente, se detuvo la reacción enzimática añadiendo 50µl de HCl (2.5M) y al cabo de 5 minutos se agregó 50 µl de Tris para restaurar el color y finalizar el ensayo; se realizó la correspondiente lectura de la microplaca en el espectrofotómetro de UV/visible Thermo Scientific Multiskan GO a DO_{420nm} .

2.6.3 Factor de inducción (FI) El criterio de genotoxicidad que se utilizó fue el factor de inducción SOS (FI), el cual representa los datos de inducción del gen *sulA*, normalizados en cada

tratamiento y es considerado indirectamente, como una medida del daño genotóxico primario inducido por el tratamiento. Se realizó el cálculo de FI de acuerdo con Quillardet & Hofnung (1985), a partir de las unidades enzimáticas de la actividad β -gal y FA por medio de la ecuación 1.

Ecuación 1

$$\text{Unidades enzimáticas} = \frac{1000 * A_{420}}{t}$$

A_{420} = la densidad óptica a 420nm de la mezcla de incubación.

t = minutos de incubación en presencia de sustrato

Seguidamente, se calculó la relación (R) de las unidades enzimáticas de β -gal y FA, las cuales reflejan la inducción del gen *sulA*, incluso si se produce alguna inhibición de la síntesis de proteínas. Para calcular R se utilizó la ecuación 2.

Ecuación 2

$$R = \frac{\beta\text{-gal}}{FA}$$

El cálculo del factor de inducción se realizó con ayuda de la ecuación 3.

Ecuación 3

$$I = \frac{R_t}{R_{nt}}$$

R_t = células tratadas

R_{nt} = células no tratadas

Los extractos se clasificaron para este ensayo como, “no genotóxico” si su valor de FI para cada tratamiento es $<1,5$; “no concluyente” si se encuentra entre el rango de 1,5-2,0 y “genotóxico” si presenta un valor de FI $<2,0$ y existe una relación positiva entre la dosis y el FI.

2.7 Ensayo de antigenotoxicidad

Los extractos obtenidos por SFE fueron ensayados para determinar su potencial antigenotóxico frente a R-UVB, usando diseños experimentales de co-incubación según lo descrito por Fuentes et al. (2006). El procedimiento se desarrolló siguiendo un protocolo similar al de genotoxicidad, con

la diferencia que las bacterias fueron expuestas a diferentes concentraciones de los extractos y co-tratamientos con UVB. Para esto se mezclaron 4.5 mL del cultivo fresco con $DO_{600nm}=0.4$ y 18 mL de medio LB 2X, se agregaron 600µl de cultivo celular en tubos Eppendorf en los que se diluyó en proporción 1:1 v/v con cada concentración del extracto y un tubo para el control positivo que contenía 600µl de agua destilada. Se procedió a extraer 1 mL de cada tubo el cual fue depositado en cajas Petri, las cuales fueron irradiadas a una dosis de 0.001 J/m^2 en una cabina de irradiación UV BS-02 (Opsystec Dr Gröbel, Alemania). Seguidamente se recuperaron 200 µL de cada caja Petri en nuevos tubos Eppendorf, y se prepararon dos tubos extra que contenían 100 µl de agua destilada y 100 µl de cultivo celular, completando así el Blanco y el control negativo. A continuación, fueron puestos por 30 min a 8°C para la penetración del compuesto y posteriormente se incubaron a 37°C por dos horas a 300 rpm en el Thermomixer Comfort (Eppendorf, Alemania); nuevamente para la recuperación celular e inducción del gen reportero. Por último, se realizó el ensayo enzimático, al igual que en el ensayo de genotoxicidad. En todos los casos, se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno.

2.7.1 Porcentaje de inhibición de la Genotoxicidad (%IG) El criterio de antigenotoxicidad empleado fue el Porcentaje de Inhibición de la Genotoxicidad (%IG), cuyo cálculo se realizó según Quintero et al. (2012). Este se entiende como una reducción significativa del Factor de Inducción (FI) y representa la capacidad que tiene el extracto para proteger del daño genético que puede provocar la R UV-B. El %IG se calculó para cada uno de los tratamientos con la ecuación 4.

Ecuación 4

$$\%IG = \frac{Ico - Ibasal}{Iuv - Ibasal}$$

Ico: factor de inducción SOS de los cotratamientos (células+extracto+RUVB)

Ibasal: FI SOS del control negativo

Iuv: FI SOS del control positivo

2.8 Análisis estadístico

Se calcularon valores promedios de las unidades enzimáticas (β G, FA), además de los promedios de FI y %GI y sus correspondientes errores estándar para tratamiento. Se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov para probar la normalidad de los datos y una prueba de Levene para probar la homogeneidad de varianza. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas aplicando una prueba posteriori de Dunnet. Para todos los análisis estadísticos, se consideró una $p < 0,05$. La totalidad de los análisis fueron llevados a cabo en el programa R (R Core Team 2013).

3. Resultados y Discusión

En la Tabla 2, se muestran los resultados de los ensayos de genotoxicidad de los diferentes extractos en el SOS Chromotest. Todos los extractos mostraron valores promedio de FI < 2 y no existió correlación entre la dosis y el FI; así, ningún extracto resultó genotóxico en el modelo de estudio.

Tabla

2

Valores promedio del Factor de Inducción SOS (FI) obtenidos para los extractos de las familias Piperaceae (A), Verbenaceae (B) y Turneraceae(C)

A. PIPERACEAE

[µg/ml]	BIO-PParS01EF2	BIO-PPsaS05E	BIO-PPsaS11E	BIO-PPsaS13E	BIO-PPvcV09EF2
C-	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
C+	4,9 ± 1,3	4,5 ± 0,8	4,2 ± 0,6	5,1 ± 0,6	3,9 ± 1,0
938	0,9 ± 0,5	0,5 ± 0,1 ***	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,2 *	0,9 ± 0,4
469	0,7 ± 0,3 .	0,5 ± 0,1 ***	0,7 ± 0,1 **	0,8 ± 0,2 .	0,7 ± 0,1 **
234	0,7 ± 0,3 *	0,9 ± 0,2 *	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2 .	0,7 ± 0,2 **
117	0,6 ± 0,2 **	0,8 ± 0,1 .	0,7 ± 0,2 **	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,2
59	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,2 ***
29	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2
15	0,8 ± 0,4	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,4	0,8 ± 0,2
7	0,7 ± 0,2 .	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2
4	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,3

B. VERBENACEAE

[µg/ml]	BIO-VEsa23E	BIO-VEsa25E	BIO-VEsa27E	BIO-VEarS02E F1	BIO-VEarS02E F2
C-	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
C+	5,1 ± 1,0	5,0 ± 1,8	3,0 ± 1,1	5,5 ± 2,3	7,2 ± 1,6
938	0,7 ± 0,2 ***	0,8 ± 0,2 *	0,7 ± 0,1 **	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1
469	0,6 ± 0,1 ***	0,6 ± 0,2 ***	0,8 ± 0,1 .	1,2 ± 0,3 .	0,8 ± 0,1
234	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1 **	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
117	0,8 ± 0,2 *	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,2 **
59	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1 **	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,2
29	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2
15	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,6
7	0,7 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2
4	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,3

C. TURNERACEAE

[µg/ml]	BIO-TUsaV06EF1	BIO-TUsaV06EF2
C-	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
C+	4,0 ± 0,6	4,8 ± 3,6
938	0,7 ± 0,3 .	0,7 ± 0,1 ***
469	0,6 ± 0,2 **	0,7 ± 0,2 ***
234	0,7 ± 0,2 .	0,7 ± 0,1 ***
117	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1 .
59	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2 **
29	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2
15	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2
7	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,1
4	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,1

Dado que ninguno de los extractos evaluados resultó genotóxico en el modelo de estudio, se procedió a evaluar su potencial antigenotóxico frente a la UVB.

En la Grafica 1 se presentan los resultados de antigenotoxicidad frente a UVB de los extractos pertenecientes a la familia Piperaceae, expresados como %IG. Tres extractos pertenecientes a las especies *Piper eriopodon* (BIO-PPsaS05E y BIO-PParS01EF2), y *Piper dilatifolium* (BIO-PPsaS11E) mostraron los mejores resultados con valores de %IG significativos ($P < 0.05$ en el test de Dunnet) a partir de la concentración 117,19 µg/mL.

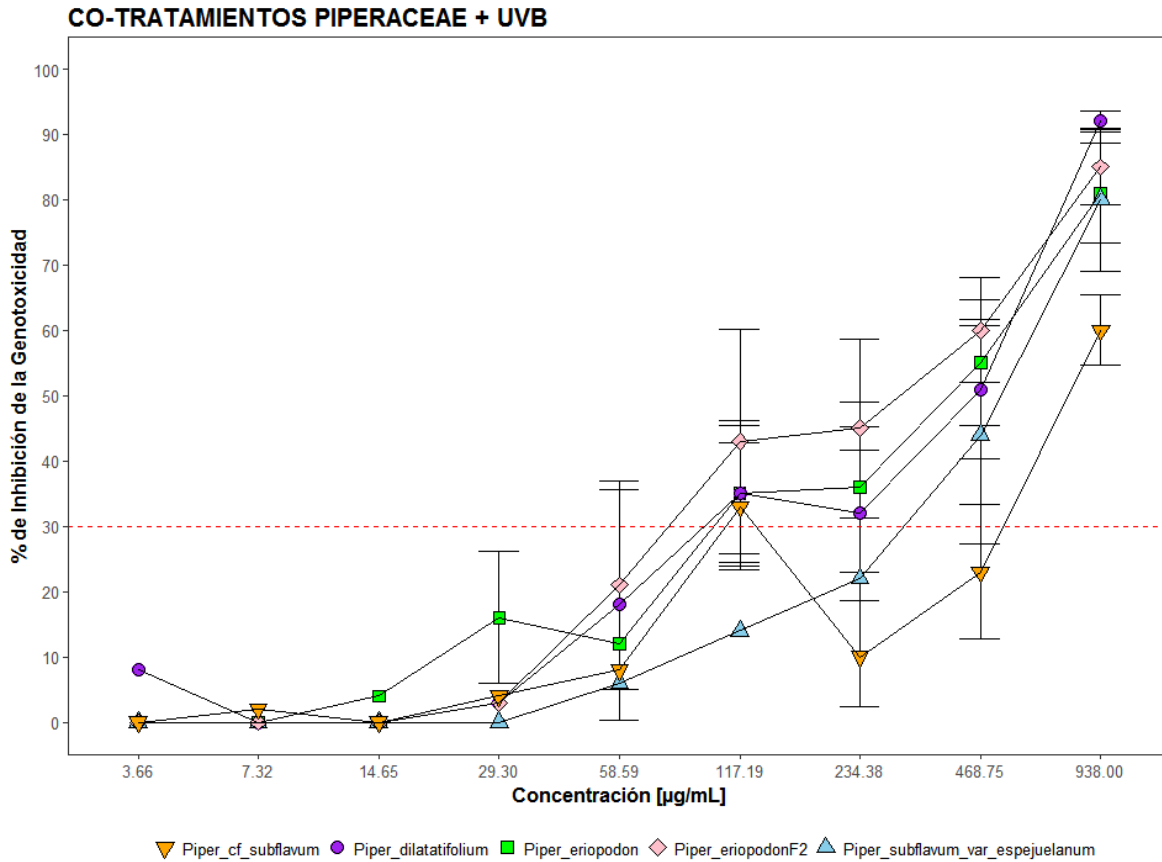


Figura 1. Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) frente a la UVB de los extractos de la familia Piperaceae en el rango de concentración estudiado. La línea de puntos discontinuos significa que todos los valores de %IG fueron significativamente diferente ($P < 0.05$ en el test de Dunnet) respecto al valor del control irradiado (% IG=0)

La familia Piperaceae, especialmente las de género *Piper*, han sido objeto de varias investigaciones, mayormente como insecticidas (Scott. et al., 2005; Celis. et al., 2008; Marques y Kaplan, 2015), fungicidas (Mosquera, 2016) e incluso algunas especies han sido estudiadas como potenciales bactericidas (Nascimento et al., 2015). Existen reportes de fotoprotección en algunas especies como es el caso de *Piper nigrum* (Choochana et al., 2015) y *Piper longum* (Kulkarni et al., 2014). Sin embargo, no se encontraron estudios en relación a las especies aquí trabajadas. Algo que queda claro es que en la especie *P. eriopodon* se obtuvo buena actividad antigenotóxica incluso para la Fracción 2 (BIO-PParS01E-F2), lo que indica que a pesar de realizar el procedimiento a 80

bar de presión ya se logró obtener aquellos compuestos fotoprotectores que permitieron tener buenos resultados al extracto de la misma especie (BIO-PPsa05E) el cual fue extraído a 500 bar de presión. Los únicos dos extractos de esta familia que no mostraron resultados antigenotóxico fueron los pertenecientes a la especie *P. subflavum* (BIO-PPsaS13E y BIO-PPvcV09E-F2).

En la Gráfica 2 se presentan los resultados de antigenotoxicidad frente a UVB de los extractos pertenecientes a la familia Verbenaceae. Como se puede observar ninguno de los extractos estudiados mostró un efecto antigenotóxico relevante para el rango de concentraciones estudiado. Los extractos de las especies *Lippia micromera* (BIO-VEsaS23E) y *Lippia origanoides* (BIO-VEarS02E-F2) mostraron valores de %IG significativos a partir de la concentración 468.75 µg/mL; mientras que los extractos de *Lippia americana* (BIO-VEsaS25E) y *Lippia origanoides1* (BIO-VEarS02E-F1) mostraron %IG significativos a partir de la concentración 938.00 µg/mL. El extracto de la especie *Lippia canescens* (BIO-VEsaS27E), no mostró ningún efecto.

En el caso de *L. origanoides* se logró observar que para la primera fracción (F1), obtenida a 40 bar de presión, no se obtuvo resultados más allá de la primera concentración del extracto. Sin embargo, para la fracción dos (F2), obtenida a 80 bar, el %IG llegó a tener valores significativos hasta la segunda concentración, esto podría indicar que los compuestos fotoprotectores en esta especie, requieren de mayor presión para ser extraídos.

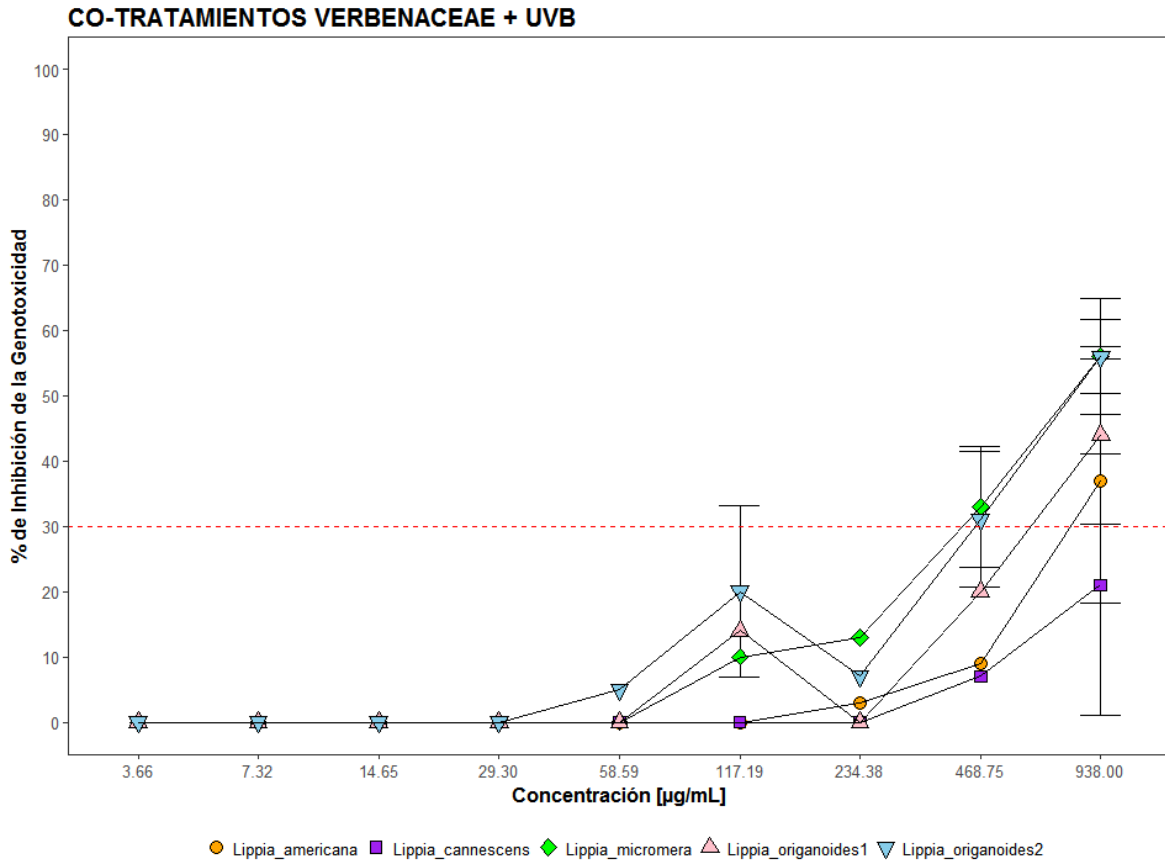


Figura 2. Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) frente a la UVB de los extractos de la Verbenaceae en el rango de concentración estudiado. La línea de puntos discontinuos significa que todos los valores de %IG fueron significativamente diferente ($P < 0.05$ en el test de Dunnet) respecto al valor en el control irradiado (%IG=0)

En la Gráfica 3 se presentan los resultados de antigenotoxicidad frente a UVB de los extractos pertenecientes a la familia Turneraceae. En este caso se evaluaron solo dos fracciones del extracto de la especie *Turnera diffusa*. El extracto *T. diffusa 1* (BIO-TU_{sa}V06EF1) mostró valores de %IG significativos a partir de la concentración 58.59 µg/mL; mientras que el extracto *T. diffusa 2* (BIO-TU_{sa}V06E-F2) mostró %IG significativos a partir de la concentración 468.75 µg/mL

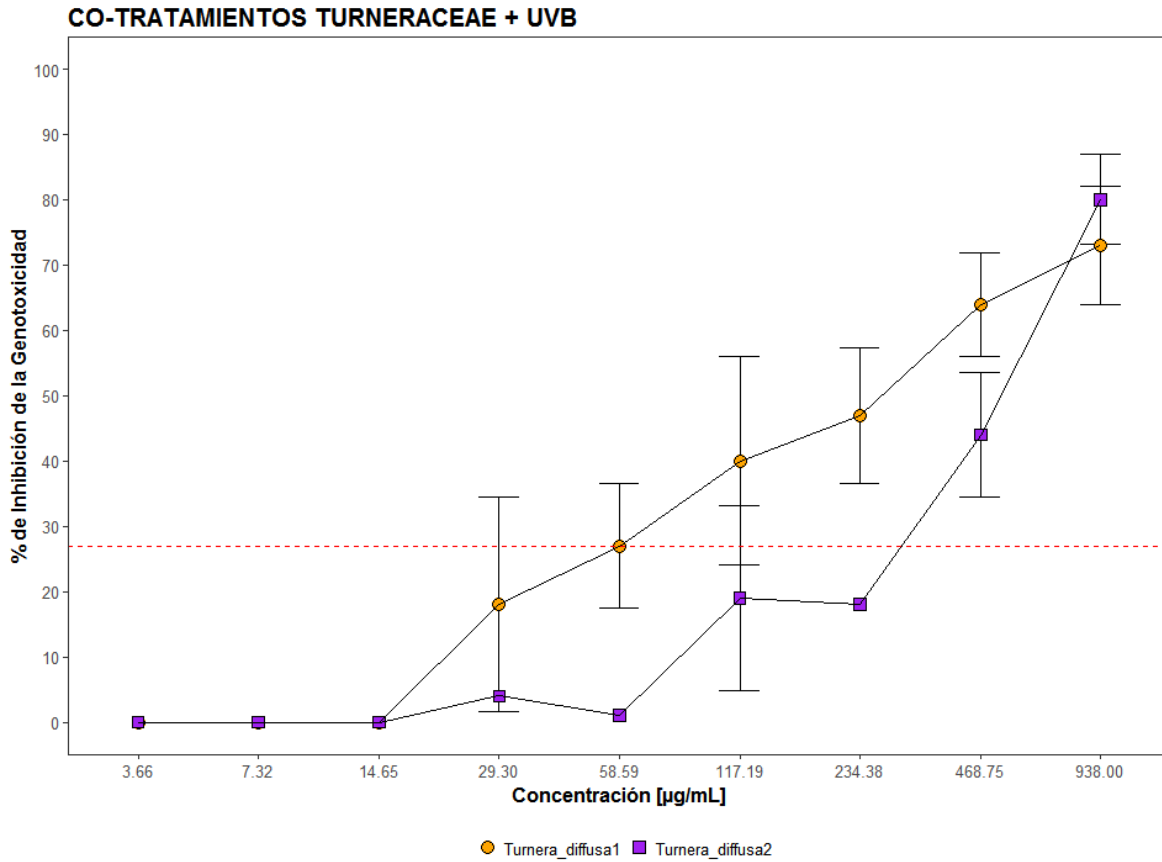


Figura 3. Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) frente a la UVB de los extractos de la familia Turneraceae en el rango de concentración estudiado. La línea de puntos discontinuos significa que todos los valores de %IG fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$ en el test de Dunnet) respecto al valor en el control irradiado (%IG=0).

En el caso de *Turnera diffusa* como se evidenció tuvo mejor resultado en el ensayo de antigenotoxicidad para su Fracción 1 (BIO-TU_{sa}V06E-F1) y menor actividad en su Fracción 2 (BIO-TU_{sa}V06E-F2), esto podría deberse a que, en el caso de esta planta, a presión de 40 bar se logró obtener la mayor parte de los compuestos fotoprotectores y para la fracción dos solo quedaron algunos residuos de lo obtenido anteriormente.

Cuando *E. coli* es expuesta a UV-B se da la generación de fotoproductos como CDP y 6-4PP, los cuales provocan alteraciones en el ADN (Rosenberg & Echols, 1990). Estos fotoproductos suelen actuar como obstáculos para la replicación del cromosoma. La detección del efecto de

genoprotección evidenciado en los extractos estudiados, podría estar actuando de diferentes maneras, que han sido descritas anteriormente por otros autores en diversos estudios para múltiples modelos. La inhibición de la formación de los fotoproductos anteriormente mencionados, la reparación del daño en el ADN y eventos de restauración de la división celular. Sin embargo, ya que la cepa *E. coli* PQ37 posee la mutación *uvrA* que la hace deficiente para la reparación por escisión de nucleótidos y la inducción del gen *sulA* se mantiene aún 240 minutos después de ocurrida la irradiación (Prada-Medina *et al.*, 2016); se puede considerar que, la evidencia de antigenotoxicidad en los extractos de *Piper eriopodon* (BIO-PParS01E-F2 y BIO-PPsaS05E), *Piper dilatifolium* (BIO-PPsaS11E) y *Turnera diffusa* (BIO-TUsaV06E-F1) aquí trabajados se da como consecuencia de la reducción en la formación de CPD y 6-4PP mediante la absorción de fotones provenientes de la luz UV (Stevanato *et al.* 2014).

4. Conclusiones

- 1) Ninguno de los extractos resultó genotóxico para el modelo de estudio.
- 2) Los extractos de las especies *Piper eriopodon*, *Piper dilatifolium* y la Fracción 1 de *Turnera diffusa* resultaron promisorios como fuente de compuestos antigenotóxicos frente a R-UVB para este estudio.
- 3) La fracción 1 de *Turnera diffusa* obtuvo el mejor resultado en la prueba de antigenotoxicidad ante R-UVB para este estudio llegando obtener valores de %IG significativos a partir de la concentración 58. 59µg/mL.

5. Recomendaciones

Será necesario realizar estudios posteriores que lleven a identificar cuáles son los compuestos activos presentes en estos extractos con efectos antigenotóxicos promisorios.

Ninguno de los extractos evaluados en este trabajo resultó genotóxico en el ensayo utilizado. Sin embargo, se recomienda el uso de diferentes pruebas y otros modelos biológicos, además del uso de células de mamíferos, para confirmar su posible uso en humanos.

Referencias Bibliográficas

- Afaq, F., & K Katiyar, S. (2011). Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(14), 1200-1215.
- Agrawal, R. C., Prachi, P., & Agrawal, N. (2016). Chemopreventive effects of andrographis paniculata extract in vivo and in vitro models. *Med One*, 1(4), 2.
- Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. *Una revisión. Agronomía Colombiana*, 26(1).
- Choochana, P., Mounjaroen, J., Jongkon, N., Gritsanapan, W., & Tangyuenyongwatana, P. (2015). Development of piperic acid derivatives from Piper nigrum as UV protection agents. *Pharmaceutical biology*, 53(4), 477-482.
- Delaporte, R. H., Sánchez, G. M., Cuellar, A. C., Giuliani, A., & de Mello, J. C. P. (2002). Anti-inflammatory activity and lipid peroxidation inhibition of iridoid lamiide isolated from Bouchea fluminensis (Vell.) Mold. (Verbenaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 82(2), 127-130.
- Dromgoole, S. H., & Maibach, H. I. (1990). Sunscreening agent intolerance: contact and photocontact sensitization and contact urticaria. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 22(6), 1068-1078.
- Duke, J. A. (2008). Handbook of medicinal herbs. CRC Press
- Estrada-Reyes, R., Carro-Juárez, M., & Martínez-Mota, L. (2013). Pro-sexual effects of Turnera diffusa Wild (Turneraceae) in male rats involves the nitric oxide pathway. *Journal of ethnopharmacology*, 146(1), 164-172.

- Fuentes, J., Alonso, A., Cuétara, E., Vernhe, M., Alvarez, N., Sánchez-Lamar, A., Llagostera, M. (2006). Usefulness of the SOS Chromotest in the study of medicinal plants as radioprotectors. *International Journal of Radiation Biology*, 82(5),323–329.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., ... & Horikawa, T. (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology*, 189(1), 21-39.
- Ikehata, H., & Ono, T. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of radiation research*, 52(2), 115-125.
- Kulkarni, S. S., Bhalke, R. D., Pande, V. V., & Kendre, P. N. (2014). Herbal plants in photo protection and sun screening action: an overview. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4(2), 1104-1113.
- Kumari, R., & Prasad, M. N. V. (2013). Medicinal plant active compounds produced by UV-B exposure. *In Sustainable Agriculture Reviews* Springer Netherlands. 225-254
- Linos, E., Swetter, S. M., Cockburn, M. G., Colditz, G. A., & Clarke, C. A.; (2009). Increasing burden of melanoma in the United States. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(7), 1666-1674.
- Marques, A. M., & Kaplan, M. A. C. (2015). Active metabolites of the genus Piper against *Aedes aegypti*: natural alternative sources for dengue vector control. *Universitas Scientiarum*, 20(1), 61-82.
- Mosquera, O. M. (2016). Determination of the antioxidant and antifungal activities of twelve plants belonging to the Colombian coffee region. *Revista Tumbaga*, 2(10).
- Nascimento, S. A., Araujo, E. A., Da Silva, J. M., & Ramos, C. S. (2015). Chemical study and antimicrobial activities of *Piper arboreum* (Piperaceae). *Journal of the Chilean Chemical Society*, 60(1), 2837-2839.
- Nash, J. F., & Tanner, P. R. (2014). Relevance of UV filter/sunscreen product photostability to human safety. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 30(2-3), 88-95.

- Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of dermatological research*, 302(2), 71-83.
- Purdue, M. P., Freeman, L. B., Anderson, W. F., & Tucker, M. A.; (2008). Recent trends in incidence of cutaneous melanoma among US Caucasian young adults. *The Journal of investigative dermatology*, 128(12), 2905.
- Rosenberg, M., & Echols, H. (1990). Differential recognition of ultraviolet lesions by RecA protein. Possible mechanism for preferential targeting of SOS mutagenesis to (6-4) dipyrimidine sites. *Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20641-20645.
- Quillardet, P., Huisman, O., D'ari, R., Hofnung, M. (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79, 5971-5975.
- Quillardet, P., & Hofnung, M. (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(3), 65-78.
- Quintero, N., Stashenko, E. E., Fuentes, J. L. (2012). The influence of organic solvents on estimates of genotoxicity and antigenotoxicity in the SOS chromotest. *Genetics and Molecular Biology* 35, 503-514.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. RFoundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (<http://www.R-project.org>)
- Rai R, Shanmuga SC, Srinivas C. (2012). Update on Photoprotection. *Indian Journal of Dermatology*.;57(5):335-342.
- Rivas, M., Rojas, E., Araya, M. C., & Calaf, G. M. (2015). Ultraviolet light exposure, skin cancer risk and vitamin D production. *Oncology letters*, 10(4), 2259-2264.
- Ryerson, A. B., Ehemann, C. R., Altekruse, S. F., Ward, J. W., Jemal, A., Sherman, R. L., ... & Anderson, R. N. (2016). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. *Cancer*, 122(9), 1312-1337.

- Scott, I. M., Puniani, E., Jensen, H., Livesey, J. F., Poveda, L., Sánchez-Vindas, P., ... & Arnason, J. T. (2005) Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: a method for isolating and identifying unsaturated amides from Piper spp extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, , vol. 53, no 6, p. 1907-1913.
- Soriano-Melgar, L. D. A. A., Alcaraz-Meléndez, L., Méndez-Rodríguez, L. C., Puente, M. E., Rivera-Cabrera, F., & Zenteno-Savín, T. (2014). Antioxidant responses of damiana (*Turnera diffusa* Willd) to exposure to artificial ultraviolet (UV) radiation in an in vitro model; *part II; UV-B radiation*. *Nutr Hosp*, 29(5), 1116-1122.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Cala, M. P., Durán, D. C., & Caballero, D. (2013). Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of separation science*, 36(1), 192-202.
- Stevanato, R., Bertelle, M., & Fabris, S. (2014). Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(1), 71-77.
- Vink, A. A., & Roza, L. (2001). Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 65(2), 101-104.
- Zaidi, M. R., Day, C. P., & Merlino, G. (2008). From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(10), 2381-2391.
- Zhang, W. J., & Björn, L. O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, 80(4), 207-218.