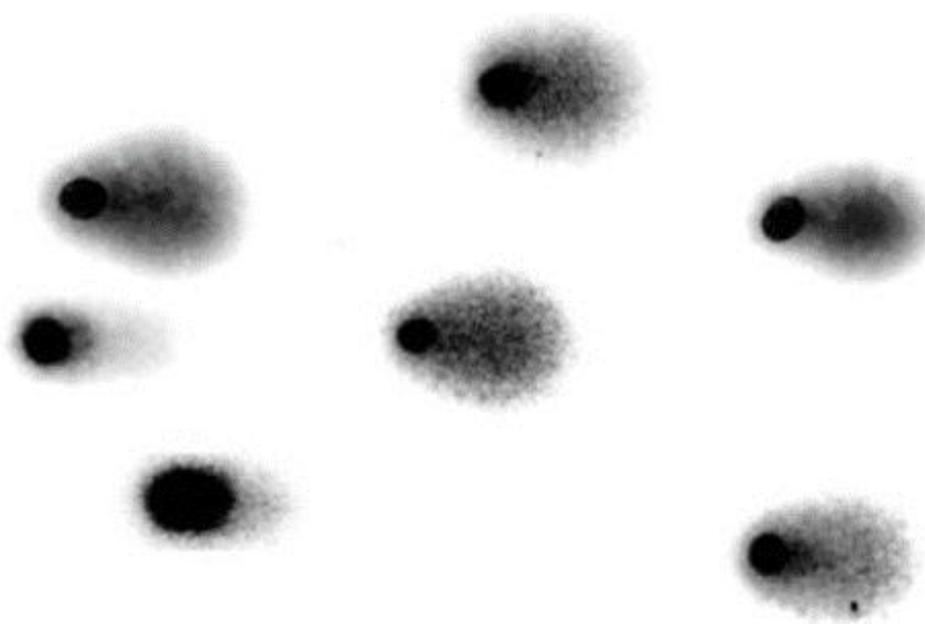




TRABAJO FIN DE GRADO

**“EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD
DE UN COMPUESTO
DEL EXTRACTO DE PROALLIUM AP®
MEDIANTE EL ENSAYO COMETA
CON POTENCIAL USO EN EL ENVASE ALIMENTARIO”**



Concepción Medrano Padial

Sevilla, 2016



Trabajo Fin de Grado de carácter experimental del Grado en Farmacia:

“EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE UN COMPUESTO DEL EXTRACTO DE PROALLIUM AP® MEDIANTE EL ENSAYO COMETA CON POTENCIAL USO EN EL ENVASE ALIMENTARIO”

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Área de Toxicología.

Tutoras: Dra. Ana María Cameán Fernández y Dra. María Puerto Rodríguez.

Concepción Medrano Padial

Sevilla, 2016

Resumen

Con el fin de reducir el uso de conservantes sintéticos, la industria alimentaria ha comenzado a desarrollar nuevos sistemas de envasado incorporando al embalaje aceites esenciales (AEs) que, por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes, contribuyan a aumentar la vida útil y calidad de los alimentos perecederos.

Aunque el uso de estos AEs en el envasado de los alimentos no está permitido aún en Europa actualmente, los estudios que evalúan la seguridad de sus principales componentes son de gran interés.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar por primera vez el potencial genotóxico de Propil Propano Tiosulfinato (PTS), uno de los componentes del Proallium AP®, un extracto comercial basado en los AEs del ajo (*Allium sativum*) y la cebolla (*Allium cepa*) destinado a ser utilizado en el envasado activo. Para ello, se estudió el daño genotóxico y la oxidación del ADN en la línea celular intestinal humana Caco-2. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de PTS (70, 140 y 280 μM) durante 24 y 48 h. Se evaluó el daño genotóxico directo mediante el empleo del ensayo cometa estándar y la oxidación del ADN mediante el empleo de las enzimas endonucleasa III (Endo III) y formamidopirimidina ADN glicosilasa (FPG) a través del ensayo cometa modificado. Los resultados demostraron que el PTS provoca cierto daño genotóxico a 280 μM . Sin embargo, a las concentraciones de interés para el envasado activo, el PTS no provocó rotura directa de la hebra de ADN. Por otra parte, los valores obtenidos tras la incubación con enzimas de restricción, no muestran oxidación de las bases nitrogenadas del ADN.

A pesar de que se requieren más ensayos con el fin de determinar el perfil toxicológico del PTS, este compuesto organosulfurado se presenta actualmente como una buena alternativa natural a otros aditivos sintéticos utilizados en la industria alimentaria.

PALABRAS CLAVES: Propil Propano Tiosulfinato, ensayo cometa, daño oxidativo

Índice

Índice	3
Introducción	4
Objetivos	8
Metodología	9
<i>Suministros y productos químicos</i>	9
<i>Cultivo celular</i>	9
<i>Selección de las concentraciones de exposición</i>	10
<i>Ensayo cometa estándar</i>	11
Metodología	12
Ensayo cometa modificado-enzima	13
<i>Estadística</i>	14
Resultados y discusión	15
<i>Resultados</i>	15
<i>Discusión</i>	18
Conclusiones	22
Bibliografía	23
Anexo I	29

Introducción

En las últimas décadas se ha producido una gran evolución en el envasado de los alimentos con objeto de intentar satisfacer las demandas de los consumidores en lo referido a métodos naturales de conservación (Cao y cols., 2013). Entre las novedades más interesantes se encuentran las técnicas de envasado activo.

El envasado activo se basa en embalajes que, además de proporcionar una barrera inerte protectora a las influencias externas para los alimentos, interaccionen beneficiosamente con éstos (Rooney, 1995; Gómez-Estaca y cols., 2014). Esta técnica de envasado viene a cumplimentar dos grandes objetivos: por una parte aumentar la vida útil y por otra, facilitar el procesado y el consumo de los alimentos. Su fin es, por tanto, mantener los nutrientes en condiciones óptimas, protegiéndolos de los agentes responsables de cualquier alteración biológica, química o física (Rooney, 1995; Fernández, 2000; Ozdemir y Floros, 2004).

El envase activo ofrece la posibilidad de reducir el contenido de aditivos sintéticos (Martyn y cols., 2012). Actualmente, se propone la utilización de algunos extractos de plantas como buenas alternativas para ser utilizados en contrapartida al envasado tradicional (Sinha y cols., 2014). Entre ellos, destacan los extractos de las especies de ajo (*Allium sativum*) y cebolla (*Allium cepa*), cuyas propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes son ampliamente conocidas (Amagase, 2006; Milner, 2006; Corzo-Martínez y cols., 2007; Ruiz y cols., 2009). Estas características se atribuyen, en gran parte, a compuestos volátiles organosulfurados, presentes en especies del género *Allium* sp. (Corzo-Martínez y cols., 2007; Ruiz y cols., 2010).

Sin embargo, dependiendo de diferentes condiciones, el contenido de estos compuestos en las plantas puede variar considerablemente, debido a que son altamente reactivos e inestables (Benkeblia y Lanzotti, 2007). A raíz de esta problemática, se ha estudiado el aislamiento de compuestos estables y bien diferenciados, obteniéndose, entre otros, el

Propil Propano Tiosulfonato (PTSO) (Figura 1A) y el Propil Propano Tiosulfinato (PTS) (Figura 1B) (Ruiz y cols., 2010).

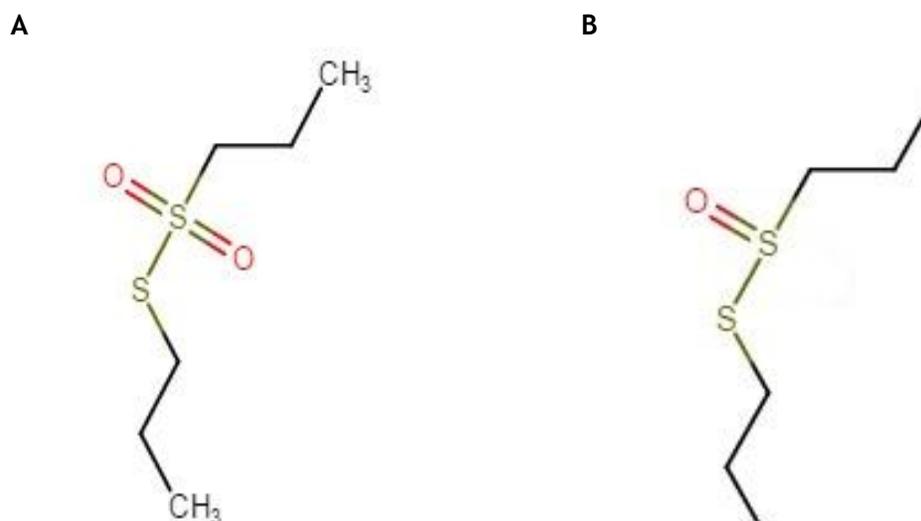


Figura 1. Estructura química de PTSO (A) y de PTS (B). Tomadas de Ruiz y cols., 2010.

El PTSO proviene de S-propil-L-Cisteína, derivado del aminoácido L-Cisteína, abundantemente encontrado en las plantas del género *Allium spp.* Para su biosíntesis es necesaria la oxidación del PTS, el cual se forma a partir de compuestos altamente reactivos como son el sulfóxido de tiopropanal, piruvato y amoníaco (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015a).

El centro de investigación DOMCA (Granada, España) ha incorporado estos dos compuestos organosulfurados al extracto comercial Proallium AP[®], el cual, se quiere incluir en distintos polímeros con el fin de ser utilizado como envase activo. Llana-Ruiz-Cabello y cols. 2015b han evaluado la incorporación de Proallium AP[®] a diferentes concentraciones (2%, 5% y 6,5%) en plásticos de ácido poliláctico (PLA) utilizados en el envasado de ensaladas listas para comer. Aunque no se observó un notable efecto antioxidante, si se ha demostrado la actividad antimicrobiana. Envases con un 5% o un

6,5% de Proallium AP® presentaron un gran potencial antimicrobiano para su posible aplicación en la industria alimentaria (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015b). Además, se ha demostrado la actividad antimicrobiana y el papel protector de PTSO frente a situaciones de estrés oxidativo inducidas con 100 μM de H_2O_2 (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015a). El estudio se completó con la evaluación del posible potencial citotóxico en la línea intestinal (Caco-2) y hepática humana (Hep G2), a la concentración máxima de 500 μM . La viabilidad celular se vio afectada en el intervalo de 350-415 μM , concentraciones 10 veces superiores a las destinadas a ser utilizadas en el envasado alimentario, la cual es inferior a 37.5 μM (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015a).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), de acuerdo al Reglamento (CE) Nº 1935/2004 sobre materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos, exige la evaluación de la seguridad de sustancias antes de dar su autorización para el uso de materiales que van a encontrarse en contacto con los alimentos (Food Contact Materials, FCM) (EFSA, 2016). Para la evaluación del potencial genotóxico, la EFSA recomienda empezar el estudio con dos ensayos *in vitro*: El ensayo de mutación inversa en bacterias, (OCDE 471) destacando el test de Ames en *Salmonella typhimurium*, y el ensayo de micronúcleos (MN) (OCDE 487) (Mellado-García y cols, 2015; EFSA, 2016). Esta combinación de ensayos cumple con los requisitos básicos para el estudio de las tres principales alteraciones genéticas más importantes con el mínimo número de ensayos: el ensayo de mutación inversa en bacterias informa sobre las mutaciones en los genes, y MN sobre aberraciones estructurales y numéricas en los cromosomas (EFSA, 2016). Además, con el fin de completar la evaluación toxicológica y optimizar los posibles ensayos *in vivo*, se llevarán a cabo más pruebas *in vitro*, que son principalmente dos: El ensayo de mutación genética en células de mamífero (MLA) y el ensayo cometa *in vitro* (EFSA, 2011).

En este sentido, y siguiendo las recomendaciones de la EFSA 2016, se ha realizado una batería de pruebas de genotoxicidad *in vitro* con el organosulfurado PTSO: Test de Ames (OECD 471); ensayo de MN (OECD 487) y MLA (OECD 476) en células L5178YTk^{+/-}; cometa estándar y modificado en la línea celular Caco-2. El PTSO mostró cierto potencial mutagénico en el ensayo de MLA tras 24 h de exposición y, además, sus metabolitos (en

presencia de S9) dieron un resultado positivo en el ensayo de MN. Sin embargo, ni su mutagenicidad ni su genotoxicidad fueron demostradas mediante el test de Ames y ensayo cometa respectivamente. Además, la incubación con enzimas de restricción (ensayo cometa modificado) indicaron que el PTSO no produjo oxidación del material genético (Mellado-García y cols, 2015). Los resultados contrarios obtenidos en los estudios genotóxicos del PTSO *in vitro*, hicieron necesaria la realización de ensayos de genotoxicidad *in vivo* (EFSA 2011), demostrándose que el compuesto organosulfurado no es genotóxico a las dosis ensayadas (0-55 mg/kg), por lo que se considera una alternativa natural a los conservantes sintéticos utilizados en la industria alimentaria.

A pesar de los estudios realizados sobre Proallium AP® y PTSO, se desconoce hasta el momento el perfil toxicológico de PTS, otro componente importante de este extracto comercial. Considerando que la EFSA 2011 recomienda hacer inicialmente una batería de ensayos *in vitro* para poder evaluar la genotoxicidad de sustancias que van a migrar al alimento, en este trabajo nos centraremos en la versión alcalina del ensayo cometa *in vitro*, el método más ampliamente usado en la evaluación genotóxica de los AEs (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015a).

El ensayo cometa permite detectar la rotura de la cadena de ADN, y además admite modificaciones enzimáticas con el fin de revelar la oxidación de bases purinas y pirimidinas (Karlsson, 2010; Azqueta y Collins, 2013).

En comparación con las diferentes técnicas enumeradas, el ensayo cometa es un método altamente sensible capaz de detectar leves daños en el ADN en cualquier tipo de células. Además, los resultados pueden obtenerse en un período relativamente corto de tiempo incluso con un número de células reducido (Kawaguchi y cols., 2010). La relativa rapidez y sencillez, las diferentes versiones disponibles y la amplia gama de células que pueden ser objeto de estudio, hacen del ensayo cometa una herramienta versátil y con potencial para estimar el daño e incluso la reparación del ADN en múltiples experimentos (Azqueta y cols., 2014; Gunasekarana y cols., 2015).

Por todo ello, adquiere especial relevancia la evaluación del PTS por primera vez mediante el ensayo cometa en la línea intestinal humana Caco-2, por ser la principal vía de exposición la vía oral (Ruiz y cols., 2010).

Objetivos

A pesar de las numerosas propiedades beneficiosas de los extractos de ajo y cebolla y de sus compuestos en los envases activos, es necesario evaluar la seguridad para el consumidor. Debido a la escasa información toxicológica que existe del compuesto PTS, el objetivo de este estudio es evaluar el potencial genotóxico así como el daño oxidativo de dicho compuesto mediante el ensayo cometa estándar y modificado en la línea intestinal humana Caco-2. Estos ensayos nos permitirán dilucidar el posible potencial genotóxico y el mecanismo de acción tóxico del organosulfurado y así evaluar el riesgo en la utilización de este componente en la industria alimentaria para su posterior aplicación en el envasado activo.

Materiales y métodos

Suministros y productos químicos

El medio celular, el suero fetal bovino (SFB) y los reactivos del medio de cultivo fueron suministrados por BioWhittaker® (Madrid, España). El compuesto PTS con un 95,5% de pureza fue obtenido por DOMCA S.L (Granada, España). La enzima endonucleasa III (Endo III) fue proporcionado por C-viral S.L (Sevilla, España) y la formamidopirimidina Glicosilasa (FPG) por Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los demás reactivos se adquirieron a través de Sigma-Aldrich (Madrid, España) y VWR International Eurolab (Madrid, España).

Cultivo celular

La línea celular Caco-2 (Figura 2) deriva de un adenocarcinoma de colon humano (ATCC® HTB-37). Las células se incubaron a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y con una humedad relativa del 95% (incubadora de CO₂, NuAire®, España). El medio Eagle se suplementó con un 10% de SFB, 1% de aminoácidos no esenciales, 50 µg/mL de gentamicina, 1,25 µg/mL de anfotericina B, 2 mM de L-glutamina, y 1 mM de piruvato. El medio fue cambiado 3 veces por semana y las células se cultivaron en suspensión en frascos de plástico estériles de 75 cm². Las células se sembraron a una densidad de 3.5 x 10⁵ células/mL en placas de 24 pocillos (Corning Costa Corporations, USA), utilizándose para su recuento y viabilidad celular el test de exclusión del colorante azul tripán con la cámara de Neubauer (Mellado-García y cols., 2015).

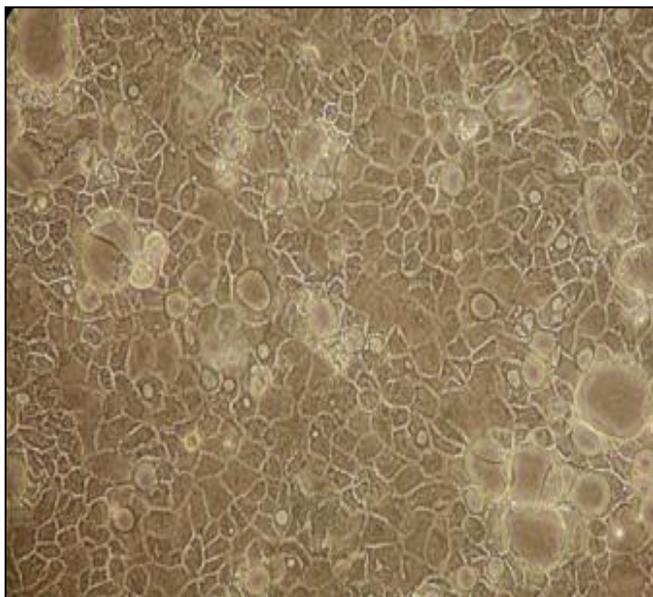


Figura 2. Morfología de la línea celular Caco-2.

Selección de las concentraciones de exposición

Las concentraciones de PTS utilizadas fueron seleccionadas teniendo en cuenta experimentos previos de citotoxicidad basándose en estudios de contenido proteico, captación de rojo neutro (RN) y la reducción de la sal de tetrazolio (MTS) (Puerto y cols., 2010). El valor de la Concentración Efectiva Media (EC_{50}) obtenida del MTS tras 24 h de exposición, se distinguió como la concentración de exposición más alta para la realización del ensayo cometa, junto a las fracciones $EC_{50}/2$ y $EC_{50}/4$. Las concentraciones de PTS seleccionadas fueron 280, 140 y 70 μM , de acuerdo con estos estudios previos de citotoxicidad (datos aún no publicados).

La solución madre de PTS de 400 mM fue preparada en DMSO. A partir de ella, se prepararon las distintas concentraciones usando medio Eagle sin SFB. La cantidad final de DMSO en las concentraciones de exposición nunca superó el 0,1%.

Ensayo cometa estándar

El ensayo cometa, también denominado electroforesis de células individuales, es una técnica rápida, sensible y relativamente simple, que detecta daños en el ADN a nivel de células individuales (Singh y cols., 1988; Collins, 2013). El ensayo cometa ha sido ampliamente estudiado con el fin de conocer sus ventajas y limitaciones en estudios de toxicidad genómica, ecológica y biomonitorización (Fairbairn y cols., 1995; Dixon y cols., 2002; Lee y Steiner, 2003; Collins, 2004;).

Este método se basa en la capacidad del ADN, de carga negativa, para migrar a través de un gel de agarosa en respuesta a un campo eléctrico hacia la carga positiva. El grado de migración de la molécula depende directamente de los daños en el ADN presente en las células (Tice y cols., 2000).

Östling y Johanson en el año 1984, fueron los primeros en desarrollar una técnica de electroforesis en microgeles para detectar el daño en el ADN a nivel de células individuales. Las células son embebidas en agarosa y colocadas en portaobjetos para ser lisadas con detergente y sales a altas concentraciones y sometidas a electroforesis en condiciones neutras. Las células con una elevada frecuencia de ruptura de doble cadena mostraron una significativa migración del ADN hacia el ánodo (Collins, 2004). Sin embargo, las condiciones neutras limitaban la utilidad del ensayo, y por eso en 1988, Singh y cols. desarrollaron una técnica involucrando la electroforesis en condiciones alcalinas. En estas condiciones, el incremento en la migración del ADN se asocia con elevados niveles de rupturas de cadena simple (Azqueta y cols, 2014).

Debido a que la mayoría de agentes genotóxicos inducen más rupturas simples que dobles, esta versión del ensayo tiene mayor importancia en la identificación de los agentes genotóxicos, y por ello estas son las condiciones más utilizadas hoy en día (Ozdemir y Floros, 2004; Azqueta y cols., 2014; Singh, 2016).

Comparado con otros métodos, el ensayo cometa presenta ciertas ventajas, como son: alta sensibilidad, rapidez, requiere un pequeño tamaño de muestra, la obtención de datos

es a nivel de células individuales y su posible uso en cualquier célula eucariota, ya sea *in vitro* e *in vivo* (Azqueta y Collins, 2008).

Metodología

Las células Caco-2 fueron sembradas a una densidad de $3,5 \times 10^5$ cél/mL y pasadas 24 h fueron expuestas a concentraciones crecientes de PTS (70, 140 y 280 μ M) durante 24 o 48 h. Todos los pocillos (grupo control y células expuestas a PTS) fueron tratados con medio sin SFB. Un control negativo y un control positivo (100 μ M de H_2O_2) fueron incluidos en todos los ensayos (Mellado-García y cols., 2015).

Tras el periodo de exposición -24 o 48h- se retiró el medio y las células fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS), tripsinizadas y neutralizadas de nuevo con PBS. La suspensión celular se centrifugó a 2500 rpm durante 3 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendió con PBS y se cuantificaron las células con el fin de obtener una densidad de 2.5×10^5 cél/mL. Seguidamente, la suspensión celular fue mezclada con 140 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (1%) a 37°C, y dispuesta en diferentes portaobjetos pretratados con agarosa. Este pretratamiento de los portaobjetos con agarosa, tiene como objetivo obtener geles uniformes lo suficientemente estables para mantenerse en todo el proceso y asegurar la fácil visualización de los cometas con el mínimo ruido de fondo (Tice y cols., 2000).

Después de la solidificación del gel de agarosa, se colocaron los portaobjetos, al menos durante 1 h a 4°C, en un buffer de lisis compuesto por NaCl, EDTA, el tampón Trizma®, DMSO y un 1% de Triton X-100. El pH del buffer se ajustó a 10, con NaOH o HCl. Al terminar el periodo de lisis, los portaobjetos se incubaron en frío en solución alcalina (EDTA a 1mM y NaOH a 300 mM) (pH > 13) durante 20 minutos a 4°C. En este proceso se produjo el desenrollamiento del ADN (Tice y cols., 2000). La electroforesis fue llevada a cabo a 25 V con 300 mA durante 20 minutos en condiciones básicas. En este paso se puede producir la migración del ADN y con ello la formación del correspondiente halo, si se ha producido daño en el ADN celular.

Los portaobjetos fueron primero neutralizados en PBS sin calcio ni magnesio y con agua destilada (Mili-Q water purification system, Milipore, España). Posteriormente, se realizó la deshidratación mediante la incubación de 15 minutos con Etanol al 70% y etanol absoluto otros 15 minutos (Mellado y cols., 2015).

Para finalizar, el ADN fue teñido con SYBR Gold (Invitrogen, thermofisher, MA USA) y se visualizó con un Microscopio de Fluorescencia (Olympus BX61). De cada preparación, al menos 100 núcleos aleatorios se analizaron con un Software de Análisis de Imagen (Comer Assay IV, Perceptive Instrumental, UK) (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2014).

Ensayo cometa modificado-enzima

El Ensayo Cometa modificado determina el posible daño oxidativo del ADN producido por el tóxico mediante la incubación con enzimas que reconocen bases purinas o pirimidinas oxidadas e intervienen en la reparación por escisión de bases (BER) (Asare y cols., 2012).

Las principales enzimas utilizadas son Endo III para detectar pirimidinas oxidadas, y la FPG para detectar purinas oxidadas, como, por ejemplo, la 8-oxo-7,8-dihidro-2-guanosina (8-oxo-G), la cual se considera un indicador de daño oxidativo en las bases del ADN (Petersen y Nelson, 2010). Como control positivo para ambas enzimas, las células fueron expuestas a H₂O₂ (100µM). La utilización dichas enzimas incrementa la especificidad y sensibilidad del ensayo cometa (Karlsson, 2010).

En nuestro estudio para conocer el daño oxidativo del ADN, las células fueron embebidas en agarosa e incubadas en solución de lisis, como se ha descrito anteriormente. Transcurrido al menos 1 hora, los portaobjetos fueron lavados 3 veces durante 5 minutos con tampón de enzima (tampón F) (40mM HEPES, 0.1 M KCL, 5 mM EDTA, Albúmina de Suero Bovino 0,2 mg/mL, a pH de 8). Una vez eliminado el exceso de tampón, los portaobjetos se trataron con 30 µL de tampón F, 30 µL de tampón F con FPG (10U/mL) o 30 µL de tampón F con Endo III (14U/mL). La optimización de la actividad enzimática se consiguió con la incubación a 37°C durante 30 minutos de los portas. Finalmente, se

sometieron a electroforesis, y a procesos de neutralización, secado y tinción anteriormente descritos (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2014).

Estadística

Todos los experimentos fueron llevados a cabo al menos tres veces y en duplicado por concentración. El porcentaje de daño en el ADN se evaluó mediante el programa estadístico Graphpad instant®. El análisis estadístico se desarrolló utilizando el análisis de varianza (ANOVA), seguido del test Tukey-Karmer (paramétrico) y el Kruskal-Wallis (no paramétrico). Se consideraron diferencias significativas a partir de un valor de $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Resultados

En el ensayo cometa estándar, los resultados obtenidos indican que el PTS a 70 y 140 μM no produce rotura de la hebra de ADN en la línea celular Caco-2 tras 24 y 48h de exposición. Sin embargo, tras ambos tiempos de exposición a la concentración más alta ensayada (280 μM) se obtuvo un incremento del porcentaje de ADN en la cola respecto al grupo control (Figura 3). Además, hubo un daño significativo en el ADN a las 48h, con respecto a las 24h ($p < 0,05$). Las células Caco-2 fueron expuestas a 100 μM H_2O_2 (control positivo (c+)) produciendo un incremento significativo ($p < 0,001$) del daño en el ADN tras 24h y 48 h de exposición, comprobándose así la efectividad del ensayo.

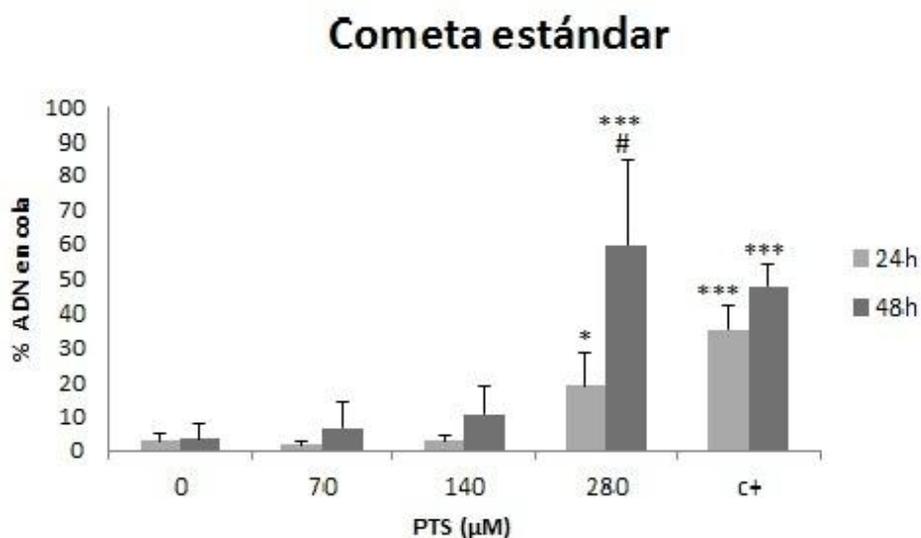


Figura 3. Daño genotóxico producido en el ADN en las células Caco-2 tras 24 y 48h de exposición a 70, 140 y 280 μM de PTS expresado como formación de roturas simples en el ADN. El marcador de genotoxicidad evaluado fue el % ADN en cola. Todos los valores son expresados como la media \pm s.d. * diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$) y *** extremadamente significativa con respecto al grupo control ($p < 0,001$). # diferencias significativas entre los tiempos de exposición ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos tras la incubación de la enzima de digestión Endo III, no mostraron un incremento del daño del ADN tras 24 y 48h de exposición de PTS con respecto al grupo expuesto solo con tampón F (Figura 4). Cuando las células fueron tratadas con H₂O₂ (C+) e incubadas con Endo III, se observó un incremento significativo ($p < 0.001$) del daño genotóxico a ambos tiempos de exposición.

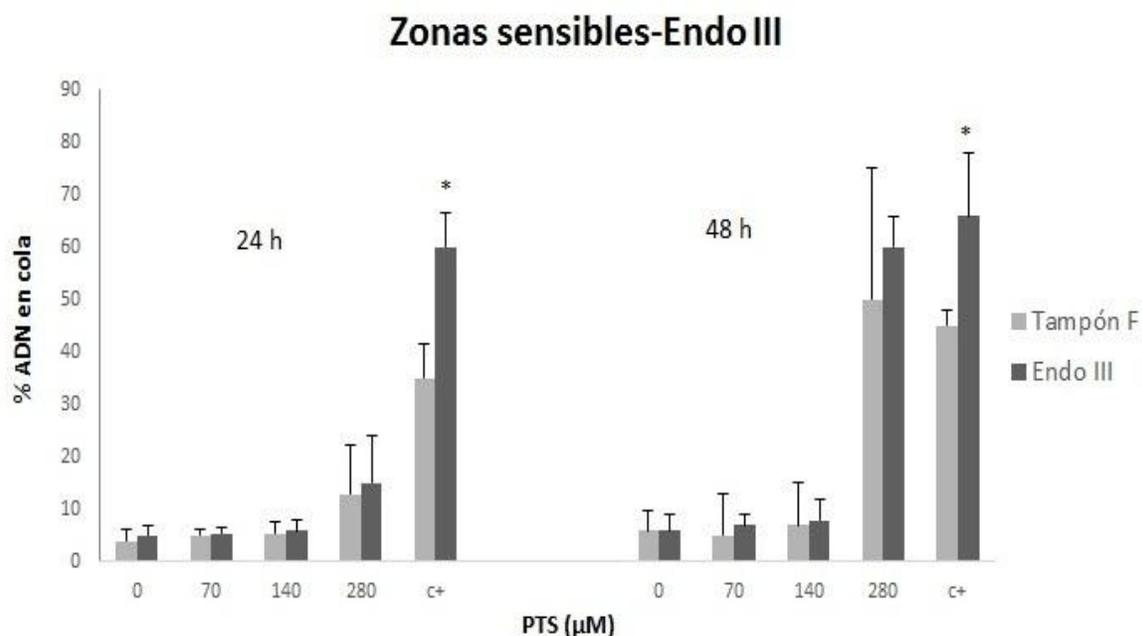


Figura 4. Daño genotóxico producido en el ADN en las células Caco-2 tras 24 y 48h de exposición a 70, 140 y 280 μM de PTS mediante el reconocimiento de la enzima Endo III a zonas sensibles. Los niveles de oxidación de las bases pirimidínicas están expresado como % ADN en cola. Todos los valores son expresados como la media ± s.d. * diferencias significativas con respecto al grupo tampón F ($p < 0,05$)

El posible daño oxidativo de PTS sobre las bases púricas se muestra en la Figura 5. No se observaron diferencias significativas en ambos tiempos de tratamiento tras la exposición a PTS y la incubación de la enzima FPG a 70, 140 y 280 μM . Sin embargo, cuando las células fueron expuestas a 100 μM de H_2O_2 , se aprecian cambios significativos ($p < 0,01$) en el % de ADN en cola con respecto al grupo control.

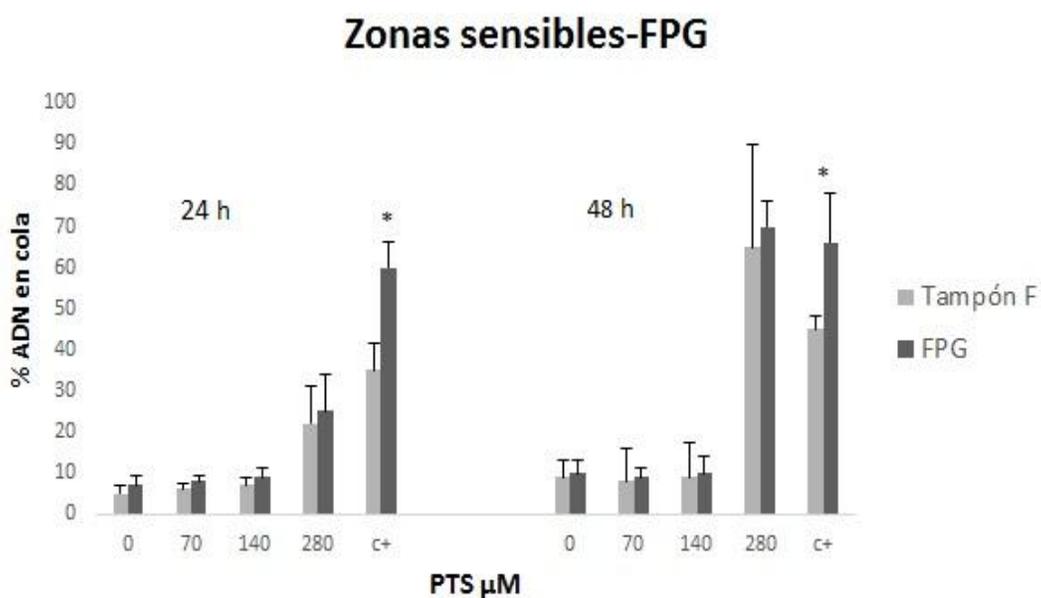


Figura 5. Daño genotóxico producido en el ADN en las células Caco-2 tras 24 y 48h de exposición a 70, 140 y 280 μM de PTS mediante el reconocimiento de la enzima FPG a zonas sensibles. Los niveles de oxidación de las bases pirimidínicas están expresados como % ADN en cola. Todos los valores son expresados como la media \pm s.d. * diferencias significativas con respecto al grupo tampón F ($p < 0,05$)

Discusión

Las propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas que presentan los AEs de la cebolla (*Allium cepa* L.), el ajo (*Allium sativum* L.) y sus principales compuestos organosulfurados, hacen que el extracto comercial Proallium AP® tenga potencial para ser usado en el envasado activo (Corzo-Martínez y cols., 2007; Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015c). Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes de esta novedosa técnica es la posible migración de los componentes activos a los alimentos, y por lo tanto, su ingestión (Fernández, 1999; Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015c).

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados sobre las propiedades de los AEs del ajo y la cebolla (Corzo-Martínez y cols., 2007; Bakkali y cols., 2008; Seow y cols., 2014), poco se conoce sobre sus posibles efectos genotóxicos (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015c). En este sentido, es necesario evaluar la seguridad asociada al uso de estos aceites y sus componentes en los envases alimentarios mediante diversos ensayos de genotoxicidad (EFSA, 2011). Por ello, con el propósito de conocer los efectos del Proallium AP® para su posible aplicación en la industria alimentaria, en el presente estudio se ha determinado el potencial genotóxico del PTS, uno de los constituyentes del extracto, en la línea celular Caco-2 mediante el ensayo cometa estándar y modificado a las concentraciones de 70, 140 y 280 μM .

El organosulfurado no produjo rotura directa de las hebras de ADN tras 24 y 48h de exposición a 70 y 140 μM . Esto puede ser debido a que el daño genotóxico no se produzca *in vitro*, o bien es fácilmente reparado por las células (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2014). Estos resultados son de gran importancia teniendo en cuenta que la seguridad de PTS no se había abordado con anterioridad. Sin embargo, se observa un incremento del % de DNA en la cola de aproximadamente 6,5 veces mayor con respecto al grupo control tras 24 h a la exposición más alta ensayada (280 μM). Cuando las células Caco-2 fueron expuestas a dicha concentración de PTS durante 48h, se observó un incremento aproximadamente del triple en las roturas de las hebras de ADN con respecto al mismo grupo expuesto durante 24h. Sin embargo, el aumento significativo de la migración de las hebras de ADN en ambos

tiempos de exposición se origina a concentraciones aproximadamente 10 veces superiores a las que se estima utilizar en el envase activo.

Los resultados negativos del PTS a las concentraciones relevantes para el embalaje, coinciden con los obtenidos por Mellado-García y cols. (2015) tras la exposición de las células Caco-2 durante 24 y 48h a PTSO, otro constituyente principal de Proallium AP®. En este caso, el rango de concentraciones ensayadas (0- 50 μ M) fueron elegidas estimando la cantidad del organosulfurado que podría migrar desde el envase con Proallium AP® (Mellado-García y cols., 2015)

Belloir y cols. (2006) evaluaron la Alicina (DADSO), el sulfuro de dialilo (DAS), el disulfuro de dialilo (DADS), S- Alil cisteína (SAC) y Alil mercaptano (AM) en células hepáticas HepG2 a las concentraciones de 5-100 μ M mediante el ensayo cometa. Ninguno de los compuestos organosulfurados del ajo estudiados mostraron aumento de la frecuencia de las roturas de las cadenas de ADN en comparación con las células no expuestas.

La electroforesis alcalina de células individuales está siendo cada vez más utilizada en la evaluación de AEs (Zegura y cols., 2011; Liju y cols., 2013; Sinha y cols., 2014;) y sus principales componentes en la industria alimentaria (Martins y cols., 2011; Aydin y cols., 2014; Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2014). De hecho, estudios realizados recientemente en nuestro laboratorio han demostrado la ausencia de actividad genotóxica del carvacrol (0-460 μ M) y del timol (0-250 μ M), principales compuestos fenólicos del aceite esencial de orégano, en células Caco-2 (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015c). Sin embargo, resultados contradictorios se han observado cuando estos compuestos activos fueron evaluados mediante el ensayo cometa en diferentes modelos experimentales *in vitro* (Aydin y cols., 2005; Horváthová y cols., 2006; Ündeger y cols., 2009; Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015c;).

Los compuestos organosulfurados poseen actividad antimicrobiana y un papel protector frente a situaciones de estrés oxidativo inducido por diversos compuestos (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015a). Sin embargo, estas sustancias antioxidantes pueden tener un comportamiento prooxidante dependiendo de la dosis y las condiciones (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015c). En este sentido, la formación de especies reactivas de oxígeno

(ERO) ha sido señalada como un fenómeno importante en las patogénesis de diversas enfermedades con una elevada prevalencia, tales como el cáncer, la diabetes, la artritis y el Parkinson (Hernández y Martin, 2010). Por lo tanto, con el fin de completar la evaluación del potencial genotóxico del PTS y reducir significativamente la posibilidad de clasificar el compuesto genotóxico falsamente como negativo (Azqueta y Collins, 2013; Mellado-Garcia y cols., 2015), incorporamos en nuestro ensayo la versión enzimática del ensayo cometa utilizando las enzimas Endo III y FPG. El uso de estas enzimas de restricción proporciona una alta sensibilidad y una alta especificidad al ensayo, siendo esta versión modificada una prueba ampliamente utilizada para confirmar la participación de ERO en el mecanismo de acción de diferentes compuestos (Zuñiga, 2009).

La incubación de las células Caco-2 con PTS y con ambas enzimas de reparación durante 24 y 48 h, no ocasionó un incremento del daño del ADN con respecto al observado con el ensayo cometa estándar. Por tanto, el compuesto no está implicado en el daño oxidativo de las bases nitrogenadas del ADN a las concentraciones ensayadas. Resultados similares se observaron recientemente en el ensayo realizado con PTSO a concentraciones de 0 a 50 μM en la línea celular Caco-2 después de 24 y 48h de exposición (Mellado-Garcia y cols., 2015).

Además de los compuestos organosulfurados que forman parte del extracto vegetal Proallium AP[®], otros compuestos activos fundamentales de los AEs han sido evaluados mediante el ensayo cometa modificado. Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2014 demostraron que el timol (0-250 μM) no interviene en la oxidación del material genético, sin embargo el carvacrol a 460 μM produce oxidación de las bases púricas.

El incremento de estudios genotóxicos de los AEs es cada vez más notable, debido principalmente al aumento en la demanda de alternativas naturales a los aditivos alimentarios sintéticos por parte de los consumidores (Sinha y cols., 2014). Sin embargo, son necesarios más investigaciones centradas en el papel que ejerce el estrés oxidativo en el daño del ADN (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2014).

Nuestro trabajo demostró que el PTS a las concentraciones de 70 y 140 μM no produce rotura directa de la hebra de ADN en las células Caco-2. Además, no se observó oxidación de las bases pirimidínicas y púricas en ninguna de las concentraciones ensayadas. Estas investigaciones indican que este compuesto organosulfurado se podría considerar una buena alternativa a los aditivos actuales.

Conclusiones

En el presente estudio se ha evaluado por primera vez el potencial genotóxico del PTS en células Caco-2 a las concentraciones de 70, 140 y 280 μM , obtenidas en ensayos previos de citotoxicidad (EC_{50} , $\text{EC}_{50/2}$ y $\text{EC}_{50/4}$). Los resultados mostraron que a concentraciones inferiores de 140 μM este compuesto no produce daño genotóxico tras 24 y 48h de exposición. Además se comprobó la ausencia del daño oxidativo del ADN valorado mediante la incubación de las enzimas Endo III y FPG. Por tanto, se demuestra el bajo riesgo genotóxico del PTS; sin embargo, con el fin de completar estos datos, otros ensayos de mutagenicidad/genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* son necesarios para confirmar la seguridad de este compuesto.

Bibliografía

Amagase HJ. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *Nutr.* 2006; 136: 716 S – 725S.

Asare A, Instanes C, Sandberg W, Refsnes M, Schwarse P, Kruszewski M, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* 2012; 291; 65-72.

Aydin S, Basaran A, Basaran N. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 1299–1305.

Azqueta A, Slysokova J, Langie SA, O'Neill Gaivão I, Collins A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front. Genet.* 2014; 5: 1-8.

Azqueta A, Collins, A. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch.Toxicol.*2013; 87: 949–968.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem. Toxicol.* 2008; 46: 446–475.

Belloir C, Singh V, Daurat C, Siess MH, Le Bon AM. Protective effects of garlic sulphur compounds against DNA damage induced by direct- and indirect- acting genotoxic agents in HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 2006; 44: 827–834.

Benkeblia N, Lanzotti V. Allium thiosulfinates: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. *Food* 2007; 193–201.

Cao Y, Gu W, Zhang J, Chu Y, Ye X, Hu Y, et al. Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage. *Food Chem.* 2013; 141: 1655–1660.

Collins AR, Azqueta A, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008; 23: 143–151.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004; 26: 249–261.

Corzo-Martínez M, Corzo N, Villamiel M. Technol. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci.* 2007; 18: 609–625.

Daryl W Fairbairn, Peggy L. Olive, Kim L. O'Neill. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 1995; 339: 37-59.

Dixon DR, Pruski AM, Dixon LR, Jha AN. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 2002; 17: 495–507.

EFSA CEF Panel. Scientific opinion on recent developments in the risk assessment of chemicals in food and their potential impact on the safety assessment of substances used in food contact materials. *EFSA Journal* 2016; 14 4357: 1-28.

EFSA Scientific Committee. Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal.* 2011; 9 2379: 1-69.

Fernandez Alvarez M. Review: Active food packaging. *Food Sci Tech Int.* 2000; 6: 97-108.

Gómez-Estaca J, Lopez-de-Dicastillo C, Hernández-Muñoz P, Catala R, Gavara R. Advances in antioxidant active food packaging. *Trends Food Sci Tech.* 2014; 35: 42-51.

Gunasekarana V, Gladwin V, Parkash Chand. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. *J. Clin. Diagn. Res.* 2015; 9: GE01-GE05.

Hernández A, Martín Gil FJ. Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *AEBM*. 2010; 6: 443-460.

Horvathova E, Sramkova M, Labaj J, Slamenova D. Study of cytotoxic, genotoxic and DNA-protective effects of selected plant essential oils on human cells cultured in vitro. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2006; 27: 44–47.

Karlsson HL. The comet assay in nanotoxicology research. *Anal. Bioana. Chem.* 2010; 398: 651–666.

Kawaguchi S, Nakamura N, Yamamoto A, Honda G, Sasaki YF. Is the Comet Assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity?. *J. Nucleic Acids.* 2010; 0-8.

Liju VB, Jeena K, Kuttan R. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L.). *Food Chem. Toxicol.* 2013; 53: 52–61.

Llana-Ruiz-Cabello M, Gutiérrez-Praena D, Puerto M, Pichardo S, Moreno FJ, Baños A et al. Acute toxicological studies of the main organosulfur compound derived from *Allium* sp. intended to be used in active food packaging. *Food Chem. Toxicol.* 2015a; 82: 1–11.

Llana-Ruiz-Cabello M, Maisanaba S, Puerto M, Prieto AI, Pichardo S, Jos A et al. Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the Ames Salmonella test and alkaline, Endo III and FPG-modified comet assays with the human cell line Caco-2. *Food Chem. Toxicol.* 2014; 72: 123–128.

Llana-Ruiz-Cabello M, Pichardo S, Baños A, Nuñez C, Bermudez JM, Guillamón E et al. Characterisation and evaluation of PLA films containing an extract of *Allium* spp. to be used in the packaging of ready-to-eat salads. *LWT-Food Sci. Technol.* 2015b; 64: 1354–1361.

Llana-Ruiz-Cabello M, Pichardo S, Maisanaba S, Puerto M, Prieto AI, Gutiérrez-Praena D et al. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: a review. *Food Chem. Toxicol.* 2015c; 81: 9–27.

Martins C, Doran C, Laires A, Rueff J, Rodrigues AS. Genotoxic and apoptotic activities of the food flavourings myristicin and eugenol in AA8 and XRCC1 deficient EM9 cells. *Food Chem. Toxicol.* 2011; 49: 385–392.

Martyn M, McNulty A, Nugent P, Gibney J. Food additives and preschool children. *Proc. Nutr. Soc.* 2013; 72: 109–116.

Mellado-García P, Maisanaba S, Puerto M, Llana-Ruiz-Cabello M, Prieto AI, Marcos R et al. Genotoxicity assessment of propylthiosulfinate oxide, an organosulfur compound from *Allium* extract, intended to food active packaging. *Food Chem. Toxicol.* 2015; 86: 365–373.

Mellado-García P, Puerto M, Pichardo S, Llana-Ruiz-Cabello M, Moyano R, Blanco A et al. Toxicological evaluation of an *Allium*-based commercial product in a 90-day feeding study in Sprague Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.* 2016; 90: 18-29.

Milner JA. Preclinical perspectives on garlic and cancer. *J.Nutr.* 2006; 136: 827S–831S.

Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 123: 291–298.

Ozdemir M, Floros J. Active Food Packaging. *Crit. Rev. Food. Sci.* 2004; 44: 185-193.

Petersen EJ, Nelson BC. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010; 398: 613–650.

Puerto M, Pichardo S, Jos A, Prieto A I, Sevilla E, Frias J E et al. Differential oxidative stress responses to pure Microcystin-LR and Microcystincontaining and non-containing cyanobacterial crude extracts on Caco-2 cells. *Toxicol.* 2010; 55: 514–522.

Rooney, M. Capítulo 4: Active Packaging in Polymer Films. En: Rooney ML, director. *Active Food Packaging*. 1ª edición. Londres: editorial Blackie Academic and Professional; 1995. p. 74-110.

Ruiz R, García MP, Lara A, Rubio LA. Garlic derivatives (PTS and PTSO) differently affect the ecology of swine faecal microbiota in vitro. *Vet. Microbiol.* 2010; 144: 110–117.

Seow YX, Yeo CR, Chung HL, Yuk HG. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2014; 54: 625–644.

Singh NP. The comet assay: Reflections on its development, evolution and applications. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2016; 767: 23-30.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 1988; 175: 184–191.

Sinha S, Jothiramajayam M, Ghosh M, Mukherjee A. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.* 2014; 68: 71–77.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 35:206-221.

Ündeger U, Basaran A, Degen GH, Basaran N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chem. Toxicol.* 2009; 47: 2037–2043.

Zegura B, Dobnik D, Niderl MH, Filipic, M. Antioxidant and antigenotoxic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in *Salmonella typhimurium* TA98 and HepG2 cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2011; 32: 296–305.

Zuñiga A. Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Bellaterra, Barcelona: Universitat autònoma de Barcelona; 2009. Tesis doctoral.

Anexo I

Comunicaciones derivadas de este trabajo:

- ✓ **Comunicación oral** que se presentará en Las Jornadas de Toxicología Españolas e Iberoamericanas 2016, organizadas por la Asociación Española de Toxicología (AETOX) y se celebrará en Sevilla en junio de 2016.

REALIZACIÓN DE ENSAYO DE MICRONÚCLEOS Y COMETA PARA LA EVALUACIÓN GENOTÓXICA DEL ORGANOSULFURADO PROPIL PROPANO TIOSULFINATO

Medrano C¹, Mellado-García P¹, Díez-Quijada L¹, Puerto M¹, Prieto A.I¹, Pichardo S¹, Cameán AM¹.

¹Área de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla, Profesor García González n^o2, 41012 Sevilla, España

Los aceites esenciales han sido ampliamente utilizados en la industria alimentaria para intentar aumentar la vida útil de los alimentos. Muchas de estas propiedades son atribuidas a su contenido en compuestos azufrados volátiles presentes en diferentes especies del género *Allium sp.* La genotoxicidad de dicho compuesto tiene que ser comprobada antes de ser incorporados en el envasado como componente activo. En este sentido y siguiendo las recomendaciones de la EFSA para la evaluación de sustancias que entran en contacto con los alimentos, el objetivo de este estudio fue investigar la genotoxicidad de propil propano tiosulfonato (PTS). Para ello, dicho compuesto fue evaluado en células Caco-2 mediante el ensayo cometa (estándar y modificado) durante 24 y 48 horas de exposición (70-280 μM) y sobre las células L5178Y tk^{+/+} mediante el ensayo de micronúcleos (MN) (2.1- 25 μM) con y sin la adición de la fracción microsómica S9. Los resultados obtenidos para el ensayo cometa estándar indicaron que no existen roturas simples en el ADN a 24 horas. Además, el tratamiento posterior con endonucleasa III y formamidopirimidina ADN glicosilasa no mostró diferencias significativas en los grupos tratados respecto al control. Basándonos en los valores del ensayo de MN, el PTS indujo un leve pero significativo aumento de la frecuencia de MN en las células binucleadas, pero sólo a las concentraciones más altas ensayadas en presencia y ausencia de S9. Este trabajo demuestra el bajo riesgo genotóxico del PTS; sin embargo, con el fin de completar estos datos, otros ensayos de mutagenicidad *in vitro* e *in vivo* son necesarios para confirmar la seguridad de este compuesto.

Agradecimientos: los autores agradecen al Ministerio de Innovación y Ciencia del Gobierno de España (AGL201238357C0201) cofinanciados con fondos FEDER, a la Junta de Andalucía (AGR-7252); y al servicio de microscopía del Citius de la Universidad de Sevilla por el apoyo técnico prestado.

Palabras clave: PTS, genotoxicidad, Ensayo de micronúcleos, Ensayo cometa.



- ✓ **Comunicación poster** que se presentará en el 52nd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2016) y se celebrará en Sevilla en septiembre de 2016.

***In vitro* genotoxicity assessment by Micronucleus test and Comet assay using an organosulfur compound.**

*Mellado-García P¹, Díez-Quijada L¹, Medrano C¹, Puerto M¹, Prieto AI¹, Pichardo S¹, Cameán AM^{*1}.*

¹Area of Toxicology. Faculty of Pharmacy. Universidad de Sevilla, Profesor García González n°2, 41012 Sevilla, España

Essential oils (EO) and their main compounds have been extensively used due to their application in the food industry for improving the shelf life of food. Many of these effects are attributed to the thiosulfonates, that are volatile sulfur compounds presented in vegetables as onion (*Allium sativum*) and garlic (*Allium cepa*). Therefore its safety should be confirmed by different toxicity assays. In this sense, according to the recommendation from the EFSA for the genotoxic assessment of substances in food and feed, the aim of this study was to investigate the genotoxicity of propyl propane thiosulfinate (PTS) present in a commercial *Allium* spp. extract, Proallium AP®. It was evaluated in Caco2 cells by the comet assay (standard and modified) (70-280 µM) during 24 and 48 hours of exposure, and on L5178Y tk+/ for micronucleus test (MN) (2.1- 25µM) with and without adding S9. Preliminary results from the standard comet assay revealed no significant increase in DNA strand breakage at 24h; moreover, differences were reported at 280 µM after 48h of exposure. Furthermore, post-treatment with endonuclease III or formamido pyrimidine glycosylase showed no difference between treated and untreated groups. On the other hand, based on the values of the MN test, PTS induced a slight but significant increase in the frequency of MN in binucleated cells, but only at the highest concentration tested in absence and presence of S9 mix. Further in vivo genotoxicity tests are needed to confirm its safety before its use as active additive in food packaging. Acknowledgment: the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2012-38357-C02-01) co-financed by FEDER Funds, and Junta de Andalucía (AGR-7252); and the Microscopy Service of CITIUS from the University of Seville for technical support.

Keywords: PTS, genotoxicity, Micronucleus test, Comet assay

TOPIC: Food Safety/Food Allergies

