



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE GENOPROTECTORA DEL
EXTRACTO DE *PEUMUS BOLDUS* EN
LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA POR
MEDIO DEL ENSAYO DEL COMETA**

POR

CRISTIAN GONZALO FELIPE SILVA CATRILEO

**Trabajo de fin de carrera presentado en la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Químico
Farmacéutico**

**Profesor patrocinante: Dra. Berta Elena Schulz Bañares, Departamento de
Farmacia.**

**Octubre, 2020
Concepción, Chile**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



CONTENIDO

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. Hipótesis	15
3. Objetivo General	15
4. Objetivos específicos:	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. Materiales	16
5.1.1. Reactivos	16
5.1.2. Equipos e instrumentos de trabajo:	17
5.2. Métodos.....	18
5.2.1. Procedimiento general del Ensayo del Cometa	18
5.2.2. Implementación del Ensayo del cometa en el Laboratorio de Toxicología	21
5.2.3. Adquisición y manejo de los extractos de Boldo	23
5.2.4. Obtención y mantenimiento con linfocitos de sangre periférica humana ..	24
5.2.5. Identificación de comportamiento genotóxico del extracto de Boldo en linfocitos	25
5.2.6. Estudio de la capacidad genoprotectora de los extractos de Boldo en linfocitos con peróxido de hidrógeno	27
5.2.7. Tratamiento de imágenes y análisis estadístico.....	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1. Optimización de la Implementación	30
6.1.1. Fijación.....	30
6.1.1.1. Agarosa de punto de fusión normal NMP (<i>Normal Melting Point</i>).....	31
6.1.1.2. Agarosa de bajo punto de Fusión LMP (<i>Low Melting Point</i>).....	31
6.1.1.3. Portaobjetos.....	33
6.1.2. Lisis.....	34

6.1.2.1. Mantenimiento del reactivo de lisis.	35
6.1.2.2. Tiempo de exposición de las células al proceso de Lisis celular.	35
6.1.3. Electroforesis	36
6.1.4. Tinción y visualización.....	38
6.1.5. Análisis de datos.	39
6.1.5.1. Método de cuantificación del daño genotóxico.....	40
6.1.5.2. Elección del control positivo.....	42
6.2. Determinación de la capacidad genotóxica del extracto de Boldo y sus componentes.....	46
6.2.1. Extractos completos	46
6.2.2. Alcaloides.....	51
6.2.3. Polifenoles.....	55
6.3 Estudio de la capacidad genoprotectora de los extractos de <i>Peumus boldus</i> en linfocitos previamente expuestos a H ₂ O ₂ 100 µM.	59
6.3.1. Exposición de linfocitos a extractos Soxhlet y liofilizado	59
7. CONCLUSIONES.....	66
GLOSARIO	68
BIBLIOGRAFÍA.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Principales propiedades farmacológicas de <i>Peumus boldus</i>	10
Tabla 5-1. Distribución de las muestras experimentales en el ensayo genoprotector.....	29
Tabla 6-1. Pruebas de siembra de agarosa sobre los portaobjetos.....	32
Tabla 6-2. Correlación entre los grupos de puntuación visual y el porcentaje de ADN en la cola.....	42
Tabla 6-3. Resumen comparativo de los porcentajes de ADN en la cola de las muestras de linfocitos expuestas a extractos de Boldo completo junto a sus desviaciones estándar.	47
Tabla 6-4. Prueba de Tukey para las medias de porcentajes de ADN en la cola a los grupos de linfocitos expuestos a diferentes concentraciones de extractos de alcaloides de Boldo.....	53
Tabla 6-5. Comparación de las medias de porcentaje de ADN en la cola entre los grupos experimentales de extractos polifenólicos y el control negativo con PBS mediante la prueba <i>post-hoc</i> de Games-Howell para grupos de datos con varianzas desiguales.	58
Tabla 6-6. Valores de porcentaje de ADN en la cola entre las pruebas a 37°C y 4°C con sus respectivas desviaciones estándar a una confianza del 95 %.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Generación de OH* por medio de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss.	5
Figura 1-2. Comparación esquemática de ADN sometido a ensayo del cometa entre la forma del núcleo de una célula sin daño y otra con ADN dañado.....	12
Figura 5-1. Proceso general del Ensayo del Cometa.....	20
Figura 6-1. Efecto del cambio de componentes en el tampón de electroforesis con respecto al desplazamiento del material genético en muestras de Linfocitos expuestas a H ₂ O ₂ 100 µM.....	37
Figura 6-2. Efecto de la concentración de cromóforo en la visualización de los núcleos sin genotoxicidad en	39
Figura 6-3. Clasificación visual de los cometas.	41
Figura 6-4. Apariencia de los núcleos tratados de los candidatos a controles positivos en orden creciente de concentración.	44
Figura 6-5. Comparación entre los valores de candidatos a controles positivos.	46
Figura 6-6. Comportamiento de cultivos con linfocitos al extracto de Boldo completo por método Soxhlet.	48
Figura 6-7. Comportamiento de cultivos de linfocitos expuestos al extracto de Boldo obtenido por Liofilización.	50
Figura 6-8. Comparación entre linfocitos tratados con extracto Soxhlet y extracto liofilizado.	50
Figura 6-9. Efecto de extractos alcaloides de Boldo en linfocitos.	52
Figura 6-10. Nucleoides de linfocitos fotografiados después de ser tratados con concentraciones crecientes de extracto de alcaloides del Boldo.	54
Figura 6-11. Comportamiento de linfocitos expuestos a concentraciones decrecientes de polifenoles durante dos horas de tratamiento.	56
Figura 6-12. Inspección visual de los núcleos de linfocitos expuestos a extractos de fracción polifenólica del Boldo por medio de microscopía de fluorescencia.	58

Figura 6-13. Comportamiento genoprotector del extracto Soxhlet al exponer linfocitos tratados con peróxido de hidrógeno 100 μM 60

Figura 6-14. Ensayo del cometa para linfocitos que fueron expuestos a extractos de boldo luego de sufrir estrés oxidativo por exposición previa a H_2O_2 100 μM .
..... 62



RESUMEN

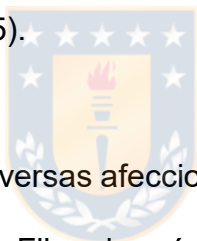
Diversas investigaciones han mostrado que el Boldo (*Peumus boldus*) posee propiedades antioxidantes, lo que puede ser útil para combatir la genotoxicidad de compuestos químicos que actúan a través de especies reactivas del oxígeno (ROS, en inglés). En el presente trabajo se investigó la capacidad genoprotectora del extracto de Boldo y también se probaron las posibles propiedades genotóxicas de alguno de sus componentes a través del Ensayo del Cometa en linfocitos de sangre periférica humana. Para ello, se implementó el ensayo estudiando y optimizando los puntos críticos de éste en base a recomendaciones de literatura científica y los recursos disponibles. De los extractos de Boldo analizados se encontró que el extracto acuoso Soxhlet junto con la fracción polifenólica no mostraron comportamientos genotóxicos, mientras que el extracto Liofilizado junto con la fracción alcaloide presentaron efecto genotóxico. Posteriormente, en linfocitos de sangre periférica humana expuestos a H₂O₂ se probó la actividad antioxidante genoprotectora del extracto acuoso Soxhlet y del extracto Liofilizado, encontrándose un efecto protector a través de la disminución del porcentaje de cola en el cometa, siendo más acentuado en el extracto Soxhlet. Finalmente, se concluyó que el extracto de Boldo tiene un potencial genoprotector basado en las propiedades antioxidantes de algunos de sus componentes, sin embargo, se necesitan estudios más profundos que confirmen estas observaciones preliminares.

ABSTRACT

*Various investigations have shown that Boldo (*Peumus boldus*) has antioxidant properties, which may be useful to combat the genotoxicity of chemical compounds that act through reactive oxygen species (ROS). In the present work, the genoprotective capacity of the Boldo extract was investigated and the possible genotoxic properties of some of its components were also tested through the Comet Assay in human peripheral blood lymphocytes. To this end, the trial was implemented studying and optimizing its critical points based on recommendations from the scientific literature and available resources. From the Boldo extracts analyzed, it was found that the aqueous Soxhlet extract together with the polyphenolic fraction did not show genotoxic behavior, while the lyophilized extract together with the alkaloid fraction showed a genotoxic effect. Subsequently, in human peripheral blood lymphocytes exposed to H₂O₂, the genoprotective antioxidant activity of the aqueous Soxhlet extract and the lyophilized extract were tested, finding a protective effect through the decrease in the percentage of tail in the comet, being more accentuated in the Soxhlet extract. Finally, it was concluded that Boldo extract has a genoprotective potential based on the antioxidant properties of some of its components, however, more in-depth studies are needed to confirm these preliminary observations.*

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el desarrollo de la Biología Molecular y la Genética, como disciplinas, han sido capitales en el esclarecimiento de procesos fundamentales en la génesis de diversos eventos tanto biológicos como patológicos, mejorando nuestra comprensión de ellos y apuntando hacia posibles estrategias terapéuticas (Cox et al., 2015).



Un ejemplo de esto es que diversas afecciones previamente complejas, mortales o difíciles de manejar como la Fibrosis quística, Hemofilia y varias enfermedades degenerativas ahora sean mejor comprendidas en su origen por los científicos y por el equipo médico, significando un progreso enorme en el abordaje y calidad de los diagnósticos y tratamientos para esas dolencias (Klug, 2006, p. 11), otorgando con ello una mejora sustancial en la calidad de vida de los pacientes.

Estos resultados han ejercido un importante impulso en diversas áreas como la Bioinformática, Farmacología y Toxicología al permitir cohesionarlas con los aportes de la genética y así abarcar desde nuevos enfoques aspectos relevantes como la toxicidad y seguridad farmacológicas (Mahadevan et al., 2011), y

abriendo el camino a nuevas disciplinas que integren estos conocimientos para aplicarlos en áreas donde se necesite verificar la inocuidad de diversos agentes (Ren et al., 2017).

Una de éstas es la Genotoxicología, subdisciplina procedente de la Toxicología que enlaza los estudios de los efectos nocivos que generan las diversas sustancias químicas y medios físicos en la salud de los organismos vivos (animales y vegetales), con los conocimientos resultantes de la biología molecular y la genética para estudiar las formas en que estos agentes pueden alterar el ADN y las transformaciones patológicas consecuentes (Casarett y Doull. 2005., p.138), procesos que se engloban en el término denominado genotoxicidad (Ren et al., 2017).

Así, podemos definir como un genotóxico a toda sustancia química o agentes físicos con actividad biológica, capaces de generar algún tipo de injuria a los componentes hereditarios de los seres vivos (Repetto, 1997 p. 329), a ciertas concentraciones, con los subsecuentes efectos que eso pueda acarrear para el correcto trabajo de células, tejidos y sistemas biológicos al producir cambios en la información genética de células somáticas o germinales y que pueda ser transmisible a las siguientes generaciones de ellas, proceso conocido como mutagénesis, o provocar otros tipos de daños genotóxicos a través de

mecanismos que provoquen pérdida de información genética con la consecuente alteración de la función o estructura de la célula. (Ren et al., 2017).

Se conocen numerosos agentes que pueden generar genotoxicidad por su alta reactividad como las bases nitrogenadas, físicos (como la radiación ionizante), compuestos químicos electrofílicos (como los compuestos aminados o halogenados, entre otros) o, de forma más frecuente, compuestos generadores de radicales libres como son las especies reactivas derivadas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS, en inglés), producidas por una amplia gama de procesos como producto secundario que pueden conducir finalmente a la producción de alteraciones genotóxicas (Repetto, 1997 p. 332), entre las cuales podemos mencionar:

- a) Sustitución de las bases nitrogenadas del ADN, como por ejemplo purinas sustituidas por otras purinas o pirimidinas, entre otros.
- b) Generación de nucleótidos inútiles para la duplicación, al sustituir una base nitrogenada por otra sustancia análoga.
- c) Alteración química de las bases que origine una modificación en sus propiedades como, por ejemplo, una oxidación o alquilación en una base

nitrogenada o una adición de un compuesto químico a una de ellas, conocido como aducto (Casarett y Doull. 2005., p. 140).

- d) Adición o deleción de bases por efecto de sustancias genotóxicas.

- e) Lesiones cromosómicas, donde pueden ocurrir fenómenos de rotura en las secuencias de las bases, deleciones o translocaciones de ellas entre otros procesos injuriantes.

Una de las sustancias productoras de radicales libres más comunes a nivel fisiológico es el peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , especie resultante de procesos metabólicos tales como la fosforilación oxidativa y presente también en cuadros inflamatorios (Benhusein et al., 2010). Este compuesto se forma a nivel intracelular, por la reacción del oxígeno con productos del metabolismo oxidativo normal (Auten R., Davis J., 2009), en presencia de hierro (reacciones de Fenton y de Haber-Weiss, como se ilustra en la figura 1-1), pudiendo liberar el radical hidroxilo (OH^*), que al reaccionar con las bases nitrogenadas provoca lesiones en el ADN en forma de roturas de cadena, tanto individuales como dobles, lo que induce efectos genotóxicos (Živković et al., 2017).

Estos daños a los que el ADN se ve sometido constantemente pueden generar niveles de injuria de grados variables, que van desde cambios leves en las bases,

fácilmente revertidos por mecanismos de reparación y restauración intracelulares específicos, hasta niveles severos de daño que pueden inducir apoptosis en las células afectadas. Si bien, también existe un nivel de daño intermedio que a menudo no afecta la viabilidad de la célula pero que produce que ésta no pueda llegar a repararse del todo, en cuyo caso la célula podrá seguir replicándose, pero transmitiendo el daño a las siguientes generaciones, lo que finalmente puede afectar la funcionalidad futura de los tejidos que las componen (u organismos originados de ellas si son células germinales), desencadenando un abanico amplio de patologías relacionadas con estas aberraciones genómicas como pueden ser la generación de neoplasias, enfermedades degenerativas hereditarias o malformaciones al momento del nacimiento, fenómeno conocido como teratogénesis (Repetto, 1997. p. 330).

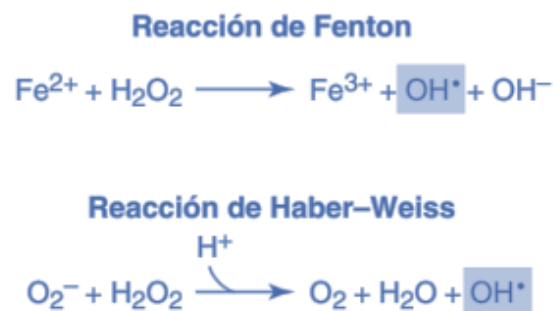
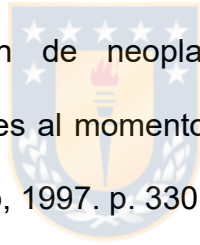


Figura 1-1. Generación de OH* por medio de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. Adaptado de Devlin, T. M. (2019). *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. Reverté.

Conocer este tipo de información es relevante tanto para fines de seguridad como para un uso racional de las sustancias con actividad farmacológica con relación a su interacción con el material genético (Gámez, 2007).

Sin embargo, estos conocimientos se pueden utilizar también para investigación de nuevas alternativas terapéuticas en un sinnúmero de patologías (sobre todo las relacionadas con células neoplásicas) que involucran células que se desean eliminar a través de la genotoxicidad inducida por agentes exógenos o endógenos, así como conocer las propiedades genoprotectoras que puedan evitar o reparar los daños producidos por sustancias genotóxicas en las células y así restaurar la integridad del genoma, siendo éste proceso llamado Antimutagénesis.

La antimutagénesis como fenómeno está formado por una serie de mecanismos defensivos destinados, a través de enzimas y sustancias de origen tanto endógeno como exógeno, a detectar y reparar o eliminar injurias genéticas adquiridas, que afectan la integridad química del ADN de forma natural por la célula o inducidas por un genotóxico a través de variadas estrategias (Casarett y Doull. 2005., p. 141) entre las que se encuentran:

- a) Escisión de componentes defectuosos en la hebra de ADN: la eliminación de bases o nucleótidos afectados es uno de los tipos de procesos reparativos más utilizados por la célula.

- b) Reparación de roturas bicatenarias: mecanismo que permite la reparación de daños cromosómicos que en última instancia puedan afectar al ciclo celular. Esto se puede llevar a cabo sintetizando la parte de la cadena faltante o dañada o enlazando directamente los extremos rotos por medio de sistemas enzimáticos.

- c) Otros procesos más específicos, entre los que se encuentran reparación de bases emparejadas erróneamente o mecanismos neutralizantes que pueden proteger al ADN de sustancias genotóxicas como pueden ser la Inhibición de penetración o remoción del agente tóxico del organismo, la inactivación del mutágeno por reacción química o enzimática, la actividad antioxidante y captura de radicales libres o la modificación del transporte de membrana.

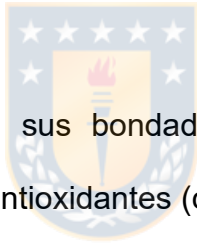
En relación a la clasificación de los tipos de antimutagénicos que se han ido identificando y caracterizando durante las últimas décadas, varios autores han sugerido diversos criterios a la hora de catalogar estos compuestos, por lo que existen diferentes propuestas de seleccionarlos y agruparlos, siendo una de las

más sencillas la del grupo experto en antimutágenos y desmutágenos (ICPEMC) que agrupa a los genotóxicos en dos categorías: inhibidores del período 1, que son los que actúan extracelularmente, e inhibidores del período 2, los que actúan intracelularmente (De Flora S., 2005).

Numerosas investigaciones en los últimos años han revelado que existen diversos agentes de origen farmacológico o nutricional que actúan como protectores del ADN, ya sea previniendo el daño generado por genotóxicos o promoviendo la reparación del material genético y, gracias a los modernos avances, se han podido estudiar con detalle sustancias presentes en una amplia gama de alimentos de múltiple origen o como principios activos provenientes del mundo vegetal (Alcaloides, compuestos fenólicos, taninos, etc.) y que actualmente son estudiados por ciencias como la botánica, farmacognosia o fitoquímica, disciplinas que han dado nueva luz sobre las propiedades farmacológicas potencialmente beneficiosas presentes en plantas, utilizadas por la medicina tradicional.

De estas plantas con propiedades curativas reconocidas y que poseen extensos estudios a sus espaldas sobresale el Boldo (*Peumus boldus*), un árbol dioico endémico de la zona central de Chile como uno de los más destacados agentes fitoterapéuticos tradicionales debido a su amplio uso popular, con una cantidad de consumo promedio de mil toneladas al año en el país (Avello y Cisternas,

2010) y que, asimilado desde la medicina tradicional del pueblo Mapuche y otras culturas locales terminó por convertirse en una de las plantas medicinales por excelencia a nivel nacional. Gracias a sus propiedades principalmente digestivas y hepatoprotectoras (Medicamentos Herbarios Tradicionales, 2010) fue llevada a principios del siglo XIX a Europa (Cassels, 2004), alcanzando relevancia alrededor del mundo (Moreno et al., 1990) y constituyendo, desde entonces, una materia prima destacada para diversos fitofármacos fuera de las fronteras nacionales, sobre todo en el mercado europeo y latinoamericano. Un resumen de sus propiedades farmacológicas se muestra en la tabla 1-1.



Amplios estudios respaldan sus bondades curativas, así como también la presencia de componentes antioxidantes (como los ácidos fenólicos, los taninos y los flavonoides) y alcaloides en el extracto acuoso de sus hojas (O'Brien et al., 2006) pero también, sobre todo en los últimos años se han esclarecido aspectos esenciales de su toxicología (Ruiz et al., 2008) y del potencial injuriante de sus principios activos a diversas concentraciones (como el trabajo de Almeida et al., 2000), lo que ha llevado a una mejor caracterización de las dosis terapéuticas y tóxicas del extracto de Boldo.

Tabla 1-1. Principales propiedades farmacológicas de *Peumus boldus*. Adaptado de Mariano et al. *Bioactive volatile fraction of Chilean boldo (Peumus boldus Molina) – an overview. 2019.*

Componente o fracción de <i>Peumus boldus</i>	Propiedades Farmacológicas
Aceite esencial	Actividad antihelmíntica
Extracto hidroalcohólico y Boldina Aislada	Actividad antiinflamatoria
Aceite esencial	Efecto antimicrobiano
Extracto acuoso de la hoja de Boldo, extracto etanólico crudo, fracción de alcaloide, fracción flavonoide, boldina y catequina aisladas	Efecto antioxidante
Boldina aislada	Efecto antipirético
Aceite esencial	Actividad antitumoral
Extracto acuoso	Efecto colagogénico
Boldina aislada	Efecto colerético
Boldina aislada	Efecto diurético
Extracto hidroalcohólico de hojas de boldo y boldina aislada	Efecto Hepatoprotector
Boldina aislada y secoboldina (derivado)	Inhibición de la agregación plaquetaria
Aceite esencial	Propiedades insecticidas y herbicidas
Extracto hidroalcohólico de hojas de boldo	Efecto laxante
Boldina aislada	Efecto espasmolítico
Extracto hidroalcohólico de hojas secas de boldo y boldina aislada	Efectos teratogénicos y abortivos
Hojas, extracto acuoso, extracto hidroalcohólico y tintura	Tratamiento de trastornos digestivos y hepatobiliares
Hojas	Tratamiento del reumatismo

Los estudios de genotoxicología para el Boldo y sus principios activos fueron realizados desde mediados de los años 80 y principios de los años 90, como los hechos por Moreno et al., 1991, Tavares y Takeshi, 1994 (sólo por citar algunos

estudios), y sobre todo en países como Brasil, donde la planta cuenta con alta popularidad en el ámbito académico, aunque desde entonces han sido pocas las publicaciones sobre el tema teniendo en cuenta que otros estudios toxicológicos (como citotoxicidad, por ejemplo) han sido mucho más prolíficos y mejor entendidos. Por lo tanto, se necesita un estudio actualizado sobre las posibles implicancias genotoxicológicas de una planta de consumo masivo, mediante un método definido, sistemático, relativamente fácil de realizar y de alta sensibilidad.

Bajo esta premisa, una de las técnicas existentes para determinar la presencia de procesos genotóxicos de forma rápida es el Ensayo del Cometa, un método de análisis de daño en el ADN que fue basada en un estudio de hace más de 3 décadas realizado por dos científicos suizos, Östling y Johanson (citados por Rodriguez et al., 2016), ideado para medir niveles bajos de rotura del material genético de células individualizadas y con una gran sensibilidad basado en la migración de ADN dañado a través de una matriz de agarosa expuesto a un campo eléctrico mediante electroforesis, tomando el núcleo afectado con el material genético migrado a la forma de un halo (tal y como se muestra esquemáticamente en la figura 1-2), y que después fue caracterizado y optimizado para ser rápido, confiable y reproducible (Zúñiga, 2009), siendo actualmente una de las técnicas más populares para evaluar daño a nivel de ácidos nucleicos, con un gran impacto en muchas áreas de la genética, bioquímica, y ciencias ligadas a la medicina, y también muy útil en estudios de

biomonitorización al poder evaluar la relación entre exposición crónica de una determinada población a un agente genotóxico presente en el medio ambiente incluso cuando dicha sustancia esté presente en concentraciones bajas.

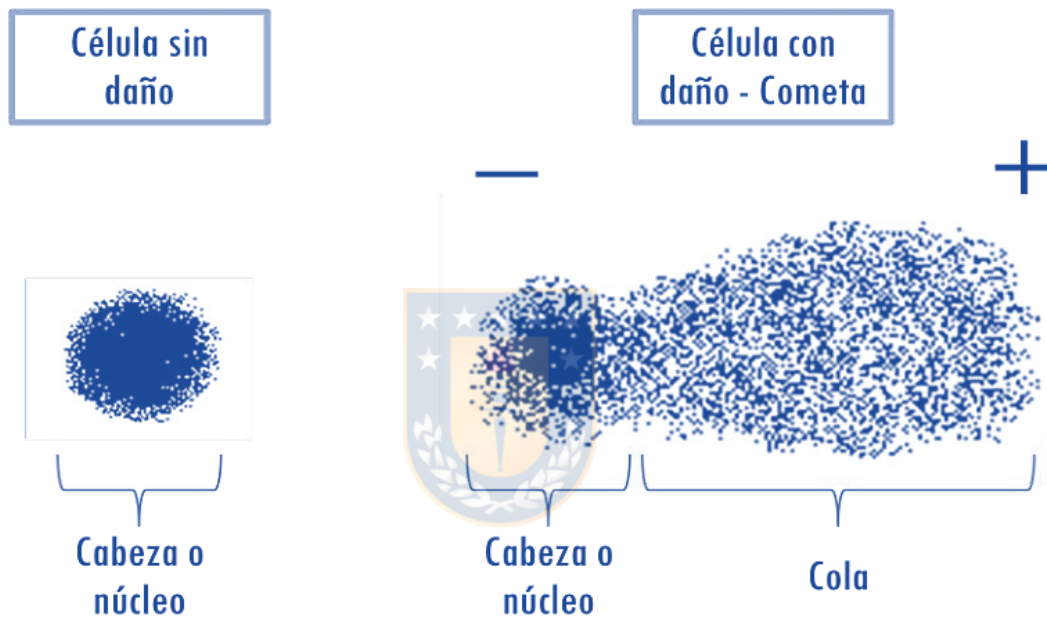


Figura 1-2. Comparación esquemática de ADN sometido a ensayo del cometa entre la forma del núcleo de una célula sin daño y otra con ADN dañado. Imagen adaptada de Vergara G. Estandarización del ensayo del cometa alcalino en células de sangre periférica. 2010.

Este método conlleva diversas ventajas: es adaptable a estudiar efectos genotóxicos en prácticamente todos los tipos de células eucariotas con un pequeño número de muestra (Al-Salmani et al., 2011), así como poder medir la respuesta al daño y reparación en células no proliferativas como los

mononucleares de sangre periférica (Prieto y Llópiz 1999), aunque es conveniente utilizar controles positivos probados para resultados comparativos más robustos.

Debido a esto, el ensayo del cometa demuestra ser una técnica versátil que puede acomodarse a diversos escenarios experimentales, pudiéndose encontrar en versiones de electroforesis en medio alcalino y neutro, siendo el primero el más popular entre las diversas implementaciones utilizadas en laboratorios alrededor del mundo, ya que es la versión que reconoce mayores mecanismos de daño genotóxico (Zúñiga, 2009).



Por consiguiente, es un método sencillo y eficaz que resulta adecuado para investigar el posible efecto genoprotector del extracto de Boldo en celulares eucariotas sometidas a agentes genotóxicos independientemente de su linaje, complementario a las distintas propiedades del Boldo además de las ya conocidas bondades antioxidantes de esta planta medicinal.

De igual forma, por medio de esta metodología se pueden estudiar las propiedades genotóxicas que puedan poseer las diferentes fracciones del extracto de boldo en linfocitos, siendo interesante determinar si éstas ocurren a concentraciones citotóxicas o incluso a niveles terapéuticos, lo que generaría una

nueva visión sobre los niveles de seguridad de uso y manipulación de la planta y su extracto.



2. Hipótesis

El extracto de Boldo tiene efecto genoprotector en linfocitos humanos afectados por un agente oxidante.

3. Objetivo General

Determinar la capacidad genoprotectora del extracto de Boldo y algunos de sus componentes en linfocitos de sangre periférica humana.

4. Objetivos específicos:

- Implementar y optimizar el Ensayo del Cometa como marcador de genotoxicidad.
- Identificar el comportamiento genotóxico de las distintas fracciones del extracto de Boldo en linfocitos de sangre periférica humana.
- Determinar la actividad genoprotectora del extracto de Boldo en linfocitos de sangre periférica humana expuestos a un agente oxidante.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Reactivos

Ácido clorhídrico (HCl)

Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)

Agarosa *low gelling temperature*, BioReagent, Sigma Aldrich

Agarosa Tipe 1, low EEO, Sigma Aldrich

Buffer fosfato salino (PBS)

Cloruro de Sodio (NaCl)

Hidróxido de Sodio (NaOH)

Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich

Medio Gibco™ RPMI 1640 en polvo

Trizma® base (*Tris(hydroxymethyl)aminomethane*), Sigma-Aldrich

Tritón X-100

5.1.2. Equipos e instrumentos de trabajo:

Balanza analítica BAS31 Boeco Germany

Baño maría

Cabina de seguridad microbiológica STREAMLINE® SC2-E SERIES

Cámara de electroforesis

Centrífuga *Places Centrifuge* PLC-05

Fuente de poder *Biorad PowerPac 3000 Electrophoresis*

Láminas portaobjetos de 26x76 mm tratadas con agarosa regular al 0.5%

Laminillas cubreobjetos de 22 x60 mm

Micropipetas de 0.1, 10, 100 y 1000µL *BioPette Plus Starcker Pack*

Microscopio Motic AE31 *Inverted Phase Contrast Fluorescence Microscope* con filtro verde de excitación de 488 nm

Microtubos tipo eppendorf de 1,5 y 2 mL

Probetas de 100, 500 y 1000 mL

Tubos cónicos (Falcon) de 15 y 50 mL

Vortex

5.2. Métodos

El ensayo del cometa se realizó en dependencias de la Facultad de Farmacia, siendo la parte experimental realizada en el Departamento de Farmacia (En las secciones de Farmacognosia y de Toxicología), mientras que en el Departamento de Bioquímica clínica e inmunología se realizó la visualización de las muestras y el análisis de los resultados.

5.2.1. Procedimiento general del Ensayo del Cometa



Se consideró lo descrito por Keohavong y Grant (*Molecular toxicology protocols*, 2005) con algunas modificaciones que se detallarán más adelante, se utilizaron portaobjetos previamente cubiertos con agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1,5%. 40 μ L de suspensión celular se mezclaron con 120 μ L de agarosa LMP al 0,5%. 40 μ L de esa mezcla se agregó sobre la agarosa de los portaobjetos y se cubrió con un cubreobjeto para distribuir homogéneamente las células. Después de 3-5 minutos de espera, se llevaron las muestras a refrigeración unos 5 minutos en oscuridad, retirando cuidadosamente el cubreobjeto. Para la lisis de las membranas celulares, los portaobjetos se colocaron en cubetas con solución de lisis al menos 1h a 4°C, protegidos de la luz, siendo este tiempo variable dependiendo de los requerimientos del experimento en particular.

Una vez llevada a cabo la lisis, se depositaron los portabojetos con las células en una cámara de electroforesis horizontal, evitando espacios entre sí para que la corriente pase uniformemente en todos ellos. Se llenó la cámara con tampón de electroforesis (1mM EDTA disódico y 300 mM NaOH a pH 13,2) para que las preparaciones estén completamente sumergidas en él, y se dejaron reposando entre 20 a 40 minutos aproximadamente a 4°C. A continuación, se procedió a realizar la electroforesis durante 20 minutos a 25V y 300mA. Durante esta fase el ADN dañado migra hacia el polo positivo.



Una vez terminado ese proceso, los Portaobjetos se retiraron cuidadosamente de la cámara y se sumergen en tampón de neutralización durante al menos 5 minutos. Las preparaciones deben ser guardadas en cajas oscuras evitando luz directa y a temperatura ambiente. Luego, para la visualización de las muestras, se utilizaron 20 µL de solución de coloración Yoduro de propidio 10 µg/mL, que se agregan sobre cada una de las preparaciones, y se cubren con un cubreobjetos de 24 x 60 mm.

La visualización se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia, equipado con filtro de excitación de 488 nm dando una coloración roja-anaranjada. Se contaron, en forma aleatoria, al menos 50 células por portaobjeto y los resultados

se tabularon según clasificación del daño relativo al ADN utilizando el largo de la cola del cometa como porcentaje de daño genético.

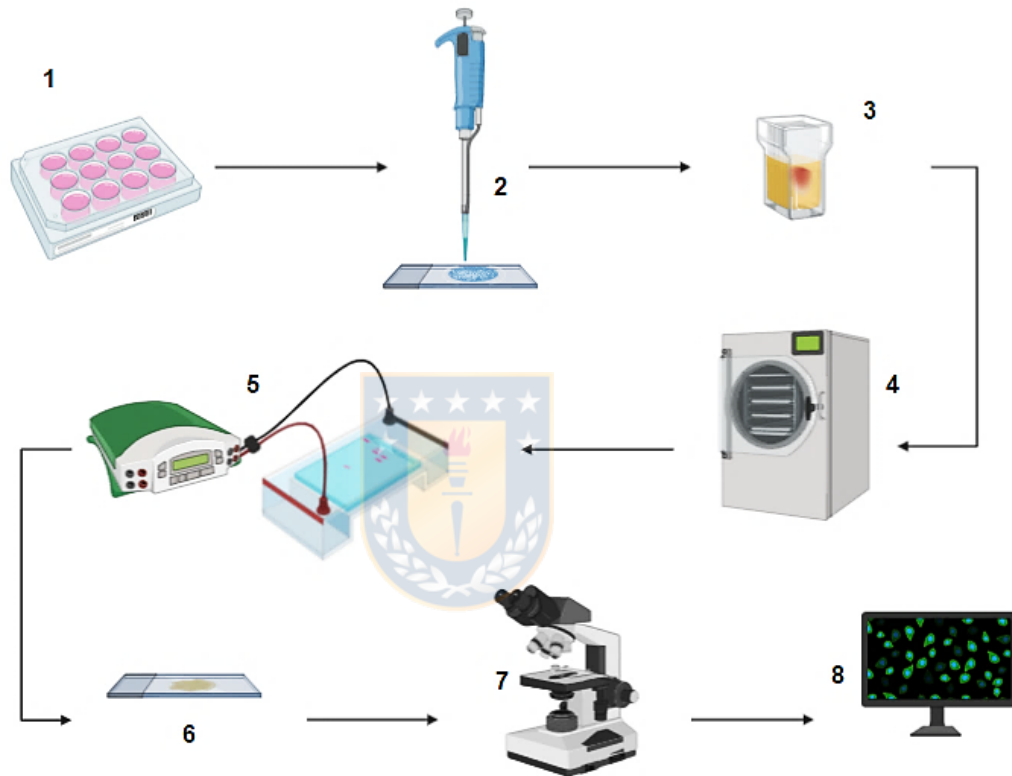


Figura 5-1. Proceso general del Ensayo del Cometa. 1. Población de células en estudio. 2. Células son embebidas en agarosa y sembradas en portaobjetos. 3 y 4. Proceso de lisis en refrigeración a 4°C. 5. Proceso de electroforesis. 6. Neutralización y tinción. 7. Observación de células por microscopía de fluorescencia. 8. Análisis de imagen y estadístico.

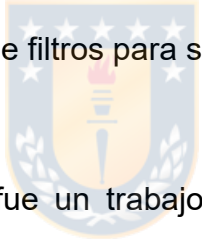
5.2.2. Implementación del Ensayo del cometa en el Laboratorio de Toxicología

Esta etapa contempló un trabajo bibliográfico previo que abordó los aspectos críticos a considerar en relación con una óptima funcionalidad y coordinación dentro de lo posible para un método de tan alta variabilidad, y adaptándolo a la naturaleza de la investigación.

Se tomaron en cuenta varios parámetros relacionados directa e indirectamente con la variabilidad del ensayo destacados en trabajos previos, entre los que destacan la optimización realizada por Zúñiga, 2009, y Collins et al., 2014, entre los que se enfatizan:

- Obtención y mantenimiento de los reactivos.
- Control de variables relacionadas con manejo del proceso. Aquí pueden detallarse los sub-ítems:
 - Fijación: en relación con la concentración de agarosa y el tipo de portaobjetos utilizado, realizándose diversas pruebas (Temperatura, tratamiento de los portaobjetos y tiempo de

almacenamiento) para encontrar el punto óptimo para una fijación correcta de las muestras.

- Lisis: en relación con el almacenamiento de los reactivos y las condiciones de trabajo óptimas (Temperatura y tiempo) para realizar el proceso de lisis.
 - Electroforesis: donde los puntos críticos están relacionados con el tiempo de electroforesis y el ajuste de pH del buffer.
 - Tinción: tipo de tinción teniendo en cuenta la naturaleza del fluoróforo elegido (en este caso, Yoduro de Propidio) y la disponibilidad de filtros para su correcta visualización.
- 
- Análisis de datos: éste fue un trabajo en parte bibliográfico, destinado a conocer el método más sencillo y efectivo de procesar los datos para poder cuantificar de forma clara el daño genotóxico, además de determinar el mejor control positivo para realizar una correcta comparación entre muestras.

Una vez optimizado el proceso, teniendo en cuenta las pruebas y ensayos que otorgaron mejores resultados en torno a la calidad del trabajo producto de una implementación con el menor número de variabilidad posible y una correcta visualización de los cometas, se procedió a trabajar con los siguientes objetivos.

5.2.3. Adquisición y manejo de los extractos de Boldo.

Para determinar el poder genoprotector del Boldo se trabajó con diferentes tipos de fracciones proporcionadas por el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia donde fueron caracterizadas y estandarizadas, a saber:

- a) Extracto de Boldo obtenido por Soxhlet (acuoso) cuya característica fundamental es su bajo contenido de ascaridol con respecto a otro tipo de fracciones generales. El extracto en polvo fue disuelto en PBS y 1% de DMSO hasta una concentración de 5 mg/L.
- b) Extracto de Boldo Liofilizado cuya característica principal es la del bajo contenido de clorofila con respecto a otro tipo de fracciones generales. Como la fracción anterior, el extracto en polvo fue disuelto en PBS y 1% de DMSO hasta una concentración de 5 mg/L.
- c) Extracto polifenólico de hojas y tallos de Boldo. Esa fracción fue entregada desde el laboratorio de Farmacognosia con una concentración de 3890 mg/L y con una alta proporción de Flavonoides y Taninos condensados en el extracto.

- d) Fracción alcaloide de hojas y tallos de Boldo, de concentración 1160 mg/L, con una alta proporción de Boldina y derivados en el extracto.

Las diferentes fracciones, una vez obtenidas, fueron esterilizadas con filtros para jeringas libres de pirógenos de 0,22 μm dentro de una cámara de flujo laminar en condiciones de esterilidad, siendo posteriormente rotuladas y conservadas en oscuridad bajo refrigeración a 4°C hasta el momento en que fueron empleadas.

5.2.4. Obtención y mantenimiento con linfocitos de sangre periférica humana



Los linfocitos fueron obtenidos a través de un donante sano por venopunción en brazo y posteriormente separados con *Ficcoll Histopaque*® según el protocolo descrito por Checa Rojas, 2018 adaptado a las correspondientes proporciones de muestra obtenida (cerca de 10 mL de sangre). Una vez aislados los linfocitos se congelaron y se almacenaron a -80°C con RPMI-1640 según lo descrito en el protocolo detallado por Zúñiga Venegas, 2009., hasta su debido uso.

La elección de linfocitos como la población celular a ocupar en este estudio se basa en su fácil obtención, su disponibilidad en gran número y la capacidad que tienen de reflejar el estado general de un organismo, motivos que los hacen útiles en estudios de biomonitorización (Collins et al., 2008).

5.2.5. Identificación de comportamiento genotóxico del extracto de Boldo en linfocitos.

El comportamiento de los linfocitos ante las diferentes concentraciones de las fracciones de los extractos de boldo fue estudiado en cada extracto por separado, obteniendo de esta manera una caracterización comprendida según tipo de fracción y concentraciones decrecientes de los extractos, tomando en consideración los siguientes aspectos:

- Concentraciones de extractos completos: para determinar la concentración de referencia se tomaron en cuenta estudios de viabilidad celular de diferentes investigaciones, siendo elegida la concentración de 0,5 mg/mL para ambos extractos completos en base a la bibliografía disponible (Fale et al., 2012).
- Tiempo y condiciones de incubación: la actividad genotóxica de las diferentes fracciones de los extractos fue probada a 4°C, temperatura elegida debido a que en trabajos anteriores (como los realizados por Anderson et al., 1997) se constató que no aumentaba el daño en las células y también disminuye la actividad de los procesos celulares, evitando la activación de los linfocitos. Así mismo, experimentos previos (como los de Razavi-Azarkhiavi et al., 2014)

utilizaron esta temperatura en el cultivo al estudiar el efecto antimutagénico de extractos acuosos en linfocitos. Además, el aislamiento de linfocitos ante algunos componentes sanguíneos como glóbulos rojos o neutrófilos impide que sean expuestos a procesos generadores de estrés oxidativo ligados a su lisis o activación (Azqueta et al., 2019).

Se formaron 6 grupos de muestra compuestos, cada uno, de 135 μL de linfocitos aislados previamente y criopreservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una concentración 5×10^4 linfocitos/mL, siendo 3 cultivados con 15 μL de extracto de boldo liofilizado (5 mg/mL) y los otros 3 con extracto de Boldo Soxhlet (5 mg/mL), y manteniéndose a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en cultivo con medio RPMI-1640 durante 2 horas. Así mismo, se estudiaron 3 concentraciones decrecientes de extractos polifenólicos y alcaloides, respectivamente, siendo las dos concentraciones menores previamente diluidas en $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ de su concentración original, con el mismo tiempo de cultivo que los extractos completos, determinándose posteriormente que cada grupo muestral obtuviera una viabilidad celular mayor al 90%. Luego, 100 μL de muestra se mezclaron con 300 μL de agarosa de bajo punto de fusión mantenida a 37°C , de los cuales se tomaron 35 μL que se sembraron en los portaobjetos previamente rotulados y se cubrieron con un cubreobjeto de 24 x 60 mm dejándose solidificar a 4°C por 10 minutos, retirándose posteriormente para ser llevados, a continuación, a los procesos lisis y electroforesis.

5.2.6. Estudio de la capacidad genoprotectora de los extractos de Boldo en linfocitos con peróxido de hidrógeno.

Para el estudio del comportamiento genoprotector de los extractos de Boldo, se descongeló un grupo de linfocitos (siguiendo el protocolo de Zúñiga, 2009. detallado anteriormente) determinando luego la viabilidad celular con azul de tripán y dividiendo la muestra en 8 grupos de 5×10^4 linfocitos/mL, siendo la mitad incubados a 37°C y el resto incubados a 4°C siguiendo el protocolo anterior. Luego, a una muestra de cada grupo se le adicionó sólo PBS y a otra un control positivo de Peróxido de Hidrógeno de $100 \mu\text{M}$ por 15 minutos. De las muestras restantes, una de cada grupo fue tratada con extracto de Boldo Soxhlet y las últimas con extracto de Boldo Liofilizado, siendo la duración del tratamiento unas 2 horas. Finalmente, cumplido el tiempo de tratamiento de muestra los grupos tratados con extractos de Boldo fueron sometidos a exposición con Peróxido de Hidrógeno de $100 \mu\text{M}$ por 15 minutos.

Una vez terminado todo el proceso, de cada grupo se extrajeron $100 \mu\text{L}$ que se mezclaron con $300 \mu\text{L}$ de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5%, de cuya mezcla se sacaron $35 \mu\text{L}$ de muestra que finalmente fueron sembradas en una capa de agarosa de punto de fusión normal de 1 mL y cubiertas con un cubreobjetos de 24 x 60 mm para proceder a continuación con el Ensayo del

Cometa. Este mismo procedimiento se realizó dos veces, uno por día, en triplicado ya que se utilizaron 3 portaobjetos por muestra (ver tabla 5-1).

5.2.7. Tratamiento de imágenes y análisis estadístico

Para el análisis de las imágenes se utilizó el software TriTek *CometScore* v. 2.0.0.38 por medio de procesamiento manual imágenes de las células tratadas, el cual entregaba un conjunto de datos de salida en modo texto, los cuales fueron ordenados y trabajados estadísticamente con Microsoft Excel para Office 365 v. 1908 con el complemento *Real Statics Analisis Tool*.

El parámetro cuantitativo utilizado en este estudio fue el porcentaje de ADN en la cola (*Tail intensity*) debido a que otorga comparabilidad con respecto a otros estudios y laboratorios además de mostrar una relación lineal con el daño de ADN y, también, permite analizar de forma robusta una amplia gama de daño genómico por medio de software dedicado (Burlinson et al., 2007) calculando el promedio del porcentaje de ADN en la cola más su desviación estándar para cada muestra en total, valores que a su vez fueron analizados por medio de test-t y el análisis de varianza de un factor (ANOVA) con corrección de Welch en caso de datos que presenten desigualdad de varianzas (Møller y Loft, 2014), estableciendo el nivel de significancia de los valores en $p < 0,05$ para los test que mostraron resultados estadísticamente significativos y $p < 0,001$ para valores estadísticamente muy significativos.

Tabla 5-1. Distribución de las muestras experimentales en el ensayo genoprotector. Cada muestra fue desarrollada en triplicado.

Muestra	Tratamiento	Tiempo	Temperatura
1	PBS		37 °C
			4 °C
2	H ₂ O ₂ 100 µM	15 minutos	37 °C
			4°C
3	Extracto Soxhlet	2 horas	37 °C
			4 °C
	H ₂ O ₂ 100 µM	15 minutos	37 °C
4	Extracto Liofilizado	2 horas	37 °C
			4 °C
	H ₂ O ₂ 100 µM	15 minutos	37 °C
			4 °C

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Optimización de la Implementación

Para la aplicación del ensayo del cometa en el laboratorio se probaron diversas variables que se consideraron críticas dependiendo de la fase del ensayo, en base al protocolo estándar para la versión alcalina del ensayo.

A su vez, los siguientes resultados muestran las condiciones en las que se realizó el ensayo del cometa con modificaciones al protocolo, adaptándolo a la realidad del laboratorio.

6.1.1. Fijación

Como en esta etapa es fundamental, según bibliografía, obtener muestras estables en portaobjetos para su posterior manipulación además de proveer una matriz que permita visualizar las células bajo microscopía con el menor ruido e interferencias posibles (Zúñiga, 2009), para este propósito se probaron diversas condiciones que pudiesen, eventualmente, afectar la adherencia del gel en los

portaobjetos y su perdurabilidad a través del tiempo, debido a que en los primeros ensayos de prueba se encontró que las muestras se desprendían fácilmente ante cambios bruscos de temperatura y la exposición al buffer de electroforesis de alta alcalinidad. Las variables consideradas fueron las siguientes:

6.1.1.1. Agarosa de punto de fusión normal NMP (*Normal Melting Point*)

En este caso, se hicieron pruebas a diferentes temperaturas para obtener la temperatura adecuada de recubrimiento sobre el portaobjetos y cuyos resultados se muestran en la tabla 6-1, en las que se determinó que la temperatura óptima de la agarosa para su siembra sobre el portaobjeto estaba entre los 60 y 55 °C, donde temperaturas más altas daban como consecuencia una rápida evaporación del agua y una morfología irregular de la agarosa sobre la superficie del portaobjetos, mientras que temperaturas bajo 55 °C mostraron dificultad en obtener una superficie uniforme en la siembra de la agarosa.

6.1.1.2. Agarosa de bajo punto de Fusión LMP (*Low Melting Point*)

Entre las variables consideradas en la agarosa de bajo punto de fusión se encontró que si bien su temperatura de gelificación es de entre 26-30°C, a temperaturas menores a 35°C, debido a que su densidad aumenta, empieza a

ser difícil su manipulación para la mezcla con las células. En este caso se optó mantener la agarosa de bajo punto de fusión a 37°C de manera constante en un baño maría, tanto la preparada como la mezclada con las células.

Tabla 6-1. Pruebas de siembra de agarosa sobre los portaobjetos. Los diferentes puntos de prueba fueron considerados en una disminución gradual de temperatura para determinar los efectos de la temperatura en la siembra.

Punto de prueba	T (°C)	Observaciones en agarosa sembrada
1	80	Capa líquida, evidenciando evaporación alta y dificultando siembra por extrema fluidez
2	70	Mayor consistencia en capa sembrada, pero de bordes irregulares, pero aun así se obtuvo una capa muy delgada
3	65	Mejor capacidad de manipulación de agarosa en la siembra.
4	60	Manipulación y fluidez de la agarosa aceptables. Capa sembrada de bordes regulares y firmes.
5	55	Capa de agarosa con las mismas características que en el punto anterior.
6	50	Menor fluidez para sembrar la agarosa sobre el portaobjetos. Capa sembrada muy gruesa y de superficie irregular.

6.1.1.3. Portaobjetos

a) Tipo de portaobjetos: para los ensayos se utilizó primero un modelo de portaobjetos convencional que produjo muchos problemas de adherencia con la agarosa durante la fase de Lisis y Electroforesis. En cambio, al probar con portaobjetos esmerilados se obtuvo una retención del gel correcta y estable a las concentraciones recomendadas por el protocolo, siendo esto consistente también con la literatura consultada (Hartmann et al., 2003).



b) Desengrasado de portaobjetos: ante el problema del desprendimiento se probaron métodos alternativos al desengrasado con alcohol puro, encontrándose que los portaobjetos desengrasados previamente con algún detergente comercial y luego secados con alcohol obtenían una adherencia más estable que los desengrasados solamente con alcohol puro.

El proceso de fijación es uno de los aspectos críticos que presenta mayor variabilidad, pues existen diversas formas y directrices de abordarlo dependiendo de los objetivos, número de muestras procesadas y soportes utilizados (Azqueta et al., 2013). Un reporte elaborado el año 2017 por Koppen y colaboradores acerca del 1th *International Comet Assay Workshop* mostró que hasta un 15% de

los participantes se encontraron con problemas de desprendimientos de geles, mostrando la frecuencia con que este problema se presenta al implementar el ensayo del cometa en diferentes laboratorios y que en el presente trabajo fue solucionado con un cambio de portaobjetos siguiendo las recomendaciones de literatura.

Así mismo, la concentración de agarosa de punto de fusión normal es fundamental para obtener un soporte robusto mientras que la concentración de agarosa de bajo punto de fusión afecta en el desplazamiento del ADN a través de dicha matriz, donde bajas concentraciones pueden dar como resultado matrices frágiles y altas concentraciones impiden la formación del cometa, afectando su sensibilidad (Azqueta et al., 2019). Con las concentraciones utilizadas por literatura, además de los aspectos ya comentados, no se obtuvieron posteriormente problemas prácticos significativos de preparación ni mantención.

6.1.2. Lisis

Para el caso del proceso de lisis se halló que los apartados sensibles estuvieron en la preparación de la solución stock de lisis, así como en sus condiciones de mantenimiento y el tiempo óptimo de exposición de las células al proceso en sí.

6.1.2.1. Mantenimiento del reactivo de lisis.

En este punto se encontró que la adición de DMSO previo al almacenamiento refrigerado a 4°C resultaba en la cristalización de la solución tanto a esa temperatura como a temperaturas más bajas. En tanto, se encontró que el almacenamiento de la solución stock sin DMSO y agregando este reactivo de forma fresca previo a la exposición de las células impedía la cristalización de la solución.



6.1.2.2. Tiempo de exposición de las células al proceso de Lisis celular.

El protocolo estándar otorgaba 1 hora de exposición de los linfocitos a la solución de Lisis a 4°C obligando a realizar el proceso en un solo día, sin interrupciones. Pero, según datos de literatura encontrados, la exposición de los linfocitos al proceso puede realizarse hasta 6 días sin evidenciar aumento de daño genotóxico (Hansen et al., 2018), no encontrándose impedimento para dejar los linfocitos en lisis durante la noche (14-18 horas) a 4°C para la realización de electroforesis al día siguiente del tratamiento de las muestras.

Con respecto al proceso de lisis hay diversos trabajos que han mostrado significativas modificaciones en este proceso, tanto en tiempo de incubación, condiciones de temperatura y pH dependientes del tipo celular y objetivos perseguidos con el ensayo en aquellas implementaciones (Enciso et al., 2018).

A pesar de ello, en este trabajo se optó por implementar la versión estándar del buffer de lisis y un mínimo de una hora de proceso dejando como alternativa la lisis nocturna, modalidad que suele resultar cómoda y válida en varias implementaciones (Koppen et al., 2018) y efectiva para poder dividir el proceso en dos pasos, además de presentar menor influencia en la validez del resultado final (Møller, P., 2018).



6.1.3. Electroforesis

En esta etapa de la optimización de la implementación se preparó inicialmente el tampón con agua destilada, pero se encontró que si bien se podía observar un desenrollamiento del material genético no se evidenciaba ningún desplazamiento de éste al someterse a la electroforesis cuando se verificaban, posteriormente, las muestras tratadas con control positivo (100 μM H_2O_2) al microscopio como se muestra en la Figura 6-1, además de presentar artefactos en su fondo. Al efectuar entonces una modificación y reemplazar el agua destilada con agua ultrapura

(Mili-Q) se encontró que el material genético migraba conforme a lo esperado formando un halo, además de presentar un fondo más claro y uniforme.

Una posible explicación a este fenómeno puede deberse a que la presencia de iones y residuos interfiere en la conductividad del agua y, por tanto, en la eficacia de la electroforesis al modificar el gradiente de voltaje del tampón, que a su vez se relaciona con la magnitud de la cola del cometa (Koppen et al., 2017).

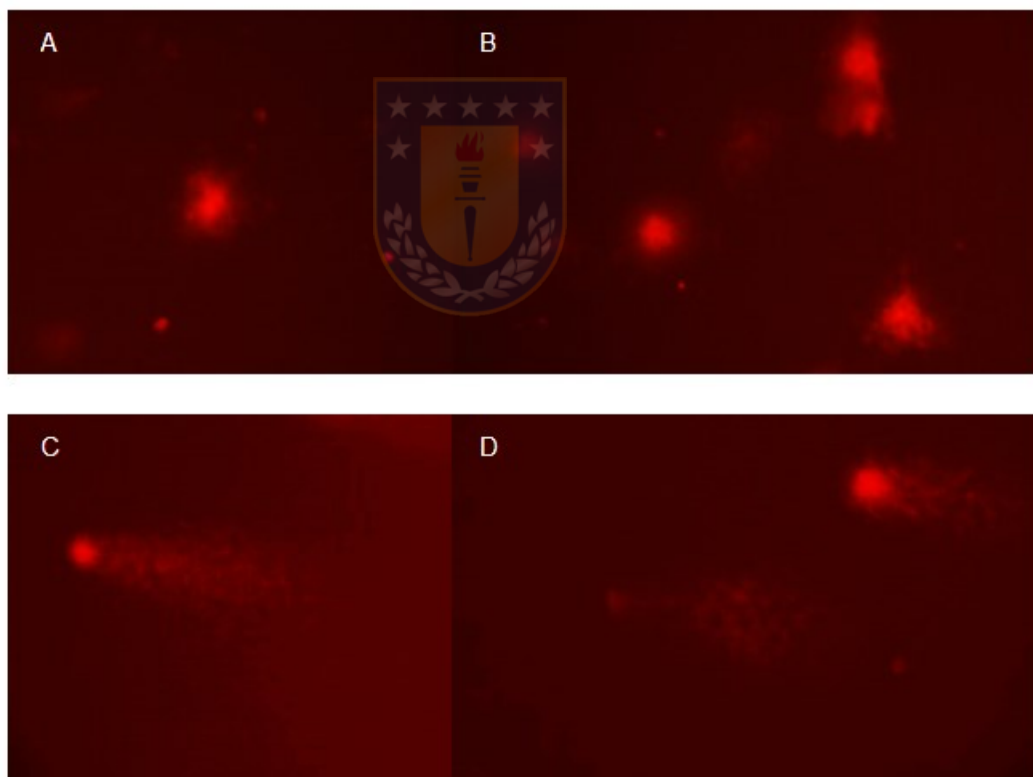
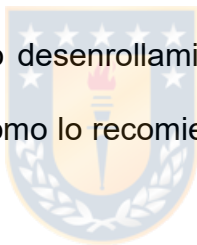


Figura 6-1. Efecto del cambio de componentes en el tampón de electroforesis con respecto al desplazamiento del material genético en muestras de Linfocitos expuestas a H_2O_2 100 μ M. A y B: Tratamiento con tampón preparado en agua destilada. C y D: Tratamiento de tampón preparado con agua ultrapura. Fotografías de microscopía de fluorescencia a 40 X.

Además, tradicionalmente se ha relacionado al pH de la solución de electroforesis con el desenrollamiento de la hebra de ADN y el tiempo necesario de incubación en el tampón para resultados óptimos, así como la relación entre diferencias de tensión en el buffer de electroforesis y la eficacia del ensayo (Azqueta et al., 2011), pero el análisis exhaustivo de dichas discusiones y planteamientos escapan a los objetivos del presente trabajo.

Por lo tanto, para efectos prácticos, se dejó un tiempo de tratamiento alcalino de 40 minutos para un correcto desenrollamiento del ADN y electroforesis de 20 minutos a 300 mA y 25 V, como lo recomienda el protocolo estándar (*Molecular toxicology protocols*, 2005).



6.1.4. Tinción y visualización

Para elegir el reactivo cromóforo se consultó en literatura cuáles podrían ser los más indicados y, considerando su disponibilidad en nuestro medio, se eligió Yoduro de Propidio que a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostró ser insuficiente para el contraste y definición de los núcleos. Por ello, se probaron concentraciones crecientes de cromóforo, encontrándose una definición y contraste óptimos entre 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 6-2). Esta observación es

compatible a la vista por Olive y col., donde bajas concentraciones de cromóforo afectaban a la detección de cometas (Olive et al., 1990).

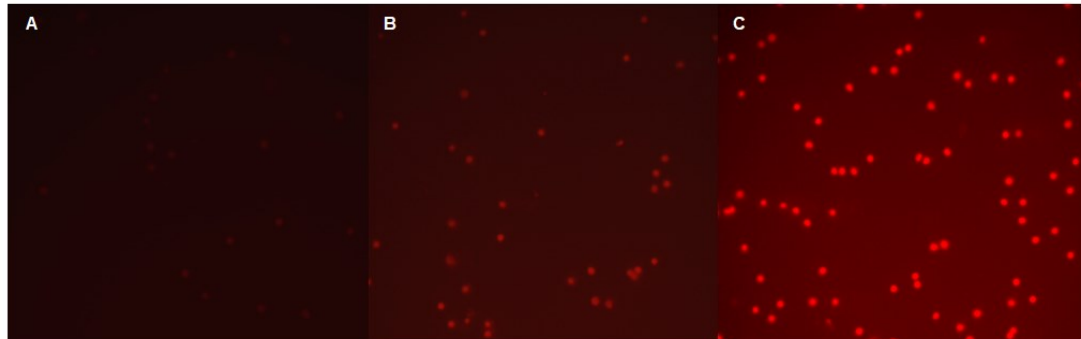


Figura 6-2. Efecto de la concentración de cromóforo en la visualización de los núcleos sin genotoxicidad en microscopía de fluorescencia. En A, muestra teñida a 10 µg/mL. En B, muestra teñida a 50 µg/mL. En C, muestra teñida a 100 µg/mL. Aumento a 10x.

6.1.5. Análisis de datos.

En el caso del análisis de datos para el ensayo del cometa se encontró en literatura la existencia de diversos indicadores de genotoxicidad, siendo la medición del porcentaje de ADN en la cola la más recomendada en diversas publicaciones por ser fácilmente interpretable al correlacionarse visualmente con el tamaño de cola de los cometas observados y también mostrar una proporcionalidad directa con la cantidad de ADN dañada (Kumaravel T., y Awadhesh N., 2006), lo que hace a este indicador comparativamente más

robusto dadas las condiciones de implementación variadas entre los laboratorios que pueden impactar en mayor medida otros indicadores utilizados como la longitud de la cola o el momento de cola.

6.1.5.1. Método de cuantificación del daño genotóxico.

Existen dos clasificaciones para determinar el daño genético en el ensayo del cometa: el método de puntuación visual, donde se clasifican los cometas observados dependiendo del largo de la cola en 5 categorías (Sin daño, daño bajo, daño medio, daño alto y daño muy alto, como se muestra en la figura 6-3), y otro donde se realiza un análisis de imágenes por software donde se obtiene información más detallada de la forma, longitud y cantidad de ADN dañado con estimaciones más precisas y parámetros cuantificables.

El consenso general (Hartmann et al., 2003) y la preferencia actual de los equipos de investigación (Burlinson et al., 2007) es decantarse por el uso de análisis de imágenes, aunque el método de puntuación visual tiene la ventaja de ser más económico y rápido de implementar, pero con la salvedad de requerir pericia y estar sujeto a subjetividades del observador (*Molecular toxicology protocols*, 2005).

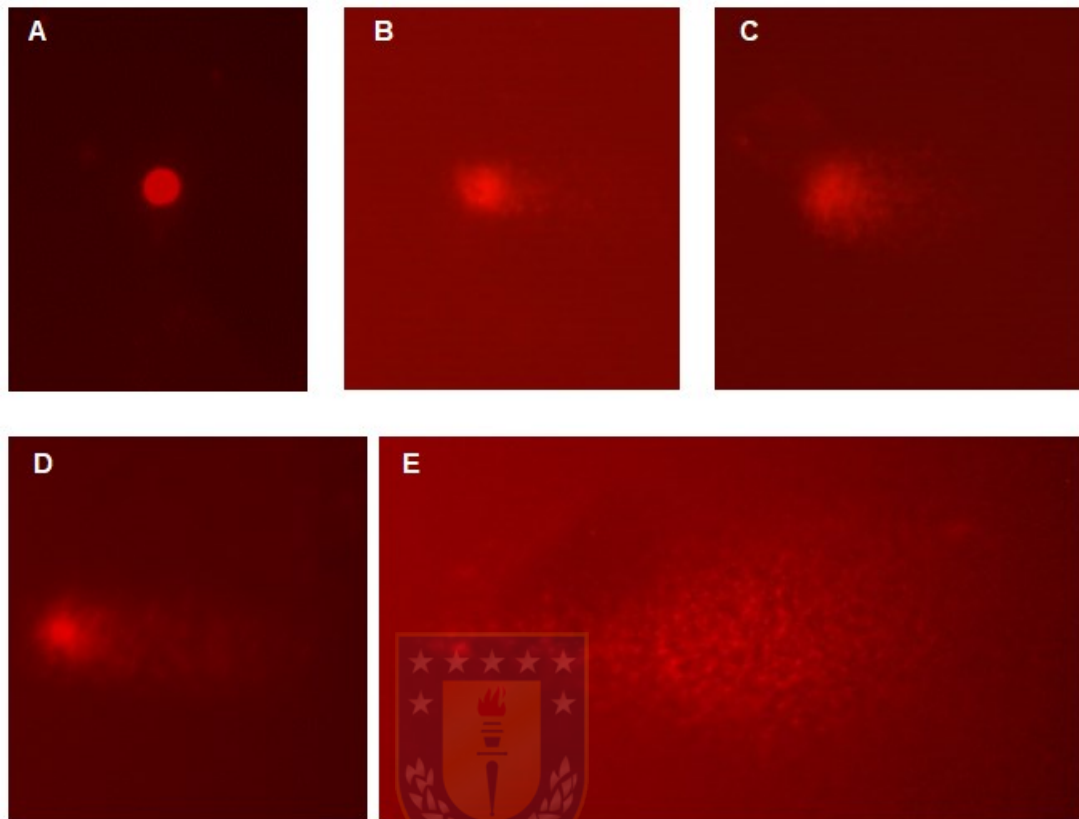


Figura 6-3. Clasificación visual de los cometas. En A tenemos un núcleo sin daños, en B un núcleo con daño bajo, en C, núcleo con daño medio, en D un núcleo con daño alto y E un núcleo con daño muy alto y de denominación fantasma o erizo. Aumento de 100x y editado por software.

De todas formas, existe una correlación entre ambos métodos, lo que es útil para la interpretar los datos con mayor facilidad al encontrarse literatura como la ilustrada por García et al., 2007, que equipara los intervalos de porcentaje de ADN en la cola con las categorías de puntuación manual, como se muestra en la Tabla 6-2.

Tabla 6-2. Correlación entre los grupos de puntuación visual y el porcentaje de ADN en la cola. Adaptada de García et al., 2007.

Intervalo de % de ADN en la cola	Grupo de puntuación manual
[0 - 5]	<i>Grado 0 (Sin daños)</i>
[6 - 25]	<i>Grado 1 (Daño bajo)</i>
[26 - 45]	<i>Grado 2 (Daño medio)</i>
[46 - 70]	<i>Grado 3 (Daño alto)</i>
[71 - 100]	<i>Grado 4 (Daño muy alto)</i>



6.1.5.2. Elección del control positivo

Para elegir el control positivo se consultó en literatura sobre reactivos usados para generar genotoxicidad en células sanguíneas con mayor frecuencia, siendo el peróxido de hidrógeno en diversas concentraciones y tiempos de incubación uno de los más utilizados debido a su capacidad de generar daño genotóxico (Taddei et al., 2001) y que también ha sido probado en estudios de potencial de antimutagenicidad de varios extractos de plantas (Gafrikova et al., 2014).

Elegido el genotóxico de referencia y una vez implementado el ensayo en el laboratorio se procedió a realizar un ensayo de calibración donde se probaron 4

concentraciones de H₂O₂ (50, 100, 250 y 500 μM) como posibles controles positivos a un tiempo de exposición de 10 minutos por muestra.

De las 4 concentraciones la muestra tratada con H₂O₂ 500 μM mostró tal destrucción de material genético que fue imposible contar suficientes núcleos (60 por portaobjeto), por lo tanto, este valor fue descartado de los resultados.

De las 3 concentraciones de H₂O₂ restantes 250 μM dio como resultado un promedio más desviación estándar de 74,774 ± 7,746 % de ADN en la cola, un valor cercano al límite de lo cuantificable pues porcentajes mayores a 80 % son considerados núcleos “Erizos” o “Fantasmas” (Koppen et al., 2017) y estarían representando un indicador de muerte celular o apoptosis según algunos investigadores, indicador que equivale al grado 4 de la escala de puntuación visual.

Debido a que la interpretación de estos valores como indicadores de muerte celular o apoptosis es discutida (Como se muestra en los trabajos publicados por Lorenzo et al., 2013 o Matsuyama et al., 2018, entre otros) no se adoptó este valor como control positivo. Una muestra de la apariencia de estos núcleos a la inspección visual se muestra en la figura 6-4.

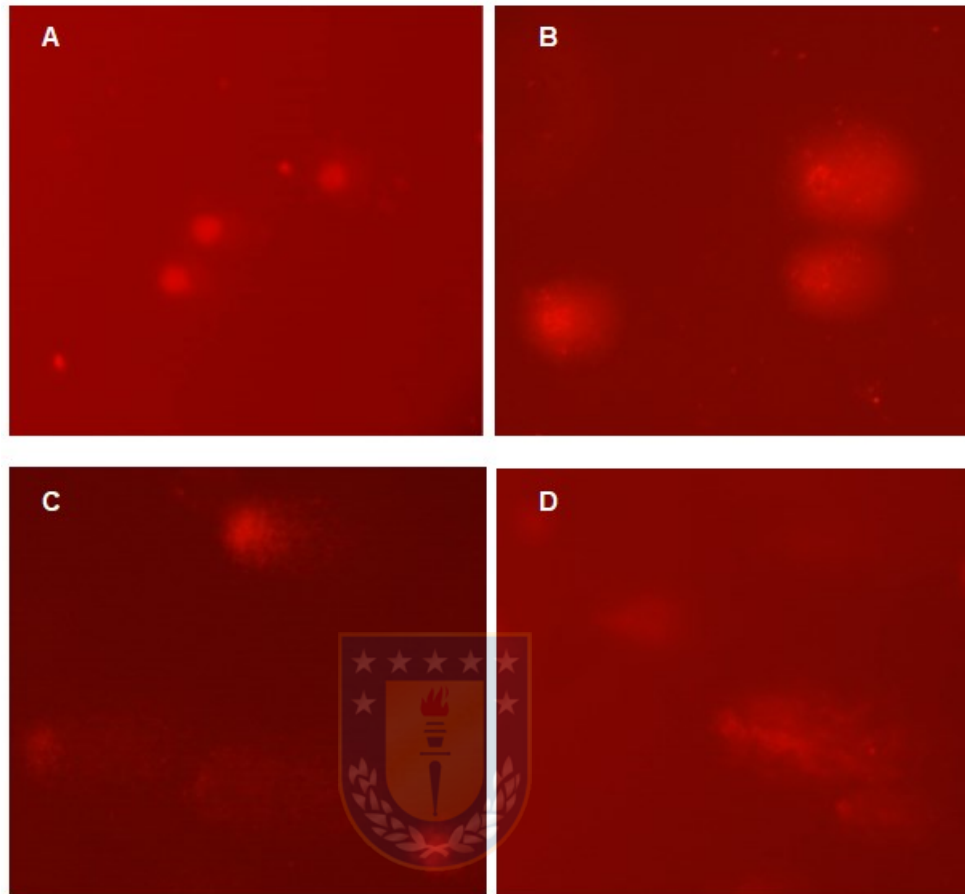


Figura 6-4. Apariencia de los núcleos tratados con los candidatos a controles positivos en orden creciente de concentración. En A: tratamiento con 50 μM H_2O_2 . En B: tratamiento con 100 μM H_2O_2 . En C: tratamiento con 250 μM de H_2O_2 . En D: tratamiento con 500 μM H_2O_2 . Aumento de 40x ampliado por software.

En cambio, la concentración de H_2O_2 100 μM dio un valor de $59,093 \pm 6,884$ % de ADN en la cola, un valor correspondiente al grado 3 de la puntuación visual (Daño alto) que evidencia un grado de genotoxicidad considerable en comparación con la concentración de H_2O_2 50 μM que mostró solamente un nivel de daño medio ($32,118 \pm 10,836$ % de ADN en la cola), por lo que se optó como

control positivo la concentración de 100 μM . Un resumen de estos resultados se presenta en la figura 6-5. En tanto, para el control negativo se optó por células en contacto con PBS, para las cuales, según directrices actuales, se aceptan valores de porcentaje de ADN en la cola de hasta 8-10% en linfocitos de sangre periférica (Azqueta et al., 2019).

La implementación física del método en el laboratorio estuvo sujeta a factores como disponibilidad de materiales y reactivos, espacio de trabajo, condiciones de temperatura y estabilidad de las muestras, las cuales permitieron obtener resultados en base a la correcta observación de las muestras. Debido a las diferencias de implementación en múltiples laboratorios, la información bibliográfica fue fundamental para llegar a resultados aceptable y acordes a las actuales recomendaciones dentro de lo posible. Algunas directrices más avanzadas, como el uso de un voltímetro en el buffer para medir la gradiente de voltaje de forma más exacta o uso de estándares comerciales, entre otras medidas recomendadas, no fueron usadas en este experimento debido a las limitaciones de tiempo y presupuesto del laboratorio pero, en general, las variables que afectan más a la reproducibilidad del ensayo como son el tipo y concentración final de agarosa, el tiempo de lisis, el período de tratamiento alcalino, el tiempo de electroforesis, el método de tinción y la puntuación de los cometas fueron debidamente estudiadas y analizadas.

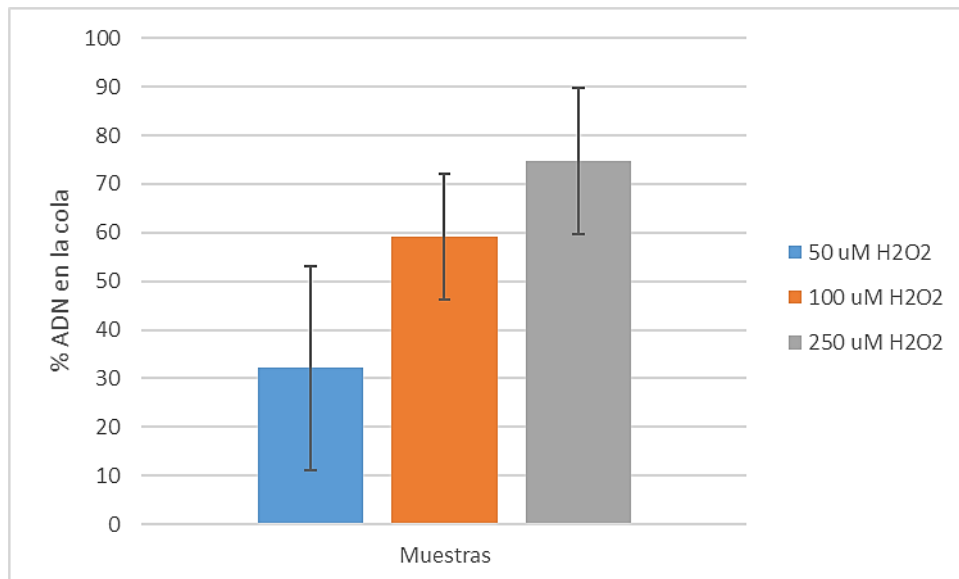


Figura 6-5. Comparación entre los valores de candidatos a controles positivos (Diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno).

6.2. Determinación de la capacidad genotóxica del extracto de Boldo y sus componentes.

6.2.1. Extractos completos

El estudio de los extractos completos de *Peumus boldus* en los linfocitos mostró comportamientos genotóxicos diferentes dependiendo de la naturaleza de extracción. Un resumen de las medias y de las diferencias significativas con respecto a los controles se puede observar en la tabla 6-3.

Tabla 6-3. Resumen comparativo de los porcentajes de ADN en la cola de las muestras de linfocitos expuestas a extractos de Boldo completo junto a sus desviaciones estándar. Las diferencias estadísticamente significativas en comparación de los controles se realizaron utilizando el Test-t entre la media de la muestra indicada y con el valor $p < 0,05$ como nivel de significancia significativa y $p < 0,001$ como nivel de significancia muy significativa. $n = 60$ núcleos por portaobjeto.

Extractos	Media % ADN en la cola \pm DE	Diferencia significativa Control +	Diferencia significativa Control -
Control -	1,876 \pm 2,933	-	-
Control +	64,231 \pm 9,563	-	-
Liofilizado 1	25,514 \pm 6,229	< 0,001	< 0,001
Liofilizado 2	23,537 \pm 8,516	< 0,001	< 0,001
Liofilizado 3	24,626 \pm 9,831	< 0,001	< 0,001
Soxhlet 1	2,239 \pm 4,203	< 0,001	0,291
Soxhlet 2	2,830 \pm 5,224	< 0,001	0,080
Soxhlet 3	2,441 \pm 3,992	< 0,001	0,126

Para el extracto por método Soxhlet se encontró que tras 2 horas de exposición a 4°C las 3 muestras de linfocitos cultivados con el extracto mostraron un promedio de porcentaje de ADN en la cola y desviación estándar similares al control negativo, solo evidenciando diferencias significativas con respecto al control positivo de linfocitos tratados 5 minutos con H₂O₂ 100 μ M como se detalla en la figura 6-6.

Al comparar las medias de las muestras entre sí por medio de ANOVA no se encontraron diferencias significativas entre sus medias ($p = 0,722$) ni entre ellas comparadas por test- t con el control negativo.

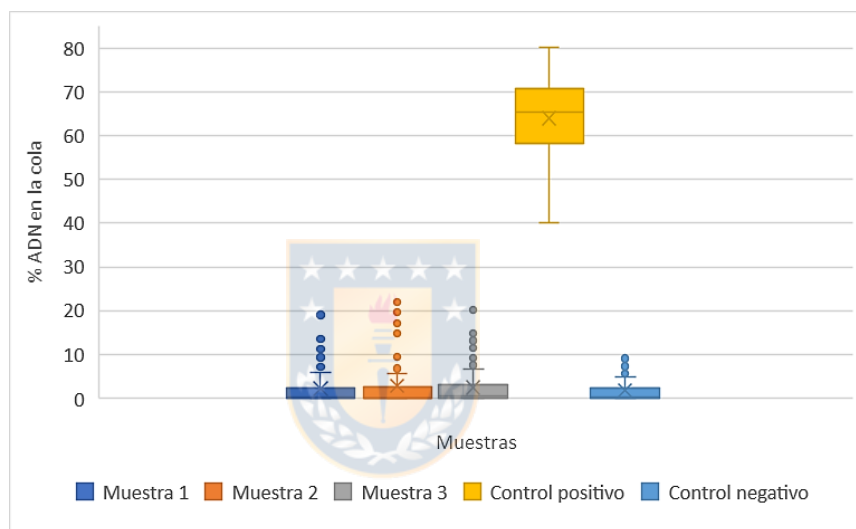


Figura 6-6. Comportamiento de cultivos con linfocitos al extracto de Boldo completo por método Soxhlet. En los gráficos, el símbolo x representa el valor promedio de cada muestra.

Para el caso del extracto obtenido por liofilización, a las 2 horas de tratamiento los resultados promedio de porcentaje de ADN en la cola junto a las desviaciones estándar de las muestras 1, 2 y 3 fueron de $25,514 \pm 6,229$, $23,537 \pm 8,516$ y $24,626 \pm 9,831$ %, respectivamente, siendo estos promedios similares entre sí,

pero evidenciando a su vez diferencias estadísticamente significativas tanto con el promedio de porcentaje de ADN en la cola del control positivo como del negativo (Figura 6-7) así como también en su aspecto visual en comparación con el extracto Soxhlet acuoso (Figura 6-8). Debido a que los valores presentados en la prueba de Levine mostraron desigualdad de varianzas ($p = 0,006$) se realizó la prueba de Welch donde se demostró que no había diferencias significativas entre las medias ($p = 0,306$). Los valores de los controles positivo y negativo utilizados son los mismos que en el caso del extracto Soxhlet, pues las pruebas con ambos extractos se realizaron en paralelo.



Una explicación a este comportamiento puede deberse a la presencia, en mayor proporción, de compuestos volátiles en el extracto como los presentes, por ejemplo, en el aceite esencial donde se encuentran productos como el ascaridol, compuesto endoperóxido de conocidas propiedades antihelmínticas que exhibe, además de toxicidad mitocondrial (Cassels et al., 2019), actividad genotóxica en células que presentan deficiencias en las vías reparativas del ADN actuando mediante daño oxidativo (Abbasi et. Al, 2012), y que debido a su naturaleza volátil se encuentra en mayores concentraciones en el extracto completo liofilizado, si bien para verificar tal afirmación se deben hacer pruebas de genotoxicidad más detalladas que escapan de los objetivos de este trabajo.

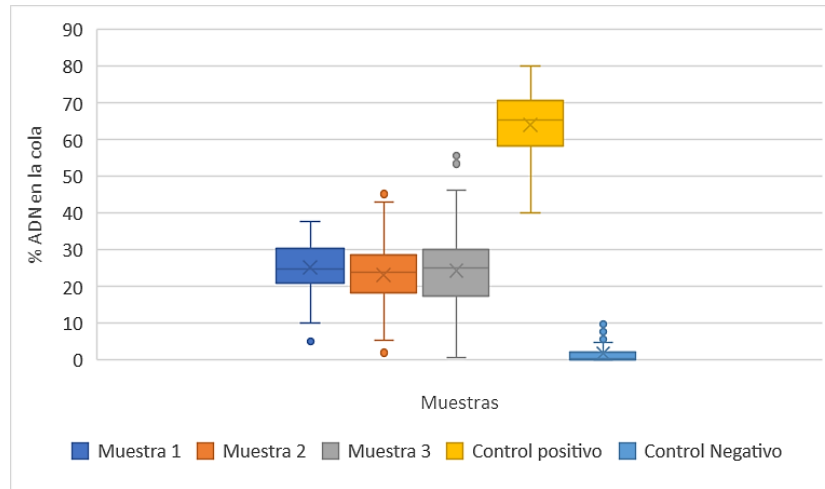


Figura 6-7. Comportamiento de cultivos de linfocitos expuestos al extracto de Boldo obtenido por Liofilización. En los gráficos, el símbolo x representa el valor promedio de cada muestra.

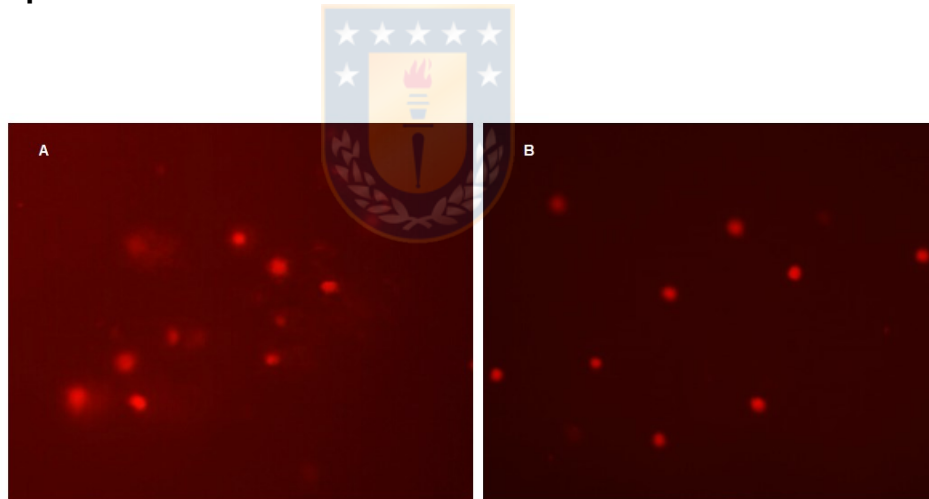
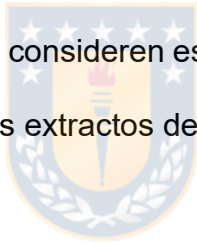


Figura 6-8. Comparación entre linfocitos tratados con extracto Soxhlet y extracto liofilizado. Se observa la muestra tratada con extracto Liofilizado (A) contra la muestra tratada con extracto Soxhlet (B) a un aumento 10x recortado por software.

Aunque el contraste en los efectos de ambos extractos en el material genético es significativo y, si bien el extracto liofilizado exhibe un comportamiento en apariencia más genotóxico que el extracto acuoso su caracterización según la

escala de daño en el ADN en base al porcentaje de ADN en la cola entra en el grupo 2, de daño bajo a medio. Este tipo de daño, en realidad, si bien es referencial para estar al tanto del grado de roturas y lesiones genotóxicas que produce una determinada sustancia en el ADN no establece, en general, que produzca necesariamente un daño notorio a posteriori. Lesiones en el ADN que han producido erizos con un porcentaje de ADN en la Cola mayor al 70% han evidenciado una reparación prácticamente total en estudios anteriores como los efectuados por Collins et al. en el 2004 y Lorenzo et al. en 2013; por tanto, si bien existe un daño bajo en el ADN por parte de los extractos liofilizados se necesitan mayores investigaciones que consideren estudios de reparación y otros modelos celulares para caracterizar los extractos debidamente.



6.2.2. Alcaloides

Para determinar el comportamiento de los linfocitos a los alcaloides del Boldo, cuyo resumen gráfico se muestra en la figura 6-9, se expusieron 3 cultivos diferentes durante 2 horas a dichos extractos en 3 concentraciones decrecientes: 1160 mg/L, 580 mg/L y 290 mg/L, dando como resultado un porcentaje de ADN en la cola con su respectiva desviación estándar de $30,880 \pm 10,330$, $30,464 \pm 12,733$ y $28,393 \pm 9,438$ %, respectivamente, en tanto, el grupo control negativo con PBS mostró un porcentaje de ADN en la cola de $3,752 \pm 3,954$ % y el control

positivo con H₂O₂ 100 μM un 64,012 ± 9,838 %, siendo estos porcentajes similares entre los 3 grupos experimentales pese a que existió una leve disminución del porcentaje de ADN en la cola dependiente de la concentración, si bien posteriormente se comprobó mediante análisis de datos que estas diferencias no eran estadísticamente significativas al compararse las medias de los grupos de muestras tratadas con extractos alcaloides entre sí a través de las pruebas paramétricas de ANOVA para el grupo de muestras (p = 0,449) y la prueba de Tukey para comparar pares de medias, cuyos resultados se resumen en la tabla 6-4. En tanto, las concentraciones decrecientes de fracciones alcaloides mostraron diferencias muy significativas de ellos con las medias de porcentaje de ADN en la cola de los controles positivo y negativo.

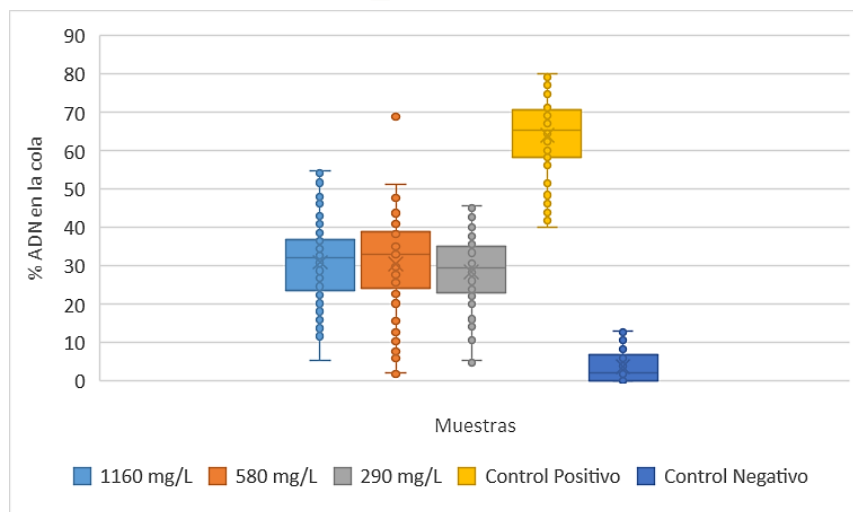


Figura 6-9. Efecto de extractos alcaloides de Boldo en linfocitos. En los gráficos de caja el símbolo x representa el valor promedio de cada muestra, donde las cajas de celeste, naranja y gris son muestras tratadas con diferentes concentraciones de fracciones alcaloides del extracto de Boldo. Control positivo: H₂O₂ 100 μM. Control negativo: PBS.

Tabla 6-4. Prueba de Tukey para las medias de porcentajes de ADN en la cola a los grupos de linfocitos expuestos a diferentes concentraciones de extractos de alcaloides de Boldo. El nivel de significancia de dicha prueba es de $p < 0,05$.

Grupo 1	Grupo 2	Valor p
1160 mg/L	580 mg/L	0,998
1160 mg/L	290mg/L	0,491
580 mg/L	290mg/L	0,750

En base a los resultados obtenidos cuantitativamente con los valores medios de porcentaje de ADN en la cola y, unidos al análisis visual al contrastarlos con los núcleos de los controles negativo y positivo, como se muestra en la figura 6-10, estos extractos reflejan un comportamiento genotóxico un poco más elevado al compararlos con el caso de los extractos de Boldo liofilizados, siendo los primeros agrupados en la categoría de daño medio al ADN además de presentar una desviación estándar de $\pm 10\%$ en promedio, lo que indica un comportamiento similar a tales concentraciones que puede atribuirse a la alta concentración de alcaloides aporfínicos entre los que se encuentra la Boldina.

Este compuesto, ampliamente estudiado en los últimos años, destaca por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias descritas en numerosas investigaciones (como las realizadas por O'Brien et al., 2006) y reafirmadas por

estudios tan recientes como los informados por Boeing et al. en 2020, pero también se han descrito algunas publicaciones donde se deja entrever que existe un umbral a partir del cual el efecto antioxidante se invierte y se origina un efecto prooxidante debido a la formación de ROS (Muthna et al., 2013) además de presentar un efecto injuriante sobre las topoisomerasas y citotóxico a concentraciones promedio de 50 mg/L que puede ser desencadenado por este mecanismo (Kazemi et al., 2015).

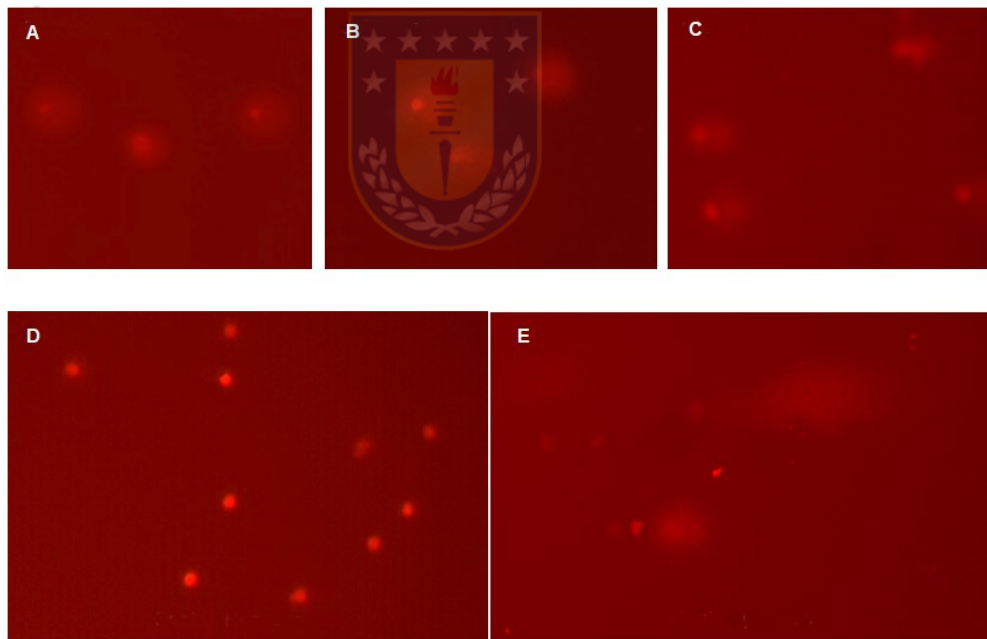


Figura 6-10. Nucleoides de linfocitos fotografiados después de ser tratados con concentraciones crecientes de extracto de alcaloides del Boldo. A, B y C concentraciones de extracto alcaloide de 1160 mg/L, 580 mg/L y 280 mg/L, respectivamente. Control negativo D, tratado con PBS; control positivo E, tratado con H₂O₂ 100 μM.

Por otro lado, trabajos como los de Cassels et al. muestran que alcaloides como la Boldina, entre otros, presentan actividad débilmente intercalante del ADN, efecto que a altas concentraciones puede reforzar el efecto genotóxico descrito, pero se necesitan mayores investigaciones para poder llegar a afirmaciones más concluyentes. Asimismo, el daño que presenta la fracción alcaloide está en un nivel medio según la clasificación de puntuación visual, lo que describe un comportamiento medianamente genotóxico y proclive a ser reversible, por lo que se requieren estudios de genotoxicidad más profundos que incluyan reparación de ADN para conocer de forma concluyente el alcance del efecto genotóxico de los alcaloides en Boldo en el material genético humano.



6.2.3. Polifenoles

El comportamiento de los cultivos de linfocitos a los extractos polifenólicos del Boldo después de 2 horas de tratamiento se probó sometiendo a las células a 3 concentraciones decrecientes de extractos tal y como, en el caso de los Alcaloides, como se resume en la figura 6-11, siendo estas concentraciones de 3890 mg/L, 1945 mg/L y 972,5 mg/L las que dieron como resultado medias con desviaciones estándar de $4,784 \pm 9,585$, $2,026 \pm 4,887$ y $1,970 \pm 3,269$ % respectivamente, más el grupo control negativo con PBS que mostró un porcentaje de ADN en la cola de $1,729 \pm 2,893$ % y el control positivo de H₂O₂

100 μM , lo que dio como resultado un $64,454 \pm 9,363 \%$, evidenciándose un porcentaje de ADN en la cola levemente más alto en los linfocitos expuestos al extracto concentrado de polifenoles con respecto a los demás grupos, pero aun así muy lejano al efecto que ejerce el peróxido de hidrógeno 100 μM .

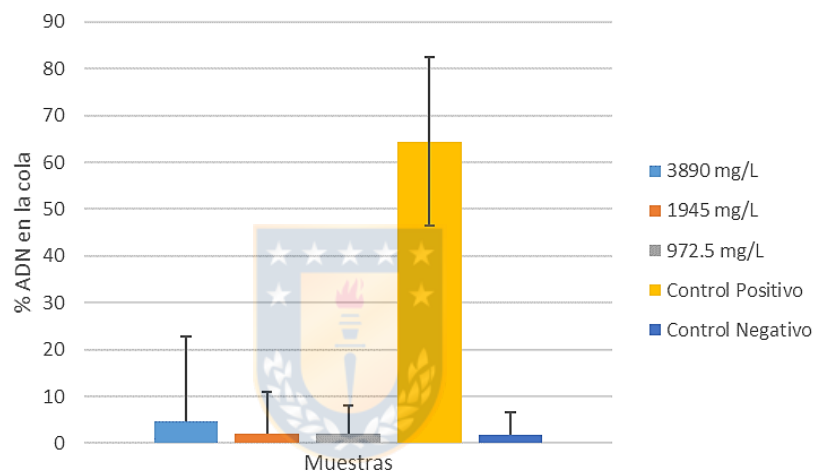
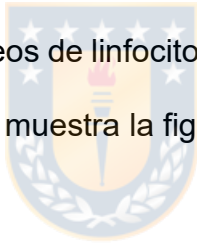


Figura 6-11. Comportamiento de linfocitos expuestos a concentraciones decrecientes de polifenoles durante dos horas de tratamiento. Control positivo: H_2O_2 100 μM . Control negativo: PBS.

Los datos de este grupo de muestras mostraron una diferencia significativa en las varianzas de las medias de los grupos (valor $p < 0,05$ en la prueba de Levene), por tanto se procedió a utilizar la prueba de Welch para comparar las medias de los grupos experimentales y la prueba *post-hoc* de Games-Howell para las medias de porcentajes de ADN en la cola de las diferentes muestras con respecto a los controles, lo que evidenció, como se muestra en la tabla 6-5, que a

diferencia del caso anterior la media del porcentaje de ADN en la cola comparado entre los grupos experimentales no tuvo diferencias significativas como tampoco éstos contra el control negativo con la sola excepción del grupo de linfocitos tratados con el extracto polifenólico más concentrado, que posee una diferencia de medias estadísticamente significativa con los demás grupos experimentales pero de poca relevancia genotóxica, pues el porcentaje de daño de todos los grupos entra en la misma clasificación (Grupo 0, sin daño apreciable). Estos resultados revelan que incluso a grandes concentraciones no se evidencia un efecto genotóxico apreciable, así como tampoco diferencias sustanciales en la inspección visual de los núcleos de linfocitos expuestos a los 3 extractos estando prácticamente intactos como muestra la figura 6-12.



Si bien en reportes previos se describen efectos potencialmente tóxicos a ingestas muy altas de compuestos fenólicos, como actividad prooxidante y toxicidad mitocondrial similares a los descritos para la boldina (Galati, G. y O'brien, P. J., 2004), en este experimento, incluso a concentraciones superiores a las terapéuticas, no se manifiesta afección apreciable al material genético, pudiendo ser estas sustancias las responsables, así mismo, del comportamiento de los extractos acuosos que presentan un gran porcentaje de compuestos polifenólicos contrarrestando los posibles efectos genotóxicos que compuestos alcaloides y monoterpénicos, como los descritos en los aceites esenciales, puedan presentar.

Tabla 6-5. Comparación de las medias de porcentaje de ADN en la cola entre los grupos experimentales de extractos polifenólicos y el control negativo con PBS mediante la prueba *post-hoc* de Games-Howell para grupos de datos con varianzas desiguales. Las concentraciones de las muestras son: Muestra 1 = 3890 mg/L, Muestra 2 = 1945 mg/L y Muestra 3 = 972,5 mg/L. Los valores mostrados con * representan los valores con diferencias estadísticamente significativas.

Grupo 1	Grupo 2	Valor p
Muestra 1 (4,784 ± 9,585 %)	Muestra 2 (2,026 ± 4,887 %)	0,010212832 *
Muestra 1 (4,784 ± 9,585 %)	Muestra 3 (1,970 ± 3,269 %)	0,004184951 *
Muestra 1 (4,784 ± 9,585 %)	C. Negativo (1,729 ± 2,893 %)	0,002589699 *
Muestra 2 (2,026 ± 4,887 %)	Muestra 3 (1,970 ± 3,269 %)	0,999938249
Muestra 2 (2,026 ± 4,887 %)	C. Negativo (1,729 ± 2,893 %)	0,969648043
Muestra 3 (1,970 ± 3,269 %)	C. Negativo (1,729 ± 2,893 %)	0,96772006

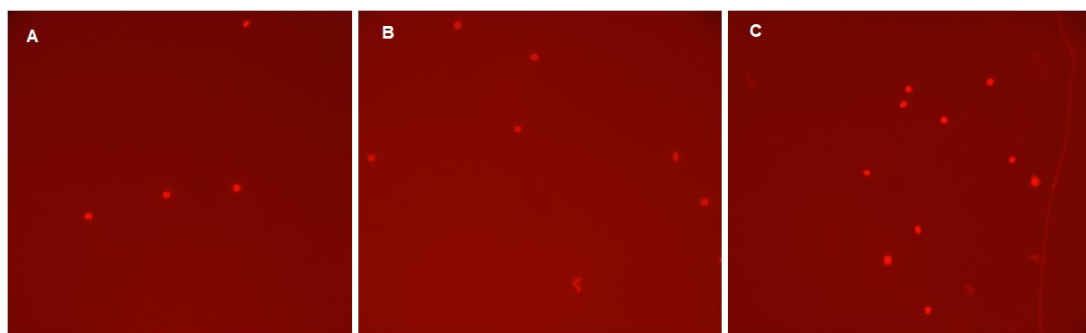


Figura 6-12. Inspección visual de los núcleos de linfocitos expuestos a extractos de fracción polifenólica del Boldo por medio de microscopía de fluorescencia. En A, B y C se muestran las concentraciones de extracto polifenólico 3890 mg/L, 1945 mg/L y 972,5 mg/L, respectivamente. Aumento 10x, amplificado por software.

6.3 Estudio de la capacidad genoprotectora de los extractos de *Peumus boldus* en linfocitos previamente expuestos a H₂O₂ 100 µM.

6.3.1. Exposición de linfocitos a extractos Soxhlet y liofilizado

La exposición de los linfocitos tratados previamente con peróxido de hidrógeno 100 µM a extractos Soxhlet y liofilizado se puede ilustrar en la figura 6-13, donde se logra apreciar una disminución de los valores altos de porcentaje de ADN en la cola presentes en el control positivo a niveles similares a los mostrados en linfocitos sin tratar y expuestos a los mismos extractos, exhibiendo comportamientos similares tanto a la temperatura experimental de 4°C como a la temperatura fisiológica de 37°C, encontrándose también patrones de desviación estándar relativamente estables a ambas temperaturas, lo que se consideran resultados positivos dentro de los valores permitidos para éste tipo de experimento, donde el extracto acuoso disminuye los valores de genotoxicidad a niveles comparables con el control negativo con una significancia alta ($p < 0,05$).

El único valor que se escapa de la tendencia es el resultado del extracto liofilizado a 4°C que exhibe un comportamiento correspondiente a la clasificación de daño alto (Grupo 3) en comparación al resto de nucleoides que, en condiciones

similares, registraron una clasificación de daño medio (Grupo 2) como se evidencia en la tabla 6-6.

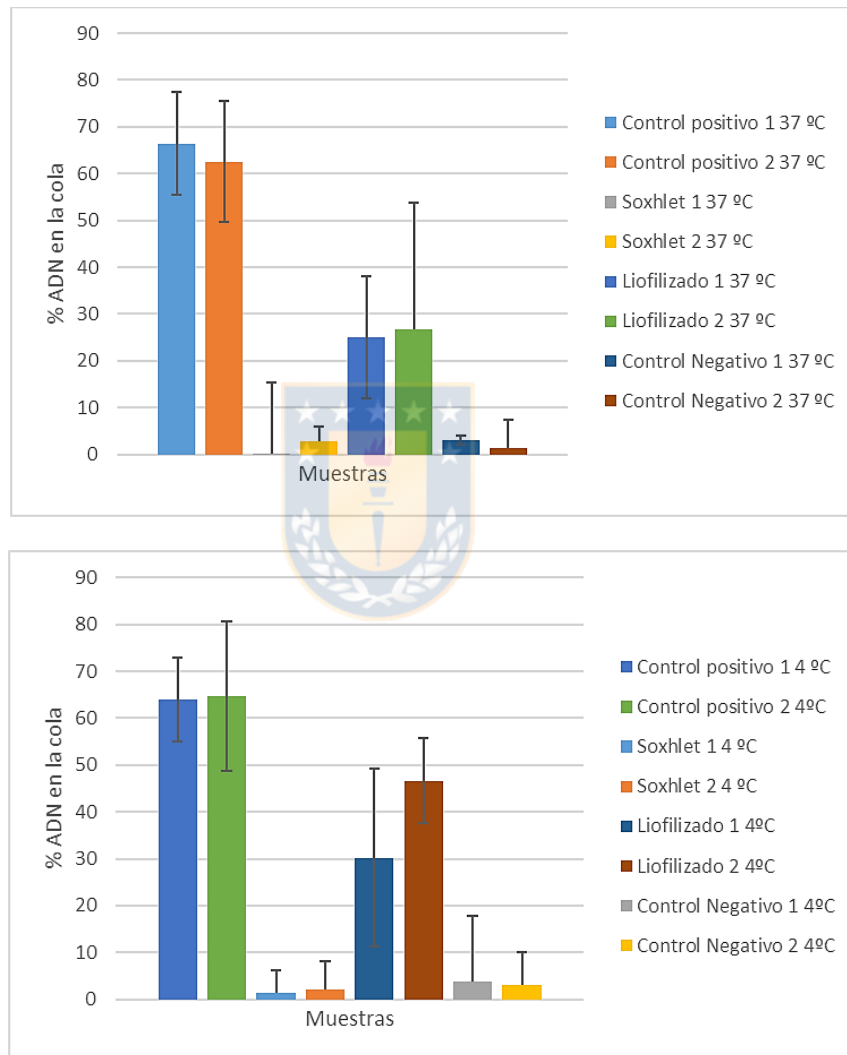


Figura 6-13. Comportamiento genoprotector del extracto Soxhlet al exponer linfocitos tratados con peróxido de hidrógeno 100 μ M. Control positivo: H₂O₂ 100 μ M. Control negativo: PBS. Gráfico superior: comportamiento genoprotector a 4°C. Gráfico inferior: Comportamiento genoprotector a 37°C.

Tabla 6-6. Valores de porcentaje de ADN en la cola entre las pruebas a 37°C y 4°C con sus respectivas desviaciones estándar a una confianza del 95 %.

Muestra	Nº Prueba	37°C	4°C
Control Negativo	1	2,950 ± 7,774	3,762 ± 7,332
	2	1,290 ± 1,814	3,016 ± 3,650
Control Positivo	1	66,445 ± 5,790	63,914 ± 4,827
	2	62,586 ± 6,790	64,744 ± 8,238
Extracto Soxhlet	1	0,251 ± 0,817	1,305 ± 2,705
	2	2,898 ± 3,371	2,046 ± 3,412
Extracto Liofilizado	1	25,027 ± 6,995	30,193 ± 9,712
	2	26,749 ± 13,992	46,624 ± 4,640

Estos valores revelaron que a diferentes temperaturas de cultivo el comportamiento de los linfocitos frente a los extractos es similar, lo que puede indicar que a temperaturas de menor actividad metabólica el efecto protector antioxidante se mantiene (Anderson et al., 1997). Esto también se ve confirmado por la inspección visual, en donde no se encontraron grandes diferencias en la morfología de los núcleos de células expuestas a los mismos agentes pero a diferentes temperaturas, como se muestra en la figura 6-14. En consecuencia, los resultados obtenidos desde este experimento son compatibles con una potencial actividad genoprotectora de los extractos completos, aunque las vías por las que esto pudiera darse no han sido claramente establecidas.

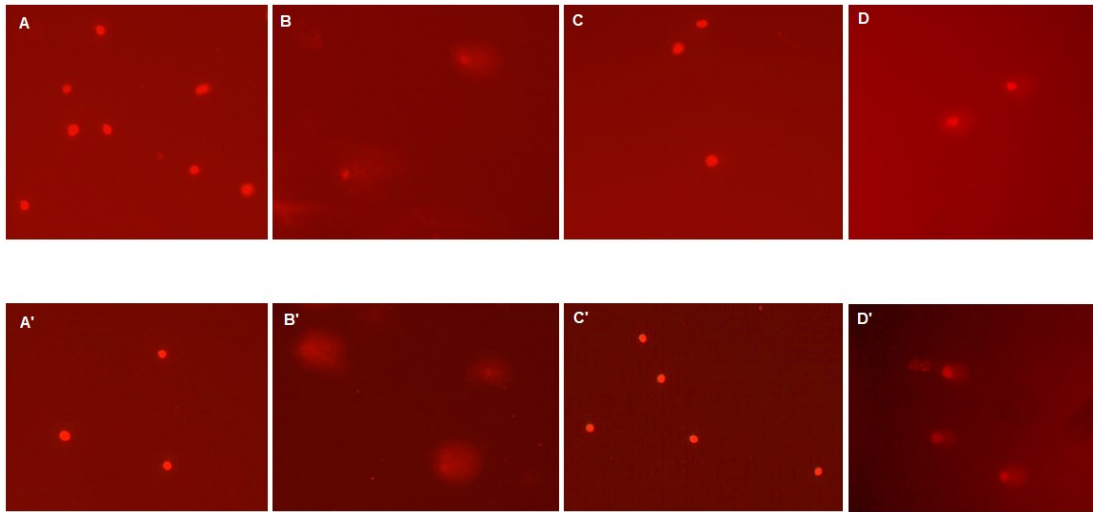


Figura 6-14. Ensayo del cometa para linfocitos que fueron expuestos a extractos de boldo luego de sufrir estrés oxidativo por exposición previa a H_2O_2 100 μM . Los linfocitos cultivados a 37°C se muestran como mayúsculas normales y los cultivados a 4°C con una prima (‘), teniendo entonces A y A’ núcleos de linfocitos control, B y B’ nucleoides de linfocitos control positivo, C y C’ expuestos a extractos Soxhlet y D y D’ a extractos liofilizados como postratamiento.

Se sabe que el extracto de Boldo acuoso es rico en compuestos fenólicos como los flavonoides, que son antioxidantes por excelencia (Quezada et. Al, 2004), además de presentar alcaloides con actividad antioxidante como la Boldina y derivados, donde diversas investigaciones (como las de Konrath et. Al, 2008 y O’Brien et. Al, 2005) han caracterizado sus diversas bondades farmacológicas, si bien su concentración en la hoja de la planta, que es la parte más utilizada de para consumo medicinal, es baja en comparación a la porción polifenólica (Quezada et. Al, 2004 y O’Brien et al, 2005) y mostrando que otros componentes del extracto son más críticos para los efectos hepatoprotectores farmacológicos (Klimaczewski et al., 2014), pero puede ser suficiente para no traspasar el umbral

de efecto tóxico y actuar como antioxidante de forma conjunta con los compuestos polifenólicos.

En relación a los mecanismos involucrados que pudiesen explicar este comportamiento más detalladamente, estudios previos informan como los polifenoles y alcaloides presentes en el extracto de Boldo acuoso exhiben propiedades antioxidantes antagonizando las especies reactivas del oxígeno de forma intra y extracelulares en conjunto (Słoczyńska et al., 2014) pudiendo el extracto acuoso de Boldo desenvolverse como inhibidor del período 1 y 2 simultáneamente, siendo el efecto inhibidor del periodo 1 lo que puede lograr explicar el notorio efecto genoprotector observado en los linfocitos expuestos a ellos previo al tratamiento con H_2O_2 100 μ M al bloquear el efecto del peróxido de hidrógeno antes que entrase en contacto con el ADN, aunque tampoco puede descartarse algún efecto intracelular relacionado con estimulación reparativa del ADN en base a la gran cantidad de compuestos activos en el extracto de Boldo, pues se ha descrito que sustancias como los flavanoles poseen características estructurales necesarias para el barrido de radicales libres (Luca et al., 2016), proceso que actuando sinérgicamente con la reparación del ADN reducen el daño genotóxico producido por ROS (Živković et al., 2017).

Además, los flavonoides del Boldo presentan propiedades de barrido de radicales libres y antioxidantes más eficaces que las vitaminas C y E para proteger el

material genético (Pereira et al., 2009) y se han estudiado sus propiedades genoprotectoras contra el daño inducido por el peróxido de hidrógeno en más de 80 plantas, también utilizando el ensayo del cometa (Sabahi et al., 2018). Uno de estos compuestos, la quercetina, presenta una pronunciada reducción en la extensión del daño en el ADN inducido por H₂O₂, explicado por sus propiedades eliminadoras de ROS (Luca et al., 2016) y cuya acción es tan potente que es usada como control positivo de antioxidante estándar en algunos estudios para demostrar actividad antimutagénica (Živković et al., 2017) como los realizados por Gafrikova et al., donde se encontró que linfocitos incubados en extractos acuosos que contenían flavonoides como la quercetina, entre otros, mostraban actividad desmutágena al reducir el daño genotóxico provocado en el postratamiento con peróxido de hidrógeno en comparación con linfocitos sin cultivar (Gafrikova et al., 2014).

Dentro de los compuestos fenólicos también destacan las catequinas que, según investigaciones como las realizadas por Grzesik et. Al, 2018, muestran una mayor actividad antioxidante comparadas con otros compuestos polifenólicos que también exhiben estas propiedades, los que actuando sinérgica y complementariamente podría explicar el pronunciado efecto antimutagénico observado tanto en el extracto polifenólico como en el extracto acuoso completo (Carmona et al., 2017), donde los niveles de daño caen a niveles basales, mientras que en el extracto liofilizado, si bien se observa una caída en el daño

genotóxico no se ha podido llegar a los mismos niveles de antagonización del efecto oxidativo producido por el H_2O_2 probablemente por la presencia de mayor concentración alcaloide y de aceites esenciales referidos en los resultados de la sección anterior, si bien los niveles de daño producidos son lo suficientemente bajos como para teorizar en una actividad reparativa completa a excepción del punto que presentó daño medio, lo que requeriría de estudios de cinética de reparación del ADN en linfocitos expuestos a daño oxidativo y tratados posteriormente con extractos de boldo para poder llegar a una conclusión más precisa.



7. CONCLUSIONES

En este trabajo se mostró una implementación sencilla del Ensayo del cometa que logró ser funcional para ser usada en estudios de genotoxicidad, mostrando que si bien es un método relativamente barato y sencillo de implementar, su gran variabilidad inter e intra laboratorio requiere de una constante optimización y actualización de estrategias de perfeccionamiento, por lo que se recomienda un entrenamiento continuo en el ensayo a fin de conseguir resultados con mayor significancia científica.



Luego, se investigó el comportamiento genotóxico de distintas fracciones de extractos de Boldo, mostrando que las fracciones alcaloides y que fueron sometidas al proceso de liofilización evidenciaron niveles genotóxicos mayores que la fracción polifenólica y el extracto acuoso Soxhlet en linfocitos de sangre periférica.

Finalmente, al estudiar la actividad genoprotectora de los extractos de boldo se evidenció una disminución del daño genotóxico producido por H₂O₂ en células previamente tratadas con ellos y, en base tanto a estas observaciones como a la literatura consultada se puede concluir que existe un efecto genoprotector del

extracto de boldo en linfocitos de sangre periférica expuestos a un agente oxidante, si bien se recomienda realizar estudios complementarios que refuercen estas observaciones preliminares.



GLOSARIO

ADN: Acrónimo de Ácido Desoxirribonucleico.

ANOVA: Acrónimo de *Analysis Of Variance*, Análisis de Varianza, en español.

DMSO: Acrónimo de Dimetilsulfóxido.

Liofilización: es un proceso que tiene como objetivo separar el agua (u otro solvente) de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida.

Prueba *Post-Hoc*: prueba de rango estadística que identifica subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí.

ROS: Acrónimo de *Reactive Oxygen Species*, Especies Reactivas del Oxígeno en español.

Soxhlet: hace referencia tanto a un método de extracción como al equipo utilizado donde la muestra se extrae repetidamente y cada extracción ocurre con solvente nuevo producto de un proceso de condensación.

BIBLIOGRAFÍA

Abbasi, R., Efferth, T., Kuhmann, C., Opatz, T., Hao, X., Popanda, O., & Schmezer, P. (2012). *The endoperoxide ascaridol shows strong differential cytotoxicity in nucleotide excision repair-deficient cells. Toxicology and applied pharmacology*, 259(3), 302-310.

Almeida, E., Melo, A., Xavier, H. (2000). *Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of Peumus boldus and boldine in rats. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(2), 99-102.

Al-Salmi, K., Abbas, H. H., Schulpen, S., Karbaschi, M., Abdalla, I., Bowman, K. J., ... & Cooke, M. S. (2011). *Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. Free Radical Biology and Medicine*, 51(3), 719-725.

Anderson, D., Yu, T. W., Dobrzyńska, M. M., Ribas, G., & Marcos, R. (1997). *Effects in the Comet assay of storage conditions on human blood. Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 17(3), 115-125

Auten R.L., Davis J.M. *Oxygen toxicity and reactive oxygen species: The devil is in the details. Pediatric Research. Res.* 2009; 66:121–127. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181a9eafb.

Avello, M., & Cisternas, I. (2010). *Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Revista médica de Chile*, 138(10), 1288-1293.

Azqueta, A., Ladeira, C., Giovannelli, L., Boutet-Robinet, E., Bonassi, S., Neri, M., ... & Koppen, G. (2020). *Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective. Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 783, 108288.

Azqueta, A., Muruzabal, D., Boutet-Robinet, E., Milic, M., Dusinska, M., Brunborg, G., ... & Collins, A. R. (2019). *Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 24-32.

Azqueta, A., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., & Collins, A. R. (2011). *Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 724(1-2), 41-45.

Benhusein, G. M., Mutch, E., Aburawi, S., & Williams, F. M. (2010). *Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. Libyan Journal of Medicine*, 5(1).

Boeing, T., Mariano, L. N. B., dos Santos, A. C., Tolentino, B., Vargas, A. C., de Souza, P., ... & da Silva, L. M. (2020). *Gastroprotective effect of the alkaloid boldine: Involvement of non-protein sulfhydryl groups, prostanoids and reduction on oxidative stress. Chemico-Biological Interactions*, 109166.

Burlinson B., Tice R., Speit G., Agurell E., Brendler-Schwaab S., Collins A., Escobar P., Honma M., Kumaravel T., Nakajima M., Sasaki Y., Thybaud V., Uno Y., Vasquez M., Hartmann A. (2007): *Fourth international workgroup on genotoxicity testing: result of the in vivo comet assay Workgroup*”, *Mutation Research*, 627, 31–35.

Carmona, E. R., Reyes-Díaz, M., Parodi, J., & Inostroza-Blancheteau, C. (2017). *Antimutagenic evaluation of traditional medicinal plants from South America Peumus boldus and Cryptocarya alba using Drosophila melanogaster. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(4), 208-217.

Cassels, B., 2004. *Investigaciones chilenas sobre la química del boldo. Ponencia presentada al Encuentro de Investigadores en Especies Medicinales Nativas. Organizado por FIA con colaboración de CYTED, Red RIPROFITO y CONICYT-Chile. Santiago, 23 de abril 2004*

Cassels, B. K., Fuentes-Barros, G., & Castro-Saavedra, S. (2019). *Boldo, Its Secondary Metabolites and their Derivatives. Current Traditional Medicine*, 5(1), 31-65.

Checa Rojas, A. (2018, 30 de abril) *Método: aislamiento de células sanguíneas por gradiente de Ficoll-Paque*. Conogasi, Conocimiento para la vida.

Collins A.R. *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249-261.

Collins, A.R., El Yamani, N., Lorenzo, Y., Shaposhnikov, S., Brunborg, G., & Azqueta, A. (2014). *Controlling variation in the comet assay. Frontiers in genetics*, 5, 359.

Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., ... & Štětina, R. (2008). *The comet assay: topical issues. Mutagenesis*, 23(3), 143-151.

Cox, D. B. T., Platt, R. J., & Zhang, F. (2015). *Therapeutic genome editing: prospects and challenges. Nature medicine*, 21(2), 121-131.

De Flora S. (2005). *Overview of mechanisms of cáncer quimiopreventive agents. Mutation Research*.591:8-15.

Devlin, T. M. (2019). *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. Reverté.

Enciso, J. M., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., Olsen, A. K., López de Cerain, A., & Azqueta, A. (2018). *Standardisation of the in vitro comet assay: influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. Mutagenesis*, 33(1), 25-30.

Fale, P. L. A., Amaral, F., Madeira, P. A., Silva, M. S., Florêncio, M. H., Frazão, F. N., & Serralheiro, M. L. M. (2012). *Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of Peumus boldus water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. Food and chemical toxicology*, 50(8), 2656-2662

Gámez, R., & Más, R. (2007). *Reseña analítica de " Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados"*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 38(3)

Gafrikova, M., Galova, E., Sevcovicova, A., Imreova, P., Mucaji, P., & Miadokova, E. (2014). *Extract from Armoracia rusticana and its flavonoid components protect human lymphocytes against oxidative damage induced by hydrogen peroxide*. *Molecules*, 19(3), 3160-3172.

Galati, G., & O'brien, P. J. (2004). *Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties*. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 287-303.

Garcia, O., Romero, I., González, J. E., & Mandina, T. (2007). *Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(2), 186-190.

Grzesik, M., Naparło, K., Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2018). *Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants*. *Food chemistry*, 241, 480-492.

Gudrun Koppen, Amaya Azqueta, Bertrand Pourrut, Gunnar Brunborg, Andrew R. Collins, Sabine A. S. Langie, *The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop*, *Mutagenesis*, Volume 32, Issue 3, 1 May 2017, Pages 397–408.

Hansen, S. H., Pawlowicz, A. J., Kronberg, L., Gützkow, K. B., Olsen, A. K., & Brunborg, G. (2018). *Using the comet assay and lysis conditions to characterize DNA lesions from the acrylamide metabolite glycidamide*. *Mutagenesis*, 33(1), 31-39.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., ... & Tice, R. R. (2003). *Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay*. *Mutagenesis*, 18(1), 45-51.

Kazemi Noureini, S., & Wink, M. (2015). *Dose-dependent cytotoxic effects of boldine in HepG-2 cells—Telomerase inhibition and apoptosis induction*. *Molecules*, 20(3), 3730-3743.

Keohavong, P., & Grant, S. G. (Eds.). (2005). *Molecular toxicology protocols* (Vol. 291). Humana Press. pag. 85-93

Klaassen, C.D.; Watkins III, J.B. 2005. *Fundamentos de Toxicología de Casarett y Doull*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid

Klimaczewski, C. V., de Aquino Saraiva, R., Roos, D. H., Boligon, A., Athayde, M. L., Kamdem, J. P., ... & Rocha, J. B. T. (2014). *Antioxidant activity of Peumus boldus extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe (II)–citrate in rat liver mitochondria in vitro*. *Industrial Crops and Products*, 54, 240-247.

Klug, W. S. C., Michael, R., & Spencer, C. A. *Conceptos de genética/por Klug, William S., Michel R. Cummings y Charlotte A. Spencer* (No. 575.1 K5y 2006.).

Koppen, G., Azqueta, A., Pourrut, B., Brunborg, G., Collins, A. R., & Langie, S. A. (2017). *The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop*.

Lorenzo Y. Costa S. Collins A. R. and Azqueta A. (2013) *The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead*. *Mutagenesis*, 28, 427–432.

Luca, V. S., Miron, A., & Aprotosoia, A. C. (2016). *The antigenotoxic potential of dietary flavonoids*. *Phytochemistry Reviews*, 15(4), 591-625.

Mahadevan, B., Snyder, R. D., Waters, M. D., Benz, R. D., Kemper, R. A., Tice, R. R., & Richard, A. M. (2011). *Genetic toxicology in the 21st century: reflections and future directions*. *Environmental and molecular mutagenesis*, 52(5), 339-354.

Mariano, X. M., de Souza, W. F. M., Rocha, C. B., & Moreira, R. F. A. (2019). *Bioactive volatile fraction of Chilean boldo (Peumus boldus Molina)–an overview. Journal of Essential Oil Research*, 31(6), 474-486.

Matsuyama, R., Kitamoto, S., & Tomigahara, Y. (2018). *Lack of genotoxic potential of permethrin in mice evaluated by the comet assay and micronucleus test. Toxicological & Environmental Chemistry*, 100(1), 92-102.
Ministerio de Salud, Chile. *Medicamentos Herbarios Tradicionales*. 2010. p. 35-36.

Møller, P. (2018). *The comet assay: ready for 30 more years. Mutagenesis*, 33(1), 1-7.

Møller, P., & Loft, S. (2014). *Statistical analysis of comet assay results. Frontiers in genetics*, 5, 292.

Moreno, P. R. H., Vargas, V. M. F., Andrade, H. H. R., Henriques, A. T., & Henriques, J. A. P. (1991). *Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. Mutation Research/Genetic Toxicology*, 260(2), 145-152.

Muthna, D., Cmielova, J., Tomsik, P., & Rezacova, M. (2013). *Boldine and related aporphines: from antioxidant to antiproliferative properties. Natural product communications*, 8(12), 1934578X1300801235.

O'Brien, C. Carrasco-Pozo, H. Speisky. *Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. Chem. Biol. Interact.*, 159 (2006), pp. 1-17

Olive, P., Banáth, J. *The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nat Protoc* 1, 23–29 (2006).

Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). *Phenolics: From chemistry to biology*.

Prieto González, E. A., & Llópez Janer, N. D. (1999). *Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa)*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 18(1), 34-36.

Razavi-Azarkhiavi, K., Behravan, J., Mosaffa, F., Sehatbakhsh, S., Shirani, K., & Karimi, G. (2014). *Protective effects of aqueous and ethanol extracts of rosemary on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes by comet assay*. Journal of Complementary and Integrative Medicine, 11(1), 27-33

Ren, N., Atyah, M., Chen, W. Y., & Zhou, C. H. (2017). *The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications*. Journal of translational medicine, 15(1), 110.

Repetto, M. *Toxicología Fundamental*. Editorial Díaz de Santos, España. Edición 1997

Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E., & Fundora Torres, M. T. (2016). *Principios y relevancia del ensayo cometa*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 35(2), 184-194.

Ruiz ALTG, Taffarello D, Souza VHS, Carvalho JE 2008. *Farmacología e toxicología de Peumus boldus e Baccharis genistelloides*. Rev Bras Farmacogn 18: 295-300.

Sabahi, Z., Soltani, F., & Moein, M. (2018). *Insight into DNA protection ability of medicinal herbs and potential mechanisms in hydrogen peroxide damages model*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 8(2), 120-129.

Siri Helland Hansen, Agnieszka J Pawlowicz, Leif Kronberg, Kristine Bjerve Gützkow, Ann-Karin Olsen, Gunnar Brunborg, *Using the comet assay and lysis conditions to characterize DNA lesions from the acrylamide metabolite glycidamide*, Mutagenesis, Volume 33, Issue 1, January 2018, Pages 31–39,

Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., & Waszkielewicz, A. M. (2014). *Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action*. Journal of applied genetics, 55(2), 273-285.

Tavares, D. C., & Takahashi, C. S. (1994). *Evaluation of the genotoxic potential of the alkaloid boldine in mammalian cell systems in vitro and in vivo*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 321(3), 139-145.

T.S. Kumaravel, Awadhesh N. Jha, *Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 605, Issues 1–2, 2006, Pages 7-16, ISSN 1383-5718.

Vasiljevic, J., Zivkovic, L., Cabarkapa, A., Bajic, V., Djelic, N., & Spremo-Potparevic, B. (2016). *Cordyceps sinensis: Genotoxic Potential in Human Peripheral Blood Cells and Antigenotoxic Properties Against Hydrogen Peroxide by Comet Assay*. *Alternative Therapies in Health & Medicine*, 22.

Vergara García, Á. P. (2010). *Estandarización del ensayo del cometa alcalino en células de sangre periférica*.

Yolanda Lorenzo, Solange Costa, Andrew R. Collins, Amaya Azqueta. *The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead*, *Mutagenesis*, Volume 28, Issue 4, July 2013, Pages 427–432.

Živković, L., Borozan, S., Čabarkapa, A., Topalović, D., Ciptasari, U., Bajić, V., & Spremo-Potparević, B. (2017). *Antigenotoxic Properties of Agaricus blazei against Hydrogen Peroxide in Human Peripheral Blood Cells*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8759764.

Zúñiga Venegas, L. A. (2009). *Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana*. Universitat Autònoma de Barcelona