

EVALUACIÓN DE LA MUTAGENICIDAD DE EXTRACTOS DE ESPORAS DEL HONGO THECAPHORA FREZII, MEDIANTE EL TEST DE AMES

Mary V.S., Arias S.L., Otaiza S.N., Rubinstein H.R. y Theumer M.G.*

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología CIBICI-CONICET, Dpto de Bioquímica Clínica de Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. *mgtheumer@fcq.unc.edu.ar.

Introducción

El carbón del maní es una de las enfermedades de mayor importancia para el sector agroindustrial manisero argentino. Esta patología es causada por el hongo *Thecaphora frezii*, que se encuentra en los suelos en su forma de resistencia, las teliosporas, las cuales germinan y penetran los ginóforos o “clavos” del maní en el suelo, colonizándolos hasta transformarlos en una masa carbonosa. Además, se produce contaminación superficial de los granos sanos durante el proceso de descapotado de los frutos infectados con *T. frezii*.

En la actualidad se dispone de muy escasa información acerca la toxicología de las teliosporas. En previos estudios específicos de genotoxicidad realizados por nuestro grupo de investigación, se determinó la fragmentación del ADN mediante el ensayo del cometa en células mononucleares de bazo (CMB) obtenidas de ratas Wistar que fueron alimentadas durante 180 días con maní infectado por *T. frezii*. Los resultados mostraron indicios de una posible acción genotóxica producida por un constituyente de las teliosporas sobre las CMB, que debe ser confirmada con estudios de genotoxicidad complementarios que evalúen la acción mutagénica en células procariontas.

Objetivo

Evaluar la mutagenicidad de los extractos de esporas de *T. frezii* en cultivos de bacterias.

Materiales y Métodos

Se prepararon tres extractos de teliosporas con hexano (E-Hex), acetato de etilo (E-AcEt), y metanol (E-MeOH), a los fines de separar los compuestos liposolubles, de polaridad intermedia, y los compuestos más polares, respectivamente. Para esto se utilizaron teliosporas purificadas a partir de maní contaminado, cosechado en la campaña 2013-2014. Los extractos fueron evaporados a sequedad bajo corriente de nitrógeno, redissueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), esterilizados por filtración y conservados a 4 °C hasta su utilización.

La toxicidad de los extractos de teliosporas para las cepas de *Salmonella* se estudió mediante la técnica del agar top inoculando en medios mínimos adicionados de nutrientes.

Test de Ames: Este ensayo de mutagenicidad tiene como objetivo determinar las alteraciones inducidas en el material genético de *Salmonella typhimurium* por distintos agentes físicos o químicos. Dichas alteraciones llevan a mutaciones puntuales o corrimientos en el marco de lectura del ADN que pueden detectarse empleando las cepas TA100 y TA98, respectivamente. Además, debido a que es posible que una sustancia química no manifieste su mutagenicidad en forma directa sino a través de sus metabolitos, se adicionó un sistema de metabolización “in vitro” (S9), obtenido de hígado de rata pretratada con fenobarbital y β-naftoflavona. Los ensayos se realizaron utilizando diluciones decimales de los extractos, y el criterio de positividad se basa en la comparación del número promedio de colonias revertientes que aparecen en las placas tratadas y en las placas testigo o control. Un producto será genotóxico si el número de colonias revertientes se incrementa al aumentar la concentración del mismo en el ensayo y si para alguna de las concentraciones el número promedio de revertientes es por lo menos el doble que el detectado en las placas testigo o control.

En el estudio se utilizó 2-aminofluoreno como control de la actividad microsomal y N-nitroso N'-nitro N-metilguanidina (MNNG) como control de la capacidad de reversión.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad mostraron que las concentraciones evaluadas (100, 10 y 1 µL/placa) de los extractos de teliosporas (E-Hex, E-AcEt y E-MeOH) no produjeron efectos tóxicos en las cepas TA98 y TA100 de *S. typhimurium*, y por lo tanto pueden ser utilizadas en el ensayo de mutagenicidad.

En el Test de Ames, ninguna de las concentraciones estudiadas de los diferentes extractos de teliosporas (0 - µL/placa) incrementaron significativamente el número de colonias revertientes de *S. typhimurium* por placa con (+S9) y sin (-S9) el agregado de la fracción microsomal, respecto al número encontrado en las placas control o testigo. En general, la concentración 100 µL/placa de los distintos extractos en presencia o ausencia del sistema de metabolización indujo una ligera disminución en el número de colonias revertientes de ambas cepas *S. typhimurium* detectadas en cada placa y fue seleccionada como la concentración más alta a testear.

Los resultados obtenidos con el test de Ames se contraponen con los observados anteriormente mediante la técnica del cometa en CMB *in vivo*, por lo tanto es necesario realizar otros estudios complementarios como la evaluación del daño cromosomal y la fragmentación del ADN en células eucariotas *in vitro*, que permitan concluir acerca de la acción genotóxica de las teliosporas.

Muestras	Muestra /placa	Ensayo de toxicidad		Ensayo de mutagenicidad			
		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
		TA98	TA100	-S9	+S9	-S9	+S9
2 Aminofluoreno	10 µg			40 ±2	>1.000	NE	NE
MNNG	15 µg			> 1.000	NE	> 1.000	NE
Control (DMSO)	100 µL	++++	++++	30 ± 2	28 ± 4	127 ±7	139 ±12
E-MeOH	100 µL	+++	+++	27 ± 1	30 ± 2	86 ± 6	141 ± 8
E-AcEt	100 µL	+++	+++	23 ± 3	34 ± 4	90 ± 6	127 ± 6
E-Hex	100 µL	+++	+++	22 ± 2	26 ± 1	109 ± 3	127 ± 14

Los datos se han expresado como número de colonias revertientes por placa con (+S9) y sin (-S9) el agregado de la fracción microsomal. NE: no ensayada.

Conclusiones

Los extractos metanólicos, con acetato de etilo y con hexano, de teliosporas no producen efectos mutagénicos en cultivos de *Salmonella typhimurium*. La presencia de un sistema de metabolización "in vitro" no modifica la toxicidad genética de los extractos estudiados.

Financiación: El presente trabajo fue financiado por Fundación Maní Argentino, PICT 2013-0750 y SECyT-UNC. Mary V.S. y Otaiza S.N. son becarios CONICET. Arias S.L. es becaria SECyT-UNC. Theumer M.G. es investigador de CONICET.