



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del potencial bioactivo de fracciones obtenidas de *Licania tomentosa* en líneas celulares Jurkat y CHO

Natalia Estrada Ortiz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia
2012

Evaluación del potencial bioactivo de fracciones obtenidas de *Licania tomentosa* en líneas celulares Jurkat y CHO

Natalia Estrada Ortiz

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Biotecnología

Directora:

M.Sc. María Elena Márquez Fernández

Asesores:

M.Sc. Juan Bautista López Ortiz

Dra. Diana Margarita Márquez Fernández

Línea de Investigación:

Bioactividad de Productos Naturales y Sintéticos

Grupo de Investigación:

Biotecnología Animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias

Medellín, Colombia

2012

*En la Ciencia la única verdad sagrada, es que
no hay verdades sagradas.*

Carl Sagan

Agradecimientos

A mis padres por brindarme la oportunidad de continuar con mis estudios, permitirme explorar mi potencial. Por su acompañamiento y apoyo durante este proceso.

Agradezco profundamente al profesor Juan Bautista López Ortiz que ha hecho parte fundamental de mi formación académica desde mis estudios de pregrado en Ingeniería Biológica, me ha mostrado las posibilidades y aplicaciones de la citogenética. Me invitó a hacer parte de este proyecto y me brindó sus conocimientos, apoyo incondicional durante este camino, aportándome no solo a nivel académico, también con muchas enseñanzas para mi futura vida laboral y personal.

A mi tutora María Elena Márquez Fernández por brindarme su acompañamiento y asesoría permanente durante la realización de mi Maestría, ofreciéndome soluciones y opciones en los momentos de dificultad, presentándome formas y mecanismos para llevar a cabo este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio Lina Marcela Blandón García y Mauricio de la Ossa Magíster en Ciencias-Biotecnología por su apoyo durante el desarrollo de mi tesis.

Y por último a las estudiantes de Ingeniería Biológica Liliana Aguilar Pérez, Lina Gómez Bedoya, Anny Yepes Acevedo y Diana Gil Calderón por su colaboración durante la realización de las pruebas de laboratorio.

Resumen

En este estudio se evaluó el potencial bioactivo de la planta *Licania tomentosa* sobre las líneas celulares Jurkat y CHO. Para las fracciones F8 y F10 se obtuvo un IC_{50} aproximado de 100 $\mu\text{g/mL}$ por medio de MTT en las líneas celulares. Ambas fracciones mostraron citotóxico sobre las líneas celulares, evidenciado en la disminución de la viabilidad celular evaluada por medio del colorante azul de tripano y MTT, y la disminución de la capacidad de clonación. La fracción F8 mostró efecto genotóxico relacionado con el incremento en la frecuencia de ICHs y el aumento del porcentaje de ADN en la cola obtenido por medio del ensayo cometa. La fracción F8 no mostró efecto relacionado con retraso o aceleración del ciclo celular para ninguna de las líneas celulares evaluadas.

Palabras clave: citotoxicidad, efecto antiproliferativo, genotoxicidad, *Licania tomentosa*, líneas celulares.

Abstract

Bioactive potential from fractions obtained from the plant *Licania tomentosa* were evaluated in this study in Jurkat and CHO-K1 cells. For F8 and F10 fractions was obtained through MTT a IC_{50} approximately 100 $\mu\text{g/mL}$ to both cell lines. Both fractions showed cytotoxic effect on both cell lines as evidenced by the decrease in cell viability assessed by the trypan blue dye and MTT, and reduced ability of cell division determined by cloning efficiency. F8 fraction showed the genotoxic effect related to the increase of SCEs frequency and amplification of the DNA percentage contain in tail obtained by the comet assay. The fraction F8 showed no effect retardation or acceleration associated with cell cycle for any of the cell lines evaluated.

Keywords: cytotoxicity, antiproliferative effects, genotoxicity, *Licania tomentosa*, cell lines.

Contenido

	Pág.
Resumen	VI
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	XI
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIII
Introducción	1
Objetivos	5
1. Materiales y métodos	7
1.1 Localización.....	7
1.2 Líneas celulares.....	7
1.2.1 Cultivo y mantenimiento	8
1.3 Fracciones evaluadas.....	8
1.4 Evaluación del efecto citotóxico	9
1.4.1 Exclusión del colorante vital Azul de Tripano	9
1.4.2 MTT	10
1.4.3 Eficiencia de clonación.....	10
1.5 Evaluación del efecto genotóxico.....	12
1.5.1 Intercambio de cromátidas hermanas	12
1.5.2 Ensayo cometa	14
1.6 Evaluación del efecto antiproliferativo.....	15
1.6.1 Función de acumulación	15
1.6.2 Cinética proliferativa.....	16
2. Resultados	17
2.1 Evaluación de efecto citotóxico.....	17
2.1.1 Azul de tripano	17
2.1.2 MTT	19
2.1.3 Eficiencia de clonación.....	20
2.2 Evaluación del efecto genotóxico.....	22
2.2.1 Intercambio de cromátidas hermanas	22
2.2.2 Ensayo cometa	24
2.3 Evaluación del efecto antiproliferativo.....	26
2.3.1 Función de acumulación	26
2.3.2 Cinética proliferativa.....	27

3. Discusión	28
4. Conclusiones y recomendaciones	31
4.1 Conclusiones	31
4.2 Recomendaciones	32
A. Anexo: Resultados obtenidos mediante la prueba de Azul de tripano	33
B. Anexo: Resultados obtenidos mediante la prueba de MTT	34
C. Anexo: Resultados obtenidos mediante Eficiencia de clonación	35
D. Anexo: Resultados obtenidos mediante ICH	36
Bibliografía	37

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1-1: Esquema de la replicación en presencia de BrdU.....	13
Figura 2-1: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con Azul de tripano en células Jurkat tratadas con las fracciones F8 y F10	18
Figura 2-2: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con Azul de tripano en células CHO tratadas con las fracciones F8 y F10.....	18
Figura 2-3: Viabilidad (promedio de dos experimentos) con MTT en células Jurkat tratadas con las fracciones F8 y F10 a diferentes concentraciones.....	19
Figura 2-4: Viabilidad (promedio de dos experimentos) con MTT en células CHO tratadas con las fracciones F8 y F10 a diferentes concentraciones.....	20
Figura 2-6: Eficiencia de clonación absoluta (ECA) y eficiencia de clonación relativa (ECR) de células Jurkat (A) y CHO (B) tratadas con F8 y F10 a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL.....	21
Figura 2-7: Promedios de ICHs obtenidos en las líneas celulares Jurkat (A) y CHO (B) tratadas con F8 a concentraciones de 50, 100 µg/mL, y respectivos controles CN, CP y DMSO.....	22
Figura 2-8: Efecto de la fracción F8 obtenidos en test cometa a concentraciones 50 µg/mL (A) y 100 µg/mL (B), controles de DMSO 1,2% (C), CN (D) y CP (E) en las líneas celular Jurkat y 50 µg/mL (F) y 100 µg/mL (G), controles de DMSO 1,2% (H), CN (I) y CP (J) en la línea celular CHO (200x)	24

Figura 2-9: Media del porcentaje de ADN en la cola obtenido en el test cometa en líneas celulares Jurkat (A) y CHO (B) tratadas con F8 a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{Ml}$, CN, CP y DMSO.....25

Figura 2-10: Curvas de acumulación de células mitóticas respecto al tiempo en las líneas celulares Jurkat (A) y CHO (B).....26

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 2-1: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con MTT a 200µg/mL de fracciones diclorometanólicas de <i>L. tomentosa</i>	17
Tabla 2-2: IC ₅₀ obtenidos con regresión Probit mediante MTT.....	19
Tabla 2-3: Comparación de medias del número de colonias totales obtenidas entre los tratamientos aplicados en eficiencia de clonación en células Jurkat y CHO.....	21
Tabla 2-4: Comparación de medias entre los tratamientos en ICH aplicados en las células Jurkat y CHO.....	23
Tabla 2-5: Comparación de medias entre los tratamientos aplicados en ensayo cometa a las células Jurkat y CHO.....	25
Tabla 2-6: Pendientes obtenidas a partir de la regresión lineal del logaritmo en base 10 del índice mitótico (IM) con respecto al tiempo en las líneas celulares Jurkat y CHO.....	27
Tabla 2-7: Promedio de ciclo y tiempo de ciclo calculados en las líneas celulares Jurkat y CHO tratadas con F8 a concentraciones de 50 y 100 µg/mL y controles negativo, positivo y de solvente.....	27
Tabla A-1: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con Azul de tripano en células Jurkat y CHO tratadas con las fracciones F8 y F10 a concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 µg/mL	35

Tabla A-2: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con Azul de tripano en células Jurkat y CHO sin tratamiento y bajo el efecto del solvente a 1,5%.....	35
Tabla B-1: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con MTT en células Jurkat y CHO tratadas con las fracciones F8 y F10 a concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 µg/mL.....	36
Tabla B-2: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con MTT en células Jurkat y CHO tratadas con las fracciones F8 y F10 a concentraciones de 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 y 110 µg/mL.....	36
Tabla C-1: Número de colonias promedio, eficiencia de clonación absoluta y eficiencia de clonación relativa en las líneas celulares Jurkat y CHO tratadas con las fracciones F8 y F10 a concentraciones de 100, 50 y 25 µg/mL.....	37
Tabla D-1: Media de ICHs obtenidos en las líneas celulares Jurkat (A) y CHO (B) tratadas con F8 a concentraciones de 50, 100 µg/mL, y respectivos controles CN, CP Y DMSO.....	38

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
A_λ	Absorbancia	1	$A_\lambda = -\text{Log}_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right)$
IC_{50}	Concentración Inhibitoria media	$\mu\text{g/mL}$	Ver pág. 9
T	Temperatura	K	
G	Gravedades	m/s^2	$\frac{d^2r}{dt^2}$

Abreviaturas

Abreviatura Término

<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>BrEt</i>	Bromuro de Etidio
<i>CN</i>	Control Negativo
<i>CP</i>	Control Positivo
<i>DMS</i>	Diferencia Mínima Significativa
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
<i>ECA</i>	Eficiencia de clonación Absoluta
<i>ECR</i>	Eficiencia de clonación relativa
<i>ICH</i>	Intercambio de Cromátidas Hermanas
<i>IARC</i>	International Agency for Research on Cancer

Abreviatura	Término
<i>MTT</i>	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol
<i>NA</i>	No aplica
<i>NCP</i>	Número de colonias promedio
<i>NCS</i>	Número de células sembradas
<i>NCI</i>	National Cancer Institute
<i>NCT</i>	Número de células totales
<i>ND</i>	No determinado
<i>PBS</i>	Tampón Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)
<i>RH</i>	Recombinación Homóloga
<i>SBF</i>	Suero fetal bovino
<i>SIDA</i>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<i>tBrdU</i>	Tiempo de exposición a BrdU
<i>Tg</i>	Tiempo de generación
<i>TTO</i>	Tratamiento

Introducción

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial. En el 2008, en nuestro país el número de muertes relacionadas con cáncer (excluyendo el de piel) fue de 58.534 personas. Se presume que para el 2030, el número de muertes a nivel mundial ascenderá a once millones de personas y será la principal causa de muerte ¹.

A partir del siglo XIX, el desarrollo de fármacos ha tenido un avance significativo para tratar enfermedades como el cáncer, el SIDA, entre otras, pero la mayoría de estos compuestos presentan efectos secundarios adversos. En el caso de los medicamentos antineoplásicos se ha encontrado una baja especificidad en el tipo celular que atacan y en el caso de tumores muy avanzados, resistencia al agente ². El principal mecanismo de acción de las drogas contra el cáncer, está relacionado con la interferencia de la división celular, la síntesis de ácidos nucleicos y/o proteínas de la división. Estos bloqueos celulares, que también afectan a las células sanas, traen como consecuencia gran variedad de efectos secundarios ³ y que incluyen la inducción de otro tipo de tumores por la genotoxicidad del medicamento ⁴.

La naturaleza, ha sido fuente de agentes medicinales por miles de años y se estima que más del 80% de los medicamentos modernos han sido aislados o desarrollados a partir de productos naturales o inspirados en éstos, particularmente derivados de plantas ⁵. La búsqueda de agentes antitumorales provenientes de plantas inició en los años cincuenta, con el descubrimiento de compuestos con efecto citotóxico como los alcaloides de la vinca, Vinblastina y Vincristina, presentes en la planta *Catharanthus roseus*, y el aislamiento de podofilotoxinas obtenidas de *Podophyllum peltatum* ⁶. Desde esa fecha, el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI) inició un programa de colección y estudio de plantas enfocado en las regiones tropicales, dando lugar al descubrimiento de una gran cantidad de quimiotipos que presentaron actividad citotóxica ⁷. En esta

búsqueda, se descubrieron los Taxanos y las camptotecinas, cuyo desarrollo como agentes clínicamente activos tomó cerca de 30 años ⁶.

En Venezuela, Brasil y EEUU, se ha estudiado la especie *Licania tomentosa*, un árbol perteneciente a la familia Chrysobalanaceae y al orden Malpighiales ⁸. Esta planta, originaria del este y sur de Brasil, de tamaño mediano de 8 a 15 m de altura y 30 a 50 cm de diámetro en el tronco; de ramas lenticeladas, con hojas simples, alternas, dísticas, onduladas, con estípulas y pubescencia en ambas caras. Las flores pequeñas se disponen en panículas y los frutos son drupas alargadas de color amarillo al madurar, las semillas son fibrosas y apiculadas ⁹. Este árbol se encuentra ampliamente distribuido en Colombia, principalmente en Cúcuta, donde es utilizado para brindar sombra con su frondoso follaje y en el Valle de Aburrá se usa para conformar barreras contra ruido, contaminantes, para dar privacidad y controlar vientos ¹⁰.

De este árbol y de especies de la familia Chrysobalanaceae, se han encontrado gran cantidad de sustancias con efectos fungicidas, antitumorales, antioxidantes, antivirales, antibacteriales y antiinflamatorios ^{8,11-18}. Los productos principales encontrados son terpenos, flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides y esteroides, los cuales han mostrado efectos citotóxicos contra líneas tumorales de colón, hígado y melanoma, adicionalmente actividad frente bacterias Gram positivas y levaduras ^{8,12,13,18}. Del genero *Licania* se conocen 150 ¹³ especies, de las cual se ha reportado actividad biológica en las especies *L. licaniaeflora*, *L. heteromorpha*, *L. michauxii* y *L. tomentosa* ^{8,11-14,16-18}.

Las fracciones obtenidas de los frutos y hojas de la planta *Licania tomentosa* contienen di- y triterpenos interesantes para realizar evaluaciones de citotoxicidad y genotoxicidad ¹⁶. De otras especies como *Chrysobalanus icaco* y *Parinari curatelifolia* pertenecientes a la familia Chrysobalanaceae, también se han aislado diterpenos extraídos con diclorometano a partir de los frutos ¹⁹. Por otro lado, se han identificado los ácidos betulínico, oleanólico y pomólico, los cuales poseen actividad citotóxica contra varios tipos de líneas celulares tumorales ²⁰⁻²³, pero sus efectos en líneas celulares de leucemia ha sido muy poco estudiado. Por ejemplo, se ha reportado inhibición del crecimiento e inducción de apoptosis de diterpenos sobre la línea celular K562 y en una línea celular derivada, Lucena 1, multiresistente a medicamentos ¹⁶. Sin embargo, no se han

reportado estudios sobre el ciclo celular o la genotoxicidad de esos compuestos presentes en *L. tomentosa*.

Lo anterior, hace necesario realizar evaluaciones citotóxicas, genotóxicas y sobre el ciclo celular de las fracciones obtenidas con distintos solventes orgánicos de *L. tomentosa* en otras líneas celulares para determinar y comparar su efecto, además de, ampliar la posibilidad de encontrar nuevos compuestos promisorios que actúen directamente sobre ellas y determinar su mecanismo de acción, lo cual conduciría posteriormente a purificación y desarrollo de alternativas biotecnológicas para la producción de estos compuestos.

Teniendo en cuenta los lineamientos para evaluar sustancias antitumorales descritos por el NCI, el cual sugiere utilizar líneas celulares de un panel de 60 diferentes (NCI-60), que incluye líneas de ocho melanomas, seis leucemias, ocho cánceres de mama, dos de próstata, nueve de pulmón, siete de colon, seis de ovario, ocho de riñón y seis de cáncer del sistema nervioso central. Para las evaluaciones citotóxicas en cada línea celular, se utilizan diferentes concentraciones dependiendo de la naturaleza de la muestra, para determinar el IC_{50} ²⁴ el cual, es el valor de referencia utilizado en evaluaciones posteriores, en las que se encuentran las pruebas de genotoxicidad y ciclo celular.

Para el estudio de las sustancias con potencial bioactivo, se usan más frecuentemente las pruebas de citotoxicidad in vitro que incluyen el uso de colorantes vitales como azul de tripano, eficiencia de clonación y pruebas de la actividad metabólica basado en el uso de la sal de tetrazolio conocida como MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) ²⁵. Estas pruebas de citotoxicidad empleadas solo evalúan el efecto a corto plazo de la muestra de interés, no obstante, las pruebas de largo tiempo, han permitido identificar la mayor parte de los fármacos antineoplásicos mediante el estudio del efecto antiproliferativo de sustancias, sobre tumores animales y líneas celulares establecidas de células de mamífero ²⁶.

Adicionalmente, se realizan evaluaciones para determinar la integridad del genoma en sistemas eucarióticos, por lo cual en el tamizaje de compuestos genotóxicos, las pruebas más utilizadas son el Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) y el Test Cometa o electroforesis en gel de células individuales, las cuales constituyen indicadores sensibles

y relativamente rápidos de genotoxicidad. La prueba ICH se ha utilizado desde su publicación en 1974 por Wolff y Perry ²⁷, para evaluar distintos tipos de agentes físicos (UV, Rayos X, Rayos γ ;) e innumerables sustancias químicas de diferente tipo: agentes alquilantes como Benzo-a-pireno ²⁸ drogas antineoplásicas como inhibidores de la síntesis de ADN como fluorodeoxiuridina ²⁹, antimetabólicos como colcemid ³⁰, drogas antisida como deoxitimidina ³¹ entre otros. El ensayo cometa es una técnica rápida, simple, visual, sensible y económica técnica para medir y analizar quiebres de ADN en células de mamífero ^{32,33}. La sensibilidad de la prueba se ha demostrado ampliamente ya que se ha detectado 0,1 quiebres de ADN por 109 Dalton ³⁴. El ensayo cometa se ha utilizado para evaluar a nivel genotóxico innumerables agentes físicos y químicos tales como UV, rayos X y H₂O₂ ³⁴, acrilamida ^{35,36} entre otros.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial bioactivo de fracciones diclorometanólicas de la planta *Licania tomentosa*, mediante las pruebas de citotoxicidad exclusión de colorante Azul de Tripano, prueba de actividad metabólica con la sal de tetrazolio (MTT) y eficiencia de clonación. Para evaluar el efecto genotóxico, se usaron las técnicas de ICH y test cometa y por último, se realizó la evaluación del efecto sobre el ciclo celular utilizando función de acumulación y cinética proliferativa por medio de ICH. Todas las evaluaciones se realizaron en las líneas celulares leucémica Jurkat clon E6-1 y establecida CHO-K1.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el potencial bioactivo de fracciones obtenidas de *Licania tomentosa* en cultivos *in vitro* de líneas celulares Jurkat clon E6-1 y CHO -K1.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto citotóxico de fracciones obtenidas de *Licania tomentosa* en las líneas celulares Jurkat clon E6-1 y CHO-K1.
- Evaluar el efecto genotóxico de fracciones obtenidas de *Licania tomentosa* en las líneas celulares Jurkat clon E6-1 y CHO-K1.
- Evaluar el efecto antiproliferativo de fracciones obtenidas de *Licania tomentosa* en las líneas celulares Jurkat clon E6-1 y CHO-K1.

1. Materiales y métodos

1.1 Localización

Los ensayos biológicos fueron realizados en los Laboratorios de Biotecnología Animal y Genética de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Las muestras fueron obtenidas por el grupo de Productos Naturales Marinos de la Universidad de Antioquia. Las líneas celulares utilizadas fueron facilitadas por el Laboratorio de Genética de Poblaciones de la Universidad de Antioquia.

1.2 Líneas celulares

La línea celular Jurkat clon E6-1 (N°ATCC TIB-152)³⁷, fue obtenida de sangre periférica de un niño de 14 años con leucemia linfoblástica aguda³⁸. El cariotipo de las células es pseudodiploide, el número de cromosomas es 46, XY, en el 74% de los casos y contiene poliploidías en el 5.3% con alteraciones tales como 2,-18, del (2) (p21p23), del (18) (p11.2), con cromosomas X y Y normales. Esta línea celular crece en suspensión formando racimos, su ciclo celular estimado es de 18 horas.

La línea celular CHO es una línea celular establecida obtenida a partir de un explante de tejido de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*)³⁹. En esta evaluación, se usó el clon CHO-K1 (ATCC N° CCL-61)⁴⁰ subclon derivado de la línea parental CHO. La línea original se caracteriza por ser euploide con un número modal cromosómico de 20-21, posee 10-13 marcadores cromosómicos bien definidos, cariotipo heteromórfico. Este tipo de células crecen en monocapa adheridas al sustrato y su ciclo celular estimado es de 14 horas. Es ampliamente utilizada en estudios para evaluar genotoxicidad por su pequeño número de cromosomas y su fácil manejo⁴¹.

1.2.1 Cultivo y mantenimiento

Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con Suero Fetal Bovino (Lonza) al 5% y penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL (Sigma) y mantenidas en incubadora a 37°C y una atmósfera húmeda de CO₂ al 5%.

Las células Jurkat fueron subcultivadas cada 3 días aproximadamente, para obtener cultivos nuevos, se tomó la suspensión celular, se centrifugó a 800g durante 7 minutos, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 2mL de medio completo nuevo, se cuantificó la viabilidad celular con azul de tripano al 0,4% y se sembraron 1x10⁵ células/mL en frascos T25 (Falcon). Para la realización de experimentos se procedió bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, y se usaron las células con viabilidad mayor o igual al 95% y en fase exponencial de crecimiento.

En el caso de las células CHO se realizaron subcultivos cada 4 o 5 días o sólo se reemplazó el medio agotado por medio nuevo hasta obtener la confluencia deseada. Para realizar el subcultivo, se lavó una o dos veces la superficie del frasco con medio simple o PBS estéril y se adicionó 1mL de Tripsina EDTA (Gibco) 1x durante 1 minuto, se inactivó la tripsina con 2mL de medio completo al 5%, se centrifugó a 800g durante 7 minutos, se descartó el sobrenadante, el pellet obtenido se resuspendió en 2mL de medio completo, se cuantificó la viabilidad celular con azul de tripano al 0,4% y se sembraron en una dilución 1:8 en frascos de cultivo nuevos. Para la realización de experimentos se procedió bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, y se usaron las células con viabilidad mayor o igual al 95%, confluencia mayor al 80% y en fase exponencial de crecimiento.

1.3 Fracciones evaluadas

Las hojas de la planta *Licania tomentosa* fueron colectadas en la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y la clasificación taxonómica se llevó a cabo en el herbario MEDEL de la Universidad Nacional de Colombia. Las hojas secas y molidas de *L. tomentosa* fueron extraídas sucesivamente con metanol y diclorometano, y los extractos obtenidos se llevaron a sequedad en un rotaevaporador a 40 °C, con presión reducida y agitación constante. Cada extracto, se sometió a fraccionamiento por cromatografía en

capa fina y cromatografía en columna usando sílica gel F₂₅₄ y sílica gel 60 como fase estacionaria, respectivamente, y como fase móvil se utilizaron mezclas de solventes hexano/acetato de etilo y diclorometano/metanol en diferentes proporciones. Del extracto en diclorometano se obtuvieron 10 fracciones F1-F10 y una fracción del extracto metanólico FM1.

De las 10 fracciones evaluadas, sólo las fracciones F8 y F10 mostraron actividad citotóxica previa, por lo cual se continuó evaluándolas.

1.4 Evaluación del efecto citotóxico

Teniendo en cuenta que para considerar una fracción citotóxica su IC₅₀ debe ser cercano a 100 µg/mL, en este estudio se utilizaron las concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 µg/mL de las fracciones F8 y F10 disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO), además, se usó como control de solvente (DMSO) la mayor concentración usada en cada uno de los tratamientos. El control negativo o control de medio (CN) se realizó con las células sin tratar, el control positivo (CP) fue H₂O₂ a 25µM. En todos los experimentos, se usaron las líneas en fase exponencial de crecimiento y viabilidad superior al 95%, se tomaron 6000 y 8000 células para células Jurkat y CHO, respectivamente, se sembraron en platos de cultivo de 96 pozos en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SBF) al 5%, incubados a 37°C a una atmósfera húmeda de CO₂ al 5% y se incubaron por un período de 48 horas. Posteriormente se adicionaron diferentes concentraciones de la fracción a evaluar y cada tratamiento se dejó actuar por mínimo 20 horas equivalentes al menos a un ciclo celular. Cada tratamiento se hizo por triplicado y cada experimento por duplicado.

1.4.1 Exclusión del colorante vital Azul de Tripano

Luego de realizados los tratamientos, se incubaron alícuotas de las suspensiones celulares con azul de tripano al 0,4% y se cuantificó la viabilidad celular por conteo en cámara de Neubauer del porcentaje de células dañadas, se siguió el protocolo propuesto por Freshney⁴². Las células afectadas se diferencian de las células sanas por presentar coloración azul como consecuencia de daño en su membrana celular^{43,44}. El cálculo del porcentaje de viabilidad celular se realizó utilizando la ecuación (1.1).

$$\%Viabilidad\ celular = \frac{Células\ vivas}{Células\ totales} \times 100 \quad (1.1)$$

1.4.2 MTT

En la prueba MTT, el compuesto Bromuro de 3-(4, 5-dimetildiazol-2-il)-2,5difenil tetrazolio es reducido por la enzima mitocondrial Succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul e insoluble en soluciones acuosas (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de formazán generado, es directamente proporcional al número de células viables⁴⁵.

El protocolo utilizado fue el descrito por Mosmann en 1983⁴⁵ con algunas modificaciones. Las células se sembraron en platos de cultivo de 96 pozos, en medio RPMI con las condiciones descritas, se incubaron y fueron tratadas por un periodo de 20 horas. Posteriormente, al cultivo se le adiciono 10µl de MTT (Sigma) a una concentración de 5 mg/mL en PBS, se incubó en la oscuridad a 37°C y 5% de CO₂ por 4 horas. Luego, en cada pozo, se adicionó 100 µl de Isopropanol ácido (0,1% HCl humeante, 10% Triton x100) mínimo 4 horas dejando en agitación. Para cuantificar la concentración del producto, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en espectrofotómetro (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific). La viabilidad se calculó usando la ecuación (1.2), la significancia estadística se calculó usando la prueba probit con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV para determinar el valor del IC₅₀, que corresponde a la concentración de una sustancia necesaria para matar al 50% de la población celular. Se realizaron varios ensayos, utilizando las mismas concentraciones usadas en la prueba del azul de tripano y usando valores mas cercanos a la IC₅₀ encontrada (70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 y 110 µg/mL).

$$Viabilidad = \frac{Absorbancia\ TTO}{Absorbancia\ CN} \quad (1.2)$$

1.4.3 Eficiencia de clonación

Esta prueba permite determinar la capacidad proliferativa de las células después de ser tratadas y determinar, el número de células individuales que originan una colonia,

además permite evaluar citotoxicidad a largo plazo. Por esta razón, se siembran un número bajo de células que permitan determinar las colonias reales y las derivadas. Para la prueba, en platos de 6 pozos, se sembraron 200 y 300 células para CHO y Jurkat, respectivamente, a partir de un cultivo subconfluyente y pretratado durante 20 horas con las fracciones F8 y F10 a concentraciones de 100, 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obtenidas a partir del valor de IC_{50} obtenido con MTT. Se usó como control positivo Mitomicina C (Sigma) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, control de DMSO al 1,2% y control negativo las células sin tratamiento.

La prueba de eficiencia de clonación en la línea celular Jurkat, se realiza inmovilizando las células en una preparación de agar semisólido. Se siguió el protocolo propuesto por Freshney ⁴² con algunas modificaciones. Inicialmente se preparó agar al 1,2% en agua ultrapura y medio RPMI 1640 2x suplementado al 40% con SBF, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se mezclaron en proporción 1:1 y se sirvió en cada pozo una primera capa de 1 mL con agar al 0,6%. Se preparó una segunda mezcla que contenía medio de cultivo RPMI 1640 2x suplementado al 40% con SBF, agar al 1,2% y agua ultra pura en un proporción 2:1:1 y posteriormente se adicionaron las células en la concentraciones descritas arriba. Finalmente, 1 mL de esta mezcla es adicionada a cada pozo que contenía la primera capa semisólida. Los platos se incubaron a 37°C, atmósfera húmeda de CO_2 al 5% por 10 días. Se realizó el conteo en microscopio invertido con aumento de 100x, y cuadrícula de 1 cm^2 para evitar errores y facilitar el conteo.

En el caso de la línea celular CHO también se siguió el protocolo reportado por Freshney ⁴² con algunas modificaciones. Las células previamente tratadas con las fracciones, se sembraron en platos de 6 pozos con medio RPMI 1640 suplementado al 5% con SBF, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron en las condiciones descritas anteriormente. Después de 10 días, se eliminó el medio, se adicionó fijador (metanol- ácido acético 3:1) y se tiñeron las colonias con Giemsa al 10% y para realizar la evaluación de las colonias presentes por conteo en microscopio invertido con aumento de 100x, y cuadrícula. Los resultados se obtuvieron mediante el cálculo de la eficiencia de clonación absoluta (ECA) (Ecuación (1.3)) y la eficiencia de clonación relativa (ECR) se obtuvo con la Ecuación (1.4). Para el análisis, se realizó una prueba ANOVA simple y

la diferencia de medias entre los tratamientos, se determinó por la Diferencia Mínima Significativa (DMS).

$$ECA = \frac{NCP}{NCS} \times 100 \quad (1.3)$$

$$ECR = \frac{ECA_{TTO}}{ECA_{CN}} \quad (1.4)$$

Donde:

NCP: Número de colonias promedio

NCS: Número de células sembradas

1.5 Evaluación del efecto genotóxico

A pesar de que la evaluación de ambas fracciones fue similar, en este estudio solo fue posible evaluar la fracción F8, a concentraciones de 100 y 50 µg/mL con los respectivos controles negativo, DMSO y positivo en cada una de las líneas celulares, debido a la poca cantidad de F10 obtenida en el fraccionamiento.

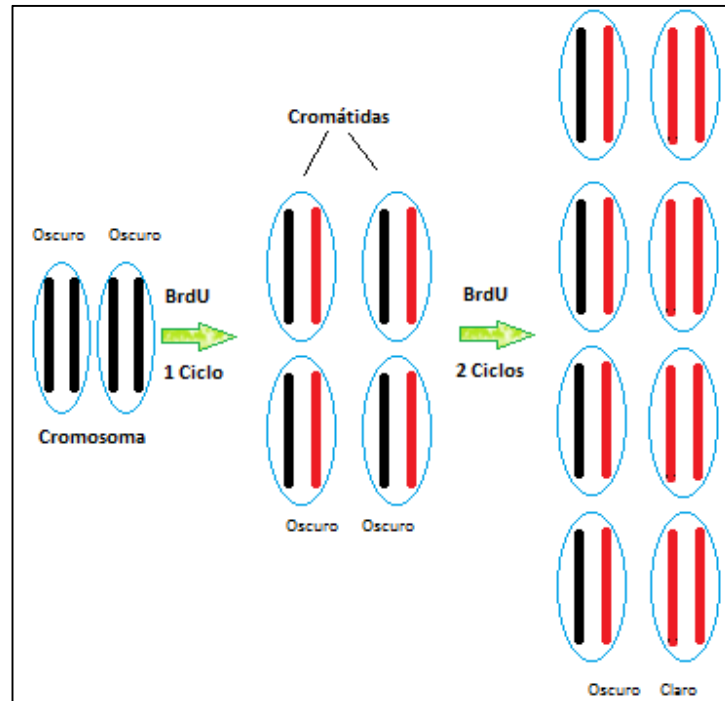
1.5.1 Intercambio de cromátidas hermanas

El intercambio de cromátidas hermanas (ICH) es un proceso de reparación asociado a la fase S del ciclo celular, en el que se dan intercambios simétricos entre las cromátidas nuevas y sus hermanas ⁴⁶ Este proceso de reparación es realizado por Recombinación Homóloga (RH) cuando hay un quiebre de doble cadena, se usa como molde para la replicación, la cadena complementaria de la cromátida hermana, para evitar pérdidas de información genética ⁴⁷⁻⁴⁹. Por lo tanto esta técnica permite cuantificar el número de rupturas de doble cadena que genera cada tratamiento evaluado.

Para la realización de la prueba de ICH, se utiliza la 5'-2'-(Bromodeoxiuridina (BrdU, Sigma) en mayor concentración que su análogo Timidina, así que las cadenas nuevas recién sintetizadas incorporan BrdU en vez de timidina. Al exponerse a la luz el Bromo es liberado en las cadenas nuevas de DNA, queda la base nitrogenada Uracilo, que no

colorean con Giemsa, por lo cual estas cadenas se observan claras después de 2 ciclos (Ver Figura 1-1).

Figura 1-1: Esquema de la replicación en presencia de BrdU.



Se sembraron cultivos de las dos líneas celulares a las condiciones descritas anteriormente y se les agregó el BrdU, por un tiempo de 48 horas y 36 horas para células Jurkat y CHO respectivamente, tiempos equivalentes a dos ciclos celulares. Los tratamientos con las distintas concentraciones de la fracción F8 se realizaron 20 horas antes de la cosecha y una hora antes del procesamiento de las muestras se adicionó el antimitótico Colcemid (Lab G&M). Para la obtención de los extendidos cromosómicos, se siguieron los protocolos descritos por López y Márquez en 2002⁵⁰ y la tinción diferencial se realizó con los protocolos descritos por Wolff y Perry en 1974²⁷.

El potencial efecto genotóxico se estimó mediante la cuantificación de los ICHs en aproximadamente 30 mitosis de segundo ciclo, para cada uno de los tratamientos y respectivos controles (control positivo: Mitomicina C). Se realizó una prueba ANOVA simple y la diferencia de medias entre los tratamientos se determinó por medio de Diferencia Mínima Significativa (DMS).

1.5.2 Ensayo cometa

El ensayo cometa, también llamado electroforesis en gel de células individuales, es una técnica sensible y ciclo independiente que permite determinar quiebres de cadena sencilla y doble del ADN bajo condiciones alcalinas. Los tratamientos se realizaron durante 6 horas, buscando efecto agudo de la fracción evaluada y se utilizó como control positivo peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a 25µM. La técnica se basa en la migración de fragmentos de ADN en una matriz de agarosa que reposa sobre un cubreobjetos, desde el polo negativo hacia el positivo resultando en un gradiente de ADN dependiendo la movilidad electroforética de los fragmentos⁵¹. Los fragmentos pequeños migrarán una mayor distancia y el área de la cola obtenida será mayor cuanto mayor sea el número de quiebres, lo que implica un daño mayor^{32,33,52}.

El protocolo utilizado fue el reportado por Singh en 1988³⁵, con algunas modificaciones. Los cultivos de las líneas celulares se incubaron durante 48 horas bajo las condiciones descritas anteriormente, luego, se trataron por un periodo de 6 horas. Posteriormente, a suspensión celular, se centrifugó, se removió el sobrenadante y se cuantificó el número de células y se mezclaron 100.000 y 50.000 células CHO y Jurkat, respectivamente, con agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) 0,5% a 37°C para un volumen final de 80 µL y se depositó sobre un portaobjetos previamente recubierto con una capa de agarosa de punto de fusión normal (Sigma) al 1%. La suspensión celular se cubrió con cubreobjetos y se refrigeró a 4°C por 10 minutos. Luego se removió cuidadosamente el cubreobjetos y se adicionó una segunda capa de agarosa de bajo punto de fusión, se volvió a cubrir con un cubreobjetos se refrigeraron a 4°C por otros 10 minutos.

Después de la solidificación, las placas se sumergieron en solución de lisis (sarcosinato de Na 1%, NaCl 2.5 M; Na₂ - EDTA, 100 mM, tris 10mM; pH 10 y triton x100, 1%) toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron usando PBS y se colocaron en una unidad de electroforesis horizontal en gel y se sumergieron en buffer electroforético fresco pH 13 (H₂O, EDTA 1mM y NaOH 300 mM) y se incubó por 30 minutos, luego se corrió a 25V y 300 mA. Después de la electroforesis, las placas fueron lavadas con un buffer neutralizante (tris 0,4 M pH 7,5) por 15 minutos y posteriormente se lavaron con agua destilada y se les adicionó 30 µl de una solución de BrEt (20µg/mL) y se colocó un cubreobjetos. Las observaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon

Eclipse 80i) equipado con filtro de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se midieron 50 núcleos por tratamiento y se realizó una prueba ANOVA simple y la diferencia de medias entre los tratamientos se determinó por medio de la Diferencia Mínima Significativa (DMS).

1.6 Evaluación del efecto antiproliferativo

1.6.1 Función de acumulación

Esta técnica presentada por Puck y colaboradores en 1963²⁶, es muy utilizada para determinar variaciones en el ciclo celular ocasionadas por un tratamiento específico, en la cual se realiza un seguimiento cada 2 horas de todo el ciclo celular. Para esta prueba, se evaluaron las concentraciones de 50 y 25 µg/mL de la fracción F8, superiores a la IC₅₀, para asegurar suficientes células viables para la obtención de los extendidos cromosómicos, con los respectivos controles negativo, positivo y de solvente.

Los cultivos celulares, con las condiciones anteriormente descritas se trataron durante 20 horas, posteriormente se reemplazó por medio fresco y se adicionó a cada cultivo el agente antimitótico Colcemid (al 1% del volumen final del cultivo), cada 2 horas durante 18 horas y 14 horas para Jurkat y CHO- respectivamente. El proceso de obtención de los extendidos cromosómicos⁵⁰ se realizó cada 2 horas y el parámetro de evaluación consistió en determinar el índice mitótico en las diferentes muestras. Se realizó una regresión lineal utilizando la ecuación (1.5)²⁶ y se compararon las diferencias entre las pendientes obtenidas.

$$\log[1 + N(M)] = \frac{0.301}{T} [T(M) + t] \quad (1.5)$$

Donde:

N(M): Índice mitótico

T(M): Tiempo de ciclo

1.6.2 Cinética proliferativa

En esta evaluación se siguió el mismo protocolo utilizado para la evaluación de ICH, se evaluaron aproximadamente 30 metafases y se determinó en que ciclo se encontraban, para calcular el tiempo de generación utilizando las ecuaciones (1.6 y 1.7) ⁴⁹.

$$PC = \frac{0,5*A+1*B+1,5*C+2*D+2,5+E+3*F}{NCT} \quad (1.6)$$

$$tg = \frac{tBrdU}{PC} \quad (1.7)$$

Donde:

PC: Promedio de ciclo

NCT: Número de células totales

tBrdU: Tiempo de exposición a BrdU

tg: Tiempo de generación

A: Número de células en medio ciclo

B: Número de células en primer ciclo

C: Número de células en ciclo y medio

D: Número de células en segundo ciclo

E: Número de células en dos ciclos y medio

F: Número de células en tercer ciclo

2. Resultados

Al inicio del experimento se evaluaron 11 fracciones a concentraciones de 50 y 200 $\mu\text{g/mL}$, de las cuales sólo cuatro mostraron actividad citotóxica preliminar (F6, F8, F9 y F10) sobre las líneas celulares evaluadas. En la Tabla 2-1 se muestran los resultados de la evaluación únicamente a la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$. Como la fracción F6 mostró problemas de solubilidad y de la F9 había poca cantidad, por esa razón se inició la evaluación la citotoxicidad de F10 y F8.

Tabla 2-1: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con MTT a 200 $\mu\text{g/mL}$ de fracciones diclorometanólicas de *L. tomentosa*.

Fracción	Jurkat	CHO
F1	92,19	88,03
F2	103,87	93,64
F3	101,71	97,34
F4	77,05	66,47
F5	63,63	81,69
F6	41,16	34,53
F7	78,67	62,53
F8	34,72	36,74
F9	28,42	27,97
F10	26,73	56,35
FM1	83,76	90,62

2.1 Evaluación de efecto citotóxico

2.1.1 Azul de tripano

Las Figuras 2-1 y 2-2 muestran el porcentaje de viabilidad promedio con azul de tripano en células Jurkat y CHO tratadas con las fracciones F8 y F10.

Figura 2-1: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con Azul de tripano en células Jurkat tratadas con las fracciones F8 y F10.

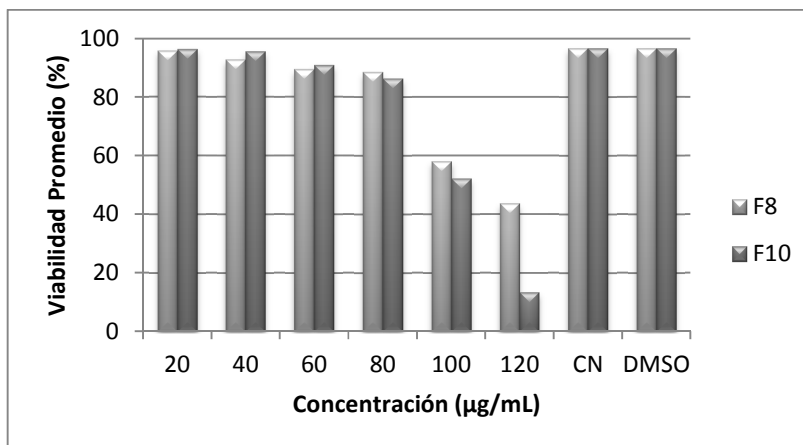
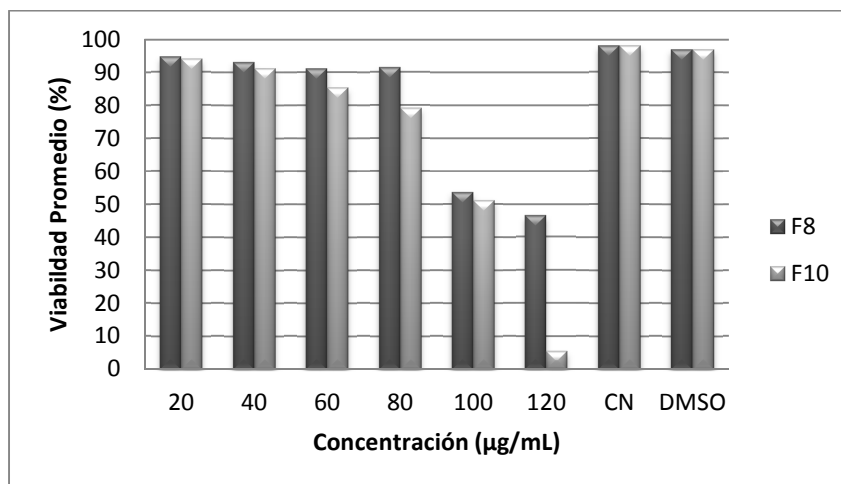


Figura 2-2: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con Azul de tripano en células CHO tratadas con las fracciones F8 y F10.



En ambas líneas celulares se observó relación directa entre la dosis y la viabilidad celular, la cual es más notoria al incrementar la dosis (entre 80 y 100 µg/mL). En las concentraciones de 100 a 120 µg/mL, se evidencia una disminución de la viabilidad celular en las dos líneas tratadas con la fracción F10. El control del solvente no mostró daño significativo en ambas líneas celulares (Ver Anexo A).

2.1.2 MTT

Con los resultados obtenidos en ambas líneas celulares tratadas con las concentraciones 20, 40, 60, 80, 100, 120 $\mu\text{g/mL}$ (Concentraciones A), se realizó un análisis Probit, para determinar el valor IC_{50} probable y en ambos casos se obtuvieron concentraciones cercanas a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 2-1). A partir de este valor, se realizaron pruebas a concentraciones de 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 y 110 $\mu\text{g/mL}$ (Concentraciones B) para confirmar la IC_{50} obtenida en las pruebas anteriores. Con estos resultados se calculó el valor de IC_{50} y sus rangos de concentración con el 95% de confianza, el porcentaje de correlación entre las variables evaluadas y el valor p correspondiente al ajuste (Tabla 2-1) y luego se realizaron las curvas de viabilidad (Figuras 2-3 y 2-4) (ver Anexo B).

Tabla 2-2: IC_{50} obtenidos con regresión Probit mediante MTT.

Línea celular	Fracción	Concentración	IC_{50}	Rangos de concentración	Porcentaje de correlación	Valor p
Jurkat	F8	A	97,62	(92,39 - 103,29)	98,23	0,00
		B	102,24	(98,39 - 107,73)	90,45	0,00
	F10	A	104,17	(95,49 - 115,78)	88,23	0,00
		B	99,64	(97,38 - 102,30)	94,17	0,00
CHO	F8	A	99,75	(93,98 - 106,31)	95,16	0,00
		B	98,18	(95,10 - 101,97)	94,95	0,00
	F10	A	96,67	(91,10 - 102,71)	94,34	0,00
		B	98,47	(95,06 - 102,79)	80,88	0,00

Figura 2-3: Viabilidad (promedio de dos experimentos) con MTT en células Jurkat tratadas con las fracciones F8 y F10 a diferentes concentraciones.

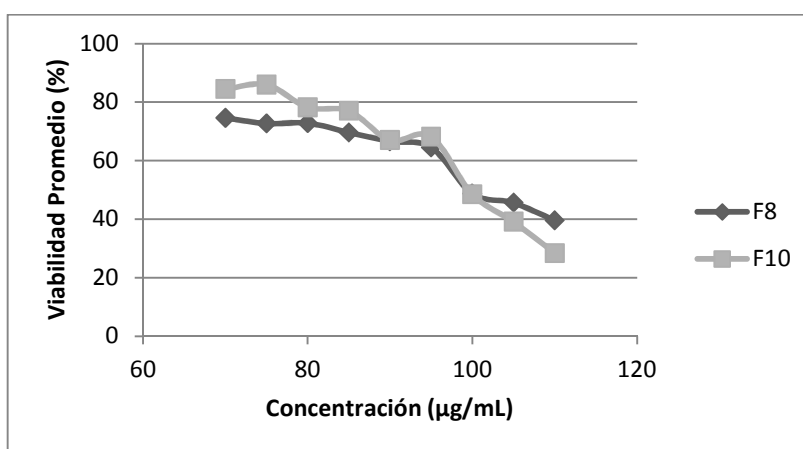
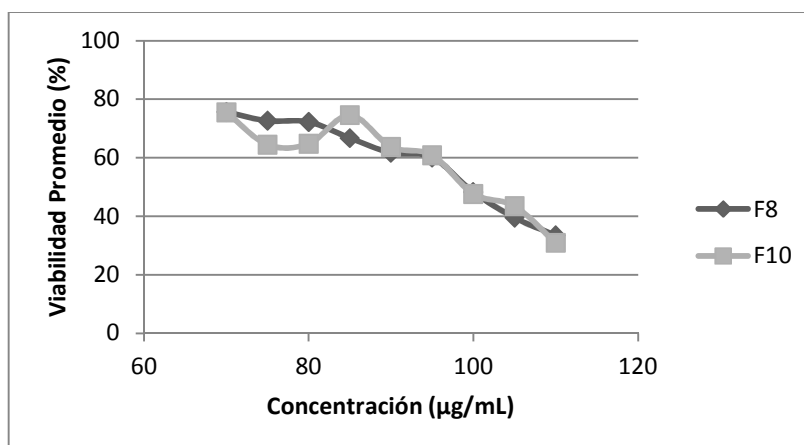


Figura 2-4: Viabilidad (promedio de dos experimentos) con MTT en células CHO tratadas con las fracciones F8 y F10 a diferentes concentraciones.

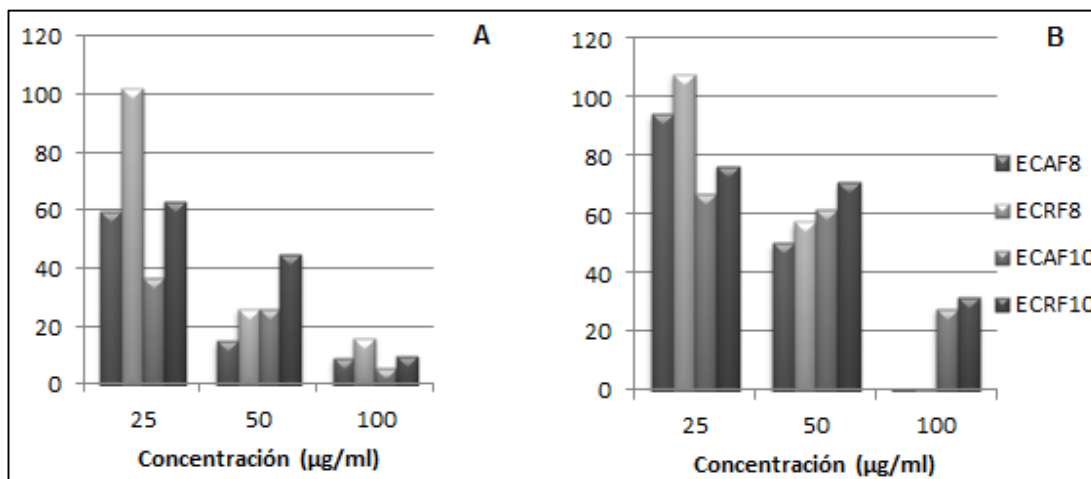


Como se observa en la tabla 2-2, en todos los casos se obtuvo un IC_{50} cercano a 100 $\mu\text{g/mL}$, incluido en todos los rangos de concentración, además el porcentaje de correlación para todas las evaluaciones fue superior al 80%, por lo cual, se tomó como referencia para desarrollar las demás pruebas de evaluación genotóxica y de antiproliferación de ambas fracciones en ambas líneas celulares.

2.1.3 Eficiencia de clonación

Se obtuvieron las ECA y ECR para células Jurkat y CHO tratadas con F8 y F10 a concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ (ver Figura 2-6), se realizó un ANOVA y comparación de medias por medio de LSD para determinar el efecto de las fracciones sobre el ciclo celular (ver Tabla 2-3).

Figura 2-6: Eficiencia de clonación absoluta (ECA) y eficiencia de clonación relativa (ECR) de células Jurkat (A) y CHO (B) tratadas con F8 y F10 a concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Con la fracción F8 en las células Jurkat se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos excepto para la evaluación a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, donde las medias no fueron estadísticamente diferentes. Por otro lado, en las células CHO se observó diferencia significativa entre todos los tratamientos evaluados. Con la fracción F10 se encontraron diferencias entre todos los tratamientos con excepción de 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en ambas líneas celulares. En la tabla 2-3 se observan las comparaciones realizadas.

Tabla 2-3: Comparación de medias del número de colonias totales obtenidas entre los tratamientos aplicados en eficiencia de clonación en células Jurkat y CHO.

Comparaciones	Jurkat		CHO	
	Diferencia significativa F8	Diferencia significativa F10	Diferencia significativa F8	Diferencia significativa F10
25-50	*		*	
25-100	*	*	*	*
25-DMSO	*			*
25-CP	*	*	*	*
25-CN		*		*
50-100		*	*	*
50-DMSO	*	*	*	*
50-CP	*	*	*	*
50-CN	*	*	*	*
100-DMSO	*	*	*	*

Tabla 2-3: (Continuación)

100-CP				*
100-CN	*	*	*	*
DMSO-CP	*	*	*	*
DMSO-CN	*	*		
CP-CN	*	*	*	*

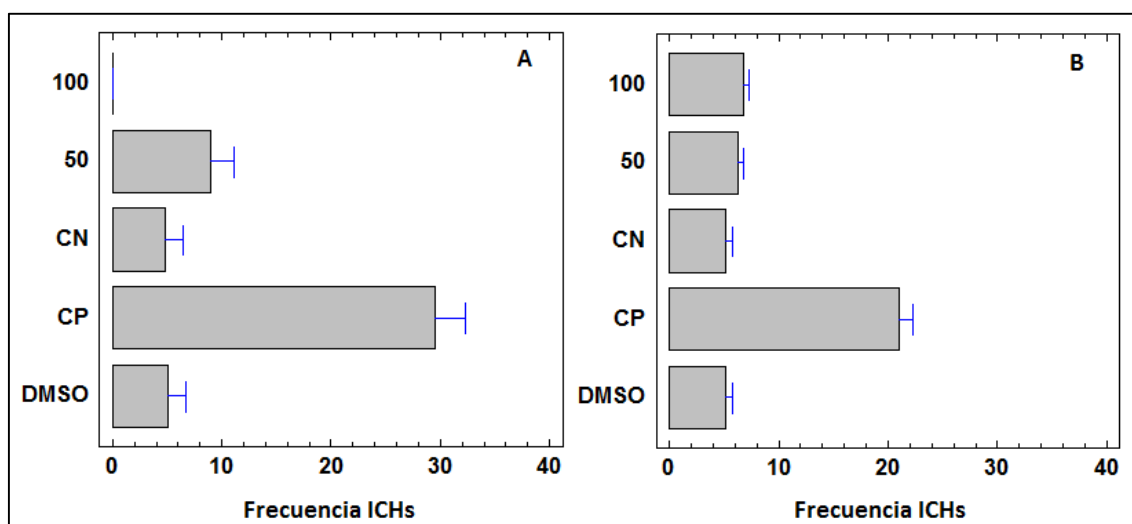
(* indica diferencia significativa)

2.2 Evaluación del efecto genotóxico

2.2.1 Intercambio de cromátidas hermanas

La Figura 2-7 muestra los resultados de las medias de los ICHs encontrados en los tratamientos de las muestras realizados a las líneas celulares Jurkat y CHO.

Figura 2-7: Promedios de ICHs obtenidos en las líneas celulares Jurkat (A) y CHO (B) tratadas con F8 a concentraciones de 50, 100 $\mu\text{g/mL}$, y respectivos controles CN, CP Y DMSO.



En el caso de la línea celular Jurkat se realizó una transformación logarítmica de los datos debido al no cumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianzas, el valor p

obtenido en la prueba de *Levene* fue de 0,0053, indicando que al menos 2 varianzas no son homogéneas, tal vez debido a la presencia de algunos valores extremos en los tratamientos. Una vez transformados los datos, se realizó el análisis de rangos múltiples con DMS (Tabla: 2-4).

En el tratamiento de concentración 100 µg/mL sobre la línea celular Jurkat no se detectaron mitosis, por lo cual no se reportaron resultados a esta concentración.

La Tabla 2-4 muestra las comparaciones de medias realizadas:

Tabla 2-4: Comparación de medias entre los tratamientos en ICH aplicados en las células Jurkat y CHO.

Comparaciones	Jurkat	CHO
	Diferencia Significativa	Diferencia Significativa
100 - 50	NA	
100 - CN	NA	*
100 - CP	NA	*
100 - DMSO	NA	*
50 - CN	*	
50 - CP	*	*
50 - DMSO	*	
CN - CP	*	*
CN - DMSO		
CP - DMSO	*	*

(* indica diferencia significativa)

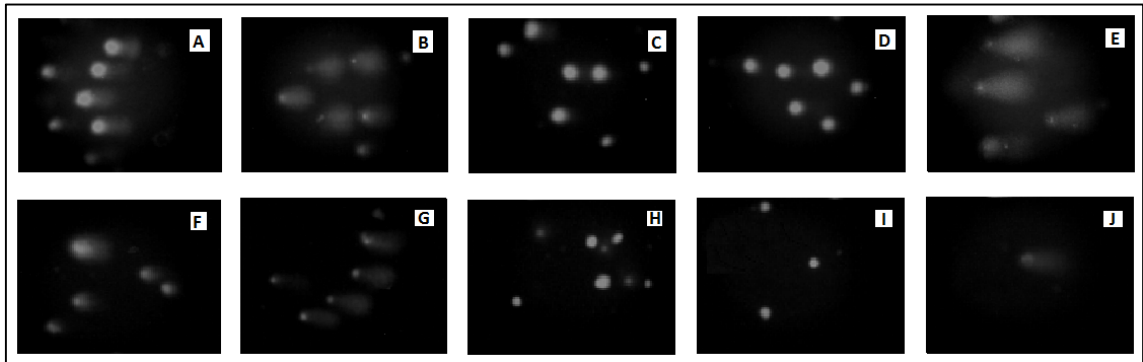
En las células Jurkat se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos, hay un aumento en la frecuencia de ICH debido al tratamiento a 50 µg/mL, mostrando efecto genotóxico de rompimiento de doble cadena de ADN en las células Jurkat expuestas a esta fracción evaluada.

En el caso de la línea celular CHO los datos cumplieron todos los supuestos del análisis de varianza por lo que se procedió con un ANOVA convencional y el análisis de rangos múltiples con DMS. Para este caso se observa que el efecto de F8 a 50 µg/mL y 100 µg/mL no presentan diferencias significativas entre ellos, pero al compararlos con el control negativo, si se observó un incremento en la frecuencia de ICHs.

2.2.2 Ensayo cometa

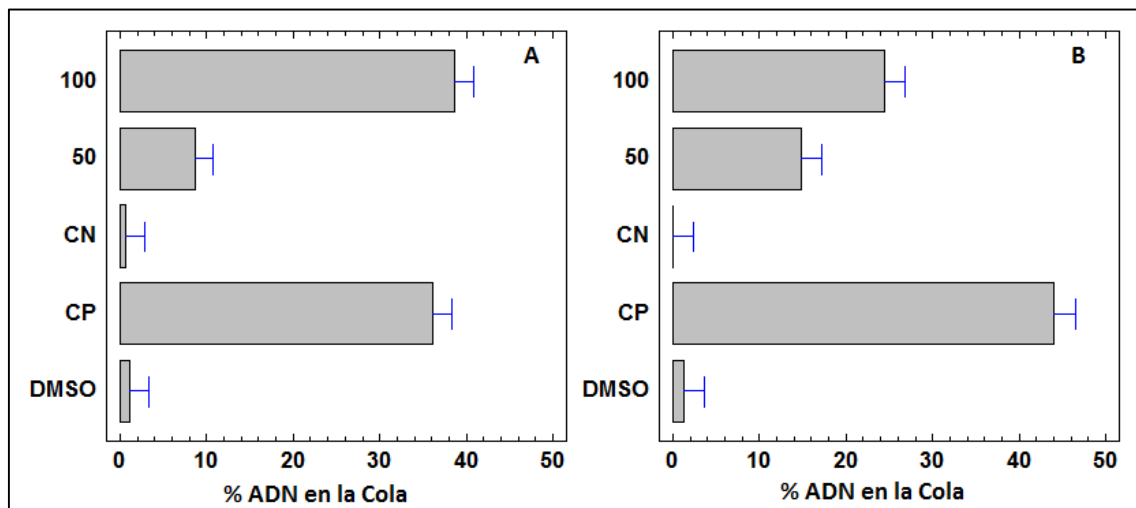
Para esta evaluación, se usó como parámetro, el promedio del tamaño de la cola, teniendo en cuenta que la línea celular Jurkat posee poliploidías en su cariotipo, el parámetro como la longitud del cometa, no es recomendable usarlo ya que depende del tamaño del núcleo analizado, mientras que el porcentaje de ADN contenido en la cola, es relativo a cada cometa. La figura 2-8 muestra el efecto de la fracción F8 a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre las líneas celulares Jurkat y CHO.

Figura 2-8: Efecto de la fracción F8 obtenidos en test cometa a concentraciones 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A) y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B), controles de DMSO 1,2% (C), CN (D) y CP (E) en las líneas celular Jurkat y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (F) y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (G), controles de DMSO 1,2% (H), CN (I) y CP (J) en la línea celular CHO (200x) .



La Figura 2-9 muestra la media del porcentaje de ADN en la cola a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre las líneas celulares Jurkat y CHO.

Figura 2-9: Media del porcentaje de ADN en la cola obtenido en el test cometa en líneas celulares Jurkat (A) y CHO (B) tratadas con F8 a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{Ml}$, CN, CP y DMSO.



La Tabla 2-5 muestra los resultados obtenidos en la prueba de comparación de medias realizadas al parámetro de porcentaje de ADN en la cola.

Tabla 2-5: Comparación de medias entre los tratamientos aplicados en ensayo cometa a las células Jurkat y CHO.

Comparación	Jurkat	CHO
	Diferencia Significativa	Diferencia Significativa
100 - 50	*	*
100 - CN	*	*
100 - CP		*
100 - DMSO	*	*
50 - CN	*	*
50 - CP	*	*
50 - DMSO	*	*
CN - CP	*	*
CN - DMSO		
CP - DMSO	*	*

(* indica diferencia significativa)

Los resultados obtenidos en la prueba de comparación de medias de las células Jurkat, muestran que la fracción F8 en las dos concentraciones evaluadas, generan mayor cantidad de rupturas respecto a los controles negativos y de solvente, adicionalmente,

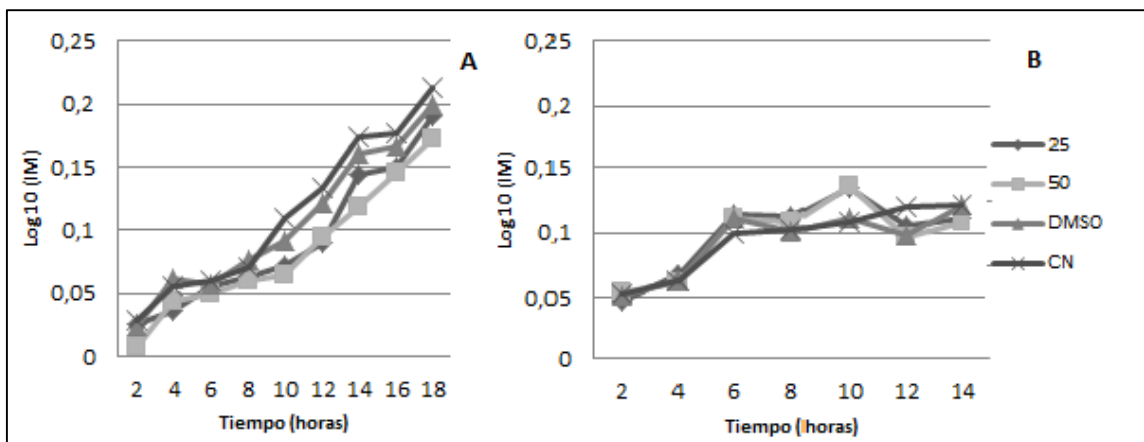
hay un efecto dependiente del incremento de la concentración, la media con la concentración 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es mucho menor que la de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 2-8 y 2-9). En el caso de las células CHO se observa un efecto similar que en las Jurkat, de igual forma se observa un efecto genotóxico agudo dependiente de la dosis aplicada sobre esta línea celular.

2.3 Evaluación del efecto antiproliferativo

2.3.1 Función de acumulación

Ambas líneas celulares mostraron un comportamiento similar en la variación de las pendientes de los tratamientos, no se evidenciaron retrasos o acortamiento del ciclo celular en los tratamientos aplicados. (Ver Figura 2-10 y Tabla 2-6)

Figura 2-10: Curvas de acumulación de células mitóticas respecto al tiempo en las líneas celulares Jurkat (A) y CHO (B).



La Tabla 2-6 muestra los resultados obtenidos para el cálculo de las pendientes de las curvas de acumulación:

Tabla 2-6: Pendientes obtenidas a partir de la regresión lineal del logaritmo en base 10 del índice mitótico (IM) con respecto al tiempo en las líneas celulares Jurkat y CHO.

Tratamiento	Jurkat	CHO
25	0,0201	0,0103
50	0,019	0,0091
DMSO (0,6%)	0,0212	0,01
CN	0,0233	0,0117

La Figura 2-10 y Tabla 2-6 muestran que en ambas líneas celulares no hay variación significativa del ciclo celular en los tratamientos aplicados respecto a los controles. En el caso de Jurkat se puede observar que las pendientes tienden a estar cercanas al valor de 0,02, mientras que las de CHO tienden a 0,01.

2.3.2 Cinética proliferativa

La Tabla 2-3 muestra el promedio de ciclo y tiempo de ciclo calculados en las líneas celulares Jurkat y CHO tratadas con F8 a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y controles negativo, positivo y de solvente.

Tabla 2-7: Promedio de ciclo y tiempo de ciclo calculados en las líneas celulares Jurkat y CHO tratadas con F8 a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y controles negativo, positivo y de solvente.

Tratamiento	Jurkat		CHO	
	Promedio de ciclo	Tiempo de ciclo	Promedio de ciclo	Tiempo de ciclo
100	ND	ND	2,13	16,94
50	2,08	23,08	1,83	19,68
DMSO (1,2%)	2,11	22,78	1,91	18,80
CN	1,99	24,17	2,20	16,36
CP	1,43	33,49	1,58	22,83

Según los resultados obtenidos en esta evaluación se puede determinar que no hay un efecto diferencial en la duración del tiempo de ciclo de las concentraciones evaluadas respecto de los controles.

3. Discusión

Los resultados obtenidos mediante las pruebas de citotoxicidad mostraron un efecto significativo de las fracciones F8 y F10 sobre las líneas celulares Jurkat y CHO. La observación microscópica de la membrana celular de ambas líneas, se vio afectada con las dos fracciones evaluadas. El mayor efecto sobre la línea celular Jurkat respecto a la CHO, fue un daño grave de membrana, e incluso sin incorporar el Azul de tripano se observaron deformaciones y cambios en su superficie.

Con los datos obtenidos, se calculó un IC_{50} aproximado a 100 $\mu\text{g/mL}$ en las dos fracciones en ambas líneas celulares, este valor se tomó de referencia ya que se encontró incluido en todos los rangos de concentración, además el porcentaje de correlación de la prueba fue superior al 80% en todas las evaluaciones. Adicionalmente, en la evaluación de la capacidad de clonación, se observó que el efecto de las fracciones F8 y F10 en ambas líneas celulares aumentó fuertemente respecto al incremento de la concentración, del mismo modo, se observó una disminución gradual de la capacidad de clonación, sugiriendo un efecto dosis dependiente. Por otro lado, se observó que las evaluaciones a 100 $\mu\text{g/mL}$ no presentaron diferencia significativa respecto al control positivo, excepto con la fracción F8 sobre las células CHO, lo cual corresponde a una inhibición casi total del crecimiento celular. Estudios anteriores, demostraron la capacidad de fracciones diclorometanólicas obtenidas de las hojas de *Licania tomentosa* de inhibir el crecimiento de la línea celular linfóide K562 ¹⁶. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que estas fracciones también afectan las líneas celulares Jurkat y CHO.

La evaluación del efecto genotóxico de F8 mostró un incremento en la frecuencia de ICH respecto a los controles en ambas líneas celulares, sin embargo, en el caso de la línea celular Jurkat a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ el índice mitótico fue 0%. El efecto observado en la línea CHO fue similar al incremento de la frecuencia de ICHs, pero fue menor respecto a la línea Jurkat. Es así como, al comparar la frecuencia de ICHs con la

concentración de 50 µg/mL y 100 µg/mL en las líneas Jurkat y CHO respectivamente, se observa un efecto mayor en la línea linfoide.

De la misma forma, los resultados obtenidos con el ensayo cometa muestran un efecto dosis dependiente e independiente del ciclo celular. También, es evidente un efecto diferencial entre las líneas celulares, el daño mayor se encontró en la línea celular Jurkat con la mayor concentración, ya que muestra un porcentaje de ADN en la cola similar al control positivo, lo que implica un daño agudo al ADN. Algunos reportes, han mostrado que las fracciones y extractos de las plantas pertenecientes a la familia Chrysobalanaceae causan efecto genotóxico de algunos compuestos contenidos en las hojas y frutos determinado por diferentes metodologías, como la evaluación directa de las fracciones sobre la conformación topológica de plásmidos por medio de electroforesis en gel de agarosa y midiendo la eficiencia en la transformación de bacterias con plásmidos previamente tratados^{8,53}.

Por otro lado, los resultados de la evaluación del potencial antiproliferativo, no evidenciaron retrasos ni aceleración en el ciclo celular de ninguna de las líneas celulares evaluadas, reflejada en la similitud entre las pendientes obtenidas respecto al control negativo en la función de acumulación. Lo anterior también puede corroborarse con los datos obtenidos en la cinética proliferativa de la prueba de ICH, en la que los tiempos de generación de las células Jurkat y CHO no variaron significativamente respecto al control negativo. Este es el primer reporte sobre la evaluación de ciclo de fracciones de *L. tomentosa*, en la literatura no se encuentran datos relacionados con esta actividad en fracciones similares.

Tomando todos los resultados en conjunto, la fracción F8 mostró efecto citotóxico diferencial entre las líneas celulares, con mayor efecto sobre la membrana de células Jurkat, lo cual se refleja en una eficiencia de clonación relativa menor, comparada con la de las células CHO tratadas con IC₂₅, mientras que con la IC₅₀ se observa un comportamiento similar en ambas líneas, pero es evidente su efecto citotóxico, como lo han mostrado estudios realizados con anterioridad de fracciones y/o extractos obtenidos de *L. tomentosa*^{8,16,19}.

De otro lado, la fracción F8 mostró efecto genotóxico independiente del ciclo celular en las pruebas de ICH y test cometa, con ausencia de mitosis en la prueba de ICH con la

concentración de 100 µg/mL en las células Jurkat. La ausencia de mitosis podría estar relacionada con la baja ECR encontrada y con los datos obtenidos con la prueba de exclusión de colorante vital azul de tripano con este mismo tratamiento, pero no se pueden explicar como retraso o aceleración del ciclo celular, debido a que los resultados de cinética de proliferación y función de acumulación no se encontraron diferencias significativas con el control. Sin embargo, no puede descartarse que posiblemente la viabilidad celular pudo disminuir, lo cual podría ser la causa de la no presencia de mitosis en los cultivos procesados.

Otra explicación que apoyan estos resultados se relacionan con las pruebas de evaluación de tiempo corto como el MTT y azul de tripano, las cuales evalúan la acción citotóxica inmediata a nivel metabólico y de membrana, sin tener en cuenta posibles reversibilidades en el daño causado por la sustancia. Por esa razón y como complemento, se llevan a cabo pruebas de tiempo largo, como eficiencia de clonación, ICH y función de acumulación, que verifican si estos daños metabólicos o de membrana pudieron ser reparados por la maquinaria celular o si por el contrario las sustancias evaluadas, ocasionaron la muerte o el daño celular.

Con los resultados obtenidos y lo reportado en la literatura acerca de las fracciones diclorometanólicas de *Licania tomentosa*, sería de vital importancia la purificación y determinación de las sustancias presentes, ya que las diversas moléculas presentes podrían interactuar y generar los altos niveles de genotoxicidad. Es importante realizar pruebas para verificar el potencial antifúngico, antibacterial, antiviral u otros potenciales de estas fracciones, debido al efecto citotóxico y genotóxico reportado en la literatura y obtenido en este estudio, los cuales pueden resultar aplicaciones en otras aplicaciones similares a las obtenidas con las líneas celulares Jurkat y CHO.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- Las fracciones F8 y F10 presentaron efecto citotóxico en las pruebas de exclusión de colorante, MTT y eficiencia de clonación, en las líneas celulares Jurkat y CHO-K1
- La IC_{50} encontrada fue de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aproximadamente para ambas fracciones y líneas celulares evaluadas.
- La fracción F8 mostró alto daño genotóxico a nivel de cadena sencilla y doble, evidenciado en un incremento en el número promedio de ICH y en el porcentaje de ADN en las colas de los cometas en ambas líneas celulares.
- La fracción F8 no mostró efecto antiproliferativo en ambas líneas celulares evaluadas.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda evaluar la fracción F10 a nivel genotóxico ya que presentó un potencial efecto citotóxico.
- Es importante la evaluación de la fracción F8 sobre otras líneas celulares para determinar y comparar su efecto biológico.
- Con los resultados obtenidos y lo reportado en la literatura acerca de las fracciones diclorometanólicas de *Licania tomentosa*, sería de vital importancia la purificación y determinación de las sustancias presentes, ya que las diversas moléculas podrían interactuar y generar los altos niveles de genotoxicidad u otro tipo de interferencia.
- Se recomienda evaluar la fracción F8 para verificar su potencial antibacteriano y antifúngico, debido a su efecto citotóxico pero principalmente por su fuerte acción genotóxica.

A. Anexo: Resultados obtenidos mediante la prueba de Azul de tripano

Tabla A-1: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con Azul de tripano en células Jurkat y CHO tratadas con las fracciones F8 y F10 a concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 µg/mL .

Concentración (µg/mL)	Jurkat		CHO	
	Viabilidad Promedio F8 (%)	Viabilidad Promedio F10 (%)	Viabilidad Promedio F8 (%)	Viabilidad Promedio F10 (%)
20	95,7	96,24	94,71	94,04
40	92,76	95,53	93,13	91,3
60	89,39	90,8	91,2	85,45
80	88,53	86,39	91,44	79,14
100	58,06	52,14	53,6	51,17
120	43,7	13,45	46,41	5,56

Tabla A-2: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con Azul de tripano en células Jurkat y CHO sin tratamiento y bajo el efecto del solvente a 1,5%.

	Jurkat	CHO
Controles	Viabilidad Promedio (%)	Viabilidad Promedio (%)
Negativo	96,69	98,02
DMSO (1,5%)	96,61	96,98

B. Anexo: Resultados obtenidos mediante la prueba de MTT

Tabla B-1: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con MTT en células Jurkat y CHO tratadas con las fracciones F8 y F10 a concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 µg/mL.

Concentración (µg/mL)	Jurkat		CHO	
	Viabilidad Promedio F8 (%)	Viabilidad Promedio F10 (%)	Viabilidad Promedio F8 (%)	Viabilidad Promedio F10 (%)
20	98,75	90,25	98,87	93,38
40	92,49	80,17	91,83	84,96
60	81,58	67,3	77,4	80,42
80	64,8	74,38	73,43	72,77
100	53,11	52,16	43,32	50,74
120	26,31	38,39	34,91	24,25

Tabla B-2: Porcentaje de viabilidad (promedio de dos experimentos) con MTT en células Jurkat y CHO tratadas con las fracciones F8 y F10 a concentraciones de 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 y 110 µg/mL.

Concentración (µg/mL)	Jurkat		CHO	
	Viabilidad Promedio F8 (%)	Viabilidad Promedio F10 (%)	Viabilidad Promedio F8 (%)	Viabilidad Promedio F10 (%)
70	74,54	84,41	75,61	75,47
75	72,63	85,92	72,6	64,44
80	72,78	78,18	72,23	64,73
85	69,59	76,96	66,7	74,55
90	66,59	66,96	61,64	63,68
95	64,46	68,18	60,09	60,85
100	48,68	48,47	48,22	47,6
105	45,55	39,08	39,48	43,44
110	39,55	28,39	33,44	30,9

C. Anexo: Resultados obtenidos mediante Eficiencia de clonación

Tabla C-1: Número de colonias promedio, eficiencia de clonación absoluta y eficiencia de clonación relativa en las líneas celulares Jurkat y CHO tratadas con las fracciones F8 y F10 a concentraciones de 100, 50 y 25 µg/mL

Línea celular	Fracción	Concentración (µg/mL)	NCP	ECA	ECR
Jurkat	F8	25	178,67	59,56	102,29
		50	45,67	15,22	26,15
		100	28,33	9,44	16,22
	F10	25	110,33	36,78	63,17
		50	79	26,33	45,23
		100	17,67	5,89	10,11
	Controles	DMSO (1,2%)	200	66,67	114,5
		CP	0	0	0
		CN	175	58,33	NA
CHO	F8	25	188,67	94,33	108,02
		50	101	50,5	57,82
		100	1,67	0,83	0,95
	F10	25	134	67	76,72
		50	124	62	70,99
		100	56	28	32,06
	Controles	DMSO (1,2%)	170,67	85,33	97,71
		CP	0	0	0
		CN	174,67	87,33	NA

D. Anexo: Resultados obtenidos mediante ICH

Tabla D-1: Media de ICHs obtenidos en las líneas celulares Jurkat (A) y CHO (B) tratadas con F8 a concentraciones de 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y respectivos controles CN, CP Y DMSO.

Tratamiento	Jurkat	CHO
100	ND	$6,67 \pm 0,55$
50	$8,94 \pm 2,12$	$6,23 \pm 0,54$
CN	$4,83 \pm 1,60$	$5,15 \pm 0,59$
CP	$29,5 \pm 2,76$	$21 \pm 1,23$
DMSO (1,2%)	$5,07 \pm 1,68$	$5,17 \pm 0,57$

Bibliografía

1. IARC. Globocan 2008 Cancer Incidence and Mortality Worldwide. 2008.
2. Li YT, Chua MJ, Kunnath AP, Chowdhury EH. Reversing multidrug resistance in breast cancer cells by silencing ABC transporter genes with nanoparticle-facilitated delivery of target siRNAs. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2473–2481.
3. NCI. Chemotherapy Side Effects Fact Sheets. 2011.
4. Valerio J, Cross KP. Characterization and validation of an in silico toxicology model to predict the mutagenic potential of drug impurities*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;260(3):209–221.
5. Sneader W. *Drug Prototypes and Their Exploitation*. UK: Wiley; 1996.
6. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(1-2):72–79.
7. Cassady JM, Douros J. *Anticancer agents based on natural product models*. Academic Press; 1980.
8. Feitosa EA, Xavier HS, Randau KP. Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Rev. bras. farmacogn*. 2012.
9. Dahlgren RMT. A revised system of classification of the angiosperms. *Bot J Linn Soc*. 1980;80(2):91–124.
10. Morales L, Varón T. *Árboles Ornamentales en el Valle de Aburrá*. Área Metropolitana del Valle de Aburrá; 2006.
11. Badisa RB, Ayuk-Takem LT, Ikediobi CO, Walker EH. Selective Anticancer Activity of Pure Licamichauxiioic-B Acid in Cultured Cell Lines. *Pharm Biol*. 2006;44(2):141–145.
12. Braca A, Bilia AR, Mendez J, Morelli I. Myricetin glycosides from *Licania densiflora*. *Fitoterapia*. 2001;72(2):182–185.
13. Braca A, Bilia AR, Mendez J, Pizza C, Morelli I, de Tommasi N. Chemical and biological studies on *Licania* genus. In: *Bioactive Natural Products (Part I)*. Vol Volume 28, Part I. Elsevier; 2003:35–67.

14. Braca A, Luna D, Mendez J, Morelli I. Flavonoids from *Licania apetala* and *Licania licaniaeflora* (Chrysobalanaceae). *Biochem Syst Ecol.* 2002;30(3):271–273.
15. Dunstan CA, Noreen Y, Serrano G, Cox PA, Perera P, Bohlin L. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays. *J Ethnopharmacol.* 1997;57(1):35–56.
16. Fernandes J, Castilho RO, da Costa MR, Wagner-Souza K, Coelho Kaplan MA, Gattass CR. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Lett.* 2003;190(2):165–169.
17. Miranda MMFS, Gonçalves JLS, Romanos MTV, et al. Anti-herpes simplex virus effect of a seed extract from the tropical plant *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (Chrysobalanaceae). *Phytomedicine.* 2002;9(7):641–645.
18. Silva JB, Meneses IRA, Countinho HDM, Rodrigues FFG. Antibacterial and antioxidant activities of *Licania tomentosa* (BENTH.) Fritsch (Chrysobalanaceae). *Arch. Biol. Sci.* 2012;64(2):459–462.
19. Lee IS, Shamon LA, Chai HB, et al. Cell-cycle specific cytotoxicity mediated by rearranged ent-kaurene diterpenoids isolated from *Parinari curatellifolia*. *Chem. Biol. Interact.* 1996;99(1-3):193–204.
20. Kim YK, Yoon SK, Ryu SY. Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedius*. *Planta Med.* 2000;66(5):485–486.
21. Pisha E, Chai H, Lee I-S, et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med.* 1995;1(10):1046–1051.
22. Schmidt ML, Kuzmanoff KL, Ling-Indeck L, Pezzuto JM. Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur. J. Cancer.* 1997;33(12):2007–2010.
23. Zuco V, Supino R, Righetti SC, et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* 2002;175(1):17–25.
24. Boyd MR, Paull KD. Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev Res.* 1995;34(2):91–109.
25. Slater K. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Curr Opin Biotechnol.* 2001;12(1):70–74.
26. Puck TT, Steffen J. Life cycle analysis of mammalian cells. I. A method for localizing metabolic events within the life cycle, and its application to the action of colcemide and sublethal doses of x-irradiation. *Biophys. J.* 1963;3:379–397.
27. Wolff S, Perry P. Differential giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma.* 1974;48(4):341–353.

28. Shimizu RW, Sun JD, Li AP, Newton GJ, Brooks AL. The use of sister-chromatid exchange in Chinese hamster primary lung cell cultures to measure genotoxicity. *Mutat Res-Envir Muta*. 1984;130(5):333–342.
29. Cassiman JJ, de Clercq E, van den Berghe H. Induction of sister-chromatid exchange by 5-substituted 2'-deoxyuridines. *Mutat Res*. 1983;117(3-4):317–327.
30. Morgan WF, Crossen PE. A comparison of induced sister chromatid exchange levels in chinese hamster ovary cells and cultured human lymphocytes. *Environ Mutagen*. 1982;4(1):65–71.
31. Perry PE. Induction of sister-chromatid exchanges (SCEs) by thymidine and the potentiation of mutagen-induced SCEs in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res-Fund Mol M*. 1983;109:219–229.
32. Liao W, McNutt MA, Zhu W-G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*. 2009;48(1):46–53.
33. Olive PL, Durand RE. Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytometry Part A*. 2005;66A(1):1–8.
34. Gedik CM, Ewen SWB, Collins AR. Single-cell Gel Electrophoresis Applied to the Analysis of UV-C Damage and Its Repair in Human Cells. *Int J Radiat Biol*. 1992;62(3):313 – 320.
35. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184–191.
36. Tice R, Andrews P., O H, IV. SN. The single cell gel (SCG) assay: An electrophoretic technique for the detection of ADN damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol*. 1991;283:157–164.
37. ATCC. TIB-152. *ATCC Advanced Catalog Search*.
38. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer*. 1977;19(5):621–626.
39. Kao FT, Puck TT. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;60(4):1275–1281.
40. ATCC. CCL-61. *ATCC Advanced Catalog Search*.
41. Sánchez-Lamar Á. Utilización de la línea celular CHO en los ensayos de genotoxicidad. *Rev Cubana Invest Biomed*. 1999;18(1):19–21.
42. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5th ed. John Wiley & Sons; 2005.

43. Kaltenbach JP, Kaltenbach MH, Lyons WB. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp. Cell Res.* 1958;15(1):112–117.
44. Renzi D, Valtolina M, Foster R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *Atla-Altern Lab Anim.* 1993;21:89–96.
45. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55–63.
46. Bozkurt G, Yuksel M, Karabogaz G, et al. Sister chromatid exchanges in lymphocytes of nuclear medicine physicians. *Mutat Res.* 2003;535(2):205–213.
47. Kanaar R, Hoeijmakers JHJ, van Gen DC. Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends Cell Biol.* 1998;8(12):483–489.
48. Sonoda E, Sasaki MS, Morrison C, Yamaguchi-Iwai Y, Takata M, Takeda S. Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. *Mol Cell Biol.* 1999;19(7):5166–5169.
49. Sjögren C, Ström L. S-phase and DNA damage activated establishment of Sister chromatid cohesion—importance for DNA repair. *Exp Cell Res.* 2010;316(9):1445–1453.
50. López O JB, Márquez ME. *Modelo experimental para el estudio cromosómico en células de mamíferos.* Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2002.
51. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004;26(3):249–261.
52. Angelis KJ, Duscaroninská M, Collins A. Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis.* 1999;20(10):2133–2138.
53. Ferreira-Machado S., Rodrigues M., Nunes AP., et al. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. *Toxicol Lett.* 2004;151(3):481–487.