

HALLAZGOS COMPLEMENTARIOS SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DEL AZUL DE METILENO Y SU TOXICIDAD

COMPLEMENTARY FINDINGS ON THE ANTIMALARIAL ACTIVITY AND TOXICITY
OF METHYLENE BLUE.

Giovanny GARAVITO.^{1*}, Stephane BERTANI.², Eric DEHARO.³

Recibido: Noviembre 11 de 2007 Aceptado: Marzo 4 de 2008

RESUMEN

En 1881, Ehrlich reportó el azul de metileno como el primer antimalárico sintético, pero dejó de ser empleado con este propósito; el debe ser reconsiderado pues son necesarias con urgencia nuevas alternativas de bajo costo, en el arsenal de medicamentos antimaláricos. En este trabajo la actividad antimalárica del azul de metileno es evaluada *in vivo* frente a parásitos de malaria murina. Una dosis de 15 mg/kg/día inhibe el 50% del crecimiento eritrocítico parasitario de *Plasmodium berghei* y *P. yoelii nigeriensis*, en tanto que es prácticamente inactivo frente a los estadios hepáticos de *P. yoelii yoelii*. Sobre un cultivo de la línea celular linfoblástica BJAB, el azul de metileno es 20 veces más citotóxico que la cloroquina, no obstante el azul de metileno presenta valores de índice de selectividad del mismo nivel que la cloroquina, frente a varias cepas de *P. falciparum* de diferentes niveles de sensibilidad y provenientes de diferentes lugares geográficos.

Palabras clave: Antipalúdicos – *Plasmodium* – Malaria - Azul de metileno

ABSTRACT

Methylene blue was reported as the first synthetic antimalarial by Ehrlich in 1881. It is currently no longer used for that purpose but it should be reconsidered since new economic alternatives are urgently needed in the arsenal of antimalarial drugs. The antimalarial activity of methylene blue is investigated here *in vivo* against rodent malaria parasites. 15 mg/kg daily dose of methylene blue inhibits 50% of the erythrocytic parasite growth of *Plasmodium berghei* and *P. yoelii nigeriensis*, while on hepatic stages of *P. yoelii yoelii* is almost inactive. In cell culture experiments with the lymphoblast-like BJAB cells line, it is 20 times more cytotoxic than chloroquine. Nevertheless, methylene blue shows a similar selectivity index as chloroquine against strains of different level of sensitivity of *P. falciparum* original from different geographical areas.

Keywords: Antimalarials, *Plasmodium*, Malaria, Methylene blue.

1 Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (DFUNC), Carrera 30 45-03, Bogotá D.C. Colombia

2 Laboratoire de Parasitologie Comparée et Modèles Expérimentaux (USM0307) Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), 61, rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France;

3 UMR-152 IRD – Université Toulouse 3, Paul Sabatier, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 31062 Toulouse cedex 9, France

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: ggaravitoc@unal.edu.co

INTRODUCTION

About 3 billion people live in endemic areas where malaria is one of the major health problems. 500 million cases are registered annually, leading to the death of 1,5 million people, most of them children (1). Control measures are largely based on vector eradication programs and clinical treatment, but their efficacy is dramatically reduced by increasing the resistance of vector and parasite. New drugs at low cost are urgently needed. Unfortunately, although the World Health Organization negotiates with pharmaceutical companies in order to reduce the prices of antimalarial drugs, these remain unattainable for most of the affected populations (2). Therefore new and affordable treatments are a major priority for affected countries. In this context, Methylene blue (MB), which has been proven to be active (3, 4, 5) and inexpensive, could be a suitable alternative.

Methylene blue is the oldest and cheapest synthetic drug ever used in antimalarial therapy (Figure 1). In 1891 Guttman and Ehrlich published the first report of its antimalarial activity (4). Two years later, Ferreira (5) recommended the use of MB by oral route in children with malaria. At the beginning of the 20th century, MB served as structural starting point for the development of 8-aminoquinolines (3, 6, 7) and disappeared thereafter from the antimalarial arsenal. Afterwards, few works on the antimalarial properties of MB have been reported because it was thought to enhance haemolysis in glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD) deficiency (8) and could stain the tissues of MB-treated people (9). Recently Mandi *et al.* (10) and Meissner *et al.* (11) showed that G6PD deficiency is not committed by the use of MB for malaria treatment, even in class III G6PD deficient young children. These observations renewed the interest of MB as a cost-effective alternative in the treatment of malaria.

This report presents data on the *in vivo* antimalarial activity of MB against blood and liver forms of rodent malaria parasites and the *in vitro* cytotoxicity on BJAB cells, thereby completing other studies published by our research team. (12, 13).

MATERIALS AND METHODS

In vivo antimalarial activity

In vivo studies were conducted according to the French and Colombian legislations on laboratory

animal use and care (N°2001-464 and N° 008430, respectively).

Effect on the intraerythrocytic cycle

The classical 4-day suppressive test (14) was conducted with *P. yoelii nigeriensis* or *P. berghei* ANKA. Swiss female mice (*Bioterio DFUNC* and Charles River France) weighing 20 ± 2 g, were infected with 10^7 parasitized cells in 0,9% saline solution (day 0). Batches of five mice were orally treated with MB at doses of 50, 25, 12.5 and 6.35 mg/Kg/day, two hours after infection and at the same hour during 4 consecutive days. A control group received 0,9% saline solution while a reference group was administered chloroquine diphosphate (CQ) at 3 mg/kg/day (oral route). The survival of mice was checked daily and the percentage of parasitized erythrocytes was determined on day 4, by Giemsa-stained thin blood smears from peripheral blood. The percentage of inhibition of parasitaemia was calculated, and the Effective Dose 50 (ED₅₀) was determined with a linear least square regression analysis.

Effect on the hepatic stage

The *in vivo* activity on the pre-erythrocytic stage was determined according to Peters and Robinson (15): Batches of three mice were intravenously inoculated with 10^8 sporozoites of *P. yoelii yoelii* (17X strain; clone 1,1) in 0,9% saline. The treatment (around twice the *in vivo* determined ED₅₀) was given to mice by oral route, 2 h after inoculation; Primaquine at 60 mg/kg was administered to a reference group. The suppressive effect was estimated on 48, 72, 96, 120, 144, and 168 hours after inoculation by Giemsa-stained thin blood smears inspection. Animals which showing no signs of infection on day 14 were considered as cured.

In vitro studies on BJAB cells

Culture of lymphoblast-like line BJAB cells was carried out on 2 mM L-glutamine-enriched RPMI supplemented with 1ml/L of 10mg/ml gentamycin and 10% heat-inactivated foetal bovine serum at 37°C in 5% CO₂ environment. BJAB cells at 2×10^5 were exposed to serial dilutions of methylene blue for 24 h in culture conditions (test in triplicate). 24 h after initial cell-plating, the cell growth was estimated by [³H]-thymidine incorporation (2,5 µCi/ml in culture medium) for 16 h. Incorporated [³H]-thymidine was then determined with a beta-counter (1450-Microbeta Trilux, Wallac-

PerkinElmer). The CC_{50} (Cytotoxic Concentration 50 i.e. concentration that kills 50% of cultured cells), was determined with a linear least square regression analysis. A control of viability was carried out in parallel.

Reagents

All chemicals reagents were provided by Sigma-Aldrich. Radiolabels were provided by PerkinElmer (Courtaboeuf, France).

RESULTS AND DISCUSSION

Against erythrocytic forms in rodent malaria parasites, MB was more active on *P. berghei* than on *P. yoelii* (ED_{50} of $12,8 \pm 8$ mg/kg/day and $19,4 \pm 4$ mg/kg/day, respectively) with no signs of acute toxicity after a 4 days treatment (Table 1, Figure 2). MB antimalarial activities were ten times lower than those observed with CQ, that showed ED_{50} of 0,53 and 1,21 mg/kg/day against *P. berghei* and *P. yoelii nigeriensis*, respectively. A previous study reported that MB had ED_{50} of 11,03 and 1,21 mg/kg/day against *P. yoelii nigeriensis* and *P. vinckei petteri*, respectively (3). The low ED_{50} found with *P. vinckei* can be explained by the degree of synchronicity of the infection, being *P. vinckei* more sensitive to antimalarial agents than other rodent malaria species (16). On the contrary, any activity against hepatic stages of *P. yoelii yoelii* (pre-erythrocytic stage) with a dose of up to 100 mg/kg was not observed (figure 3). This was the expected result since the main action of MB is based on the inhibition of heme-GSH degradation (13), a process not occurring during the pre-erythrocytic cycle of *Plasmodium yoelii*.

In a previous paper was shown that MB was very active *in vitro* against laboratory-reared strains from various geographic regions (concentration of MB required to inhibit 50% of the parasite growth IC_{50} : 5 nM) and that late rings and early trophozoites were the most sensitive stages; while early rings, late trophozoites and schizonts were less sensitive (12). Furthermore, combination of MB with commercially available antimalarials resulted in: antagonism with amodiaquine; antagonism/additivity with atovaquone, doxycycline, pyrimethamine; additivity/lack interaction with artemether, chloroquine, mefloquine, primaquine; and synergy with quinine (12). The model described in this study (on BJBAB cells) showed MB with CC_{50} of 577 ± 12 nM (Fig-

ure 4) while doxorubicin and CQ, used as controls, had CC_{50} of 416 ± 8 and 11563 ± 1647 nM respectively. Thus, MB was as toxic against BJBAB cells as doxorubicin, and almost 20 times more toxic than CQ. Results were surprising since previous studies reported that MB had CC_{50} s of 1610 and 26700 nM on KB and J111 cells (3, 17). Nevertheless, Kirszberg *et al.* (18) showed that MB was more toxic on leukaemia cells, than on normal cells. This could explain our results, because BJBAB cells are derived from lymphoblast-like lines. A previous study measured the IC_{50} on *P. falciparum* chloroquine sensitive (F32, HB3) and resistant strains (FcB1 and FcM29) (12). With the data on BJBAB cells found in this study and those previously described, the Selectivity Index (SI) was calculated. SI is defined as the ratio between concentration which produces a cytotoxic effect (CC_{50}) and the antimalarial concentration which causes the desired effects (IC_{50}) (Table 1). The values of SI for CQ were higher than those obtained with MB on sensitive strains (on HB3 the CC_{50} was 321 times higher than the CI_{50}). On the contrary, MB had highest SI values on resistant strains (Figure 5).

Table 1. General Results.

In vivo activity	MB		CQ	
Effect on the intraerythrocytic cycle	ED_{50} (mg/kg/day)		ED_{50} (mg/kg/day)	
<i>P. berghei</i>	12,8		0,53	
<i>P. yoelii nigeriensis</i>	19,4		1,21	
Effect on the hepatic stage				
<i>P. yoelii yoelii</i>	Inactive		Not tested	
In vitro activity	CI50 (nM)*	SI	CI50 (nM)*	SI
<i>P. falciparum</i> F32	5	115	70	165
<i>P. falciparum</i> HB3	4	144	36	321
<i>P. falciparum</i> FcB1	8	72	186	62
<i>P. falciparum</i> FCM29	5	115	600	19
In vitro citotoxicity	CC50 (nM)		CC50 (nM)	
BJBAB cells	577		11563	

* Previously reported data (12)

These results complete those obtained in previous works (12, 13) and confirm the interest of MB as an ancient effective molecule that could be integrated into a new low cost antimalarial therapy, after confirmation of the benefit/risk ratio by further clinical trials.

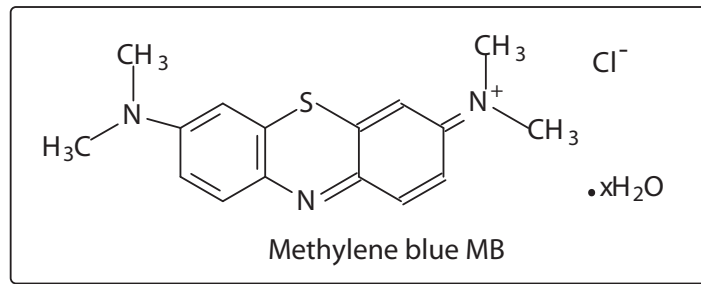


Figure 1. Methylene blue: 3,7-Bis(dimethylamino)phenothiazin-5-ium chloride; $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot xH_2O$; m.w. 319.85 (anhydrous base).

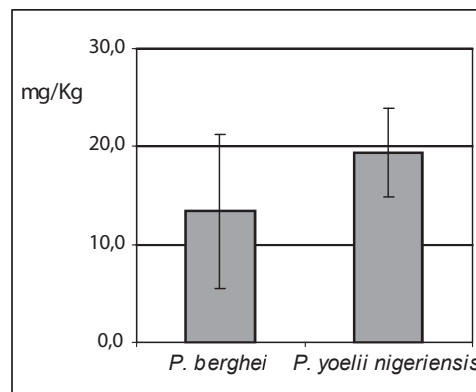


Figure 2. Effective Dose 50 (mg/kg/day) of MB on *P. berghei* ANKA and *P. yoelii nigeriensis* rodent malaria.

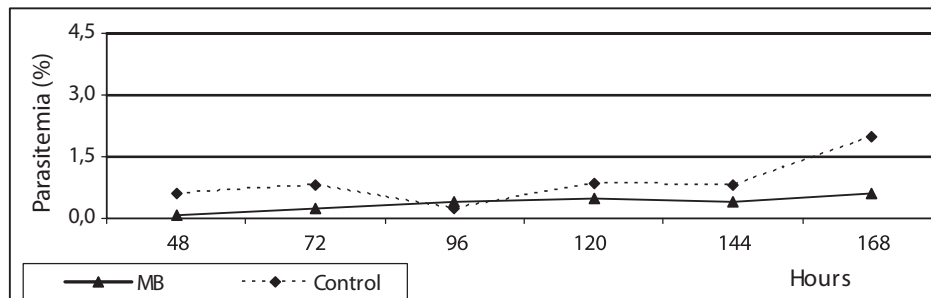


Figure 3. Effect of MB (100 mg/Kg) on hepatic stage of *P. yoelii yoelii* infected mice.

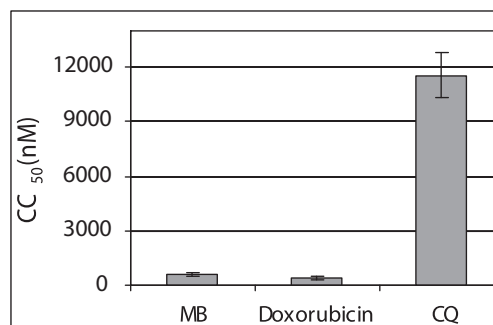


Figure 4. Cytotoxic Concentration 50 (CC₅₀) of methylene blue (MB), doxorubicin and chloroquine (CQ) on BJBAB cells.

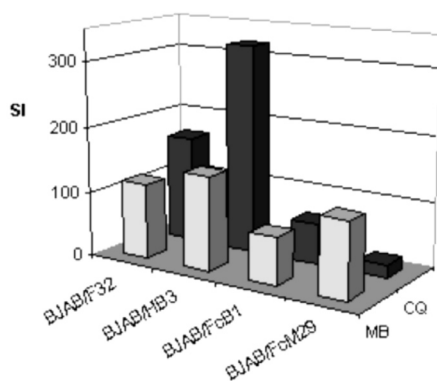


Figure 5. Selectivity Index of MB and CQ on different *P. falciparum* strains (chloroquine sensitive strains: F32, HB3 chloroquine resistant strains: FcB1, FcM29) in culture.

ACKNOWLEDGEMENTS

Giovanni Garavito was awarded a PhD fellowship supported by the Programme Al β n, the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America (Scholarship No. E04D039384CO).

Thanks to Landau I. (*Museum National d' Histoire Naturelle, France*), Ginsburg H. (Hebrew University of Jerusalem, Israel), and Perea-Sasiaín J. (*Universidad Nacional de Colombia, Colombia*), for these appreciated illuminating discussions. We also wish to thank the members of the *Centre National de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme (CNRCP) aux Antilles – Guyane* of the *Institut Pasteur de la Guyane* for their technical support.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Pan American Health Organization (PAHO). Regional Strategic Plan for Malaria in the Americas 2006–2010. Washington (DC): Publications of the PAHO; 2006.
- Mutabingwa TK. Artemisinin-based combination therapies (ACTs): Best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy! *Acta Trop* 2005;95:305–15.
- Atamna H, Krugliak M, Shalmiev G, Deharo E, Pescarmona G, Ginsburg H. Mode of antimalarial effect of methylene blue and some of its analogues on *Plasmodium falciparum* in culture and their inhibition of *P. vinckei petteri* and *P. yoelii nigeriensis* in vivo. *Biochem Pharmacol* 1996;51:693–700.
- Guttman P, Ehrlich P. Ueber die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berlin Klin Wochenschr* 1891;28:953–6.
- Ferreira. Treatment of malaria with methylene blue. *Lancet* 1893;821–2.
- Schulemann W. Synthetic anti-malarial preparations. *Proc R Soc Med* 1932;25:897–905.
- Wainwright M, Amaral J. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. *Trop Med Int Health* 2005;10:501–11.
- Schirmer RH, Coulibaly B, Stich A, Scheiwein M, Merkle H, Eubel J, et al. Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Rep* 2003;8:272–5.
- Wainwright M, Amaral J. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. *Trop Med Int Health* 2005;10:501–11.
- Mandi G, Witte S, Meissner P, Coulibaly B, Mansmann U, Rengelshausen J, et al. Safety of the combination of chloroquine and methylene blue in healthy adult men with G6PD deficiency from rural Burkina Faso. *Trop Med Int Health* 2005;10:32–8.
- Meissner PE, Mandi G, Witte S, Coulibaly B, Mansmann U, Rengelshausen J, et al. Safety of the methylene blue plus chloroquine combination in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in young children of Burkina Faso. *Malar J* 2005;4:45–54.
- Garavito G, Bertani S, Rincon J, Maurel S, Monje MC, Landau I, et al. Blood schizontocidal activity of methylene blue in combination with antimalarials against *Plasmodium falciparum*. *Parasite* 2007;14:135–40.
- Garavito G, Monje MC, Maurel S, Valentin A, Nepveu F, Deharo E. A non-radiolabeled heme–GSH interaction test for the screening of antimalarial compounds. *Exp Parasitol* 2007;116:311–3.
- Peters W. Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria. London: Academic Press;1970.
- Peters W, Robinson BL. Handbook of animal models of infection. New York: Academic Press;1999.
- Landau I, Gautret P. Malaria: Parasite Biology Pathogenesis and Protection. Washington (DC): ASM Press;1998.
- Vennerstrom JL, Makler MT, Angerhofer CK, Williams JA. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2671–7.
- Kirszberg C, Rumjanek VM, Capella MA. Methylene blue is more toxic to erythroleukemic cells than to normal peripheral blood mononuclear cells: a possible use in chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56:659–65.

BAJA GENOTOXICIDAD DE EXTRACTO ORGÁNICO DE AGUA DE MAR DE COVEÑAS (SUCRE, COLOMBIA)

LOW GENOTOXICITY OF ORGANIC SEA WATER EXTRACTS FROM COVEÑAS (SUCRE, COLOMBIA)

Wilmer SOLER T.^{1*}, Nelly D. VELÁSQUEZ E.², Juan P. SOLER A.³

Recibido: Noviembre 4 de 2007 Aceptado: Abril 8 de 2008

RESUMEN

El agua de mar natural se utiliza en algunos países iberoamericanos como elemento nutritivo y terapéutico, y en los países desarrollados se usa como complemento nutricional de forma refinada y comercial. Los estudios de ingesta de agua de mar tratada muestran que no hay toxicidad; sin embargo, el uso de agua cercana a las playas representa un riesgo para la salud debido a la polución de los centros urbanos. En este estudio se emplearon linfocitos humanos y la electroforesis de células individuales (ensayo cometa), para comparar la genotoxicidad de un extracto orgánico de agua de mar tomada de la orilla respecto a muestras obtenidas mar adentro en el pequeño municipio de Coveñas-Sucre, Colombia, que vierte sus aguas domésticas directamente al mar o a pozos sépticos. Se observa genotoxicidad a 37 °C pero no a 4 °C, este efecto es dependiente de la concentración del extracto ($p < 0.0001$), del sitio de muestreo ($p = 0.0026$) y de la interacción de estos dos factores ($p = 0.0001$). La muestra orgánica que presenta menor genotoxicidad es la de mar adentro. La citotoxicidad del extracto orgánico de agua de mar es muy baja comparada con la obtenida de muestras del acueducto de Medellín (Colombia).

Palabras clave: agua de mar, extracto orgánico, genotoxicidad, citotoxicidad, ensayo cometa.

ABSTRACT

Natural sea water is used as a nutritive and therapeutic element in Ibero-American countries, and commercial, refined sea water as a nutritional complement in developed countries. Although treated sea water has no toxicity, as demonstrated by previous sea water ingestion studies, consumption of near-shore seawater poses a health risk due to pollution of nearby urban centers. In this study, human lymphocytes and single cell gel electrophoresis (comet assay) were used to compare the genotoxicity of an organic sea water extract taken near shore with that of sea water samples taken offshore in the small municipality of Coveñas (Sucre, Colombian), where domestic waters are flushed directly into the sea or into septic tanks. Genotoxicity was observed at 37°C, but not at 4°C. This effect depends on the concentration of extract ($p < 0.0001$), the sampling site ($p = 0.0026$), and the interaction of these two factors ($p = 0.0001$). The lowest genotoxicity was observed in offshore organic samples. The cytotoxicity of sea water organic extracts was very low compared to that of the freshwater samples from the water supply system in Medellín (Colombia).

Keywords: sea water, organic extract, genotoxicity, cytotoxicity, comet assay.

1. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. A.A. 1226, Medellín, Colombia
2. Instituto de Biología. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Antioquia. A.A. 1226, Medellín, Colombia.
3. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. A.A. 1226, Medellín Colombia.
* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: wsoler@udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

En la cultura occidental, las propiedades terapéuticas del agua de mar (AM) se conocen desde sus inicios (1). Las investigaciones científicas se iniciaron hace cerca de 100 años, con los trabajos del fisiólogo francés Rene Quinton, quien demostró la similitud entre el AM y los líquidos fisiológicos de diversos organismos, incluyendo el ser humano, por el contenido de minerales y oligoelementos. Con sus estudios se iniciaron los dispensarios marinos, como lugares donde se hacían aplicaciones subcutáneas para el control de graves epidemias infecciosas y de desnutrición, que afectaba particularmente a la población infantil (2, 3). En décadas recientes ha renacido el interés por las propiedades terapéuticas y nutricionales del AM, a tal punto que hoy se consigue una amplia variedad de productos comerciales de AM refinada o filtrada, como complemento nutricional, por su alto contenido de minerales como Mg y Ca y cerca de 95 oligoelementos en cantidades traza (4). En el campo médico son interesantes los estudios recientes realizados en humanos sobre el efecto de la ingesta de AM en problemas de piel (5), rinitis alérgica (6); en animales se ha observado prevención de la aterosclerosis e hiperlipidemias (7, 8). Uno de los aspectos que llama la atención del AM es su acción inespecífica en diversas patologías, lo que se atribuye al contenido de minerales y oligoelementos que afectan positivamente todos los sistemas del organismo y podría ayudar a resolver los mayores problemas de salud de los países occidentales, por el estilo de vida, en particular la dieta refinada, pobre en algunos minerales como Mg, Ca y micronutrientes. Por otra parte, se ha mostrado la ausencia de toxicidad en animales que ingirieron AM refinada de profundidad (mayor de 200 m) y de superficie (8, 9). En una de nuestras investigaciones mostramos la ausencia de genotoxicidad del AM natural sobre linfocitos humanos incubados por una hora y la estabilidad de los eritrocitos frente a un periodo de incubación de tres horas (10).

En Colombia y otros países de Iberoamérica se viene utilizando el AM natural como elemento terapéutico y nutricional. Se obtiene de las orillas en lugares limpios y poco habitados, o de mar adentro a varios kilómetros de la playa, ya sea de la superficie ó a 10-20 m de profundidad. En Medellín (Colombia) y municipios cercanos se consume AM

obtenida en la isla de Barú y Coveñas, de la costa Caribe colombiana. Sin embargo, existen riesgos de contaminación en Coveñas por las posibles fugas de petróleo, dado que ahí funciona un puerto petrolero, y por las aguas vertidas de las zonas urbanas, que se suman a la falta de alcantarillado (11).

Dada la baja concentración del material orgánico del agua de consumo humano, incluyendo el AM, se ha utilizado la extracción por cromatografía y luego la incubación del material concentrado en las pruebas de toxicidad celular. Esta técnica ha sido empleada en Colombia y otros países para detectar la presencia de sustancias genotóxicas en aguas de río y de mar (12, 13, 14,15, 16). En varios de estos estudios y en el presente trabajo se utilizó la electroforesis de células individuales o Ensayo Cometa como indicador de genotoxicidad, ya que detecta rupturas de cadena sencilla y/o reparación del ADN en cualquier población de células eucarióticas (19). Además, es una metodología rápida y sensible, ampliamente utilizada en el biomonitoreo y pruebas de genotoxicidad de productos naturales, sustancias contaminantes y fármacos (17, 18). Con el fin de determinar *in vitro* la bioseguridad de la ingesta del AM de Coveñas, el material orgánico contenido en tres muestras de AM se concentró mediante cromatografía de columna y resinas XAD 2/7, y luego se compararon sus respectivas citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras y procesamiento. Se tomaron tres muestras de AM de 100 L cada una, en la zona de Coveñas, frente al Centro Colombiano de Talasoterapia a distancias de 10 m, 5 y 8 km de la línea costera. Para las dos últimas, a una profundidad de 10 m utilizando una bomba de succión o “achique” de material plástico especial para esta clase de agua. Dos de las muestras (10 m y 5 km) se colectaron cerca de las 10 a.m. del mismo día en el mes de noviembre, después de un día de lluvia, y a los 15 días se colectó la tercera muestra (8 km) con el fin de evitar algún efecto del agua lluvia. Las muestras se depositaron en recipientes plásticos de polietileno de alta densidad (HDPE) y luego se transportaron toda la noche por vía terrestre a temperatura ambiente hasta el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, para

su procesamiento inmediato. Se les midió el pH, la salinidad y la presencia de coliformes totales y fecales, como indicador de contaminación microbológica terrestre.

Concentración del extracto orgánico (EO). Se concentró el EO a partir de 100 L de cada una de las tres muestras de AM, dado que los compuestos genotóxicos pueden estar a muy bajas concentraciones. La adsorción del EO no volátil contenido en estas muestras de agua se hizo por el método de adsorción en resinas styrene divinylbenceno amberlita XAD-2 y XAD-7 no polares, de acuerdo con los procedimientos descritos (20, 21), con algunas modificaciones. Cada muestra se pasó por una columna que contenía 100 g de resina XAD-2 y 100 g de XAD-7 a una velocidad aproximada de 15 mL/min. La elución se realizó con 300 mL de acetona. El volumen del eluyente se retiró por rota evaporación a baja presión, hasta eliminar la acetona, y la porción acuosa se liofilizó. Se pesaron los extractos liofilizados, se diluyeron en DMSO al 50% y se guardaron a 4°C para realizar posteriores pruebas de viabilidad y genotoxicidad.

Prueba de viabilidad (efecto citotóxico): Mediante el método de centrifugación en gradiente de Ficoll, se aislaron linfocitos humanos a partir de sangre total tratada con EDTA de un donante no consumidor de AM (para lo cual se obtuvo el consentimiento informado). Después del aislamiento, se evaluó la viabilidad por el método de exclusión del colorante azul tripano (0.2 %). Luego se incubaron a tres diluciones del EO del AM, a 4°C y a 37°C por una hora, después de lo cual, nuevamente se evaluó la viabilidad. Con este procedimiento se encontró la concentración más alta, a la cual no se afectó la viabilidad.

Prueba de genotoxicidad (ensayo cometa): Para determinar el daño en el ADN, se siguió la técnica SCGE o ensayo cometa, según el protocolo descrito (19). Se utilizó H₂O₂ (150 μM) como control positivo y buffer fosfato salino (PBS) como control negativo. Se prepararon tres diluciones del EO, a partir de la más alta, que no presentó alteración en la viabilidad celular, con diluciones sucesivas a la mitad y por duplicado. Después del tratamiento por una hora de los linfocitos con las diluciones del concentrado orgánico de AM, se tomaron 10 μL de esta suspensión y se mezclaron con 75 μL

de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) a 37°C y se colocaron en un portaobjetos el cual ha sido previamente recubierto con una capa de agarosa de punto de fusión normal (NMA). Luego las láminas se sumergieron en una solución de lisis (NaCl 2.5 M, Na₂EDTA 100mM, Tris 10 mM, triton X-100 1%, DMSO 10%) a 4°C por una hora, después se llevaron a un buffer de electroforesis a pH 13 (Na₂EDTA 1 mM, NaOH 300mM) a 4°C por 30 minutos, para permitir desenrollamiento del ADN y expresión de sitios lábiles a álcalis. Luego se realizó la electroforesis durante 30 minutos a 25 voltios y 300mA. Después, las láminas se lavaron con buffer neutralizante (tris 0.4 M pH 7.5) por 15 minutos. Finalmente las láminas se colorearon con 50 μL de bromuro de etidio al 2% y se examinaron en un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm usando una magnificación de 40X. Para cada dilución del concentrado orgánico de AM, se analizaron al menos 50 células, usando un programa de computador de acceso público (22), especial para el ensayo cometa, que permite medir la longitud de la migración y la intensidad de la fluorescencia, como Momento de Olive (MO), que nos da la relación entre la distancia desde el centro de gravedad de la cabeza (CGH) al centro de gravedad de la cola (CGT) y el porcentaje de DNA en la cola % DNAT:

$$MO = \frac{CGT - CGH}{DNAT}$$

Para el análisis de los datos, se realizó un análisis de varianzas, con dos factores: la concentración y el lugar de muestreo. Se consideró un nivel de significancia $p < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico STATISTICA 7.0 (Stat Soft, Inc. Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS

Las características fisicoquímicas de las muestras de AM recogidas a distancias media y adentro son similares respecto al pH y la presencia de coliformes; sin embargo, difieren en salinidad, con menor porcentaje para la muestra de media distancia y muy cercana al valor de la muestra de la orilla (Véase tabla 1).

Tabla 1. Características fisicoquímicas y microbiológicas de tres muestras de agua de mar de Coveñas-Sucre, Colombia.

Muestras	pH	Salinidad (%)	Conductividad (msiemens/cm)	Coliformes (UFC**/100 mL)	
				Totales	Fecales
Orilla (10 m)*	7.5	33.0	50.5	42	10
Medio (5 km)	8.0	32.6	50.0	30	0
Adentro (8 km)	8.0	35.6	57.7	30	0

* Distancia de colección desde la línea de playa. A los 5 y 8 km se obtuvo a 10 m. de profundidad.

** UFC: unidades formadoras de colonias

El rendimiento de la obtención del EO de AM de agua del acueducto de la ciudad de Medellín por cromatografía de amberlita XAD 2/7, fue (Véase tabla 2). 10 veces mayor respecto a lo obtenido a partir

Tabla 2. Características físicas del extracto orgánico extraído de tres muestras de agua de mar de Coveñas-Sucre, Colombia.

Muestras	Peso (mg/100 L de AM**)	Color
Orilla (10 m)*	957	Marrón claro
Medio (5 km)	966	Marrón oscuro
Adentro (8 km)	970	Blanco
Agua acueducto sin cloro	79	Blanco
Agua acueducto con cloro	38	Blanco

* Distancia de colección desde la línea de playa, a los 5 y 8 km se obtuvo a 10 m de profundidad

** AM: agua de mar

La viabilidad de las células incubadas en EO el extracto del agua del acueducto, clorada y sin AM bajó del 90% cuando se utilizó una concentración de 5 mg/mL, con similar resultado clorar, bajó del 90% cuando se utilizó una concentración de 0.27 mg/mL (Véase tabla 3). para las tres muestras de AM, mientras que para

Tabla 3. Viabilidad de los linfocitos humanos expuestos a extracto orgánico de agua de mar (Coveñas-Sucre, Colombia) y agua de acueducto (Medellín).

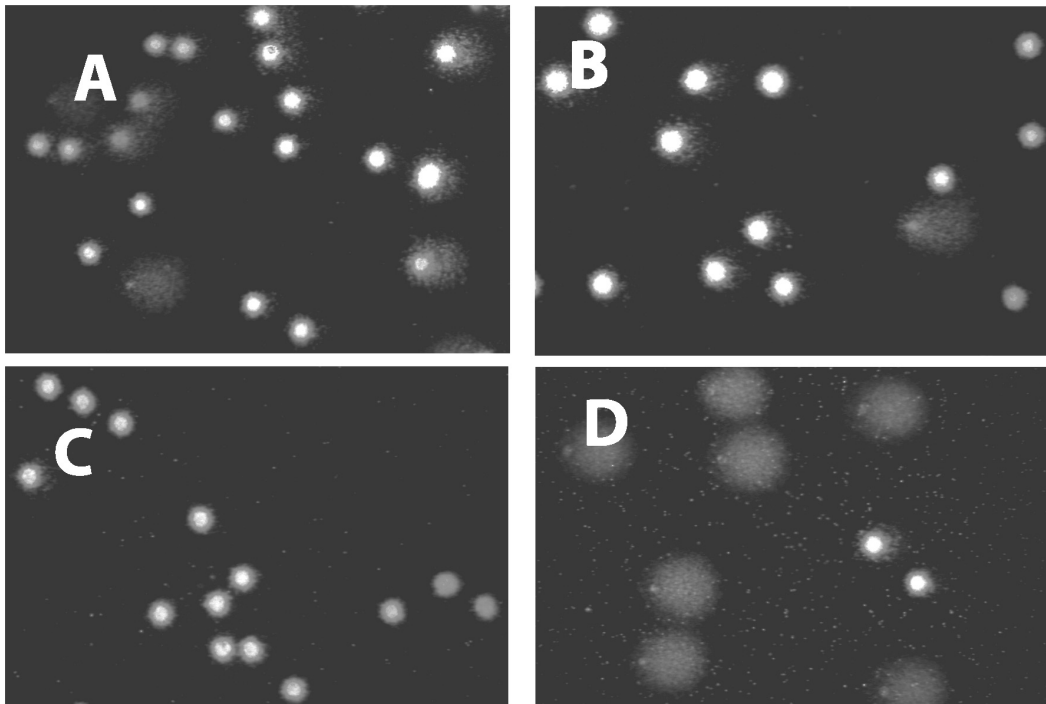
Muestras	Viabilidad en dos concentraciones de EO* (%)	
Agua de mar	3.3 mg/mL	5.0 mg/mL
Orilla	88	80
Mitad	93	95
Adentro	97	73
	Viabilidad en dos concentraciones de EO (%)	
Agua acueducto	0.17 mg/mL	0.27 mg/mL
Sin cloro	92	84
Con cloro	92	89

*EO: extracto orgánico. La viabilidad de los linfocitos tratados con PBS (control negativo) y con H₂O₂ (control positivo) fue mayor del 95%.

Cuando los linfocitos se trataron con EO de AM mo extracto e iguales concentraciones, pero a una temperatura de 37°C sí ocasionó daño genotóxico (Véase figura 1). Este efecto fue dependiente de la concentración del extracto orgánico ($p < 0.0001$),

del sitio de recogida ($p=0.0026$) y con efecto significativo de la interacción de estos dos factores

($p=0.0001$), según el análisis de varianzas del MO transformado logarítmicamente.

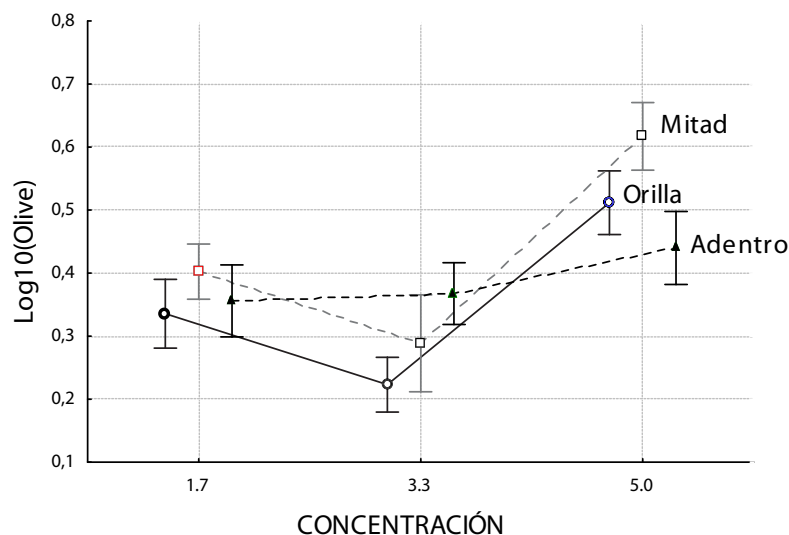


A= mitad 5.0 mg/mL, B= adentro 5.0 mg/mL, C= control negativo, D= control positivo

Figura 1. Electroforesis de linfocitos humanos después de incubación a 37 °C en extracto orgánico de agua de mar de Coveñas-Sucre, Colombia (ensayo cometa).

El mayor daño del ADN se presentó a la concentración más alta de EO (5.0 mg/mL). La muestra que presentó el menor daño a esta concentración fue la de mar adentro, que además presentó

la menor variación del promedio del MO entre las tres concentraciones de EO utilizadas en la incubación (Véase figura 2).



Sitio recogida $p=0.0026$, Concentración $p=0.0000$, Interacción $p=0.0001$. Las barras verticales indican el intervalo de confianza del 95 %. El número de células utilizado a las concentraciones de 1.7, 3.3 y 5.0 mg/mL fue respectivamente: orilla: 254, mitad: 212 y adentro: 206

Figura 2. Análisis de varianzas de medias del Momento de Olive de linfocitos humanos incubados en tres extractos orgánicos de agua de mar de Coveñas-Sucre, Colombia en función de la concentración, a 37 °C.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El alto contenido de EO obtenido del AM, comparado con el agua de acueducto, la califican como un medio orgánico (3, 23). La fracción de este material, separado por cromatografía de resinas XAD, corresponde a moléculas sencillas y macromoléculas derivadas del carbono de carácter hidrofóbico, posiblemente carbohidratos y proteínas no identificadas plenamente que hacen parte del material orgánico disuelto en el AM y son productos metabólicos de los microorganismos marinos (23, 24). Se conoce que buena parte de estas moléculas se encuentran en forma de complejos con elementos traza y minerales tan abundantes como Ca y Mg; por ejemplo, se ha calculado que más del 99% del Cu contenido en el AM está en forma de complejos orgánicos (25). El desarrollo de la química bioinorgánica (26) ha mostrado la presencia de fuertes complejos orgánico-metálicos en los sistemas biológicos, algunos metales como Fe, Cu, Zn, entre otros, ocupan centros activos en enzimas y otras proteínas.

Las concentraciones del EO de AM utilizadas en los experimentos de viabilidad y genotoxicidad fueron muy altas, en particular si se considera que en la prueba de viabilidad de los linfocitos incubados con este extracto se observó daño de membrana a una concentración 20 veces mayor que la obtenida con EO de agua potable del acueducto de Medellín. En los linfocitos humanos incubados a 4°C con el EO de AM no se observó genotoxicidad significativa, lo que permite sugerir baja toxicidad de este material. Los resultados obtenidos a 37°C pueden originarse de un proceso de reparación de las modificaciones ocasionadas por el material orgánico, proceso que se inhibe cuando la incubación se realiza a 4°C (19, 27). También hay que considerar que la fragmentación del ADN observada a 37°C puede explicarse porque a mayor temperatura habrá mayor transporte y reactividad entre las sustancias genotóxicas y las macromoléculas de las células.

El efecto de dosis para el EO de las muestras de AM no fue lineal. La muestra que presentó el menor MO, a la concentración más alta de 5 mg/mL fue la de mar adentro (8 km), y la mayor fue para la muestra de la mitad (5 km). Se puede explicar este resultado por la presencia de corrientes marinas, que se pudieron observar a simple vista; por el color marrón de las corrientes de aguas lluvias cerca de la playa, color que se atribuye a la presencia de

material orgánico disuelto en las corrientes de aguas de procedencia terrestre (28). El color marrón del EO de la muestra de AM obtenida a 5 km indica la presencia de aguas lluvias mezcladas con AM. La presencia de coliformes fecales en la muestra de la orilla, aunque en baja cantidad, se explica por la ausencia de alcantarillado y el uso de pozos sépticos en la población de Coveñas. En consecuencia, es recomendable recoger el AM para consumo humano en otros lugares menos poblados o, en su defecto, aplicar algún tratamiento para desinfectarla.

Con los resultados de este estudio *in vitro* podemos concluir que este EO del AM ofrece bioseguridad para el consumo humano respecto al efecto genotóxico, de manera particular si es agua obtenida en las condiciones que aseguren su estado natural, libre de mezclas con aguas lluvias y servidas que arrastran sedimentos y microorganismos terrestres. Los efectos de la polución orgánica dependen principalmente de la cantidad de contaminantes introducidos, pero modificados por factores tales como la configuración del fondo, las mareas y las corrientes, que influyen sobre la difusión de los contaminantes, y en especial, por el catabolismo que realizan los microorganismos marinos sobre este componente orgánico (29)

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CODI (Universidad de Antioquia) por la financiación de este trabajo, a la Fundación española Aquamaris y al Centro Colombiano de Talasoterapia por el apoyo logístico; al profesor Benjamín Alberto Rojano, de la Universidad Nacional-sede Medellín, por su apoyo técnico, y al profesor Abel Díaz Cadavid del Centro de Investigaciones Médicas de la Universidad de Antioquia por la asesoría estadística.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diógenes L. Vidas de los más ilustres filósofos griegos. Barcelona: Orbis SA; 1985.
2. Mahé A. El plasma de Quinton. El agua de mar nuestro medio interno. Barcelona: Icaria; 1999.
3. Quinton R. L'eau de mer milieu organique. Constance du milieu marin originel comme milieu vital des cellules, à travers la série animale. 39ª ed. Paris: Encre; 1995 [1904].
4. Nozaki Y. A fresh look at element distribution in the North Pacific. [Sitio en internet]. Disponible en: http://www.agu.org/eos_elec/97025e.html. Consultado: 17 de septiembre de 2007.
5. Kimata H, Tai H, Nakagawa K, Yokoyama Y, Nakajima H, Ikegami Y. Improvement of skin symptoms and mineral imbalance by drinking deep sea water in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS). Acta Médica 2002; 45(2):83-84.

6. Kimata H, Tai H, Nakajima H. Reduction of allergic skin responses and serum allergen-specific IgE and IgE-inducing cytokines by drinking deep-sea water in patients with allergic rhinitis. *Otorhinolaryngol Nova* 2001; 11(6):302-303.
7. Yoshioka S, Hamada A, Cui T, Yokota J, Yamamoto S, Kusunose M, et al. **Pharmacological activity of deep-sea water: examination of hyperlipemia prevention and medical treatment effect.** *Biol Pharm Bull* 2003; 26(11):1552-1559.
8. Miyamura M, Yoshioka S, Hamada A, Takuma D, Yokota J, Kusunose M, et al. Difference between deep seawater and surface seawater in the preventive effect of atherosclerosis. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(11):1784-1787.
9. Tsuchiya Y, Watanabe A, Fujisawa N, Kaneko T, Ishizu T, Fujimoto T, et al. Effects of desalated deep seawater on hematologic and blood chemical values in mice. *Tohoku J Exp Med* 2004; 203(3):175-182.
10. Soler W, Velásquez N del C, Miranda LF, Zuluaga DC. Ausencia de genotoxicidad de agua de mar de Coveñas: estudio *in vitro* en eritrocitos y leucocitos humanos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* 2005; 23 (2):25-30.
11. Ministerio de Salud. **Perfiles epidemiológicos. Región costa Atlántica.** Bogotá: Ministerio de Salud; 1996.
12. Velásquez N. **Mutagenicidad y genotoxicidad de extractos de agua tratada para el consumo humano y de subproductos de la cloración.** [Tesis] Medellín: Universidad de Antioquia; 2000.
13. Yuan J, Liu H, Zhou LH, Zou YL, Lu WQ. Oxidative stress and DNA damage induced by a drinking-water chlorination disinfection by product 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in mice. *Mutat Res* 2006; 609(2):129-136.
14. Aleem A, Malik A. Genotoxicity of water extracts from the River Yamuna at Mathura. *Environ Toxicol* 2003; 18(2):69-77.
15. Wu JY. Assessing surface water quality of the Yangtze Estuary with genotoxicity data. *Mar Pollut Bull* 2005; 50(12):1661-1667.
16. Zietz BP, Nordholt G, Ketsseridis G, Pfeiffer EH. Mutagenicity of Baltic seawater and the relation to certain chemical and microbiological parameters. *Mar Pollut Bull* 2001; 42(10):845-851.
17. Márquez-Fernández ME, López-Ortiz JB, Correa-Londoño G, Pareja-López A, Giraldo-Solano A. Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos. *Iatreia* 2003; 16(4):275-282.
18. Pareja-López A, García-García CP, Abad-Mejía PJ, Márquez-Fernández ME. Estudio *in vitro* de la citotoxicidad y genotoxicidad de los productos liberados del acero inoxidable 316L con recubrimientos cerámicos bioactivos. *Iatreia* 2007; 20(1):12-20.
19. Singh NP, McCoy MT, Tice R, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175(1):184-191.
20. Meier JR, Blazak WF, Knohl R. Mutagenic and clastogenic properties of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: A potent bacterial mutagen in drinking water. *Environ Mol Mutagen* 1987; 10(4):411-424.
21. Stahl RG. The genetic toxicity of organic compounds in natural waters and wastewaters. *Ecotoxicol Environ Saf* 1991; 22 (1):94-125.
22. Comet Score. Version 1.5 Free comet scoring software (TriTek Corp, USA). [Sitio en internet]. Disponible en: <http://autocomet.com> Consultado: 17 de septiembre de 2007.
23. Ogawa H, Tanoue E. Dissolved organic matter in oceanic waters. *J Oceanography* 2003; 59(2):129-147.
24. Aluwihare LI, Repata DJ, Chen RC. A major biopolymeric component to dissolved organic carbon in surface seawater. *Nature* 1997; 387:166-169.
25. Hirose K. Chemical speciation of trace metals in seawater: a review. *Anal Sci* 2006; 22(8):1055-1063.
26. Voet D, Voet JG, Pratt Ch W. **Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular.** 2ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006.
27. Meyers CD, Fairbairn DW, O'Neill KL. Measuring the repair of H₂O₂-induced DNA single strand breaks using cell gel assay. *Cytobios* 1993; 74(298-299):147-153.
28. Coble P, Hu Ch, Gould RW, Chang G, Word M. Coastal ocean optics and dynamics. *Oceanography* 2004; 17(2):50-59.
29. Hood DW. **Los ciclos químicos del mar.** En: Vetter RC. *Oceanografía. La última frontera.* Buenos Aires: El Ateneo; 1976: 30-40.