

Artículo Original/ Original Article

Evaluación genotóxica de las moléculas con efectos tripanocida y leishmanicida cantin-6-ona y 5-metoxicantin-6-ona en células de médula ósea de ratones

Gloria Yaluff^{1,3}, Gisel Piris², Kristha Paredes², Fernando Ramond³, Marisel Maldonado¹, Tomas López³, Miguel Martínez³, Ninfa Vera¹, Alain Fournet⁴, Ma Elena Ferreira¹, *Edith Segovia²

¹Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Dpto. de Medicina Tropical. San Lorenzo, Paraguay

²Universidad Nacional de Asunción, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica-Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas-Laboratorio de Biotecnología (CEMIT-DGICT-UNA). San Lorenzo, Paraguay

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. (FACEN-UNA). San Lorenzo, Paraguay

⁴Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacognosie, dIRD UMR 217, rue Jean-Baptiste Clément, Châtenay-Malabry, France

Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:

Yaluff G, Piris G, Paredes K, Ramond F, Maldonado M, López T, et al. Evaluación genotóxica de las moléculas con efectos tripanocida y leishmanicida cantin-6-ona y 5-metoxicantin-6-ona en células de médula ósea de ratones. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2020; 18(1): 69-75

RESUMEN

La tripanosomiasis americana y la leishmaniasis son problemas de salud pública relevantes en Iberoamérica. Las drogas utilizadas actualmente para el tratamiento de estas enfermedades poseen efectos colaterales tóxicos severos. Varios grupos de investigación están abocados a la búsqueda de productos naturales y sintéticos para encontrar nuevos agentes terapéuticos efectivos que no presenten reacciones colaterales adversas. En la evaluación de compuestos de la especie vegetal *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae), se demostró que compuestos aislados del extracto presentaban actividad leishmanicida, tripanocida y antifúngica in vivo. Teniendo como antecedentes estos resultados, en el presente estudio se evaluaron los efectos genotóxico y citotóxico del cantin-6-ona y del 5-metoxicantin-6-ona, moléculas aisladas de la planta, en células de médula ósea de animales tratados. El estudio de los efectos genotóxicos se hizo a través del ensayo de modificaciones en la frecuencia de micronúcleos y el efecto citotóxico por modificaciones en la relación entre eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocromáticos. Se realizaron 2 ensayos independientes y en cada ensayo los animales fueron divididos en tres grupos de tratamiento: GRUPO I: control negativo que recibió 200 uL de agua y 2.1% de DMSO, vía oral, GRUPO II: compuesto a ser evaluado (cantin-6-ona o 5-metoxicantin-6-ona) con 2.1% de DMSO, y GRUPO III: control positivo que recibió ciclofosfamida 50mg/kg/peso del animal, vía intraperitoneal. El análisis estadístico mostró que ambos compuestos no presentaron efectos genotóxicos ni citotóxicos. Estos resultados permiten proponer a estas moléculas como candidatas a ser sometidas a estudios más detallados como potenciales fármacos contra estas dos enfermedades.

Palabras clave: *Zanthoxylum chiloperone*, cantin-6-ona, 5-metoxicantin-6-ona, genotoxicidad, citotoxicidad, micronúcleo, eritrocito policromático.

Fecha de recepción: octubre 2019. Fecha de aceptación: diciembre 2019

*Autor correspondiente: Edith Segovia. Universidad Nacional de Asunción, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica-Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas-Laboratorio de Biotecnología (CEMIT-DGICT-UNA). San Lorenzo, Paraguay

Correo electrónico: edaluz@gmail.com



Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una Licencia Creative Commons

Genotoxic evaluation of the molecules with trypanocidal and leishmanicidal effects, canthin-6-one and 5-methoxycanthin-6-one in mouse bone marrow cells

ABSTRACT

American trypanosomiasis and leishmaniasis are relevant public health problems in Latin America. The drugs currently used to treat these diseases have severe toxic side effects. Several research groups are dedicated to the search of natural and synthetic products to find new effective therapeutic agents that do not present adverse collateral reactions. In the evaluation of compounds of the plant species *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae), it was shown that isolated compounds of the extract had leishmanicidal, trypanocidal and antifungal *in vivo* activities. Based on these results, the genotoxic and cytotoxic effects of canthin-6-one and 5-methoxycanthin-6-one, molecules isolated from the plant, on bone marrow cells of treated mice were evaluated in the present study. The study of genotoxic effects was made through the test of modifications in the frequency of micronuclei and the cytotoxic effects by modifications in the relationship between polychromatic erythrocytes and normochromic erythrocytes. Two independent assays were performed and in each assay the animals were divided into three treatment groups: GROUP I: negative control that received 200 μ L of water and 2.1% of DMSO, orally, GROUP II: compound to be evaluated (canthin-6-one or 5-methoxycanthin-6-one) with 2.1% DMSO, and GROUP III: positive control that received cyclophosphamide 50mg /kg animal weight, intraperitoneal. Statistical analysis showed that both compounds had neither genotoxic nor cytotoxic effects. These results allow these molecules to be proposed as candidates to be subjected to more detailed studies as potential drugs against these two diseases.

Keywords: *Zanthoxylum chiloperone*, canthin-6-one, 5-methoxycanthin-6-one, genotoxicity, cytotoxicity, micronucleus, polychromatic erythrocyte.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad que representa un serio problema de salud pública, se distribuye en zonas tropicales y sub tropicales de África, Asia, América del Sur y la zona del Mediterráneo⁽¹⁾, con una estimación de 2 millones de casos por año y el tratamiento es limitado por la toxicidad, baja eficacia y dificultad de acceso a los medicamentos². Por otro lado, la enfermedad de Chagas es una patología cuya quimioterapia actual se basa casi exclusivamente en el uso de benznidazol, pero, nuevas drogas con menos efecto secundario y con mayor actividad tripanocida son necesarias⁽³⁾ debido a que el tratamiento actual posee severos efectos colaterales tóxicos^(4,5). Al igual que en la leishmaniasis, numerosos grupos de investigación están abocados a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas eficaces y seguras. Es así que, en el caso de las especies de plantas paraguayas con propiedades medicinales prometedoras destaca la rutácea *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* Engl. que entre otros compuestos aislados tiene una familia de alcaloides de tipo beta-carbolina llamados cantinonas, siendo las más abundantes la cantin-6-ona y 5-metoxicantin-6-ona. Estos alcaloides fueron aislados a partir de la corteza del tronco y de las hojas de este árbol y se destacan por presentar interesante actividad antiparasitaria *in vivo* contra las formas amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*⁽⁶⁾ y leishmanicida⁽⁷⁾. Ferreira et al.⁽⁸⁾ evaluaron los efectos antiparasitarios del cantin-6-ona, el 5-metoxicantin-6-ona, el N-óxido de cantin-6-ona (5 mg/kg/día durante 2 semanas) y los alcaloides totales de la corteza del tronco de *Z. chiloperone* (50 mg / kg / día durante dos semanas) en comparación con benznidazol (50 mg / kg / día durante 2 semanas) en ratones en fase aguda y crónica de la infección con *T. cruzi*. En este estudio, la parasitemia se redujo significativamente después del tratamiento por vía oral con cantin-6-ona y el extracto de alcaloides totales, en los casos agudos y se observaron altos niveles de eliminación parasitológica. En la fase crónica de la enfermedad, tanto cantin-6-ona como el extracto conteniendo los alcaloides totales, indujeron un 80-100% de supervivencia en los animales, en comparación con el grupo control no tratado. Estos resultados indican que la cantin-6-ona exhibió actividad tripanocida en un modelo de infección crónica; mientras que el 5-

metoxicantin-6-ona si bien presentó una acción limitada contra *T. cruzi*, mostró una reducción rápida de la parasitemia y parásitos circulantes. En relación a la leishmaniasis, Ferreira et al⁽⁷⁾ mostraron que el cantin-6-ona presentó una baja toxicidad y una interesante efectividad cuando fue administrada de forma interlesional y sugirieron otros estudios para determinar su uso en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

Los grupos de trabajo de la Unión Europea (EU), la Organización Económica de Cooperación y Desarrollo (OECD) y también la Conferencia Internacional de Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos farmacéuticos de Uso Humano (ICH) han definido el uso de baterías de ensayos de genotoxicidad, tanto *in vitro* como *in vivo*⁽⁹⁾ necesarios para la evaluación de moléculas con posible acción terapéutica. Así, el ensayo de micronúcleos en células de médula ósea de ratas o ratones es un ensayo de fácil acceso⁽¹⁰⁾. Los micronúcleos en eritrocitos jóvenes surgen primariamente de fragmentos cromosómicos que no son incorporados en las células hijas en el momento de la división celular de células eritropoyéticas mientras que los cambios en la incidencia de EPCMNs se consideran que reflejan daños cromosómicos^(11,12). Este ensayo es válido tanto para realizar un estudio de los efectos genotóxicos (clastogénicos o aneugénicos) de algunas sustancias como para estudiar los posibles efectos protectores de otras sustancias⁽¹³⁾. La aplicación de este ensayo está en consonancia con la estrategia adoptada internacionalmente en la evaluación del potencial aneugénico o clastogénico de potenciales moléculas de actividad farmacológica⁽¹⁴⁾. Dado que la presencia de micronúcleos (MN) se traduce en el ámbito celular como pérdida de ADN, esta técnica es entonces una alternativa muy eficaz para el monitoreo de genotóxicos de manera fácil, sencilla, rápida y con resultados contundentes⁽¹⁵⁾. La prueba permite detectar tanto agentes clastogénicos (que rompen cromosomas), como aneuploidogénicos (que pueden afectar el huso mitótico), pudiéndose diferenciar unos de otros por el tamaño de los MN y presencia de centrómero⁽¹⁶⁾.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial genotóxico y citotóxico de las moléculas cantin-6-ona y 5-metoxicantin-6-ona en células de médula ósea de ratones tratados por vía oral en un tratamiento sub agudo en dos ensayos independientes utilizando las pruebas de modificación de la frecuencia de micronúcleos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales: Suero Bovino Fetal (PAA), Ciclofosfamida (SIGMA), Metanol.

Extractos: El cantin-6-ona y el 5-metoxicantin-6-ona fueron extraídos, liofilizados y mantenidos a -20°C hasta el momento del uso. Cada liofilizado se diluyó en 2.1% de dimetilsulfóxido (DMSO) y agua destilada.

Animales: Se utilizaron ratones Swiss albinos, hembras (cantin-6-ona) y machos (5-metoxicantin-6-ona), de 6-8 semanas de vida, peso corporal 28-30 gramos, mantenidos en un ambiente con temperatura controlada con agua y comida ad libitum, con 12 h de luz y 12 h a oscuras, en el bioterio del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS). Se realizaron dos ensayos por separado, cada ensayo tuvo sus controles, negativo y positivo. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de 5 animales (ensayo 1) o 6 animales (ensayo 2).

Tratamientos: En cada ensayo se emplearon tres grupos de tratamiento. Ensayo 1: GRUPO I: control negativo, tratado con 200µl de agua destilada con DMSO al 2.1%, GRUPO II: tratado con 20 mg/Kg peso animal, del compuesto cantin-6-ona y GRUPO III: control positivo, tratado con 50 mg/Kg. de ciclofosfamida. Ensayo 2: GRUPO I: control negativo, tratado con 200µl de agua destilada con DMSO al 2.1%, GRUPO II: tratado con 20 mg/Kg peso animal de 5-metoxicantin-6-ona, GRUPO III: control positivo, tratado con 50 mg/Kg de ciclofosfamida. Para las concentraciones utilizadas en cada grupo, se tomaron como referencia las dosis empleadas en los ensayos *in vivo* de actividad antiparasitaria de productos naturales realizados previamente por nuestro grupo de trabajo. La vía utilizada en la administración del control negativo y de los compuestos en los grupos I y II de cada ensayo fue oral (v.o.) durante 4 días y en el grupo III la vía fue intraperitoneal (i. p.), en única dosis, 24 horas antes del sacrificio.

Ensayo de micronúcleo: Los animales de los ensayos 1 y 2 se sacrificaron por ruptura cervical a las 48 hs de finalizado el tratamiento, estando este tiempo de muestreo basado en la cinética de maduración de los eritrocitos en ratones. El procedimiento empleado para la obtención de las preparaciones de la médula ósea fue realizado de

acuerdo a la metodología propuesta por Schmid⁽¹⁷⁾. Se tiñeron las muestras con colorante Giemsa al 5%, diluido en agua destilada estabilizada con tampón. Se analizaron las muestras en microscopio óptico de inmersión y se contaron 1000 eritrocitos policromáticos (EPCs) incluyendo los que presentaron micronúcleos (EPCMN), por animal tratado. La proporción de EPCMN fue realizada para cada grupo y los grupos de tratamiento de los compuestos y ciclofosfamida (CP) fueron comparados con el grupo control negativo. Para el análisis de citotoxicidad se utilizaron las mismas muestras del ensayo de micronúcleo, donde se analizaron 200 células por animal tratado y se observó la proporción de eritrocitos policromáticos (EPC) versus la proporción de eritrocitos normocromáticos (ENC).

Análisis estadístico: A partir de los valores individuales de los parámetros evaluados se calcularon los valores medios y sus desviaciones estándar, para cada uno de los grupos experimentales. Los datos fueron procesados mediante el software de análisis estadístico EpiInfoTM versión 3.5.1. y el ensayo estadístico ANOVA con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Asuntos éticos: El protocolo No. 1305-2005-14 de este estudio fue aprobado por el Comité Ético y Científico del IICS. Se siguieron las recomendaciones de la Guía de Principios Internacionales para Investigaciones Biomédicas que envuelven animales, elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas¹⁸. Se utilizó la cantidad mínima posible de animales y se tomaron todas las precauciones para evitarles sufrimientos innecesarios.

RESULTADOS

Análisis de la frecuencia de micronúcleos:

Los criterios de genotoxicidad tomados fueron los recomendados por OECD19 (1993) y los de Hayashi et al.⁽¹⁵⁾, comparando las frecuencias de EPCMN en una o más dosis del grupo de tratamiento con respecto al control negativo. En la Tabla 1 se muestran los resultados del análisis de la inducción de micronúcleos en médula ósea de ratones con el compuesto cantin-6-ona. Se evaluaron 5000 células por cada grupo de tratamiento, el porcentaje de EPCMN en el grupo control negativo fue de 0.2% y el porcentaje de EPCMN en el grupo control positivo, tratados con una dosis única de ciclofosfamida, fue de 3.5%. También se muestra la relación EPC/ENC, analizada para evaluar el potencial citotóxico del tratamiento. Si existe una diferencia significativa en la comparación de la relación de los tratamientos con el control negativo es indicativa de toxicidad.

Tabla 1: Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados, media y desvío estándar (SD), en médula ósea de ratones hembras tratadas con cantin-6-ona.

Grupo experimental	Total EPC	Total EPCMN	Número de EPCMN (%)	EPC Media \pm SD	Ratio EPC/ENC
CTL-	5000	12	0.24	2.4 \pm 1.1	1,10
CP	5000	179	3.5	25.8 \pm 5.1	1,15
Canthin-6-ona	5000	13	0.26	2.6 \pm 1.1	1,10

EPC: Eritrocito Policromático; EPCMN: Eritrocitos Policromático Micronucleado; ENC: eritrocito Normocromático; CP: ciclofosfamida. Datos procesados por el software de análisis estadístico EpiinfoTM versión 3.5.1. Ensayo estadístico ANOVA ($p < 0,05$).

Por otro lado, en la Tabla 2 se observan los valores de MN en los grupos de ratones que han sido tratados con el compuesto 5-metoxicantin-6-ona en células de médula ósea de ratones, se evaluaron 6000 células por grupo de tratamiento, donde el porcentaje del EPCMN en el grupo de control negativo fue de 0,5 % y el porcentaje de EPCMN en el grupo control positivo, tratados también con dosis única de ciclofosfamida fue de 3.4% mientras que en el grupo 5-metoxicantin-6-ona fue de 0.5%. Se muestra la relación EPC/ENC de los 3 grupos analizados.

Tabla 2: Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados, media y desvío estándar (SD), en médula ósea de ratones machos tratados con 5-metoxicantin-6-ona.

Grupo experimental	Total EPC	Total EPCMN	Número de EPCMN (%)	EPC Media \pm SD	Ratio EPC/ENC
CTL-	5000	25	0.5	5 \pm 2.2	1,19
CP	5000	174	3.4	34.8 \pm 6.8	1,08
5-metoxicantin-6-ona	5000	29	0.5	5.8 \pm 3.3	1,14

EPC: Eritrocito Policromático; EPCMNs: Eritrocitos Policromático Micronucleado; ENC: eritrocito Normocromático; CP: ciclofosfamida. Datos procesados por el software de análisis estadístico EpiinfoTM versión 3.5.1. Ensayo estadístico ANOVA ($p < 0,05$)

DISCUSIÓN

En la búsqueda de nuevos principios activos para el tratamiento de enfermedades endémicas o regionales es necesario evaluar los posibles efectos secundarios de los mismos, para evitar o minimizar las secuelas del tratamiento. Las drogas utilizadas actualmente en el tratamiento de la leishmaniasis presentan efectos secundarios tóxicos o genotóxicos⁽²⁰⁻²³⁾ así como las utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas⁽²⁴⁻²⁵⁾, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento de estas enfermedades. De acuerdo a la OECD se deben aplicar varios ensayos básicos para determinar el potencial mutagénico, clastogénico o aneugénico, tanto *in vitro* como *in vivo*, en el desarrollo de nuevos productos químicos con potencial farmacológico⁽¹⁰⁾. La actividad de los principios activos extraídos de la planta *Zanthoxylum chiloperone*, cantin-6-one y el 5-metoxicantin-6-ona ya fue analizada *in vitro* e *in vivo* por nuestro equipo de trabajo en una fase inicial, donde se ha visto que presentaron una actividad antiparasitaria importante^(6,8,26). La concentración utilizada en este estudio representa el promedio de la concentración utilizada en los ensayos de evaluación de la actividad antiparasitaria de los productos *in vivo*⁽²⁷⁾. Las dosis de tratamiento utilizadas en ambos ensayos fueron seleccionadas con la finalidad de conocer los límites de concentración de uso del producto. Los resultados indican que los compuestos evaluados no inducen un aumento de daño genotóxico en células de médula ósea de ratones cuando son expuestas al mismo en un tratamiento agudo de 96 hs. Resulta imprescindible para estos ensayos la utilización de un control negativo (vehículo o solvente de los compuestos evaluados) por que las respuestas genotóxicas y tóxicas de dichos compuestos se evidencian en la comparación con los valores de sus respectivos controles y un control positivo que valide el ensayo; los porcentajes de EPCMNs en el grupo control negativo fueron de 0.2% y 0.5%, valores que se encuentran en los rangos descritos en la literatura⁽²⁸⁻³⁰⁾ y que son valores dentro del rango normal. Con respecto al grupo control positivo, los datos obtenidos en este estudio concuerdan con los datos reportados en la literatura, ya que el análisis estadístico mostró que la frecuencia de micronúcleos en células de médula ósea en los animales tratados con ciclofosfamida fue significativa, cuando fue comparada con el grupo control negativo⁽³¹⁾. En cuanto al efecto citotóxico de ambas moléculas hemos observado que tanto el cantin-6-ona y el y el 5-metoxicantin-6-ona no han presentado ninguna actividad citotóxica en células de médula ósea, por lo que se deduce que no presentan actividad citotóxica ni genotóxica. La concordancia de los resultados obtenidos con la ciclofosfamida en este estudio con los encontrados en la literatura⁽³¹⁾ validan los resultados obtenidos en la evaluación de los principios activos cantin-6-ona y 5-metoxicantin-6-ona.

Los resultados obtenidos en la evaluación de estos compuestos derivados de la planta de *Zanthoxylum* contribuyen al conocimiento de sus posibles efectos secundarios e indican que podrían ser candidatos a ser incorporados en la medicina humana como antifúngicos, antichagásicos o leishmanicidas en el futuro. Resulta indudable la importancia de estos resultados en la búsqueda de alternativas más seguras para el tratamiento de la tripanosomiasis y la leishmaniasis. Sin embargo, otros análisis deben ser aplicados para tener mayor seguridad de que estas moléculas no presentan efectos adversos, como ser, el ensayo de genotoxicidad en células humanas tratadas *in vitro*⁽³²⁾ o ensayos *in vivo* en modelos murinos con mayores tiempos de exposición⁽³³⁾.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kaiming Bi, Yuyang Chen, Songnian Zhao, Yan Kuang, and Chih-Hang John Wu. Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. Hindawi. BioMed Research International Volume 2018, Article ID 9872095, 13 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/9872095>.
2. Moreira RRD, Santos AGD, Carvalho FA, Perego CH, Crevelin EJ, Crotti AEM, et al. Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2019 Jul 1;61: e33. doi: 10.1590/S1678-9946201961033
3. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010 Apr 17;375(9723):1388-402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X. Review.
4. Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Real JP, Palma S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. Acta Trop. 2016; 156:1-16. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.12.017. Review
5. Bartel LC, Montalto de Mecca M, Fanelli SL, Rodriguez de Castro C, Diaz EG, Castro JA. Early nifurtimox-induced biochemical and ultrastructural alterations in rat heart. Hum Exp Toxicol. 2007; 26(10):781-8.
6. Ferreira ME, Cebrián-Torrejón G, Corrales AS, Vera de Bilbao N, Rolón M, Gomez CV, et al. *Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: First sustainable Chagas disease treatment. Ethnopharmacol. 2011 Feb 16; 133 (3): 986-93. doi: 10.1016/j.jep.2010.11.032. Epub 2010 Dec 4.
7. Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortiz S, Inchausti A, Nakayama H, Thouvenel C, et al. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. J Ethnopharmacol. 2002; 80(2-3):199-202.
8. Ferreira ME, Nakayama H, de Arias AR, Schinini A, de Bilbao NV, Serna E, et al. Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice. J Ethnopharmacol. 2007 Jan 19;109(2):258-63. Epub 2006 Jul 29.
9. OECD: [https://one.oecd.org/document/C\(2016\)103/en/pdf](https://one.oecd.org/document/C(2016)103/en/pdf).
10. OECD/OCDE 474. 2016© OECD, (2016). <http://www.oecd.org/termsandconditions> /.This Guideline was adopted by the OECD Council by written procedure on 29 July 2016.
11. Diab KA, Fahmy MA, Hassan ZM, Hassan EM, Salama AB, Omara EA. Genotoxicity of carbon tetrachloride and the protective role of essential oil of *Salvia officinalis* L. in mice using chromosomal aberration, micronuclei formation, and comet assay. Environ Sci Pollut Res Int. 2018 Jan;25(2):1621-36. doi: 10.1007/s11356-017-0601-2. Epub 2017 Nov 3.
12. Lemes SR, Chaves DA, Silva NJD Júnior, Carneiro CC, Chen-Chen L, Almeida LM, et al. Antigenotoxicity protection of *Carapa guianensis* oil against mitomycin C and cyclophosphamide in mouse bone marrow. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 2017; 89(3 Suppl.): 2043-205.
13. Al-Dualimi DW, Shah Abdul Majid A, Al-Shimary SFF, Al-Saadi AA, Al Zarzour R, Asif M, et al. 50% Ethanol extract of *Orthosiphon stamineus* modulates genotoxicity and clastogenicity induced by mitomycin C. Drug Chem Toxicol. 2017; <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1317785>
14. OECD <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals.htm>. Section 4: Health Effects. 2019.
15. Hayashi M, Tice R, MacGregor J, Romagna F, Pacchierotti F. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutation Research. 1994; 312:293.
16. Alice CB, Vargas VM, Silva GA, de Siqueira NC, Schapoval EE, Gleye J, Henriques JA, et al. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. J Ethnopharmacol. 1991; 35(2):165-71.
17. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. Chemical Mutagens. 1975; 4:31.
18. Council for International Organizations of Medical Sciences. Suiza Mayo de 2007 (5 de Septiembre de 2007). 1985 International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. URL disponible en: http://www.cioms.ch/1985_texts_of_guidelines.html
19. OECD (1993) Organización Económica de Cooperación y Desarrollo. Guidelines for the Testing of Chemicals # 475: Genetic 26.Toxicology. Micronucleus test. OECD Publication service, 2 rue Andre-Pascal, 75775, Paris Cedex 16, France.
20. Moreira RRD, Santos AGD, Carvalho FA, Perego CH, Crevelin EJ, Crotti AEM, Cogo J, Cardoso MLC, Nakamura CV. Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. Rev Inst Med Trop Sao

- Paulo. 2019 Jul 1;61:e33. doi: 10.1590/S1678-9946201961033.
21. Marques SA, Merlotto MR, Ramos PM, Marques MEA. American tegumentary leishmaniasis: severe side effects of pentavalent antimonial in a patient with chronic renal failure. *An Bras Dermatol*. 2019 Jul 29; 94(3):355-57. doi: 10.1590/abd1806-4841.20198388.
 22. Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop*. 2011 May; 118(2):87-96. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.02.007. Epub 2011 Mar 21.
 23. Egito LC, de Medeiros SR, Medeiros MG, Price JC, Egito ES. Evaluation of the relationship of the molecular aggregation state of amphotericin B in medium to its genotoxic potential. *J Pharm Sci*. 2004 Jun;93(6):1557-65.
 24. Buschini A, Ferrarini L, Franzoni S, Galati S, Lazzaretti M, Mussi F. et al. Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. *J Parasitol Res*. 2009; 463575. doi: 10.1155/2009/463575. Epub 2009 Oct 21.
 25. Nagel R. Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. *Mutation Research*. 1987; 191.
 26. Ferreira ME, Cebrián-Torrejón G, Corrales AS, Vera de Bilbao N, Rolón M, Gómez CV, et al. *Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: first sustainable Chagas disease treatment. *J Ethnopharmacol*. 2011 Feb 16; 133(3):986-93. doi: 10.1016/j.jep.2010.11.032. Epub 2010 Dec 4.
 27. Wolff FR, Broering MF, Jurcevic JD, Zermiani T, Bramorski A, de Carvalho Vitorino J. Safety assessment of Piper cernuum Vell. (Piperaceae) leaves extract: Acute, sub-acute toxicity and genotoxicity studies. *J Ethnopharmacol*. 2019; 230: 109-116. doi: 10.1016/j.jep.2018.10.035.
 28. Yonekubo BT, Alves HMC, de Souza Marques E, Perazzo FF, Rosa PCP, Gaivão IOM, Maistro EL. The genotoxic effects of fruit extract of *Crataegus oxyacantha* (hawthorn) in mice. *J Toxicol Environ Health A*. 2018; 81(19):974-82. doi: 10.1080/15287394.2018.1503982. Epub 2018 Oct 16.
 29. Vilela TC, Leffa DD, Damiani AP, Damazio DDC, Manenti AV, Carvalho TJG, et al. Hibiscus acetosella extract protects against alkylating agent-induced DNA damage in mice. *An Acad Bras Cienc*. 2018 Jul-Sep; 90(3):3165-74. doi: 10.1590/0001-3765201820180144.
 30. de Oliveira AM, dos Santos AG, Dos Santos RA, Csipak AR, Olivato C, da Silva IC, et al. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. *Mutagenesis*. 2009 Nov;24(6):501-6. doi: 10.1093/mutage/geb034. Epub 2009 Sep 7.
 31. Vlastos D, Drosopoulou E, Efthimiou I, Gavriilidis M, Panagaki D, Mpatziou K, et al. Genotoxic and Antigenotoxic Assessment of Chios Mastic Oil by the *in vitro* Micronucleus Test on Human Lymphocytes and the *in vivo* Wing Somatic Test on *Drosophila*. *PLoS One*. 2015 Jun 25;10(6): e0130498. doi: 10.1371/journal.pone.0130498. eCollection 2015.
 32. Wolff FR, Broering MF, Jurcevic JD, Zermiani T, Bramorski A, de Carvalho Vitorino J, et al. Safety assessment of Piper cernuum Vell. (Piperaceae) leaves extract: Acute, sub-acute toxicity and genotoxicity studies. *J Ethnopharmacol*. 2019; 230: 109-16. doi: 10.1016/j.jep.2018.10.035.