

ANTIBIOSIS, CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD INDUCIDAS POR EL  
EXTRACTO LIOFILIZADO DEL MICROHONGO ENDÓFITO *Aspergillus*  
*fumigatus* EN318

DIANA MARÍA NARVÁEZ NOGUERA

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA  
BOGOTÁ  
2007

ANTIBIOSIS, CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD INDUCIDAS POR EL  
EXTRACTO LIOFILIZADO DEL MICROHONGO ENDÓFITO  
*Aspergillus fumigatus* EN318

DIANA MARÍA NARVÁEZ NOGUERA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Magíster en  
Ciencias Biológicas.

HELENA GROOT de RESTREPO

Directora

MARÍA CARIDAD CEPERO de GARCÍA

Codirectora

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATORIO DE GENÉTICA HUMANA  
BOGOTÁ  
2007

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por ser la Luz que ilumina mi camino.

A Helena Groot, por abrimme las puertas del extraordinario mundo de la investigación y contagiame con su espíritu emprendedor.

A María Caridad Cepero de García, por su orientación y asesoría en la realización de este proyecto.

A Marcela Varona, por colaborame con la evaluación de este trabajo.

A Diana Sicard, por compartir con migo sus conocimientos.

A Consuelo Vanegas y Juliana Martínez, por brindame su ayuda y apoyo en la realización de las pruebas antibacterianas.

Al Comité de Investigaciones de la Facultad de Ciencias, por financiar este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Sandra Ortiz, Gina Riveros, Johana Moscoso, María Paula Sánchez y Andrés Felipe Rodríguez, por todo su apoyo.

A mis padres, por compartir mis sueños, alegrías y tristezas y por entregame su Amor incondicional.

A mi hermana, por estar a mi lado cuando más lo necesito.

A mis abuelitos, tíos y primos, por el constante apoyo y por estar a mi lado en los momentos importantes de mi vida.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
INTRODUCCIÓN	11
2 JUSTIFICACIÓN	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos	14
4 MARCO TEÓRICO	15
4.1 Productos naturales	15
4.2 Microorganismos Endófitos	16
4.2.1 Productos naturales producidos por Endófitos	17
4.3 Género <i>Aspergillus</i>	19
4.3.1 Morfología	20
4.3.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> EN318	23
4.4 Daño en el ADN detectado por el Ensayo del Cometa	24
4.4.1 Resultados Ensayo del Cometa	25
5 METODOLOGÍA	28
5.1 Diagrama de Flujo	28
5.2 Obtención del extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318	29
5.3 Prueba de Antibiosis	29
5.4 Células	30
5.4.1 Línea celular de fibrosarcoma HT1080	30
5.4.2 Línea celular de fibroblastos GM38	30
5.4.3 Línea celular de fibroblastos CHO K1	31
5.4.4 Células de fibroblasto de piel de ratón	31
5.5 Controles	31
5.6 Citotoxicidad crónica (cristal violeta)	32
5.7 Adición del extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318	32

	<b>Página</b>
5.8 Citotoxicidad aguda	32
5.9 Ensayo del cometa	33
5.9.1 Resultados del ensayo del cometa	33
5.10 Análisis estadístico	34
5.10.1 Citotoxicidad	34
5.10.1 Cometa	34
6 RESULTADOS	35
6.1 Prueba de Antibiosis	35
6.2 Citotoxicidad crónica	38
6.3 Citotoxicidad aguda	39
6.4 Genotoxicidad	41
6.4.1 Morfología del núcleo	41
6.4.2 Longitud de la cola	45
7 DISCUSIÓN	48
8 CONCLUSIONES	51
9 RECOMENDACIONES	52
10 BIBLIOGRAFÍA	53
11 ANEXOS	60

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Morfología microscópica <i>Aspergillus fumigatus</i>	20
<b>Figura 2.</b> Morfología típica obtenida mediante el Ensayo del Cometa, que corresponde a la intensidad del daño inducido.	26

## INDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Porcentaje de viabilidad obtenido mediante la técnica de Azul de Trypan, para siete concentraciones del extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318 en las líneas celulares HT1080, GM38, CHO K1 y en Fibroblastos de Piel de Ratón (FPR).	39
<b>Tabla 2.</b> Resultados prueba estadística ANOVA y prueba de comparación de medias Dunnett ( $\alpha = 0.05$ y $0.01$ ), para las diferentes concentraciones del extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318, según la morfología del núcleo, en la línea celular HT1080, GM38, CHO K1 y en Fibroblastos de Piel de Ratón (FPR), obtenidos mediante el ensayo del cometa.	45
<b>Tabla 3.</b> Resultados prueba estadística ANOVA y prueba de comparación de medias Dunnett ( $\alpha = 0.05$ y $0.01$ ), para las diferentes concentraciones del extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318, según la longitud de la cola, en la línea celular HT1080, GM38, CHO K1 y en Fibroblastos de Piel de Ratón (FPR), obtenidos mediante el ensayo del cometa.	47

## INDICE DE GRÁFICAS

	<b>Página</b>
<b>Gráfica 1.</b> Inhibición del extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318 para <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> , determinada por la disminución en la Densidad Optica (OD) a las 8 horas de exposición.	35
<b>Gráfica 2.</b> Inhibición del extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318 para <b><i>Escherichia coli</i></b> , determinada por la disminución en la Densidad Optica (OD) a las 8 horas de exposición.	36
<b>Gráfica 3.</b> Inhibición del extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318 para <b><i>Salmonella sp.</i></b> , determinada por la disminución en la Densidad Optica (OD) a las 8 horas de exposición.	37
<b>Gráfica 4.</b> Inhibición del extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318 para <b><i>Shigella sonnei</i></b> , determinada por la disminución en la Densidad Optica (OD) a las 8 horas de exposición.	37
<b>Gráfica 5.</b> Curva de Viabilidad en células de Fibroblasto de Piel de Ratón (FPR) y células de la Línea Celular CHO K1 luego de la exposición de 72 h al extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318, determinada mediante la técnica de Cristal Violeta.	38
<b>Gráfica 6.</b> Curva de Viabilidad en células de Fibroblasto de Piel de Ratón (FPR) y células de la Línea Celular HT1080, GM38 y CHO K1 luego de la exposición de 3 h al extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318, determinada mediante la técnica de Azul de Trypan.	40



**Gráfica 7.** Porcentaje de células con diferente morfología del núcleo, de acuerdo al daño en el ADN, para cada concentración del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 en la línea celular HT1080. 41

**Gráfica 8.** Porcentaje de células con diferente morfología del núcleo, de acuerdo al daño en el ADN, para cada concentración del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 en la línea celular GM38. 42

**Gráfica 9.** Porcentaje de células con diferente morfología del núcleo, de acuerdo al daño en el ADN, para cada concentración del extracto liofilizado de *A. Fumigatus* EN318 en la línea celular CHO K1. 43

**Gráfica 10.** Porcentaje de células con diferente morfología del núcleo, de acuerdo con daño en el ADN, para cada concentración del extracto liofilizado de *A. Fumigatus* EN318 en células de fibroblasto de piel de ratón (FPR). 44

**Gráfica 11.** Curva de Genotoxicidad, en células de Fibroblasto de Piel de Ratón (FPR) y células de la Línea Celular HT1080 y CHO K1, inducida por la exposición al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318, de acuerdo a la Longitud de la Cola medida en el ensayo del Cometa. 46

## INDICE DE ANEXOS

	<b>Página</b>
<b>ANEXO A.</b> Obtención del extracto liofilizado de <i>A.fumigatus</i> EN318	61
<b>ANEXO B.</b> Protocolo prueba de antibiosis a partir de densidad óptica	63
<b>ANEXO C.</b> Cultivo primario de fibroblastos de piel de ratón	64
<b>ANEXO D.</b> Protocolo de citotoxicidad crónica (cristal violeta)	66
<b>ANEXO E.</b> Exposición al extracto liofilizado de <i>A. fumigatus</i> EN318	69
<b>ANEXO F.</b> Protocolo citotoxicidad aguda (azul de trypan)	71
<b>ANEXO G.</b> Protocolo ensayo del Cometa	72
<b>ANEXO H.</b> Poster presentado en “Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting, 2006: Vancouver, Canada.”	74

## INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son metabolitos producidos por plantas, animales y microorganismos que han sido utilizados ancestralmente para combatir enfermedades. Este tipo de productos tiene el potencial de proporcionar una fuente de nuevas estructuras químicas para la medicina, la agricultura y la industria, que no pueden ser obtenidas mediante síntesis combinatoria de compuestos artificiales (Williams, 2002).

Las pruebas de sensibilidad a agentes antimicrobianos pueden realizarse *in vivo* o *in vitro*. Las pruebas *in vitro* se usan para seleccionar el tratamiento más eficiente contra una enfermedad infecciosa o el potencial antibiótico de una sustancia de interés. (Guía Laboratorio Bacteriología I, 1999).

Diferentes técnicas para detectar daño en el ADN, basadas en los efectos biológicos (p.ej. micronúcleos, mutaciones, aberraciones cromosómicas estructurales) resultantes del daño genético, han sido utilizadas para identificar sustancias con actividad genotóxica. Recientemente, los métodos más frecuentemente empleados involucran la detección de rompimientos de cadena sencilla (SSB) y sitios alcali-lábiles (ALS) en poblaciones celulares (Tice, 2000). Este principio es aplicado en la técnica empleada en este trabajo de investigación, denominada electroforesis alcalina de células individuales (SCGE) o ensayo del Cometa (término utilizado para identificar el patrón de migración de las células producido en el ensayo), que detecta daño en el ADN a nivel celular. La electroforesis alcalina de células individuales o ensayo del Cometa, se basa en la migración electroforética de fragmentos de ADN producidos por daño genético. La migración de los fragmentos, es proporcional a la cantidad de rompimientos de ADN, es decir, a una mayor migración de los fragmentos, mayor será el daño en la célula.

La ventaja más grande del ensayo del Cometa es que permite la medición de respuesta de células individuales, lo que facilita el estudio de heterogeneidad dentro de la población celular en la inducción de rompimientos de ADN (Nelms, 1997).

Adicionalmente, la muerte celular esta asociada con altos niveles de rompimientos de ADN. En el ensayo del cometa, células apoptóticas o necróticas pueden resultar como falsos positivos ya que pueden deberse a tratamientos con sustancias citotóxicas y no estar relacionadas con agentes genotóxicos (Hartmann, 2003). La selección de la dosis y los resultados del ensayo deben estar justificados en términos de citotoxicidad (Tice, 2000).

El estudio de citotoxicidad crónica se realiza para evaluar el efecto de un agente químico durante un tiempo de exposición prolongado. Esto permite estudiar diversos mecanismos de reparación celular (Kamrin, 1988).

Las pruebas de citotoxicidad aguda se realizan con el objetivo de determinar el daño o la muerte celular de diversos compuestos químicos, luego de una breve exposición a los mismos, midiendo sus efectos inmediatos (Kamrin, 1988).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La creciente necesidad de nuevos productos químicos que sean altamente efectivos, posean una baja toxicidad y menor impacto ambiental (Strobel y Daisy, 2003), sumada a la gran diversidad de compuestos presentes en la naturaleza, hacen que las nuevas investigaciones se enfoquen en el estudio de productos naturales que logren cubrir efectivamente este tipo de necesidades.

Una enorme y casi inexplorada fuente de diversidad microbiana y de compuestos químicos, se encuentra en microorganismos endófitos. Los endófitos producen una amplia serie de agentes antimicrobianos y poseen sistemas genéticos y biológicos únicos, que pueden ser aplicados en diferentes áreas de investigación, fuera de la planta huésped en la que normalmente residen (Strobel, 2003).

Uno de los mayores problemas clínicos, es la proliferación de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, lo que se ha venido dando, en parte por el uso indiscriminado de estos agentes antimicrobianos. Es por esta razón que se vuelve importante realizar una prueba de sensibilidad en bacterias de importancia clínica frente a la exposición del extracto de *A. fumigatus* EN318. Se ha reportado previamente la actividad antibiótica del extracto de éste microhongo endófito contra bacterias patológicas para humanos en el trabajo realizado por Jiménez (2001).

En este estudio se busca establecer la utilidad de un producto natural obtenido a partir de la fermentación del microhongo endófito *Aspergillus fumigatus* EN318, mediante la detección de actividad antibiótica, genotóxica y antimutagénica, en diferentes líneas celulares de fibroblasto, provocada por la exposición al extracto liofilizado de éste microhongo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Deteminar el efecto *in vitro* del extracto liofilizado del microhongo endófito *A. fumigatus* EN318 como agente antibiótico, citotóxico y genotóxico en células de Fibroblasto.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Obtener, por fermentación, el extracto liofilizado del microhongo endófito *A. fumigatus* EN318, para realizar pruebas de antibiosis, citotoxicidad y genotoxicidad.
- Deteminar la actividad antibiótica del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 en bacterias de interés clínico: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* y *Shiguella sonnei*.
- Obtener células de Fibroblasto de Ratón a partir de cultivo primario de piel de Ratones Neonatos.
- Deteminar la citotoxicidad aguda y crónica del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 en células de Fibroblasto.
- Mediante el ensayo del Cometa, establecer la inducción de daño en el ADN en células de Fibroblasto, expuestas al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318.

## 4. MARCO TEORICO

### 4.1 Productos Naturales

Los productos naturales son metabolitos derivados y/o productos directos de microorganismos, plantas y animales que han sido la fuente tradicional de nuevos compuestos. Ofrecen una innumerable diversidad de estructuras químicas que sirven frecuentemente como molécula principal en la industria, cuya actividad puede ser aumentada mediante manipulación química combinatoria o sintética (Strobel y Daisy, 2003).

Mientras la síntesis combinatoria produce compuestos al azar, los metabolitos secundarios, definidos como compuestos de bajo peso molecular que no son requeridos para el crecimiento en cultivo puro, son producidos como adaptación a funciones específicas en la naturaleza (Strobel y Daisy, 2003). Esto hace que se trate de sustancias de una alta complejidad estructural que no pueden ser sintetizadas artificialmente por el hombre, pues llevan años de evolución. En su mayoría, los productos naturales utilizados son empleados por el organismo productor como mecanismo de defensa (Williams, 2002), tanto para el propio organismo como para sus simbiosis.

Los productos naturales aún juegan un rol importante en medicina, aproximadamente un 60% de las nuevas drogas aprobadas contra el cáncer y antibióticos contienen productos naturales como base (Williams, 2002).

Uno de los prerequisites indispensables en el descubrimiento de productos naturales es su rango de uso y lo novedoso de la diversidad molecular. Esta diversidad sobrepasa a la obtenida mediante procesos químicos y en consecuencia proporciona una única gama de compuestos base para la producción de drogas y otro tipo de investigaciones (Bull, 2000).

Debido a que la biodiversidad es tan importante en el descubrimiento continuo de nuevos productos naturales, es indispensable conocer la diversidad existente. Una de las áreas que posee mayor potencial y que definitivamente corresponde a una de las más altas fuentes de diversidad es el mundo microbiano (Williams, 2002).

El descubrimiento de una gran cantidad de microorganismos cuya aplicación abarca un amplio espectro de utilidades en medicina (p.ej. funciones contra el cáncer e inmunosupresoras), industria y agricultura son ahora posibles gracias al desarrollo de nuevos y sofisticados procesos de investigación. Estos procesos involucran organismos individuales, células y enzimas, que resultan en una rápida detección de pistas promisorias para el desarrollo de nuevos productos (Strobel y Daisy, 2003).

#### **4.2 Microorganismos Endófitos**

Por definición, estos microorganismos (en su mayoría hongos y bacterias) se establecen en los espacios intercelulares de los tejidos de plantas (Strobel, 2003). Mientras que la naturaleza asintomática de la ocupación endofítica en el tejido vegetal se ha enfocado en relaciones simbióticas o mutualistas entre los endófitos y su huésped, la biodiversidad observada dentro de los endófitos sugiere que pueden ser saprobitos agresivos o patógenos oportunistas en algunos casos (Strobel y Daisy, 2003).

Los endófitos más frecuentemente aislados son hongos (Strobel y Daisy, 2003). Entre los endófitos más estudiados se encuentran los simbioses intracelulares pertenecientes a la familia ascomicota *Clavicipitaceae*, que crecen en el tejido aéreo de muchas gramíneas en la zona templada. Éste tipo de endófitos asexuales son transmitidos verticalmente de una generación a otra y crecen sistemáticamente a lo largo de hojas y tallos (Clay, 2002). Estos endófitos transmitidos verticalmente, forman asociaciones mutualísticas con sus huéspedes. Esta asociación simbiótica, permite a la gramínea, resistir el estrés



causado por enfermedades, infestación de insectos y nemátodos, y sequía, en comparación con las plantas libres de endófitos (Joost, 1995). El hongo provee a la planta huésped de compuestos secundarios de defensa (alcaloides), para la reducción de herbivoría, y la planta provee de los nutrientes esenciales al hongo (D'Mello, 1997). La defensa química adquirida parece ser la base común para la asociación endofítica entre plantas y hongos (Strobel y Daisy, 2003), especialmente en casos en los que se presenta herbivoría.

Por el contrario, los endófitos asociados a hojas sanas, de algunas angiospermas leñosas son poco conocidos y parece que son transmitidos horizontalmente (Arnold, 2003), a través del tejido de las semillas del huésped o de propágulos vegetativos: esporas. El clima puede influenciar de gran manera en la germinación de las esporas o conidios y en la resultante infección de nuevas plantas huésped (Carrol, 1988). Muchos endófitos de plantas leñosas se encuentran cercanamente relacionados con patógenos (Saikkonen, 1998) y es improbable que jueguen un papel mutualista o protector con respecto a la planta huésped que habitan (Faeth, 2002). Sin embargo existe evidencia de que algunos endófitos fúngicos asociados con angiospermas leñosas, reducen el daño y la pérdida de las hojas debida a la acción de patógenos (Arnold, 2003) lo que redefine la teoría mutualista planteada anteriormente.

Ciertos endófitos pueden producir sustancias bioactivas involucradas en la relación huésped-endófito, las cuales pueden tener aplicaciones en medicina (Strobel, 2003).

#### **4.2.1 Productos Naturales producidos por Endófitos**

Existe una gran variedad de productos naturales producidos por microorganismos endófitos con potencial para ser utilizados en la industria farmacéutica y agroquímica, que incluyen compuestos antivirales, antioxidantes, insecticidas, compuestos inmunosupresores y agentes antidiabéticos (Strobel y Daisy, 2003; Strobel 2003; Williams, 2002). Entre los productos naturales más

estudiados se encuentran los que pueden servir como antibióticos y sustancias anticancerígenas.

### ***Productos de Endófitos como Antibióticos***

Los Antibióticos son definidos como productos naturales orgánicos de bajo peso molecular, producidos por microorganismos, activos a bajas concentraciones en contra de otros microorganismos. Se ha observado que ciertos productos naturales provenientes de microorganismos endófitos poseen la capacidad de inhibir o matar una amplia variedad de agentes productores de enfermedades como fitopatógenos, bacterias, hongos, virus y protozoarios que afectan a humanos y animales (Strobel y Daisy, 2003).

### ***Productos de Endófitos como Anticancerígenos***

El descubrimiento de drogas anticancerígenas se ha convertido en una prioridad. El objetivo en la búsqueda de nuevas drogas es encontrar medicamentos que actúen mediante un modo específico de acción. Se espera que las células cancerosas puedan ser atacadas y que las células normales sufran poco o ningún daño. Sin embargo, la reducción en la citotoxicidad no es una cuestión simple, ya que las células cancerosas y las no cancerosas son muy similares. Algunos de los tratamientos más efectivos contra el cáncer involucran productos naturales o compuestos derivados de estos (Williams, 2002).

La historia de los productos naturales empleados como compuestos anticancerígenos empieza en 1947 con el descubrimiento de la Podofilotoxina aislada de *Podophyllum peltatum*. Aunque es demasiado tóxica para ser usada a nivel clínico, ha servido como base para otro tipo de compuestos como el Etopósido y Tenipósido, que son modificaciones de un análogo (4-dimetilepodofilotoxina) y son usados clínicamente como tratamientos contra el cáncer (Williams, 2002).

La Podofilotoxina actúa previniendo la polimerización de Tubulina en microtúbulos, mientras que los análogos del 4-dimetilepipodofilotoxina no actúan de la misma manera. Ellos inhiben la Topoisomera II previniendo el rompimiento y la unión de las cadenas de ADN (Williams, 2002).

El éxito de la Podofilotoxina y sus derivados, favoreció la investigación de plantas con el fin de descubrir nuevos compuestos útiles en la industria y la medicina. Como resultado del incrementado interés en este campo de investigación, se llegó al estudio de *Taxus brevifolia*, árbol de tejo del Pacífico, del que se descubrió el Paditaxel (Taxol<sup>®</sup>) como compuesto activo (Williams, 2002). Este compuesto actúa como una droga antimetabólica como la podofilotoxina, sin embargo, el Paditaxel es la primera droga descubierta que estabiliza los microtubulos (Williams, 2002), evita que las moléculas de Tubulina se despolimericen durante el proceso de división celular. El Paclitaxel y alguno de sus derivados representan el primer grupo de agentes anticancerígenos que son producidos por endófitos (*Pestalotiopsis* spp) (Strobel y Daisy, 2003).

### **4.3 Género *Aspergillus***

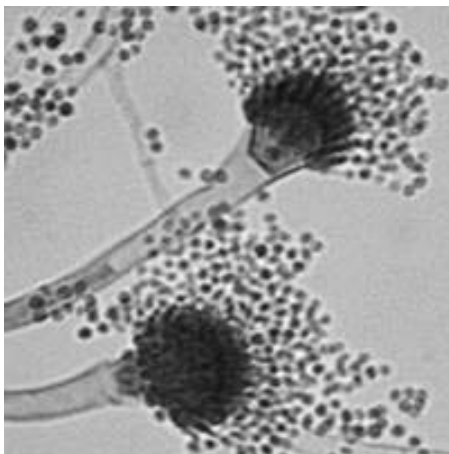
El genero *Aspergillus* fue establecido por Micheli en 1729 para acomodar cierto tipo de hongos asexuales que producen esporas, en cadena o en columna, que emergen de una estructura central. El género *Aspergillus* se clasifica dentro de la familia Moniliaceae en el phylum Deuteromicota. Los telomorfos correspondientes a las especies de *Aspergillus* se clasifican en diez generos: *Edyullia*, *Eurotium*, *Emericella*, *Fennellia*, *Neosartorya*, *Chaetosartoya*, *Hemicarpenales*, *Dichlaena*, *Petromyces* y *Sclerocleista*. Estos géneros pertenecen a la familia Trichocomaceae y al orden Eurotiales en el phylum Ascomycota (Kwon-Chung, 1992).

La clasificación de las especies de *Aspergillus* se ha basado en las diferencias entre las características morfológicas y de cultivo. Existen 18 especies, las cuales no son taxa acreditados pero funcionan como puntos convenientes para

la caracterización de aislamientos. Cada grupo contiene de una a varias especies con ciertas características comunes. Los rasgos empleados en la determinación de los grupos incluyen: el color y la forma de los conidios; el número de esterigmata o fiálides; la forma de la vesícula; marcas y color de los conidioforos; forma de las células de Hülle (Kwon-Chung, 1992).

Las características usadas para la identificación de especies dentro del grupo son el tamaño de cada estructura externa, la presencia o ausencia de cleistotecio y el tamaño, forma y color de las ascosporas y los conidios. El medio estándar para la identificación de la mayoría de las especies de *Aspergillus*, es Agar Extracto de Malta y Agar Czapek's (3% sacarosa) (Kwon-Chung, 1992).

#### 4.3.1 Morfología



**Figura 1.** Morfología microscópica *Aspergillus fumigatus*. Tomado de [www.merckmedicus.com/ppdocs/us/hcp/diseasemodules/fungal/figures/figure17.html](http://www.merckmedicus.com/ppdocs/us/hcp/diseasemodules/fungal/figures/figure17.html)

#### ***Cabeza Conidial***

El color, la forma y el tamaño de la cabeza conidial, que esta compuesta por la vesícula, esterigmata o fiálides y la cadena de conidios, son los rasgos de

identificación de varias especies. Las cabezas conidiales pueden ser verde azuladas o verdes y tienen forma de columna, larga o corta, como en *Aspergillus fumigatus* y *A. nidulans*. Otros como *A. niger* o *A. ochraceus*, son negros o amarillos y tienen forma globosa o radial. La forma de las cabezas esta determinada por la forma de la vesícula y el arreglo del esterigmata en la superficie de la misma. El color se deriva del color de los conidios (Kwon-Chung, 1992).

### **Conidioforos**

La cabeza conidial es producida en la punta del conidioforo, que emerge perpendicular a la célula de pie de la hifa vegetativa. En la mayoría de las especies, el ancho del conidioforo es mayor al de la hifa y su pared es más gruesa. El conidioforo es liso en la mayoría de las especies, excepto en *Aspergillus flavus*, *A. oryzae* y *A. avenaceus*, en los que el conidioforo es rugoso (Kwon-Chung, 1992).

### **Vesículas**

El conidioforo se alarga en la punta para formar la vesícula. Las vesículas pueden ser globosas, redondas, elípticas, en forma de mazos o clavadas y producen los esterigmata o fiálides en la superficie. *Aspergillus niger*, *A. candidus* y *A. ochraceus* producen vesículas globosas con fiálides en toda la superficie, mientras que *A. fumigatus* y *A. terreus* producen vesículas en forma de mazos o redondas que producen fiálides solamente en la mitad superior. Esta característica determina la forma de la cabeza conidial. Las vesículas pueden ser hialinas o estar pigmentadas (Kwon-Chung, 1992).

### **Fiálides o esterigmata**

Las fiálides son producidas en una o dos series. En las especies biseriadas, la primera serie de células, la fiálide primaria, usualmente soporta dos o tres fiálides secundarias. Por ejemplo, *Aspergillus fumigatus* y *A. amstelodami* producen solamente la fiálide primaria, mientras que especies como *A. niger*, *A.*

*nidulans*, *A. terreus* y *A. ustus* producen series dobles de fiálides. *A. flavus* y *A. oryzae* producen fiálides sencillas y dobles en la misma cepa. Las fiálides son uni o multinúcleadas y producen conidios en el ápice en cadenas basipétalas (Kwon-Chung, 1992).

### **Conidios**

Cada fiálide se estrecha en el ápice en un tubo productor de conidios. El núcleo (o núcleos) en la fiálide se divide y los núcleos hijos pasan por el tubo conidial. Un septo es luego construido entre la fiálide y el tubo conidial para separar el primer conidio de la fiálide. La formación repetida de conidios a partir de cada fiálide resulta en una cadena de esporas, con la más antigua en la punta y la más reciente en en la base (cadena basipétala). Los conidios pueden ser lisos, como en *A. terreus* o equinulados, como en *A. niger*. El color en las paredes del conidio varía de brillante a oscuro y determina el color de la cabeza conidial. La forma de los conidios va de esférica a elíptica, extremadamente hidrofóbica, y fácilmente dispersada por el viento cuando son maduros (Kwon-Chung, 1992).

### **Cleistotecio**

El cuerpo fructífero sexual, cleistotecio es producido por algunas especies de *Aspergillus*. *A. nidulans* y *A. amstelodami* son dos especies cuyo telomorfo pertenece a *Emericella* y *Eurotium*, respectivamente. Estas especies son homotáticas y la formación del cleistotecio es iniciada por un ascogonio terminal enrollado. La pared del cleistotecio consiste en de una delgada capa de células usualmente, aplanadas pero que pueden cambiar marcadamente a una apariencia gruesa (Kwon-Chung, 1992).

### **Ascosporas**

Excepto en casos raros, cada asco contiene ocho ascosporas, que son liberadas en la cavidad del cleistotecio en maduración. Las ascosporas son hialinas en la mayoría de las especies. En el grupo de *A. nidulans* (especies de *Emericella*), sin embargo, las ascosporas son de café rojizas a púrpura. Las

ascosporas maduras tienen una forma convexa con o sin cobertura, y la cobertura puede o no estar protegida por bordes o crestas. La variación en el patrón básico de la morfología de las ascosporas es considerada como un factor significativo en la separación de las especies (Kwon-Chung, 1992).

#### **4.3.2 *Aspergillus fumigatus* EN – 318**

El microhongo endófito *A. fumigatus* EN318 fue aislado de hojas con muestra de herbivoría de *Espeletia grandiflora* y *E. corymbosa* encontradas en el Páramo de Cruz Verde, ubicado en la cordillera Oriental en el departamento de Cundinamarca, Colombia (Pardo, 2001).

Este microhongo mostró gran actividad antibacteriana en pruebas de sensidiscos contra bacterias de importancia clínica (22mm *S. aureus*; 17mm *P. aeruginosa*; 23mm *B. cereus*; 58mm *E.coli*) y se observó actividad genotóxica en células de la línea celular HT1080 de acuerdo con el estudio realizado por Jiménez en el 2004.

Existen sustancias anticancerígenas aisladas de cepas de *A. fumigatus*. La más conocida es la Fumagilina, que inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos, en el proceso de Angiogénesis, adhiriéndose a la enzima MetAP2. La angiogénesis es considerada como un evento relevante en el desarrollo de cáncer, ya que la formación de nuevos vasos sanguíneos, provee de nutrientes a las células cancerosas y facilita su crecimiento e invasibilidad (Catalano, 2001). Otro blanco del desarrollo de agentes quimioterapéuticos es el ciclo celular, especialmente agentes antimitóticos. Recientemente, se han reportado las propiedades de dos nuevos compuestos aislados de *A. fumigatus*, las Triprostantinas A y B, que inhiben la formación de microtúbulos (Caballero, 2000).

Por todo lo anterior, se escogió el microhongo *A. fumigatus* EN318 para el desarrollo de este estudio.

#### **4.4 Daño en el ADN detectado por el Ensayo del Cometa**

El principio básico de la electroforesis alcalina de células individuales o ensayo del Cometa, es la migración de fragmentos de ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones electroforéticas (Hartmann, 2003). Östling y Johanson en 1984, fueron los primeros en desarrollar una técnica de electroforesis para detectar daño en el ADN al nivel de una sola célula. En su técnica, las células eran embebidas en agarosa y puestas en una placa microscópica. Las células eran lisadas por detergentes y altas concentraciones de sal y el ADN liberado migraba en la electroforesis bajo condiciones de pH neutro. Las células con un aumento en la frecuencia de rompimientos de cadena doble (DSB), mostraban un aumento en la migración de ADN hacia el ánodo. El ADN que migraba era cuantificado por tinción con bromuro de etidio y la intensidad, medida por fluorescencia, en el patrón de migración utilizando foto-microscópio.

Posteriormente, Singh et al, en 1988, introdujo una técnica en la que la electroforesis se realiza bajo condiciones alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ). A este pH, el aumento en la migración del ADN está asociado con un aumento en los niveles de rompimiento de cadena sencilla (SSB), sitios alcali-labiles (ALS) y rompimientos de cadena sencilla producidos por sitios de reparación por excisión incompleta. Debido a que la mayoría de agentes genotóxicos inducen más rompimientos de ADN de cadena sencilla que rompimiento de cadena doble, esta versión del ensayo del cometa, ofrece un aumento de sensibilidad en la identificación de posibles agentes genotóxicos (Tice, 2000).

Bajo ciertas condiciones el ensayo puede, además, detectar entrecruzamientos de ADN-ADN y ADN-proteína, los cuales (en la ausencia de otro tipo de lesiones en el ADN) aparecen como una disminución relativa de la migración del ADN comparada con los controles (Hartmann, 2003).

Las principales ventajas que ofrece el ensayo del cometa, si se compara con otro tipo de ensayos de genotoxicidad, comprenden: sensibilidad para detectar



bajos niveles de daño genético, el requerimiento de bajo número de células por muestra, flexibilidad, bajos costos, facilidad de aplicación, la habilidad de realizar estudios usando relativamente bajas cantidades de sustancia prueba y periodos cortos de tiempo (un par de días), necesarios para completar el experimento (Tice, 2000; Garaj-Vrhovac 2003; Hartmann, 2003).

El ensayo de electroforesis alcalina de células individuales o ensayo del cometa, puede ser utilizado para investigar la genotoxicidad de diferentes tipos de agentes mutagénicos como químicos industriales, biocidas, productos agroquímicos y farmacéuticos (Hartmann, 2003).

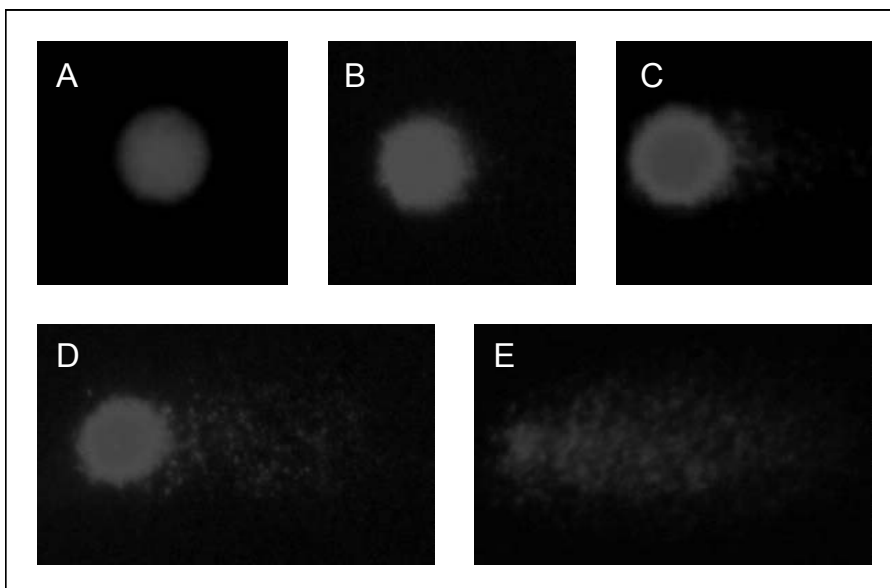
La muerte celular esta asociada con altos niveles de rompimientos de ADN. En el ensayo del cometa, células apoptóticas o necróticas pueden resultar como falsos positivos ya que pueden deberse a tratamientos con sustancias citotóxicas y no estar relacionadas con agentes genotóxicos. No es completamente claro cómo el aumento en los fragmentos de ADN que conduce a la muerte celular puede resultar en falsos positivos en el ensayo del cometa (Hartmann, 2003), es por esta razón que es indispensable realizar pruebas de citotoxicidad con cada experimento.

Los métodos empleados para medir citotoxicidad pueden ser realizados al final del periodo de exposición al extracto (exclusión de colorante vital) o después de un cultivo celular de larga duración (conteo celular o niveles de ATP). La selección de la dosis y los resultados del ensayo deben estar justificados en términos de citotoxicidad (Tice, 2000).

#### **4.4.1 Resultados del ensayo del Cometa**

Un cometa consiste en una “cabeza”, que representa el ADN que no migra fuera de la región del núcleo y la “cola”, que representa el ADN que migra fuera del núcleo debido a su fragmentación y pérdida de estructura (Figura 1). La cantidad de ADN en una ubicación específica es proporcional a la intensidad de

fluorescencia en ese punto en el plano bidimensional de la imagen microscópica. Inicialmente, los cometas fueron analizados mediante una categorización empírica basada en la presencia o tamaño de la cola, midiendo la intensidad de fluorescencia a una distancia fijada desde la cabeza y la intensidad del centro de la cabeza o midiendo el tamaño de la cola de fotomicrografías (Nelms, 1997).



**Figura 2.** Morfología típica obtenida mediante el Ensayo del Cometa que corresponde a la intensidad del daño inducido. A: Sin daño, B: Daño Bajo, C: Daño Medio, D: Daño Alto y E: Daño Total. Imágenes tomadas por Diana Narváez, Laboratorio de Genética Humana, Universidad de los Andes.

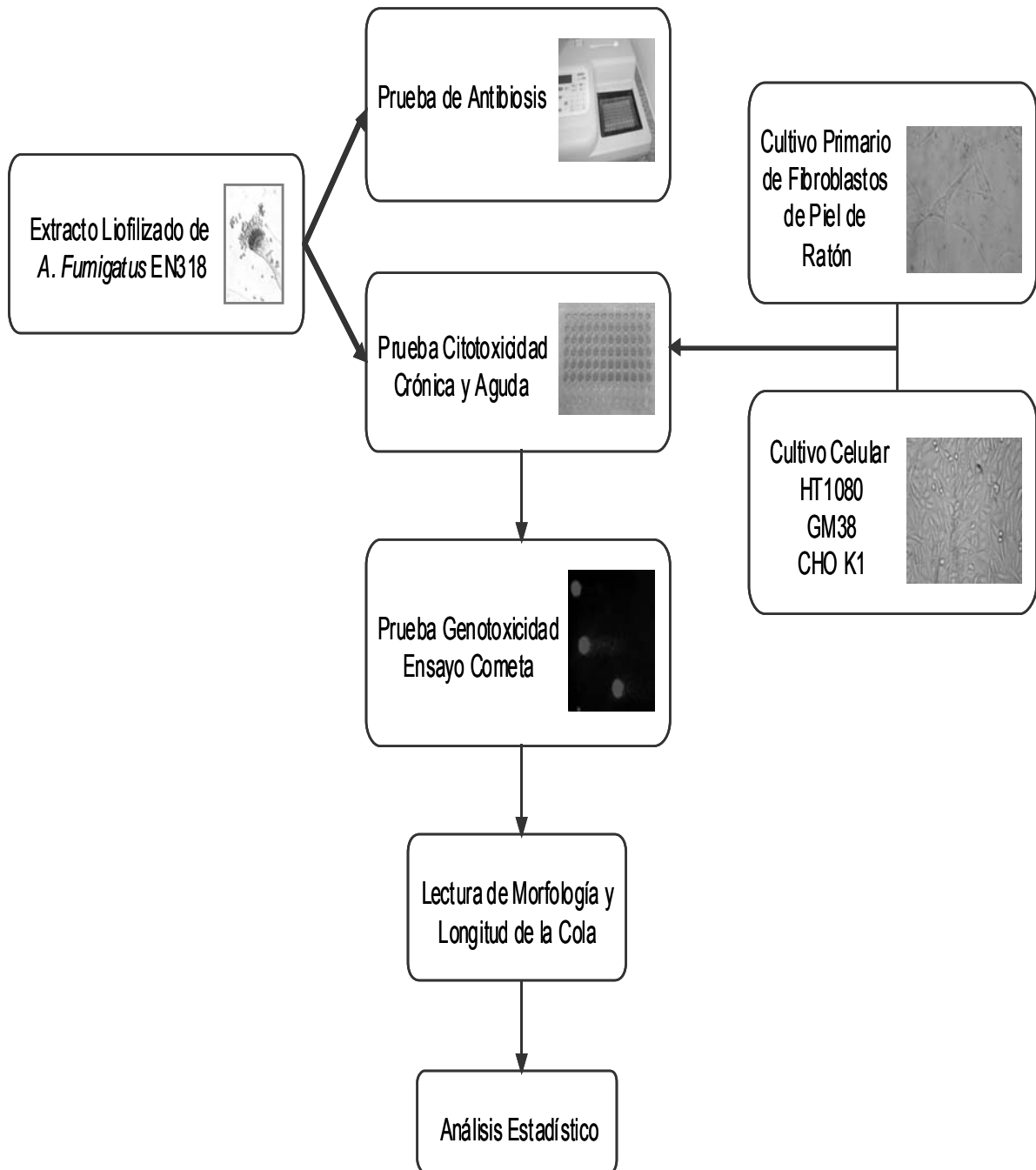
Los parámetros que se utilizan para determinar y medir el tipo de daño producido por un agente genotóxico de acuerdo con un análisis visual, se basan en la longitud de migración y/o la percepción de la relativa proporción de ADN en la cola (Tice, 2000). Las células se clasifican como células no dañadas sin cola (tipo A), células con cola muy pequeña (tipo B), células con una cola tenue (tipo C), células con una cola clara (tipo D) y solo cola (tipo E) (Kobayashi, 1995) (Figura. 2).

El análisis métrico, más comúnmente utilizado es la longitud de migración de ADN, que esta directamente relacionada al tamaño de los fragmentos y es proporcional a los niveles de rompimientos de cadena sencilla y sitios alcalilables, e inversamente proporcional a la cantidad de entrecruzamientos de ADN (Tice, 2000). La longitud de migración o longitud de la cola del cometa, puede ser medida con un micrómetro.

Otro tipo de análisis es el de imagen que se realiza mediante la utilización de un software. La mejor manera de cuantificar la cantidad de daño en el ADN usando imágenes digitales de cometa es combinando la medida de la longitud de la cola y la distribución de ADN en la misma. En 1990, Olive y colegas introdujeron el Momento, una aproximación que combina estos dos parámetros de medida (Nelms, 1997). Al principio, muchos pensaron que la longitud de la cola sería un indicador suficiente de daño en el ADN, un mayor grado de daño resulta en más y pequeños fragmentos que dan como resultado colas más largas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la longitud de la cola por sí sola no es uno de los mejores factores, porque, aunque aumenta para niveles bajos de daño, alcanza una meseta después de cierto punto mientras que la cantidad de ADN que migra a la cola continúa aumentando, es decir, colas de tamaño similar pueden estar representando diferentes niveles de daño; por otra parte, dos cometas diferentes pueden tener el mismo porcentaje de ADN en la cola, pero una de ellas puede ser más larga mostrando mayor daño, esta diferencia se disminuye con la utilización del Momento como parámetro de medida (Nelms, 1997). El Momento y la longitud de la cola son los parámetros más reportados, pero es recomendable utilizar el porcentaje de ADN en la cola, ya que brinda una clara información de la apariencia del cometa y esta directamente relacionado con la frecuencia de rompimiento de ADN en un amplio rango de niveles de daño genético (Hartmann, 2003).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Diagrama de Flujo



## 5.2 Obtención del extracto liofilizado de *Aspergillus fumigatus* EN318

Se sembró e incubó el microhongo *A. fumigatus* EN318 durante siete días a una temperatura de 28° C. Luego de este tiempo se fermentó en medio Wickerham líquido en agitador (25° C y 150 r.p.m.), durante 8 días. Se liofilizó el extracto durante 7 horas. El extracto liofilizado se disuelve en 1ml de medio DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium – Sigma) sin Suero bovino fetal. Por dilución, se prepararon las diferentes concentraciones que serán utilizadas para los ensayos de antibiosis, citotoxicidad y el ensayo del cometa (Ver ANEXO 1).

## 5.3 Prueba de Antibiosis

Se utilizaron bacterias de importancia clínica. *Escherichia coli*, *Salmonella sp* y *Shigella sonnei* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, que comprende bacilos Gram negativos cuyo hábitat natural es el tubo digestivo del hombre y los animales.

*E. coli* puede integrar la flora normal, causar diarrea, infección urinaria, meningitis, etc. La versatilidad de este microorganismo está dado porque *E. coli* ha adquirido conjuntos diferentes de genes de virulencia.

*Shigella* produce una enfermedad inflamatoria aguda del colon con diarrea sanguinolenta, que en su presentación más característica se manifiesta como una disentería.

*Salmonella*, presenta características patogénicas que dependen de su hábitat: Formas digestivas (gastroenteritis), Formas septicémicas (Fiebre Tifoidea) y Formas diversas de gravedad variable (meningitis, osteítis) (Algorta, 2002).

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo. Es un patógeno oportunista que debido a su amplia versatilidad, es capaz de causar enfermedades de amplio espectro: infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque tóxico (Crosseley, 1997).

Se determinó la inhibición del crecimiento bacteriano, luego de la exposición al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 durante 6,8 y 24 horas, mediante el análisis de la densidad óptica obtenida en un lector de microplacas (BIORAD) a 595 nm (Ver ANEXO 2).

Se utilizaron dos tipos diferentes de cepas bacterianas: las de *E. coli*, *Salmonella sp.* y *S. aureus* que fueron donadas por el Laboratorio de Ecología y Microbiología de Alimentos (LEMA) de la Universidad de los Andes, y corresponden a cepas no virulentas. Las cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *S. sonnei*, aisladas de pacientes en el Hospital La Misericordia (Bogotá), donadas por Gloria Uribe, corresponden a cepas virulentas.

## **5.4 Células**

### **5.4.1 Línea celular de fibrosarcoma HT1080**

La línea celular de fibrosarcoma HT1080 fue donada al laboratorio de Genética Humana de la Universidad de los Andes por P. Hanawalt de la Universidad de Stanford en 1999 (proceden de la biopsia de fibrosarcoma de un hombre caucásico de 35 años de edad en 1972, que no había recibido tratamiento de quimio ni radioterapia (Rasheed, 1974). Son cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Sigma), suplementado con 5% de Suero bovino fetal (Gibco), 1 % Penicilina / Estreptomina (Gibco), 2% Glutamina (Gibco) y 2.2% Bicarbonato de sodio. Se incuban a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>.

### **5.4.2 Línea celular de fibroblastos normales (GM38)**

Las células de fibroblasto normales cepa GM38 proceden de donación de la Universidad de Stanford al laboratorio de Genética Humana de la Universidad de los Andes. Estas células se cultivan en DMEM, suplementado con 10% de Suero bovino fetal (Gibco), 1 % Penicilina / Estreptomina (Gibco), 2%

Glutamina (Gibco) y 2.2% Bicarbonato de sodio. Se incuban a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>.

#### **5.4.3 Línea celular de fibroblastos de ovario de Hamster chino (CHO K1)**

Las células de ovario de Hamster Chino (CHO K1), fueron donadas por el Instituto de Virología de la Universidad El Bosque, Colombia. Son un subclon de la línea celular CHO que fue iniciado a partir de una biopsia de ovario de un hámster chino adulto (Puck, 1958). Se cultivan en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF, 1 % Penicilina / Estreptomina, 2% Glutamina y 2.2% Bicarbonato de sodio. Se incuban a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>.

#### **5.4.4 Células de fibroblastos de piel de ratón (FPR)**

Las células de Cultivo Primario de Fibroblasto de piel de ratón, son cultivadas en medio DMEM, suplementado con 10% de SBF, 1 % Penicilina / Estreptomina, 2% Glutamina y 2.2% Bicarbonato de sodio. Se incuban a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> (Ver ANEXO 3).

Las células se sembraron en microplaca con un título de  $3 \times 10^5$  células en 200µL de DMEM suplementado (dos pozos por cada una de las siete concentraciones del extracto). Se incuban en atmósfera húmeda (5% de CO<sub>2</sub>) a 37° C por 24 horas.

### **5.5 Controles**

Se tomó como control negativo 100 µL de la suspensión celular sin tratamiento más 100 µL de DMEM suplementado, equivalente a 0mg/mL del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318.

Como control positivo se utilizó una sustancia mutagénica estándar: Etil metanosulfonato (EMS) a una concentración de 5 mM (Plewa, 1998). El EMS es

un agente alquilante que introduce un metilo en la guanina, que ya no puede aparearse con la citosina provocando la transición GC a AT (Mateos).

### **5.6 Citotoxicidad Crónica (cristal violeta)**

Se expusieron las células, sembradas en la microplaca, a concentraciones de 0.01, 0.03, 0.04, 0.05, 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, 0.5 y 1 mg/mL del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318. Se dejaron incubando a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Luego las células, que se han adherido a la superficie de los pozos, se fijaron y tiñeron con Cristal Violeta para ser leídas por absorbancia y de esta manera determinar el porcentaje de células viables luego de la exposición (Ver ANEXO 4).

### **5.7 Adición del extracto liofilizado de *Aspergillus fumigatus* EN- 318**

Luego de las 24 horas de cultivo en la microplaca, se retiró por aspiración el medio de cada pozo y se lavó con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). Se adicionaron 100µL de DMEM sin Suero bovino fetal y 100µL del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318. Se incubó por 3 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> (Ver ANEXO 5).

### **5.8 Citotoxicidad Aguda**

Se aspiró el medio de los pozos y se lavó con HBSS. Se adicionaron 50µL de Tripsina : PBS (1 mL Trip. + 9 mL PBS (1x)), se agitó y se incubó a 37° C en atmósfera 5% de CO<sub>2</sub>. Se adicionaron 100 µL de DMEM suplementado. Luego, se tomaron 50 µL y se adicionó a 10 µL de Azul de Trypan para hacer conteo de células vivas y células muertas en cámara de Neubauer y así determinar el porcentaje de viabilidad (Ver ANEXO 6).

Adicionalmente, se tomaron 30 µL de la suspensión para estudio de genotoxicidad con el ensayo del cometa.



## **5.9 Ensayo del Cometa**

Se sacaron dos láminas por pozo para las siete concentraciones analizadas. Las láminas se cubrieron con Agarosa (1%). Por separado, se adicionaron 100  $\mu$ L de la suspensión celular a 900  $\mu$ L de Agarosa de bajo punto de fusión (0.5%, LMA) a 37° C. 100  $\mu$ L de la suspensión celular + LMA fueron puestos en una lámina y cubiertos con una laminilla, se dejó refrigerar a 4° C durante 8 minutos. Se retiró la laminilla y se adicionaron 100  $\mu$ L de LMA, se volvieron a cubrir con la laminilla y se refrigeraron 8 minutos a 4° C. Se retiró la laminilla y se puso las láminas en la solución de lisis. Se dejó a 4° C por 24 horas aproximadamente. Se lavaron las láminas con PBS sin Ca ni Mg durante 5 minutos y se dejaron en reposo alcalino por 25 minutos en Buffer de electroforesis, pH >13 a 4° C. Se corrió la electroforesis a 25V y 290mA durante 35 minutos. Las láminas fueron lavadas con solución neutralizante, pH 7.5. Todos los pasos se realizaron en oscuridad para prevenir daño adicional de ADN (Nanthawan, 2003).

Las láminas se conservaron con metanol absoluto y se dejaron secar a temperatura ambiente para ser teñidas posteriormente con 20 $\mu$ L de Bromuro de Etidio y se leyeron en microscopio fluorescente Zeiss con un filtro de excitación BP 546/10nm y un filtro de barrido de 590nm a un aumento de 250x.

### **5.9.1 Resultados del Cometa**

Las láminas fueron codificadas antes de su análisis para ser leídas sin saber a que tratamiento pertenecían. Se analizaron de 50 - 25 células por lámina (200 - 150 células por tratamiento). Se estableció la existencia de daño genético mediante análisis visual. Se clasificaron las células según su morfología, en los tipos de daño A (sin daño), B (daño bajo), C (daño medio), D (daño alto), E (daño total) y se midió la longitud de la cola teniendo en cuenta la distancia a partir de la mitad del núcleo hasta el último rastro de fluorescencia de la cola del cometa (Nanthawan, 2003).

## **5.10 Análisis estadístico**

### **5.10.1 Citotoxicidad**

Los datos se analizaron usando la prueba de correlación de Pearson (STATISTIX 7), para determinar la correlación entre la viabilidad celular y las concentraciones del extracto evaluadas.

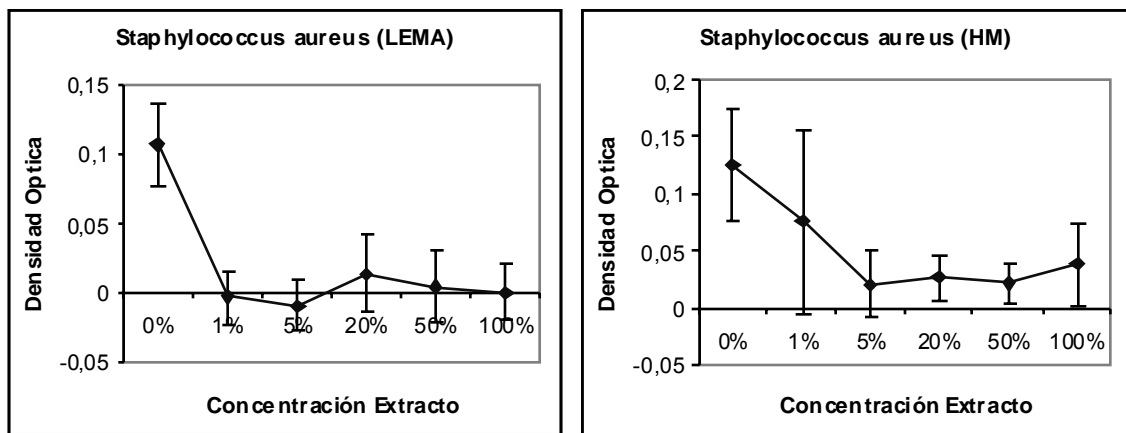
### **5.10.2 Cometa**

Se determinó el porcentaje de células pertenecientes a cada tipo de morfología en cada tratamiento y se reemplazó por un valor numérico: A=0, B=1, C=2, D=3, E=4 para realizar el análisis estadístico. Se calcularon la media y desviación estándar de la morfología y la longitud de la cola para cada tratamiento. Se comparó la relación entre los parámetros evaluados (morfología A, B, C, D o E y Longitud de la cola) y las concentraciones del extracto en los cuatro tipos celulares, teniendo en cuenta un aumento o disminución en la migración de ADN relacionada con la concentración y un aumento o disminución significativa en la migración de ADN en uno o más concentraciones diferentes (Tice, 2000). Se normalizaron los datos mediante una transformación, sacando el promedio del promedio para cada tratamiento. Se realizó una prueba de one way ANOVA (SPSS 12.0). La significancia del efecto de cada tratamiento contra el control negativo fue evaluada por la prueba de Dunnett (Lee,2003; Plewa, 2002) para la longitud de la cola y el tipo de morfología en SPSS 12.0.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Prueba de Antibiosis

Se tomaron los valores de inhibición obtenidos luego de 8 horas de exposición al extracto, ya que a este tiempo se tiene una representación del comportamiento bacteriano frente al agente en estudio pues a las 24 horas de exposición los valores de OD se mantienen. Se evaluaron dos tipos de cepas, una no virulenta procedente del banco de cepas del LEMA y otra virulenta, aislada de pacientes del Hospital La Misericordia (HM) (Bogotá).

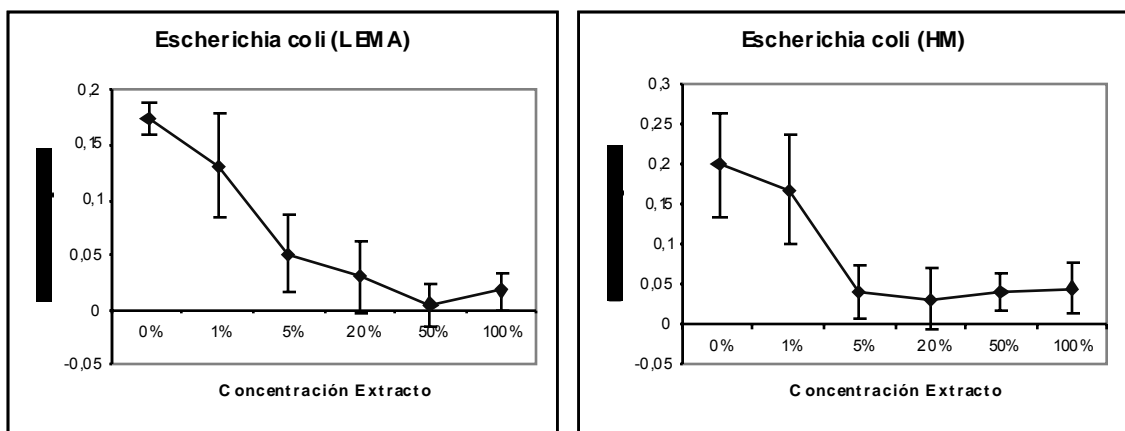


**Gráfica 1.** Inhibición del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 para *Staphylococcus aureus*, determinada por la disminución en la Densidad Óptica (OD) a las 8 horas de exposición.

Al exponer las dos cepas de *S. aureus* al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 (Gráfica 1) se puede observar que la inhibición del crecimiento se evidencia a partir de la concentración del 1% del extracto. La cepa aislada de un paciente (HM), es más resistente a la actividad antibiótica del extracto, pues la disminución en la OD de aproximadamente el 80% (0.126 a 0.021) se da a una concentración del 5%, mientras que la disminución del OD, en la cepa no virulenta de casi el 100% (0.1072 a -0.003) se da a una concentración del 1%.

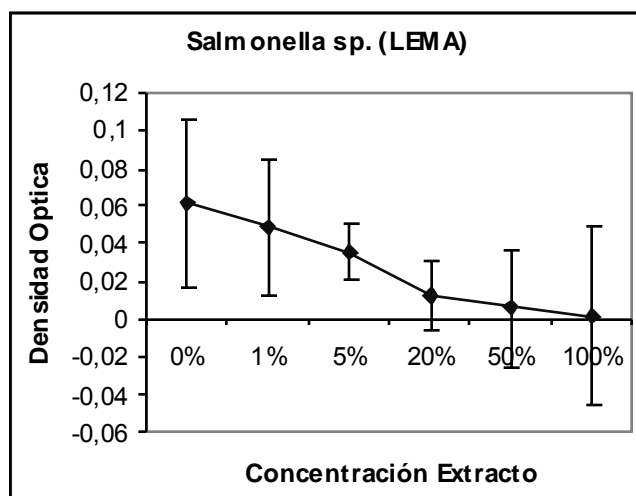
A partir de estas concentraciones la inhibición se mantiene constante en ambos casos, siendo mucho más pronunciada para la cepa de *S. aureus* LEMA.

Como se observa en la Gráfica 2, hay una inhibición del crecimiento a partir de la concentración de 5% del extracto en la cepa de *E. coli* LEMA y en la cepa virulenta de *E. coli* HM, que se ve reflejada en la disminución de la OD de casi el 70 % (0.1745 a 0.0511) y del 80% (0.199 a 0.04) respectivamente. También se puede observar que a concentraciones mayores al 5% del extracto, la inhibición se mantiene con datos similares en la cepa de *E. coli* HM y disminuye para la cepa de *E. coli* LEMA.

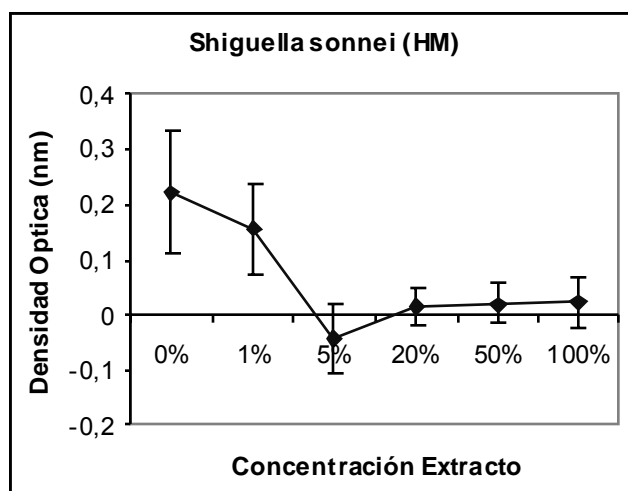


**Gráfica 2.** Inhibición del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 para *Escherichia coli*, determinada por la disminución en la Densidad Óptica (OD) a las 8 horas de exposición.

Luego de 8 horas de exposición al extracto de la cepa no virulenta de *Salmonella sp* LEMA se observó inhibición a medida que aumentaba la concentración del extracto. A partir de una concentración de 5 % del extracto se observa una disminución de aproximadamente el 40% (0.06 a 0.035) del crecimiento, a una concentración del 20% la disminución en el OD fue de 80% (0.0609 a 0.0122) aproximadamente (Gráfica 3), lo que demuestra una relación positiva entre la inhibición y la concentración del extracto, sin embargo, a concentraciones mayores al 20 %, la capacidad inhibitoria se mantiene aunque la concentración aumente.



**Gráfica 3.** Inhibición del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 para *Salmonella sp.*, determinada por la disminución en la Densidad Óptica (OD) a las 8 horas de exposición.

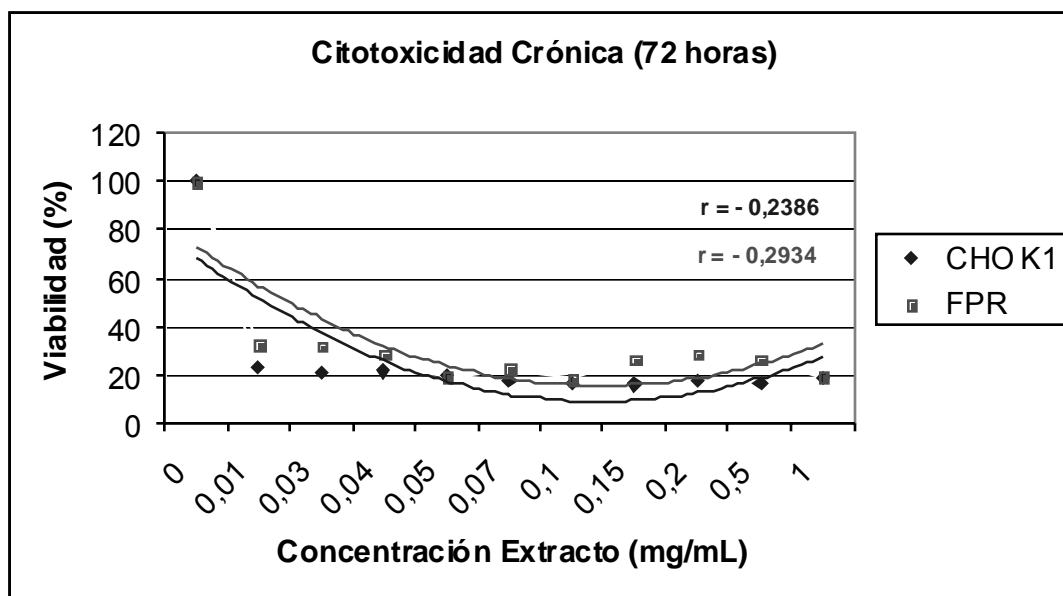


**Gráfica 4.** Inhibición del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 para *Shigella sonnei*, determinada por la disminución en la Densidad Óptica (OD) a las 8 horas de exposición.

En el caso de la cepa virulenta de *S. sonnei* HM la inhibición del crecimiento se hace evidente a partir de una concentración del extracto de 5%. La disminución de la OD es, para esta concentración de casi el 100% (0.224 a -0.042), la cual se mantiene a mayores concentraciones (Gráfica 4).

## 6.2 Citotoxicidad Crónica

Luego de la exposición de 72 horas al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 de las células de Fibroblasto de Piel de Ratón (FPR) y las células de la línea celular CHO K1, se pudo observar una disminución de casi el 80% en la viabilidad celular a una concentración de 0.01mg/mL del extracto, la cual se mantiene a medida que la concentración aumenta (Gráfica 5). Adicionalmente, se puede decir que los dos tipos celulares se comportan de manera similar frente a la exposición al extracto.



**Gráfica 5.** Curva de Viabilidad en células de Fibroblasto de Piel de Ratón (FPR) y células de la Línea Celular CHO K1 luego de la exposición de 72 h al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318, determinada mediante la técnica de Cristal Violeta.  $r =$  Correlación de Pearson para viabilidad y concentración del extracto.

El análisis de Pearson muestra una correlación negativa no significativa entre la concentración del extracto y la viabilidad observada, siendo de  $-0.2386$  para la línea celular CHOK1 y de  $-0.2934$  para las FPR (Gráfica 5), lo que nos sugiere que el efecto en la disminución de la viabilidad celular no está relacionado con el aumento en la concentración del extracto.

De acuerdo con estos resultados, el extracto puede tener un efecto altamente citotóxico cuando se exponen las células a un periodo prolongado de tiempo (72 h), que no está claramente explicado por la acción del extracto.

### 6.3 Citotoxicidad Aguda

Cuando las células de Fibroblasto de Piel de Ratón (FPR) y las células de las líneas celulares HT1080, GM38 y CHO K1 fueron expuestas al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 por 3 horas, se observó una viabilidad celular mayor al 80% a concentraciones de 0.01 – 0.1 mg/mL para la células HT1080, GM38 y CHO K1 y a concentraciones de 0.01 – 0.05 mg/mL del extracto para las células FPR (Tabla 1).

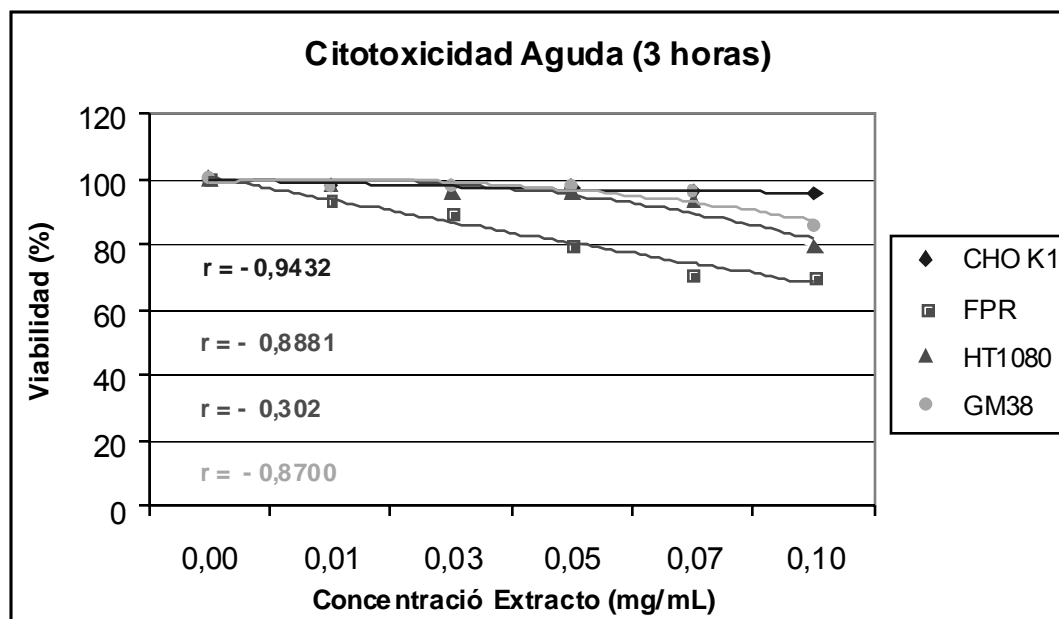
Concentración del extracto	Porcentaje de Viabilidad			
	HT1080	GM38	CHO K1	FPR
0mg/ml	100 %	100 %	99.73 %	100 %
0.01 mg/ml	97.92 %	97.92 %	98.03 %	93.38 %
0.03mg/ml	95.83 %	97.22 %	97.78 %	89.47 %
0.05mg/ml	95.80 %	97.20 %	97.45 %	80 %
0.07mg/ml	93.75 %	95.83 %	95.92 %	71 %
0.1mg/ml	79.17 %	85.42 %	95.54 %	70 %
EMS (5mM)			96.17%	85.71 %

**Tabla 1.** Porcentaje de viabilidad obtenido mediante la técnica de Azul de Trypan, para siete concentraciones del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 en las líneas celulares HT1080, GM38, CHO K1 y en Fibroblastos de Piel de Ratón (FPR).

La prueba estadística de correlación de Pearson, muestra una relación negativa entre la viabilidad celular y la concentración del extracto: a medida que se aumenta la concentración del extracto, disminuye la viabilidad celular en un tiempo de exposición de 3 horas. El valor del índice de correlación para las líneas celulares HT1080 (-0.8881), GM38 (-0.8700) y CHO K1 (-0.932) es

estadísticamente significativo, mientras que para las células FPR (-0.302) no es significativo (Gráfica 6).

En la gráfica 6, se puede observar que la respuesta a la exposición del extracto, es similar para las líneas celulares. Las células de FPR son más sensibles que las células de las líneas HT1080, GM38 y CHO K1, en este caso, a concentraciones mayores a 0.07 mg/mL del extracto, se puede esperar que el efecto citotóxico interfiera con los resultados obtenidos en el ensayo del Cometa para las células FPR.



**Gráfica 6.** Curva de Viabilidad en células de Fibroblasto de Piel de Ratón (FPR) y células de la Línea Celular HT1080, GM38 y CHO K1 luego de la exposición de 3 h al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318, determinada mediante la técnica de Azul de Trypan.  $r$  = Correlación de Pearson para viabilidad y concentración del extracto.

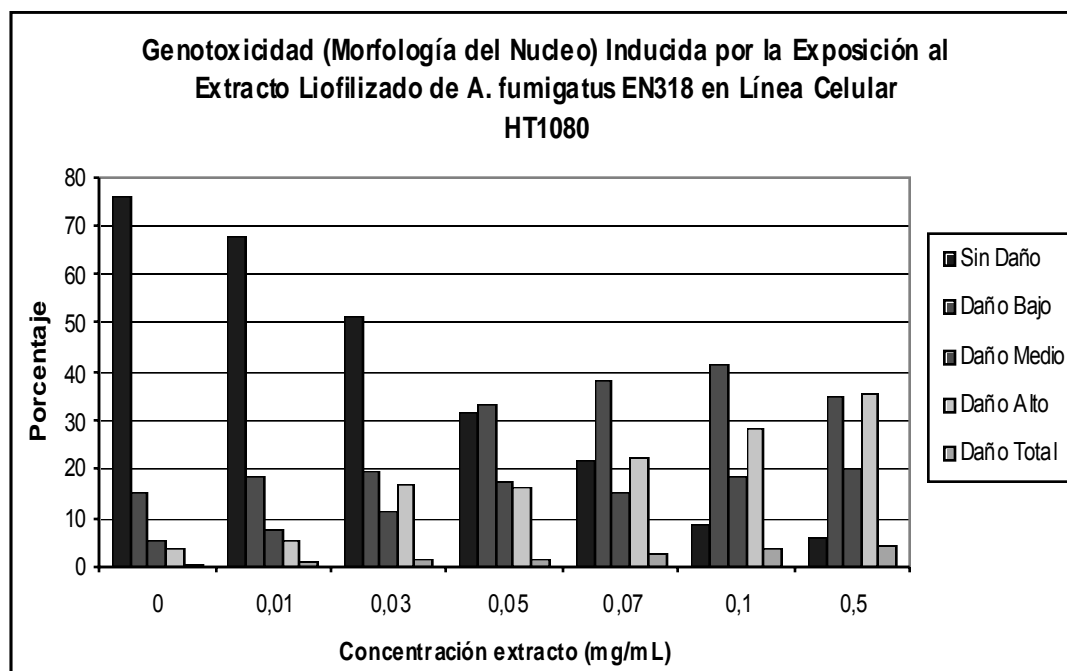
Adicionalmente, tenemos que la viabilidad del control positivo (EMS 5 mM) es mayor al 80 %, lo que asegura que el efecto observado en el ensayo del Cometa sea debido a su efecto genotóxico y no a un falso positivo por un efecto citotóxico (Tabla 1).



## 6.4 Genotoxicidad

El efecto genotóxico del extracto se determinó mediante el ensayo del Cometa, exponiendo las células a 5 diferentes concentraciones del extracto (0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.1 mg/mL). El control negativo fue medio de crecimiento de las células y el control positivo fue EMS a una concentración de 5mM. Se realizaron 5 experimentos y se leyeron de 150 a 200 células por tratamiento en cada experimento para las células de las líneas CHO K1 y HT1080, respectivamente. Con las células de Fibroblastos de Piel de Ratón, se realizó 1 experimento y se leyeron 150 células por tratamiento.

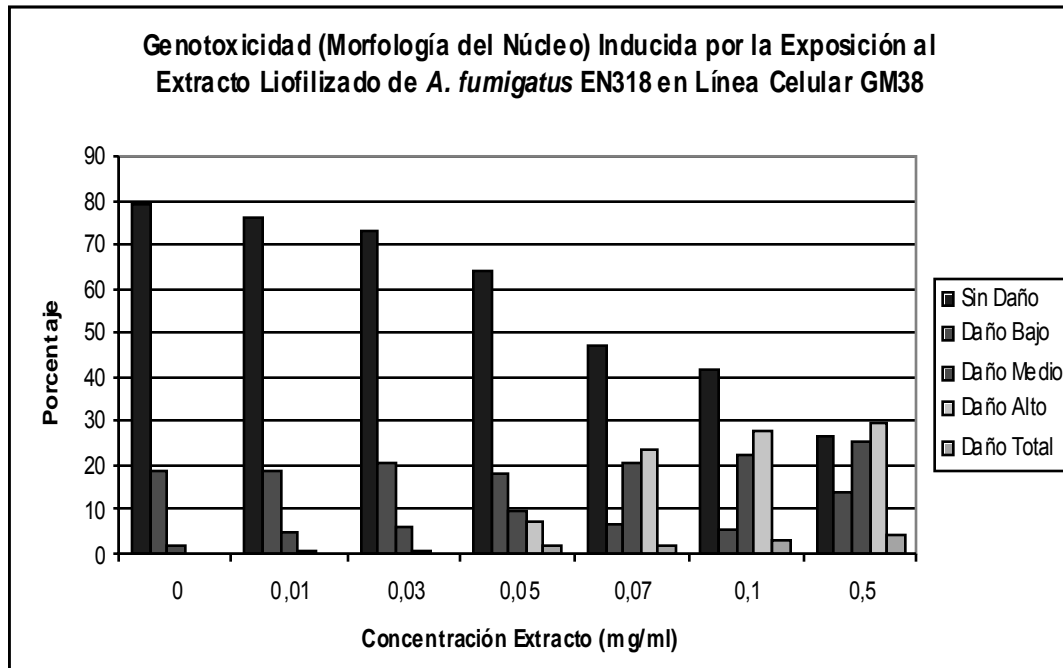
### 6.4.1 Morfología del Núcleo



**Gráfica 7.** Porcentaje de células con diferente morfología del núcleo, de acuerdo al daño en el ADN, para cada concentración del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 en la línea celular HT1080.

De acuerdo con el tipo de morfología del núcleo, obtenida en el ensayo del Cometa, se puede observar que el porcentaje de células con daño medio y

bajo aumenta a medida que se aumenta la concentración del extracto en las células de la línea HT1080 (Gráfica 7) a partir de una concentración de 0.03mg/mL. Contrario a lo anterior, se observa una disminución en el porcentaje de células sin daño con un aumento de la concentración, resultado de un efecto genotóxico del extracto.



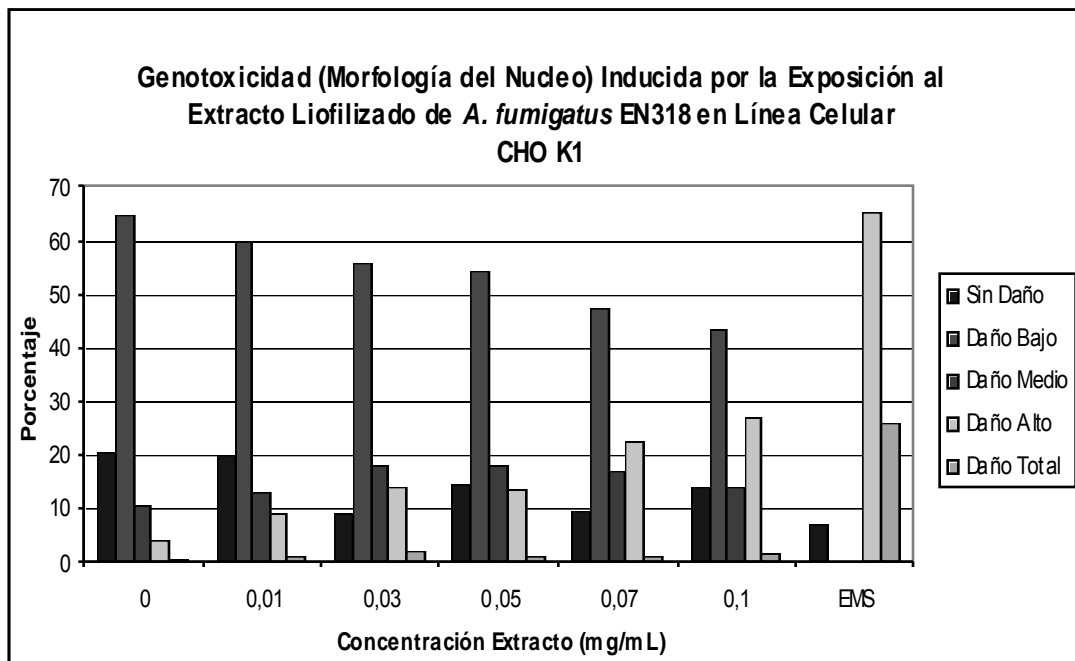
**Gráfica 8.** Porcentaje de células con diferente morfología del núcleo, de acuerdo al daño en el ADN, para cada concentración del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 en la línea celular GM38.

Por su parte, para las células de fibroblasto normales GM38, los resultados obtenidos para la morfología celular demuestran que hay disminución significativa de células sin daño a partir de una concentración de 0.05mg/ml comparadas con el control negativo, en la gráfica 8 de porcentaje celular según la morfología. De igual manera, el aumento de células con daño medio y daño alto a partir de 0.05mg/ml muestra la existencia de un efecto genotóxico inducido por la exposición al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN-318,

teniendo en cuenta que en estas concentraciones el porcentaje de viabilidad es mayor a 80, para las células normales.

Para las células de la línea CHO K1, el porcentaje de células con daño bajo y sin daño disminuye a medida que la concentración del extracto aumenta, mientras el porcentaje de células con daño alto aumenta a partir de una concentración de 0.03 mg/mL (Gráfica 9).

Para el control positivo (EMS 5 Mm) se puede observar que el 64.9 % de células corresponde a células con daño alto y el 7.09% a células sin daño (Gráfica 7), reflejo de su efecto altamente genotóxico.



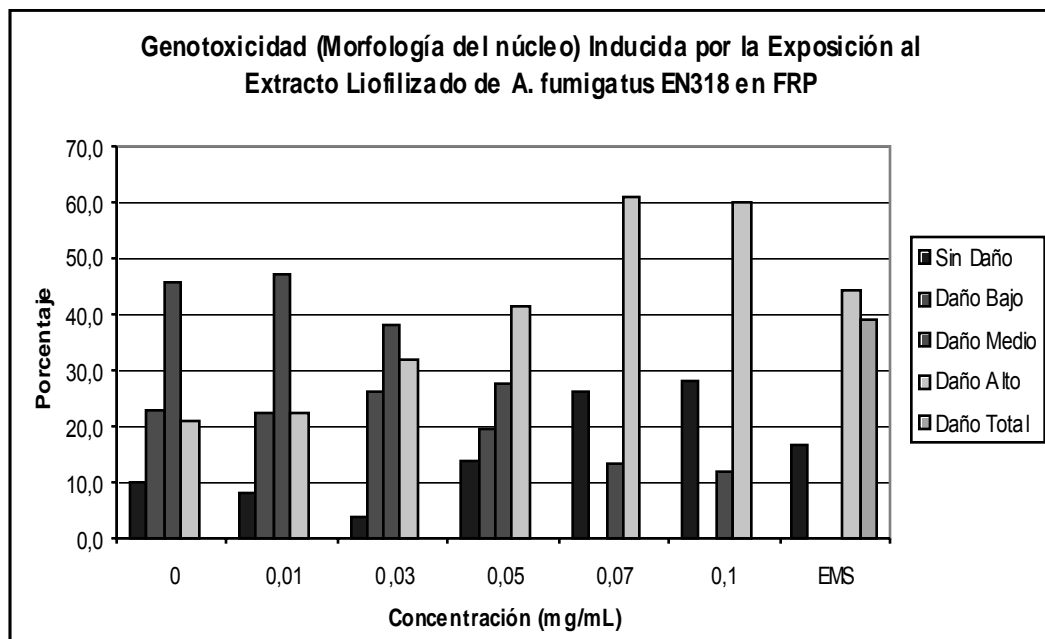
**Gráfica 9.** Porcentaje de células con diferente morfología del núcleo, de acuerdo al daño en el ADN, para cada concentración del extracto liofilizado de *A. Fumigatus* EN318 en la línea celular CHO K1

Al exponer las células de FPR al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318, se puede observar que el porcentaje de células con daño bajo disminuye a partir

de una concentración de 0.07 mg/mL, mientras que el porcentaje de células con daño alto aumenta a partir de la misma concentración (Gráfica 10). Hay que recordar que a partir de 0.07 mg/mL el aumento de células con daño alto puede deberse a un efecto citotóxico más que genotóxico para este tipo celular.

El daño basal (0mg/mL) de las células FPR es mayor al de las células de las líneas celulares (Gráficas 7, 8 y 9) ya que se observa un mayor porcentaje de células con daño medio y alto.

Para el control positivo (EMS 5mM) se observa un porcentaje de 16.7 de células sin daño y un porcentaje de 44.4 de células con daño alto; las células con daño total tienen también un porcentaje elevado (38.9) lo que sugiere un efecto altamente genotóxico del EMS en este tipo celular.



**Gráfica 10.** Porcentaje de células con diferente morfología del núcleo, de acuerdo con daño en el ADN, para cada concentración del extracto liofilizado de *A. Fumigatus* EN318 en células de fibroblasto de piel de ratón (FPR).

Existen diferencias significativas con respecto al control negativo a partir de una concentración de 0.01 mg/mL del extracto en la línea celular HT1080, mientras que para la línea celular GM38 y CHO K1 las diferencias son significativas a partir de 0.03 mg/mL. Las células de FPR presentan diferencias significativas solamente para el control positivo, lo que puede deberse al alto daño basal en este tipo de células (Tabla 2).

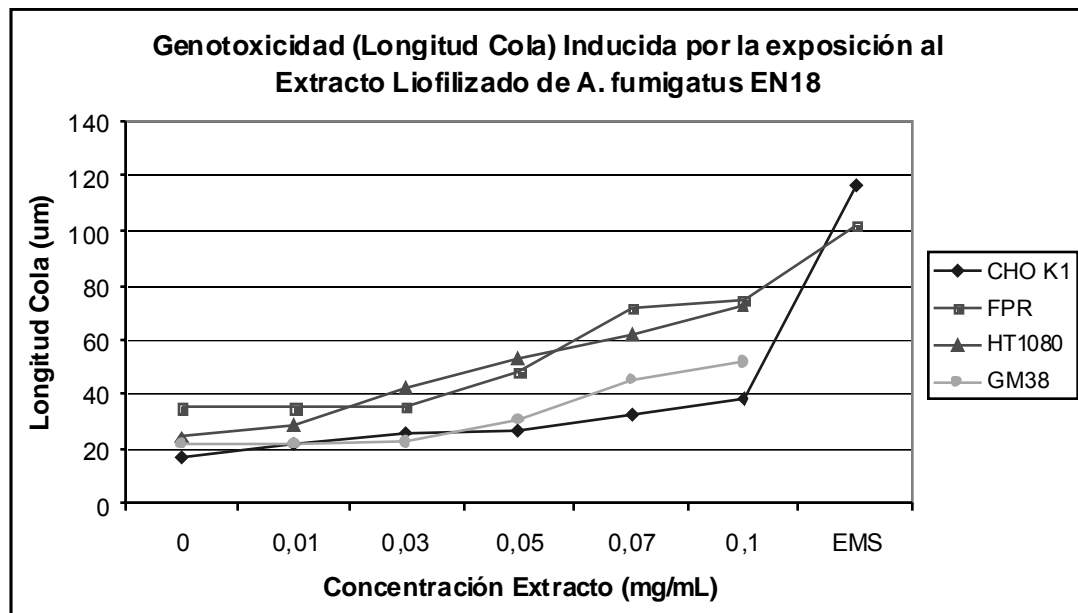
Extracto	Promedio ± DE			
	HT1080	GM38	CHO K1	FPR
0mg/ml	1.37 ± 0.121	1.237 ± 0.073	0.964 ± 0.170	1.80 ± 0.500
0.01mg/ml	1.531 ± 0.046 *	1.303 ± 0.034	1.111 ± 0.353	1.80 ± 0.000
0.03mg/ml	1.962 ± 0.167 **	1.343 ± 0.015 **	1.375 ± 0.368 **	1.95 ± 0.071
0.05mg/ml	2.222 ± 0.114 **	1.657 ± 0.029 **	1.307 ± 0.215 *	1.65 ± 0.212
0.07mg/ml	2.460 ± 0.130 **	2.267 ± 0.045 **	1.508 ± 0.345 **	2.05 ± 0.071
0.1mg/ml	2.779 ± 0.145 **	2.460 ± 0.086 **	1.583 ± 0.365 **	1.80 ± 0.283
EMS (5mM)			3.085 ± 0.482 **	2.70 ± 0.283 *
** P < 0.01	$F_{5,59} = 184.356$	$F_{5,35} = 592.088$	$F_{6,97} = 56.651$	$F_{6,14} = 2.764$
* P < 0.05				

**Tabla 2.** Resultados prueba estadística ANOVA y prueba de comparación de medias Dunnett ( $\alpha = 0.05$  y  $0.01$ ), para las diferentes concentraciones del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318, según la morfología del núcleo, en la línea celular HT1080, GM38, CHO K1 y en Fibroblastos de Piel de Ratón (FPR), obtenidos mediante el ensayo del cometa.

#### 6.4.2 Longitud de la Cola

La medida de la longitud de la cola en el ensayo del cometa es una medida del daño en el ADN, debida a la migración electroforética de los fragmentos producidos por la exposición a un agente genotóxico.

En la gráfica 11 se observa el efecto genotóxico del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 en los tres tipos celulares, de acuerdo con esto, las células CHO K1 y GM38 son más resistentes que las células HT1080 y FPR, ya que presentan menor longitud de la cola a medida que aumenta la concentración del extracto. Por su parte la longitud de la cola para el control positivo es mucho mayor que la longitud obtenida para las diferentes concentraciones del extracto.



**Gráfica 11.** Curva de Genotoxicidad, en células de Fibroblasto de Piel de Ratón (FPR) y células de la Línea Celular HT1080 y CHO K1, Inducida por la exposición al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318, de acuerdo a la Longitud de la Cola medida en el ensayo del Cometa.

El análisis estadístico para la longitud de la cola (Tabla 3), nos muestra que hay diferencias significativas a partir de una concentración de 0.01 mg/mL para las células HT1080, para las células GM38 a partir de una concentración de 0.05 mg/mL y a partir de 0.07 mg/mL para las células CHO K1 y FPR. En el caso de las FPR, el aumento en la longitud de la cola a partir de ésta concentración, puede ser un reflejo del efecto citotóxico del extracto.

Extracto	Promedio (um) ± DE			
	HT1080	GM38	CHO K1	FPR
0mg/ml	24,471 ± 1,332	21.607 ± 0,849	17.301 ± 3.227	35.373 ± 14.281
0.01mg/ml	28,949 ± 1,447 **	21,860 ± 0,379	21.584 ± 9.234	35.000 ± 5.657
0.03mg/ml	42,039 ± 1,501 **	22,177 ± 0,378	25.955 ± 7.005	35.710 ± 1.004
0.05mg/ml	53,044 ± 1,758 **	30,897 ± 0,625 **	26.663 ± 6.224	48.500 ± 12.021
0.07mg/ml	61,827 ± 1,072 **	45,317 ± 0,262 **	32.726 ± 9.513 **	71.450 ± 0.778 **
0.1mg/ml	73,004 ± 1,230 **	51,767 ± 0,674 **	38.316 ± 14.331 **	75.000 ± 1.414 **
EMS (5mM)			116.722 ± 16.757 **	102.000 ± 2.828 **
** P < 0.01 * P < 0.05	<b>F</b> <sub>5,59</sub> = 1809.411	<b>F</b> <sub>5,35</sub> = 3284.595	<b>F</b> <sub>6,97</sub> = 148.682	<b>F</b> <sub>6,14</sub> = 19.073

**Tabla 3.** Resultados prueba estadística ANOVA y prueba de comparación de medias Dunnett ( $\alpha = 0.05$  y  $0.01$ ), para las diferentes concentraciones del extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318, según la longitud de la cola, en la línea celular HT1080, GM38 y CHO K1 y en Fibroblastos de Piel de Ratón (FPR), obtenidos mediante el ensayo del cometa.

Estos resultados, difieren a los obtenidos al analizar el tipo de morfología encontrada. Teniendo en cuenta que la medición de la longitud de la cola es un estimativo subjetivo ya que depende del observador, recomendaría tener en cuenta los resultados correspondientes al tipo de morfología del núcleo, que además, detectan el daño en el ADN a una menor concentración (0.03 mg/mL) para las células GM38 y CHO K1.

## 7. DISCUSIÓN

En general, se observa un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano en presencia del Extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318. Existe una concentración crítica a partir de la cual el efecto inhibitorio se mantiene, en el caso de *E. coli*, *Salmonella sp* y *S. sonnei* (Gráficas 2, 3 y 4), ésta concentración es igual al 5 % del extracto. Estas similitudes en la respuesta al extracto de *A. fumigatus* EN318 se pueden deber al hecho de que estas bacterias pertenecen a la misma familia y comparten características fisiológicas. Es interesante ver el parecido entre las gráficas de inhibición de *E. coli* y *S. sonnei* (HM), pues se sabe que por hibridación, *Shigella* se encuentra muy cercana a *E. coli* y hasta podrían pertenecer a una misma especie (Algorta, 2002).

La concentración crítica, con efecto antibiótico, para *S. aureus* es igual al 1 %, siendo esta más sensible al efecto antibiótico del extracto. Teniendo en cuenta la creciente resistencia de *S. aureus* a todos los  $\beta$ -lactámicos y a múltiples antibióticos que limitan las opciones terapéuticas contra las infecciones que ésta produce (Velásquez-Mesa, 2005), es importante el descubrimiento de nuevas alternativas que puedan reemplazar la utilización de este tipo de antibióticos para inhibir el crecimiento de la bacteria.

En el caso de las cepas virulentas, se aprecia que el crecimiento es mayor al de las cepas no virulentas, lo que puede deberse a la habilidad patógena de invadir a su huésped.

Por otro lado, el gran efecto citotóxico encontrado, luego de 72 horas de exposición, en el análisis de citotoxicidad crónica, no está claramente relacionado con el aumento en la concentración del extracto. Es necesario confirmar los resultados con otro tipo de metodologías más aproximadas, que den mayor información sobre la muerte celular como la técnica de MTT que



mide la tasa de proliferación y la reducción en la viabilidad celular, a partir de eventos metabólicos que conllevan a apoptosis o necrosis (Biocompare).

El aumento en los fragmentos de ADN que conduce a la muerte celular puede resultar en falsos positivos en el ensayo del cometa (Hartmann, 2003), es por esta razón que es indispensable realizar pruebas de citotoxicidad con cada experimento. La prueba de citotoxicidad aguda, demuestra que las células del cultivo primario de fibroblastos de piel de ratón son más sensibles a la exposición del extracto que las células de las otras líneas celulares.

Trabajar con cultivos celulares facilita los estudios para detectar sustancias tóxicas *in Vitro*. Las principales ventajas de utilizar líneas celulares es que son fáciles de manejar y presentan relativamente baja variabilidad. De todas formas, las células son menos diferenciadas y han perdido sus características genéticas y bioquímicas. En contraste, las células de cultivo primario mantienen la mayoría de sus características originales y pueden ser utilizadas como puente entre las líneas celulares y los sistemas *in vivo*. Sin embargo, las células de cultivo primario, son más sensibles y tienen una capacidad metabólica mayor que las líneas celulares (Smeets et al., 1999; Chen, 2003). Esta sensibilidad puede deberse a que las células de cultivo primario tienen un número de divisiones celulares limitado y varía dependiendo del origen, las condiciones y el tipo celular del cultivo, es por esta razón que tienen un tiempo corto de vida y son más inestables que las células inmortalizadas.

En general, la prueba de genotoxicidad demuestra que el extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 induce rompimientos de cadena sencilla en el ADN a concentraciones mayores a 0.03 mg/mL en células de fibroblasto, siendo la línea celular de fibrosarcoma HT1080 más sensible. Las HT1080 contienen un gen silvestre para p53 (Bowman, 2000; Clifford, 2003), al igual que las células de fibroblastos humanos GM38 (Tong, 2000). El nivel de la proteína de p53 se eleva en respuesta al daño en el ADN causado por una gran variedad de agentes como la radiación ionizante UV, agentes alquilantes y nucleasas

(Kastan, 1991). Es de esperarse que tanto las células de fibroblasto normales GM38 y las de fibrosarcoma HT1080 aumenten los niveles de p53 luego de la exposición al extracto; por esta razón, las diferencias en la respuesta al efecto genotóxico del extracto en la línea celular HT1080 y los otros tipos de fibroblastos pueden deberse a interacciones con mecanismos ajenos a p53.

Sin conocer la estructura química del extracto que pueda tener el efecto genotóxico, y desconociendo su mecanismo de acción, solamente se puede sugerir la posible utilización de éste como agente anticancerígeno diferencial para células de fibrosarcoma.

## 8. CONCLUSIONES

El extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 tiene actividad antibiótica en cepas virulentas y no virulentas. Para *E. coli* hay inhibición del crecimiento a partir de una concentración de 5% del extracto, al igual que para la cepa de *S. sonnei* y la cepa no virulenta de *Salmonella sp.* En el caso de *S.aureus*, la cepa virulenta es más resistente a la actividad antibiótica del extracto mostrando inhibición a partir de una concentración de 5%, mientras que la cepa no virulenta presenta inhibición a partir de una concentración del 1%.

A exposiciones prolongadas de tiempo (72 h) el extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 presenta un efecto citotóxico en las células de Fibroblasto de Piel de Ratón (FPR) y las células de la línea celular CHO K1.

La exposición durante 3 horas al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 no presenta un efecto citotóxico agudo a concentraciones de 0.01 – 0.1 mg/mL en las líneas celulares HT1080, GM38 y CHO K1 y a concentraciones de 0.01 – 0.05 mg/mL en células de FPR, siendo estas últimas más sensibles que las dos anteriores.

El extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 tiene un efecto genotóxico en los cuatro tipos de fibroblastos estudiados.

Las células de la línea celular HT1080 son más sensibles al efecto genotóxico del extracto que las células GM38, CHO K1 y FPR, lo que puede sugerir la utilización del extracto diferencialmente en células de fibrosarcoma HT1080.

## 9. RECOMENDACIONES

Utilizar otra técnica que permita determinar Citotoxicidad Crónica en células expuestas al extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318.

Realizar extracciones orgánicas del extracto crudo de *A. fumigatus* EN318 para utilizarlas en pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad y determinar las fracciones que confieren el efecto genotóxico observado con el extracto puro.

A partir de las fracciones identificadas, determinar la estructura química del extracto de *A. fumigatus* EN318 para establecer su mecanismo de acción como agente antibiótico y genotóxico.

## BIBLIOGRAFÍA

ALGORTA G. 2002. Bacilos Gram Negativos No Exigentes: *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonas*. [Consultado 19 ene.2007]. Disponible en <<http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2022.pdf>>

ARNOLD, A.E., MEJÍA, L.C., KYLLO, D., ROJAS, E., MAYNARD, Z., ROBBINS, N. y HERRE, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, 100:15649-15654.

BETTI C., DAVINI T., GIANNESI L., LOPRIENO N. y BARALE R. 1994. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research*, 307: 323-333.

BIOCOMPARE. Protocols. MTT Cell Proliferation Assay. [base de datos en línea]. [consultado 30 ene. 2007]. Disponible en <<http://www.biocompare.com/protocols/protocol/235/MTT-Cell-Proliferation-Assay.html>>

BOWMAN KK, SICARD DM, FORD JM, HANAWALT PC. 2000. Reduced global genomic repair of ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in simian virus 40-transformed human cells. *Mol Carcinog*, 29: 17- 24.

BULL A.T, WARD A.C. y GOODFELLOW M. 2000. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, September p. 573-606, Vol. 64, No. 3.

CABALLERO E., AVENDAÑO C. y MENÉNDEZ J.C. 2000. Brief synthesis of the cell cycle inhibitor tryprostatin B and its alanine analogue. Fourth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. Septiembre 1-30. Disponible en <<http://www.mdpi.org/ecsoc-4.htm>>.

CARROL G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent to mutualistic symbiont. *Ecology*, Vol 69, No 1, p: 2-9.

CATALANO A., ROMANO M., ROBUFFO I., STRIZZI L. y PROCOPIO A. 2001. Methionine Aminopeptidase-2 Regulates Human Mesothelioma Cell Survival. *American Journal of Pathology*. 159: 721-731.

CHEN, G., KONSTANTINOV, A.D., CHITTIM, B.G., JOYCE, K.M., BOLS, N.C. y BUNCE, N.J., 2001. Synthesis of Polybrominated diphenyl ethers and their capacity to induce CYP1A by the Ah receptor mediated pathway. EN: ZHOU B., LIU C., WANG J. LAM P.K. y WU R.S.S. 2006. Primary cultured cells as sensitive *in vitro* model for assessment of toxicants-comparison to hepatocytes and gill epithelia *Aquatic Toxicology* 80: 109–118.

CLAY, K. y SCHARDL, C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. EN: ARNOLD, A.E., MEJÍA, L.C., KYLLO, D., ROJAS, E., MAYNARD, Z., ROBBINS, N. y HERRE, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, 100:15649-15654.

CLIFFORD, B., BELJIN, M., STARK G.R. y TAYLOR W.R. 2003. G2 Arrest in Response to Topoisomerase II Inhibitors: The Role of p53. *Cancer Research*, 63: 4074–4081.

CROSSLEY KB, ARCHER GL, eds. 1997. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone. EN: VELÁZQUEZ-MEZA M.E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud Publica Mex*, 47:381-387. Disponible en <<http://www.insp.mx/Portal/produccion/pdfs/356.pdf>>

FAETH, S.H. y FAGAN, W.F. 2002. Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integ. And Comp. Biol.*, 42: 360–368.

GARAJ-VRHOVAC V. y KOPJAR N. 2003. The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutagenesis*. Vol.18 No. 3: 265-271.

Guía de Laboratorio de Bacteriología I. 1999. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

HARTMANN A. et al. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. Vol.18 No.1: 45-51.

JIMÉNEZ H. 2004. Microhongos productores de sustancias antibióticas y sustancias citotóxicas y genotóxicas para la línea celular de fibrosarcoma HT1080. Tesis de Maestría en Microbiología. Universidad de los Andes.

JOOST, R.E. 1995. *Acremonium* in fescue and ryegrass: boon or bane?. A review. EN: D´DMELLO, J.P.F. y MACDONALD, A.M.C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69: 155-166.

KAMRIN, N. 1988. *Toxicology*. Lewis Publishers, INC. pág: 14.15.

KASTAN, M. B., ONYEKWERE O., SIDRANSKY D., VOGELSTEIN B. y CRAIG R. W. 1991. Participation of the p53 protein in the cellular response to DNA damage. EN: TONG Z., SINGH G. y RAINBOW A.J. 2000. The Role of the p53 Tumor Suppressor in the Response of Human Cells to Photofrin-mediated Photodynamic Therapy *Photochemistry and Photobiology*, 71(2): 201–210.

KHAN A.A., KHAN H.M. y DELINCÉE H. 2003. “DNA comet assay” a validity assessment for the identification of radiation treatment of meats and seafood. *Eur. Food Research Technology*, 216:88-92.

KIM B., PARK J.J. et al. 2002. New Measure of DNA repair in the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40: 50-56.

KOBAYASI H., SUGIYAMA Ch., MORIKAWA Y., HAYASHI M. y SOFUNI T. 1995. Acomparision between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *M.M.S. Community*. 3 (2) :103 - 115. Disponible en <<http://www.cometassay.com/files/Kobayashi.PDF>>.

KWON-CHUNG K.J. y BENNETT J.E. 1992. *Medical Mycology*. Lea & Febiger.

LEE M, KWON J. y CHUNG M-K. 2003. Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. *Mutation Research* 541: 9-19.

LI W., TAKAHASHI N., JHANWAR S., CORDON-CARDO C., ELISSEYEFF Y., JIMENO J., FAIRCLOTH G. y BERTINO J. 2001. Sensitivity of Soft Tissue Sarcoma cell lines to Chemotherapeutic Agents: Identification of Ecteinascidin-743 as a Potent Cytotoxic Agent. *Clinical Cancer Research*, Vol 7, 2908-2911.

MADIGAN, M.T, MARTINKO, J.M y PARKET J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. 8 ed. New Jersey: Prentice-Hall Inc. 710-711,806-807,933-935.

MATEOS, P.F. *Mutaciones, Bases Moleculares de la Mutación*. [Consultado 11 ene.2007]. Disponible en <<http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema09MI.html>>

NANTHAWAN A., RABINOWITZ, C. y RINKEVICH B. 2003. Use of the Comet Assay for Studing Environmental Genotoxicity. Comparisons Between Visual and Image Analyses. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42: 155-165.



NELMS B. 1997. Measuring Apoptosis in Individual cells with the Comet Assay. Promega Notes. 64, pág: 13.

PARDO, S. 2001. Microhongos endófitos aislados de hojas de *Espeletia grandiflora* y *E. corymbosa* en el Páramo de Cruz Verde, Colombia. Tesis de maestría en Microbiología. Universidad de los Andes.

PLEWA, M., WAGNER, E., KIRCHOFF, L., REPENTY, K., ADAMS, L. y RAYBURN, A. 1998. The use of single cell gel electrophoresis and flow cytometry to identify antimutagens from commercial soybean by-products. Mutation Research 402: 211-218.

PLEWA, M.J., KARGALIOGLU Y., VANKERK D., MINEAR R.A. y WAGNER E.D. 2002. Mamalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by- products. Environmental and Molecular Mutagenesis. 40(2): 134-142.

PUCK, T.T., CIECIURA, S.J. y ROBINSON, A. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. J. Exp. Med., 108(6): 945-956.

RASHEED, S., NELSON-REES, W.A., TOTH, E.M., ARSTEIN, P. y GARDNER, M.B. 1974. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). EN: DSMZ. Human and Animal Cell Lines. [base de datos en línea]. [consultado 19 may. 2004]. Disponible en: <[http://www.dsmz.de/human\\_and\\_animal\\_cell\\_lines/info.php?dsmz\\_nr=315&form=cell\\_line\\_index&select=search\\_for\\_term&term=\\*&preselect=human](http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=315&form=cell_line_index&select=search_for_term&term=*&preselect=human)>

SAIKKONEN, K., FAETH, S. H., HELANDER, M. y SULLIVAN, T. J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. EN: ARNOLD, A.E., MEJÍA, L.C., KYLLO, D., ROJAS, E., MAYNARD, Z., ROBBINS, N. y

HERRE, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, 100:15649-15654.

SMEETS, J.M.W., VOORMOLEN, A., TILLITT, D.E., EVERAARTS, J.M., SEINEN, W. y VAN DEN BERG, M., 1999. Cytochrome P4501A induction, benzo(a)pyrene metabolism, and nucleotide adduct formation in fish hepatoma cells: effects of preexposure to 3,3\_4,4\_5-pentachlorobiphenyl. EN: ZHOU B., LIU C., WANG J. LAM P.K. y WU R.S.S. 2006. Primary cultured cells as sensitive *in vitro* model for assessment of toxicants-comparison to hepatocytes and gill epithelia *Aquatic Toxicology* 80: 109–118.

STROBEL G. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5, 535-544.

STROBEL G. y DAISY B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol 67, No 4, p: 491-502.

TONG Z., SINGH G. y RAINBOW A.J. 2000. The Role of the p53 Tumor Suppressor in the Response of Human Cells to Photofrin-mediated Photodynamic Therapy *Photochemistry and Photobiology*, 71(2): 201–210.

TICE R.R., AGUERELL E. et al. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.

VALVERDE M., OTROSKY-WEGMAN P. et al. 1999. The application of single cell gel electrophoresis or comet assay to human monitoring studies. *Salud Pública Mexico*, 41 supl. 2:s109-s113.

WILLIAMS R.B. 2002. Isolation and Structure Elucidation of Cytotoxic Natural Products from Suriname and Madagascar. Master of Science Thesis. Chapter 1. Disponible en <<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd11182002213441/unrestricted/Chapter1.pdf>>

# **ANEXOS**

**ANEXO A. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIOFILIZADO DE *A. fumigatus* EN318**

1. Se cultiva el microhongo *A. fumigatus* EN-318 en tubos de ensayo con Agar Extracto de Malta (AEM).
2. Incubar a 28°C durante 7 días.
3. Adicionar 10 mL medio Wickerham líquido (100ml: 0.3gr Peptona, 0.2gr Glucosa, 3gr Sacarosa, 0.2gr Ext. Levadura, 0.15gr KNO<sub>3</sub>, 0.1gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.05gr MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 0.001gr FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).
4. Raspar con asa para suspender el hongo.
5. Adicionar los 10 mL de suspensión a 90 mL (en fiola de 250 mL) y fermentar en agitador 8 días a 25°C y 150rpm.
6. Centrifugar 1 hora a 4000rpm.
7. Decantar y filtrar.
8. Servir 2mL de extracto en tubos para liofilizar.
9. Liofilizar 7 horas (aproximadamente) a - 35°C y 22 in.Hg (1 in. Hg = 3.38638 kPa).
10. Disolver el extracto liofilizado en 1mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sin Suero Bovino Fetal (SBF) para los ensayos de citotoxicidad, genotoxicidad y para la prueba de antibiosis.

11. Diluir el extracto con DMEM sin SBF, para preparar las concentraciones utilizadas en los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad así:

<b>Concentración</b>	<b>Solución Extracto</b>	<b>DMEM sin SBF</b>
0.01 mg/mL	1 $\mu$ L	999 $\mu$ L
0.03 mg/mL	3 $\mu$ L	997 $\mu$ L
0.04 mg/mL	4 $\mu$ L	996 $\mu$ L
0.05 mg/mL	5 $\mu$ L	995 $\mu$ L
0.07 mg/mL	7 $\mu$ L	993 $\mu$ L
0.1 mg/mL	10 $\mu$ L	990 $\mu$ L
0.15 mg/mL	15 $\mu$ L	985 $\mu$ L
0.2 mg/mL	20 $\mu$ L	980 $\mu$ L
0.5 mg/mL	50 $\mu$ L	950 $\mu$ L
1 mg/MI	100 $\mu$ L	900 $\mu$ L

**ANEXO B. PROTOCOLO PRUEBA DE ANTIBIOSIS A PARTIR DE DENSIDAD ÓPTICA**

1. Pasar varias colonias del medio sólido a 5 mL de BHI (Brain-Heart Infusion Agar).
2. Dejar crecer las bacterias toda la noche a 37° C.
3. Leer el OD<sub>595</sub> y calibrar a 0.004 diluyendo en mL de BHI.
4. Sembrar en microplaca de 96 pozos 20 µL de dilución de las Bacterias con DMEM y Extracto liofilizado de *A. fumigatus* EN318 suspendido en 1 mL de DMEM a concentraciones de 1%,5%,20%, 50% y 100% así:

Pozo	1	2	3	4	5	6
<b>Concentración</b>	<b>C-</b>	<b>1%</b>	<b>5%</b>	<b>20%</b>	<b>50%</b>	<b>100%</b>
<b>Extracto (DMEM)</b>	0 µL	1 µL	5 µL	20 µL	50 µL	80 µL
<b>DMEM</b>	80 µL	79 µL	75 µL	60 µL	30 µL	0 µL
<b>Bacteria</b>	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Repetir a partir del pozo 7 hasta el 12. Sembrar 6 réplicas.

5. Se dejan crecer a 37° C
6. Hacer lecturas del OD<sub>595</sub> a las 6, 8 y 24 horas.

## **ANEXO C. CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE PIEL DE RATÓN**

Sugerido por Dr. Eduardo Mitrani el 27 de septiembre de 2005.

1. Lavar el ratón con Agua de la llave y jabón antibacterial. Secar con papel.
2. Limpiar con alcohol.
3. Decapitar y cortar las extremidades.
4. Hacer un corte ventral en el Torax. Sacar la piel con cuidado de no perforar el intestino.
5. Lavar con medio DMEM con antibióticos (10x) sin SBF, en una caja de vidrio.
6. Pasar a una caja de plástico y cortar en pedazos muy pequeños con un poco de DMEM con antibióticos (10x) sin SBF.
7. Adicionar 2 mL de Tripsina. Resuspender bien con pipeta pasteur (punta larga).
8. Incubar 20 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Revisar a los 15 min para ver si hay desprendimiento).
9. Resuspender con pipeta pasteur (punta larga) hasta que quede lechoso = desprendimiento.
10. Adicionar 6 mL de DMEM suplementado y pasar a un tubo de centrifuga.
11. Centrifugar 5 min a 1200 r.p.m..
12. Retirar sobrenadante y lavar con 6 mL de DMEM.
13. Centrifugar 5 min a 1200 r.p.m..
14. Retirar sobrenadante y adicionar 2.5 mL de DMEM suplementado y resuspender.
15. sembrar en cajas pequeñas:
  - a. 2mL de suspensión celular
  - b. 0.5mL de suspensión celular + 2 mL DMEM
  - c. 0.5mL de (b) + 1.5 mL DMEM



16. Incubar a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda.
17. Cambiar el medio todos los días por tres días después del cultivo.
18. Observar crecimiento y esperar a que las cajas estén confluentes para hacer pase en caja de cultivo grande.

## **ANEXO D. PROTOCOLO DE CITOTOXICIDAD CRÓNICA (CRISTAL VIOLETA)**

Basado en Protocolo del Dr. Michael Plewa, University of Illinois (USA).

1. A partir de una caja de cultivo confluyente, Aspirar el medio y lavar con 5 mL de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 2 veces.
2. Adicionar 1 mL de Tripsina y dejar actuar durante 30 – 60 segundos a 37°C.
3. Observar desprendimiento celular y resuspender en 10 mL de DMEM (pasar 5mL a ubo de centrifuga estéril y 5 mL a una nueva caja de cultivo, completando a 10 mL con DMEM)
4. Centrifugar el tubo a 800 r.p.m. durante 5 minutos.
5. Descartar 9 mL y resuspender el pellet en el mL restante.
6. Hace conteo celular en cámara de Neubauer.
7. Ajustar las células a una concentración de  $3 \times 10^4$  células /mL para el control negativo.
8. Hacer una dilución 1:10 para obtener una concentración de  $3 \times 10^3$  células/mL para los tratamientos.
9. Sembrar toda la microplaca de acuerdo con el siguiente esquema:

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tratamientos (mg/mL)	C -	BL	0.01	0.03	0.04	0.05	0.07	0.1	0.15	0.2	0.5	1
Extracto			100 µL (0.01)	100 µL (0.03)	100 µL (0.04)	100 µL (0.05)	100 µL (0.07)	100 µL (0.1)	100 µL (0.15)	100 µL (0.2)	100 µL (0.5)	100 µL (1)
DMEM	100 µL	200 µL										
Células	100 µL $3 \times 10^4$		100 µL $3 \times 10^3$	100 µL $3 \times 10^3$	100 µL $3 \times 10^3$	100 µL $3 \times 10^3$	100 µL $3 \times 10^3$	100 µL $3 \times 10^3$	100 µL $3 \times 10^3$	100 µL $3 \times 10^3$	100 µL $3 \times 10^3$	100 µL $3 \times 10^3$

10. Agitar en orbital durante 5 minutos a 37°C.
11. Incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas.
12. Retirar el medio por aspiración.
13. Adicionar 20 µL de Metanol al 100% a cada pozo de la microplaca.
14. Incubar a 37°C a -5% de CO<sub>2</sub> por 20 min.
15. Adicionar 18 µL de Cristal Violeta al 0.1% en 50% de metanol e incubar en cámara por 30 min. (Plewa, 2002).
16. Lavar, sumergiendo la microplaca tres veces en una bandeja con agua y secarla sobre papel.
17. Adicionar a los pozos 50 µL de DMSO e incubar a 37°C a -5% de CO<sub>2</sub> por 30 min.
18. Analizar microplaca mediante lectura del número de células viables en Microplate Reader Model 680- BIORAD a 595 nm (Plewa, 2002).
19. Se calcula el porcentaje de viabilidad de cada tratamiento con respecto al control negativo de acuerdo a su absorbancia.

## **ANEXO E. EXPOSICIÓN AL EXTRACTO LIOFILIZADO DE *A. fumigatus* EN318**

Metodología estandarizada por el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad de los Andes, con algunas modificaciones tomadas de Jiménez 2004.

1. Ajustar las células a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/mL.
2. Tomar alícuotas de 100  $\mu$ L de la suspensión celular ( $3 \times 10^5$  células/mL) y sembrar en los pozos de microplaca con 100  $\mu$ L de DMEM.
3. Incubar a 37°C a -5% de CO<sub>2</sub> por 24h. Observar crecimiento en microscopio invertido.
4. Retirar el sobrenadante y lavar con 50  $\mu$ L de (HBSS) una vez.
5. Adicionar el extracto de *A. fumigatus* EN318 a una concentración de 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.1 mg/mL y completar a 200  $\mu$ L con DMEM sin SBF.
6. Cultivar a 37°C en atmósfera -5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas.
7. Retirar el medio por aspiración de cada pozo. Lavar con 100  $\mu$ L HBSS dos veces.
8. Adicionar 50  $\mu$ L de Tripsina (1%) a los pozos tratados. Agitar en orbital por 5 minutos a 37°C.
9. Golpear la microplaca suavemente para desprender las células.

10. Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de DMEM a los pozos con Tripsina y resuspender con la micropipeta. Tomar 30  $\mu\text{L}$  para análisis de genotoxicidad y 50  $\mu\text{L}$  para observar viabilidad con Azul de Trypan.

## **ANEXO F. PROTOCOLO CITOTOXICIDAD AGUDA (AZUL DE TRYPAN)**

1. Tomar 50  $\mu$ L de suspensión celular y adicionarlos a 10  $\mu$ L de Azul de Trypan, dejar actuar durante 5 minutos.
2. Observar en cámara de Neubauer.
3. Determinar el porcentaje de viabilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{No. Células Vivas}}{\text{No. Células Totales}} \times 100$$

$$\text{No. Células Totales} = \text{Células Vivas} + \text{Células Muertas}$$

4. Utilizar los valores > 80% de viabilidad (no citotóxicos) para el ensayo del cometa.

## **ANEXO G. PROTOCOLO ENSAYO DEL COMETA**

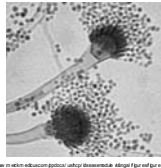
Basado en Protocolo del Dr. Michael Plewa, University of Illinois (USA).

5. Cubrir una lámina con agarosa (NMA) al 1%.
6. A los 30  $\mu$ L de la suspensión celular se le adiciona 270  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5% a 37°C.
7. Poner 100  $\mu$ L de la suspensión celular + LMA, en la lámina y cubrir con una laminilla. Refrigerar a 4°C por 8 minutos.
8. Poner una segunda capa de 100  $\mu$ L de LMA y cubrir con una laminilla. Refrigerar a 4°C por 8 minutos.
9. Introducir las láminas (sin laminilla) en Solución de Lisis [Sol. Stock/1L : NaCl (2.5M) EDTA (100mM) Tris (10mM) ajustar a pH 10 con NaOH. Sol. Trabajo/100 mL : Sol. Stock 89 mL, DMSO 10 mL, Triton X-100 1 mL]. Dejar toda la noche a 4°C.
10. Lavar las láminas con PBS sin calcio ni Magnesio durante 5 minutos.
11. Poner las láminas en la cámara de electroforesis y dejar en Reposos Alcalino durante 25 minutos a 4°C, sumergidas en Buffer de Electroforesis [Sol.Stock/1L: NaOH (10N) EDTA (200mM). Sol. Trabajo/100 mL: NaOH 30 mL, Sol. Stock 2.25 mL, completar a 100 mL con EDTA y ajustar pH >13].
12. Cuadrar el Voltaje a 25V y 300 mA y correr la Electroforesis durante 35 minutos a 4°C.
13. Retirar cuidadosamente el buffer y lavar las láminas con sol neutralizante [Tris (0.4M) a pH 7.5] cada 5 minutos tres veces.



14. Conservación: con metanol (100%) y dejar secar a T° ambiente.
15. Teñir con 20  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (20  $\mu$ g/mL).
16. Observar en microscopio fluorescente (250x) con filtro de 590nm.
17. Determinar el tipo de morfología del núcleo y la longitud de la cola ( $\mu$ m).
18. Contar de 50 – 25 células por lámina.

**ANEXO H. Poster presentado en "Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting, 2006: Vancouver, Canada."**



**Genotoxic Effect Of Liophilized Extract Of *Aspergillus Fumigatus* EN-318 On Human Fibroblast Cells**

Narváez Diana M<sup>1</sup>, Grot Helena<sup>1</sup>, Sicard Diana<sup>1</sup> y Cepero de García María Caridad<sup>2</sup>.  
<sup>1</sup>Laboratorio de Genética Humana, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.  
<sup>2</sup>Laboratorio de Micología Y Fitopatología Uniandes, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia



**INTRODUCTION**

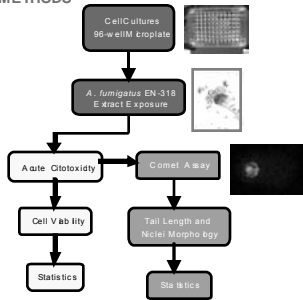
Natural Products are metabolites and/or by products from microorganisms, plants, animals, and are produced as adaptation to specific functions in nature. These products, have been used for thousands of years as source of many compounds used for medicine (1). Approximately 60% of anti-infective and anticancer agents contain Natural Products as their source (2).

Because biodiversity is so important to the continued discovery of novel natural products (2), it is important to know that an enormous, relatively untapped source of microbial diversity is represented by the microbial endophytes (3).

*Aspergillus fumigatus* EN-318 is an endophytic fungus isolated from leaves of *Espeletia grandiflora* and *E. ayumbae* found in Cruz Verde bleak plateau, Colombia (4). Microbial endophytes produce antimicrobial agents and have unique biological and genetic systems that can be applied in different areas outside the host plant (3). Because of the growing need for new alternative of highly effective and low toxicity medicinal products this research become important.

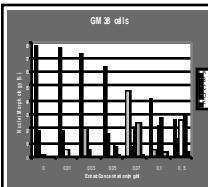
The aim of this study was to establish DNA damage associated with *in vitro* exposure to liophilized extract of *A. fumigatus* EN-318 in the human fibroblast cell line GM38 and the human fibrosarcoma cell line HT1080 measured by alkaline Comet assay.

**METHODS**

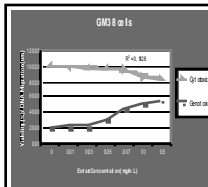


**RESULTS**

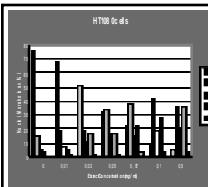
In the acute cytotoxicity test, the concentration range used was: for the GM38 cells, 0.01 to 0.1 mg/mL, and for the HT1080 cells 0.01 to 0.07 mg/mL of the liophilized extract, and with cell viability count higher than 80%. The genotoxicity test was measured by the comet assay (DNA migration from morphology of the nuclei), the results showed an increase of damage at 0.05 mg/mL for the GM38 cells and of 0.01 mg/mL for the HT1080 cells. HT1080 cells showed genotoxic effect at a lower concentration than the GM38 cells with a significance of (p<0.001).



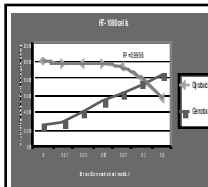
**Figure 1.** Percentage of GM38 cells with comet morphology exposed to *A.fumigatus* EN-318 Extract. A: No Damage; B: Low Damage; C: Medium Damage; D: High Damage; And E: Total Damage



**Figure 2.** Acute Cytotoxicity and DNA Damage measure as DNA Migration (µm) in GM38 cells exposed to *A.fumigatus* EN-318 Extract



**Figure 3.** Percentage of HT1080 cells with comet morphology. A: No Damage; B: Low Damage; C: Medium Damage; D: High Damage; And E: Total Damage



**Figure 4.** Acute Cytotoxicity and DNA Damage measure as DNA Migration (µm) in HT1080 cells exposed to *A.fumigatus* EN-318 Extract

Extract Concentration (µg/ml)	HT1080		GM38	
	Average Mean (µm)	SE	Average Mean (µm)	SE
0	24.91	1332	21607	0.868
0.01	28.96**	1447	21860	0.379
0.03	42.89**	1501	22177	0.378
0.05	53.84**	1758	3089**	0.825
0.07	61.87**	1072	4539**	0.82
0.1	73.81**	1230	5170**	0.874
0.5	84.82**	2584	5489**	0.207
	$F_{(6,10)} = 1874.097$		$F_{(6,10)} = 4681.569$	
	$P < 0.001$		$P < 0.001$	

**Figure 5.** DNA damage in GM38 cells and HT1080 cells induced by liophilized extract of *A.fumigatus* EN-318 Extract. DNA Migration (µm)

**CONCLUSIONS**

The extract of *Aspergillus fumigatus* EN-318 was genotoxic in the human fibrosarcoma cell line.

The fibrosarcoma cells were more sensitive than the GM38 cells (not transformed cells).

There are no significant differences between the genotoxic effects in both cell types, suggesting that the use of liophilized extract of *A.fumigatus* EN-318 could act as a possible anticancer agent.

**Acknowledgment**

This work was supported by the Comité de Investigación y Proyectos de la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

**REFERENCES**

1. Brodeur G and Day B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67:46-60.
2. Williams RB. 2002. Isolation and Structure Elucidation of Cyclic Natural Products from *Spartanum flavipes* and *Isaria fumosipes*.
3. Brodeur G. 2005. Endophytes as sources of bioactive products. Medicines and Infections 10:55-64.
4. Parra S. 2005. Microorganismos endófitos en las plantas. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. Tesis de maestría en Microbiología.
5. Jiménez H. 2004. Microorganismos productores de sustancias antibióticas y su uso en el control de plagas para la producción de frutales en el HT-1080. Tesis de Maestría en Microbiología. Universidad de los Andes.