

Genotoxicidad en leucocitos por la quimioprofilaxis de sangre con Violeta de Genciana y su prevención con antioxidantes

Genotoxicity in leukocytes by blood chemoprophylaxis with Gentian Violet and its prevention with antioxidants

Genotoxicidade em leucócitos pela quimioprofilaxia de sangue com Violeta Genciana e sua prevenção com antioxidantes

► María Isabel Díaz Gómez^{1ab}, José Alberto Castro^{2ab}

¹ Dra. en Ciencias Químicas.

² Dr. en Ciencias Químicas.

^a Centro de Investigaciones Toxicológicas (UNIDEF, MINDEF-CONICET-CITEDEF). J.B. de La Salle 4397, B1603ALO, Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina.

^b Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional de General San Martín (UNSAM). 25 de Mayo y Francia, B1650HMP San Martín, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

El Violeta de Genciana (GV) se usa como aditivo en la sangre para eliminar el *Trypanosoma cruzi* en la quimioprofilaxis de la infección por enfermedad de Chagas vía transfusión sanguínea, cuando no es posible un control previo de laboratorio o bajo situaciones de emergencia. En estos estudios se encontraron efectos genotóxicos del GV con el ensayo Cometa, cuando se lo agregó a la sangre bajo las condiciones empleadas para esterilizarla para transfusión. El efecto genotóxico fue aún más intenso si la sangre se mantenía con GV por 48 horas. Los resultados obtenidos con el ensayo Cometa sugieren la formación de bases hidroxiladas de ADN como resultado de un ataque de especies reactivas de oxígeno y apoyan la genotoxicidad del GV y su potencial carcinogénico ya informado previamente. Los efectos genotóxicos observados en el ensayo Cometa fueron parcialmente prevenidos por administración de antioxidantes que ya tienen uso clínico seguro, como α -tocoferol, ácido lipoico o N-acetilcisteína. El ácido lipoico fue capaz también de reaccionar *in vitro* con GV. Los resultados sugieren un uso potencial de estos antioxidantes para prevenir los efectos secundarios no deseados del GV para el individuo receptor de la sangre.

Palabras clave: violeta de Genciana * enfermedad de Chagas * transfusión sanguínea * ensayo Cometa * efectos genotóxicos * antioxidantes

Summary

Gentian violet (GV) is being used as blood additive to eliminate Trypanosoma cruzi in the chemoprophylaxis of Chagas disease infection via blood transfusion when prior laboratory control is not possible or under emergency circumstances in endemic areas. In these studies genotoxic effects of GV were found employing the Comet assay when GV was added to rat blood under the

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

conditions employed to sterilize it for transfusion. The genotoxic effect was even more intense if blood was kept with GV for 48 hours. The positive results obtained in the Comet assay suggest the formation of DNA hydroxylated bases as result of a reactive oxygen species (ROS) attack and further confirm GV genotoxicity and its potential carcinogenic effects previously reported. Genotoxicity effects observed in the Comet assay were partially but significantly prevented by prior administration of antioxidants having safe clinical use such as α -tocopherol; lipoic acid or N-acetylcysteine. Lipoic acid was also able to chemically react in vitro with GV (eg. the one remaining in the transfusion mixture after it had enough time to eliminate the parasite from blood). Results would suggest the potential use of these antioxidants to prevent unwanted side effects of GV for the blood recipient.

Key words: *Gentian Violet* * *Chagas' disease* * *blood transfusion* * *Comet assay* * *genotoxic effects* * *antioxidants*

Resumo

O Violeta de Genciana (GV) é utilizado como aditivo no sangue para remover o *Trypanosoma cruzi* da sangue em quimioprofilaxia da infecção por doença de Chagas através de transfusão de sangue, quando não é possível controle prévio de laboratório ou em situações de emergência. Nestes estudos encontraram-se efeitos genotóxicos do GV utilizando o ensaio Cometa, quando o GV foi adicionado ao sangue sob as condições utilizadas para a esterilização para transfusão. O efeito genotóxico foi ainda mais intenso se o sangue era mantido durante 48 horas com GV. Os resultados obtidos com o ensaio Cometa sugerem a formação de bases de DNA hidroxiladas, como resultado de um ataque de espécies reativas de oxigênio e apoiam a genotoxicidade do GV e seu potencial carcinogênico já informado anteriormente. Efeitos genotóxicos observados no ensaio do Cometa foram parcialmente prevenidos por administração de antioxidantes que já têm uso clínico seguro, como α -tocoferol, o ácido lipoico ou N-acetilcisteína. O ácido lipoico também foi capaz de reagir in vitro com GV. Os resultados sugerem um uso potencial destes antioxidantes para prevenir os efeitos colaterais não desejados de GV para o indivíduo receptor do sangue.

Palavras-chave: *violeta Genciana* * *doença de Chagas* * *transfusão de sangue* * *ensaio Cometa* * *efeitos genotóxicos* * *antioxidantes*

Introducción

Se estima que 15-16 millones de personas están infectadas con *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) en América Latina y que 75-90 millones están expuestos a la infección. El control de la enfermedad de Chagas debe llevarse a cabo interrumpiendo su transmisión por vectores y en la transfusión sanguínea, mejorando las viviendas y las áreas que rodean a las mismas, proveyendo educación sanitaria a las poblaciones expuestas y tratando los casos agudos y los recientemente infectados (1). La infección por *T. cruzi* se extiende a través de Norte, Centro y Sud América, afecta 21 países y frecuentemente permanece sin diagnosticar. Además, el *T. cruzi* puede detectarse en la sangre de individuos infectados décadas después de que la infección tuvo lugar y la transfusión sanguínea y el trasplante de órganos es considerado el segundo modo más común de transmisión de *T. cruzi* (2).

La transmisión de la enfermedad de Chagas a través de productos de la sangre no es únicamente un problema de las áreas rurales en países endémicos en América Latina. En efecto, un gran número de personas infectadas por *T. cruzi* provenientes de áreas rurales endémicas migran a zonas urbanas en países endémicos y no endémicos (2-4). Los países no endémicos que reciben

inmigrantes provenientes de otros endémicos deberían desarrollar políticas preventivas para evitar la contaminación de la sangre para transfusión con *T. cruzi* (2) (5-7). En áreas altamente endémicas o donde no es posible (o no está disponible) el control serológico, el riesgo de transmisión del *T. cruzi* por transfusión sanguínea puede ser reducido por la adición de Violeta de Genciana (GV) a la sangre a transfundir (3). Este tratamiento es capaz de eliminar el parásito en 24 horas (3) (8) (9). Sin embargo, la toxicidad a largo plazo de este agente para los receptores de la sangre es todavía un problema no resuelto (3) (10-12).

El desarrollo de tratamientos profilácticos alternativos que sean efectivos y seguros debería ser de interés sanitario. Esfuerzos de este laboratorio en este sentido fueron informados anteriormente (13-15).

En el presente trabajo se informan resultados que evidencian que durante la exposición de la sangre a GV bajo condiciones empleadas regularmente para la quimioprofilaxis contra la infección de la enfermedad de Chagas por transfusión, se producen efectos mutagénicos sobre el ADN de los glóbulos blancos de la sangre. Estas acciones deletéreas fueron significativamente disminuidas cuando la sangre se obtuvo de animales pretratados con vitamina E, ácido lipoico o N-acetilc-

teína. Se discuten las limitaciones potenciales y el valor de los resultados obtenidos para mejorar la quimioprofilaxis por GV para prevenir la infección de Chagas por transfusión, en emergencias importantes que ocurran en zonas endémicas y se discuten las ventajas, desventajas y dificultades para una eventual aplicación práctica que existiría en comparación con otras alternativas que emplean métodos de diagnóstico rápido por inmunocromatografía como modo para descartar sangre infectada.

Materiales y Métodos

COMPUESTOS QUÍMICOS

El ácido lipoico o DL-6,8-ácido tióctico (LA), el α -tocoferol anhidro (α -T), la N-acetil cisteína (NAC) y el Violeta de Genciana (GV) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.). Agarosa Ultra Pura y L.M.P. Agarosa fueron de Invitrogen, Life Technologies, España. Los otros compuestos usados fueron de grado reactivo analítico.

ANIMALES

Se usaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley (250-270 g de peso corporal) en todos los experimentos y la colonia de cría original fue de Charles River (Wilmington, EE.UU.). Los procedimientos usados para la cría, alojamiento y manipulación de los animales fueron los establecidos por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

En el experimento con α -tocoferol, a las ratas se les administraron 575 mg/kg en aceite de oliva, y luego de 4 ó 24 horas, se extrajo sangre vía la vena cava (16). Cuando se probó el ácido lipoico, en un experimento a las ratas se les administró 550 mg/kg en carboximetilcelulosa 0,1% por vía oral intragástrica (po) y se les extrajo sangre a la media hora y en otro la dosis fue de 121 mg/kg en carboximetilcelulosa 0,1% y la sangre fue extraída a las 3 horas (17). Cuando se administró NAC se usó una dosis de 2000 mg/kg en agua, po, y la sangre se extrajo después de 30 minutos (18). En todos los experimentos se usaron cinco ratas por grupo y se hicieron los controles correspondientes con aceite de oliva, carboximetilcelulosa o agua.

ENSAYO COMETA

El ensayo Cometa se llevó a cabo en sangre venosa heparinizada (extraída de la vena cava inferior bajo anestesia suave con éter) proveniente de ratas sin pretratamiento (efecto de GV a 24 y 48 horas) o con pretratamiento con α -tocoferol, ácido lipoico o NAC. El ensayo se realizó en tubos de ensayo que contenían 2 mL de sangre más 0,3 mL de anticoagulante (citrato de sodio 81,3 mM, ácido cítrico. H₂O 37,9 mM, glucosa 100 mM). Luego de

agregar GV (50 μ L del colorante de una solución 0,0245 M) a la sangre extraída de los animales, la mezcla se dejó a 4 °C por 24 horas (o 48 horas en un caso). El experimento se realizó en duplicado para cada rata. Los controles con GV o para cada una de las otras drogas solas o sin GV se realizaron simultáneamente. Después del período de incubación las células se centrifugaron, se lavaron una vez con HBSS (KCl 5,0 mM; KH₂PO₄ 0,3mM; NaCl 138,0 mM; NaHCO₃ 4mM; Na₂HPO₄ 0,3mM, pH 7-7,5), se resuspendieron en HBSS, se separó una alícuota para evaluar el rendimiento celular y la viabilidad y el resto después de centrifugar nuevamente se usó para llevar a cabo la electroforesis en gel de células individuales en medio alcalino (pH>13), *single-cell gel electrophoresis* (SCGE) o ensayo Cometa, el cual se realizó en duplicado para cada muestra. El ensayo SCGE se llevó a cabo esencialmente de acuerdo con Singh *et al.* (19). El *pellet* fue resuspendido en agarosa de bajo punto de fusión (0,5% en PBS) y 75 μ L se depositaron sobre portaobjetos que habían sido cubiertos previamente con agarosa de punto de fusión normal (0,5% en PBS). Después que la agarosa hubo solidificado (4 °C por 10 minutos), se aplicó una segunda capa de agarosa de bajo punto de fusión de modo similar a la primera. Luego, los portaobjetos fueron sumergidos en una solución lisante (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 10, que contenían 1% Triton X100 recién preparada y 10% DMSO) por al menos 1 hora a 4 °C y luego colocados en un aparato de electroforesis horizontal con *buffer* recién preparado (Na₂EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH>13). Después de 20 minutos de pre-incubación (para desenrollar el ADN), la electroforesis se llevó a cabo por 20 minutos a un voltaje fijo de 25 V (0,83 V/cm) y 300 mA, ajustado ya sea elevando o bajando el nivel del *buffer* de electroforesis en la cuba. Al final de la electroforesis, los portaobjetos se lavaron dos veces con *buffer* de neutralización (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5), se secaron a temperatura ambiente y se fijaron en etanol 100% por cinco minutos. Los portaobjetos se tiñeron con 40 μ L de bromuro de etidio (20 μ g/mL).

DETECCIÓN DE LOS COMETAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las células se analizaron 24 horas después del teñido con un microscopio de fluorescencia Eclipse E 400 (Nikon, Japón) equipado con filtros de epifluorescencia y a una magnificación de 20 x. La captación de imágenes se realizó mediante un programa Nikon ACT-2U con una cámara DS 5M digital. Se usó el *software* CASP adquirido desde <http://www.casp.of.pl>, para determinar Longitud de la cola, Intensidad de la cola y el Momento de la cola (20), todos parámetros relacionados con el grado de daño al ADN en cada célula. Para cuantificar el daño al ADN, se analizaron un total de 50 células por portaobjetos.

Los resultados de cada experimento se analizaron usando el *test* ANOVA de una vía. Para todos los análisis

sis el criterio de significancia fue establecido a $p < 0,05$ y los valores promedio fueron comparados mediante el Tukey's *post hoc test*. Los cálculos se realizaron usando un *software* GraphPad (GraphPad InStat) (21).

El rendimiento celular y la viabilidad de las suspensiones celulares se evaluaron con una tinción dual con diacetato de 5-6-carboxifluoresceína y bromuro de etidio. La viabilidad celular después de los tratamientos fue siempre mayor del 80%.

REDUCCIÓN DEL VIOLETA DE GENCIANA POR ÁCIDO LIPOICO

Para ensayar la reducción del GV por ácido lipoico, a una absorbancia de 590 nm, se usaron dos soluciones *stock* de los compuestos: Violeta de Genciana (10^{-4} M) y ácido lipoico (5×10^{-3} M), ambos en *buffer* Tris pH 7,5. Se tomaron alícuotas de estas soluciones hasta alcanzar las concentraciones del ensayo. Simultáneamente se realizaron los controles correspondientes.

Resultados

1) Efecto del Violeta de Genciana sobre parámetros del ensayo Cometa a 24 h y 48 h en sangre de rata.

Se midió el efecto del GV sobre la inducción de roturas en las hebras del ADN en células individuales, usando el ensayo Cometa alcalino, en sangre entera.

Se observó que el GV condujo a un incremento significativo de la presencia de imágenes de Cometa a ambos períodos de tiempo en la sangre proveniente de las ratas Sprague Dawley usadas y la diferencia en todos los parámetros determinados: Longitud de la cola, % ADN en la cola y el Momento de la cola fue aún mayor a 48 horas (Tabla I).

2) Efecto del α -tocoferol, ácido lipoico o *N*-acetil cisteína sobre los efectos inducidos por el Violeta de Genciana en parámetros del ensayo Cometa en sangre de rata a 24 h.

Se midió el efecto de diferentes dosis y tiempos de administración de los tres antioxidantes, nuevamente usando el ensayo Cometa alcalino y midiendo el efecto sobre los tres diferentes parámetros ya mencionados.

Bajo las condiciones experimentales empleadas, la administración previa de α -T previno de manera significativa pero sólo moderada la acción genotóxica del GV (Tabla II). Más efectivo que el α -T mostró ser el LA. En un experimento inicial se probó una dosis menor (125 mg/kg) y se extrajo sangre a las 3 horas después de la administración de LA. Luego se incrementó la dosis de LA (550 mg/kg) y se obtuvo sangre a la media hora después del tratamiento y así el grado de efecto preventivo del LA fue aumentado significativamente y fue más notable comparativamente que el del α -T (Tabla III).

De manera interesante el NAC a una dosis de 2000 mg/kg y extrayendo sangre después de 30 min, probó ser más efectivo que el α -T o el LA, previniendo el efecto del GV en un 55% (Tabla IV).

3) Reducción del Violeta de Genciana por ácido lipoico.

Se observó que midiendo el efecto del ácido lipoico sobre la absorbancia del GV a 590 nm, hay una disminución marcada de la misma, que indica un efecto directo químico destructivo y significativo sobre el GV (Fig. 1).

Discusión y Conclusiones

El uso de GV, primero informado por Nussenzweig *et al.* ya en 1953, fue indicado en áreas endémicas carentes de controles o bajo circunstancias de emergencia cuando el control no está disponible cuando se necesita (22). El GV es capaz de eliminar el parásito en 24 horas (3) (8) (9).

El agregado de Violeta de Genciana tiene aún vigencia como modo de asegurar transfusiones en zonas endémicas, particularmente en emergencias importantes cuando el número de dadores de sangre es crítico. Así lo señala explícitamente el Ministerio de Salud y Medio Ambiente de Argentina en su "Guía para la atención del paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas)". Este texto fue elaborado en 2005 y aprobado por Resolución Ministerial N° 1870 del 29/11/2006. En su texto, en el punto 5.1.4 señala: "En las zonas endémicas en las cuales el número de dadores es crítico y/o para casos de emergencia se recomienda

Tabla I. Efecto del Violeta de Genciana (GV) sobre parámetros del ensayo Cometa a 24 y 48 horas en sangre de rata*.

	Parámetros		
	Longitud cola (μ m)	ADN% en cola	Momento cola (unidades arbitrarias)
Control (24 h)	3,80 \pm 0,60	2,90 \pm 0,10	0,25 \pm 0,58
GV (24 h)	12,20 \pm 2,31 ^a	11,44 \pm 2,36 ^a	1,49 \pm 0,37 ^a
Control (48 h)	4,10 \pm 1,02	3,92 \pm 0,86	0,98 \pm 0,23
GV (48h)	20,78 \pm 2,38 ^a	13,60 \pm 1,93 ^a	4,77 \pm 1,23 ^a

* A la sangre extraída de las ratas, se agregó GV, se dejó por 24 ó 48 horas y el ensayo Cometa se llevó a cabo según se describe en Métodos. Los datos son el promedio \pm DE.

^a $p < 0,001$ cuando se compara con Control.

Tabla II. Prevención por pretratamiento con α -tocoferol de los efectos inducidos por el Violeta de Genciana (GV) en parámetros del ensayo Cometa (en sangre de rata a 24 horas)*.

	Parámetros		
	Longitud cola (μm)	ADN% en cola	Momento cola (unidades arbitrarias)
Control	4,60 \pm 0,57	3,03 \pm 1,37	0,36 \pm 0,12
GV	13,92 \pm 2,04 ^a	9,92 \pm 1,60 ^a	1,81 \pm 0,11 ^a
α -tocoferol (575 mg/ kg) (4 h)	4,80 \pm 0,65	3,05 \pm 1,30	0,39 \pm 0,10
GV + α -tocoferol (575 mg/ kg) (4 h)	10,60 \pm 1,59 ^b	7,10 \pm 1,40 ^b	1,20 \pm 0,13 ^b
α -tocoferol (575 mg/ kg) (24 h)	4,45 \pm 0,60	3,08 \pm 1,39	0,34 \pm 0,09
GV + α -tocoferol (575 mg/ kg) (24 h)	8,79 \pm 1,29 ^c	5,90 \pm 1,41 ^c	0,98 \pm 0,25 ^c

* Las ratas se trataron con α -T y se extrajo sangre a los dos tiempos indicados. El ensayo Cometa se llevó a cabo después de agregar GV a la sangre y dejar por 24 h según se describe en Métodos. Control se refiere a la sangre sin ninguna de las drogas. Los datos son el promedio \pm DE.

El valor para la significancia del efecto total del tratamiento previo con α -T a los dos tiempos, obtenido por análisis de variancia fue $p < 0,001$ para los tres parámetros medidos.

^a $p < 0,001$ cuando se compara con Control.

^b $p < 0,001$ cuando se compara con GV, ^c $p < 0,001$ cuando se compara con GV.

Tabla III. Prevención por pretratamiento con ácido lipoico de los efectos inducidos por el Violeta de Genciana (GV) en parámetros del ensayo Cometa (en sangre de rata a 24 horas)*.

	Parámetros		
	Longitud cola (μm)	ADN% en cola	Momento cola (unidades arbitrarias)
Control	3,50 \pm 0,31	2,49 \pm 0,60	0,32 \pm 0,09
GV	11,66 \pm 1,61 ^a	9,84 \pm 1,87 ^a	1,49 \pm 0,11 ^a
Ácido lipoico (550 mg/kg) (30 min)	3,30 \pm 0,42	2,40 \pm 0,63	0,29 \pm 0,07
GV + ácido lipoico (550 mg/kg) (30 min)	6,24 \pm 1,18 ^b	4,88 \pm 1,25 ^b	0,70 \pm 0,18 ^b
Ácido lipoico (121 mg/kg) (3 h)	3,90 \pm 0,40	2,60 \pm 0,65	0,35 \pm 0,10
GV + ácido lipoico (121 mg/kg) (3 h)	8,06 \pm 1,45 ^c	6,10 \pm 1,69 ^c	0,89 \pm 0,25 ^c

* Las ratas se trataron con LA a las dosis indicadas y se extrajo sangre a los dos tiempos indicados. El ensayo Cometa se llevó a cabo después de agregar GV a la sangre y dejar por 24 h según se describe en Métodos. Control se refiere a sangre sin ninguna de las drogas. Los datos son el promedio \pm DE.

El valor para la significancia del efecto total del tratamiento previo con LA a los dos tiempos y dosis, obtenido por análisis de variancia fue $p < 0,001$ para los tres parámetros medidos.

^a $p < 0,001$ cuando se compara con Control.

^b $p < 0,001$ cuando se compara con GV.

^c $p < 0,001$ cuando se compara con GV.

Tabla IV. Prevención por pretratamiento con N-acetil cisteína (NAC) de los efectos inducidos por el Violeta de Genciana (GV) en parámetros del ensayo Cometa (en sangre de rata a 24 horas)*.

	Parámetros		
	Longitud cola (μm)	ADN% en cola	Momento cola (unidades arbitrarias)
Control	4,20 \pm 0,54	2,85 \pm 0,35	0,40 \pm 0,09
GV	14,20 \pm 1,98 ^a	10,20 \pm 1,93 ^a	1,50 \pm 0,26 ^a
NAC (2000 mg/kg) (30 min)	4,40 \pm 0,60	2,90 \pm 0,39	0,43 \pm 0,11
GV + NAC (2000 mg/kg) (30 min)	6,39 \pm 0,98 ^b	5,80 \pm 0,88 ^b	0,72 \pm 0,19 ^b

* Después de tratar las ratas con NAC a la dosis indicada la sangre se extrajo a la media hora, y el ensayo Cometa se llevó a cabo después de agregar GV a la sangre y dejar por 24 h según se describe en Métodos. Control se refiere a la sangre sin ninguna de las drogas. Los datos son el promedio \pm DE.

El valor para la significancia del efecto total del tratamiento previo con NAC obtenido por análisis de variancia fue $p < 0,001$ para los tres parámetros medidos.

^a $p < 0,001$ cuando se compara con Control.

^b $p < 0,001$ cuando se compara con GV.

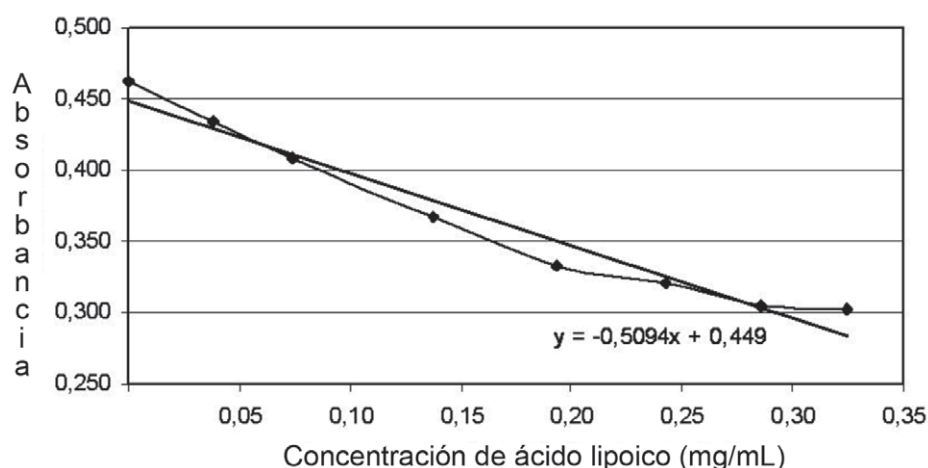


Figura 1. Reducción del Violeta de Genciana por ácido lipóico.

Se tomaron alícuotas de dos soluciones *stock* de los compuestos en *buffer* Tris pH 7,5 y se midió la absorbancia a 590 nm.

mantener un *stock* permanente de sangre tratada con cristal violeta en una concentración final de 125 mg por cada 500 cc a ser utilizada, como mínimo, después de 24 horas de tratamiento”.

Idealmente lo conveniente es usar en transfusiones sangre libre de *T. cruzi*. Esa situación no siempre se da en zonas endémicas y menos aún si la necesidad se da durante una emergencia grave (ej. terremotos, conflictos, accidentes importantes, etc.). No es fácil, en esos casos, en zonas endémicas disponer de suficientes donantes sanos y en cantidad.

Sin embargo, la administración intravenosa de GV causa depresión en el número de glóbulos blancos (10). Además, se conoce que el GV es un mutágeno, un tóxico mitótico y un clastógeno. Estas conclusiones se obtuvieron al ensayar el GV con cepas de *Salmonella typhimurium* TA97 y TA104 (11) o ensayando su toxicidad citogenética en células de hamster chino (CHO) (11) (23). Este compuesto también se mostró que es carcinogénico para ratones macho y hembra de la cepa B6C3F1 (11).

En los presentes estudios se observaron efectos genotóxicos del GV en leucocitos de la sangre empleando el ensayo Cometa. Este ensayo es capaz de detectar con alta sensibilidad la producción de bases hidroxiladas del ADN resultantes de un ataque por estrés oxidativo (24). El efecto fue ensayado a 24 y 48 horas (Tabla I). El GV condujo a un incremento significativo de la presencia de imágenes de cometa a ambos tiempos en la sangre proveniente de las ratas Sprague Dawley usadas y la diferencia en todos los parámetros determinados resultó aún mayor a las 48 horas. Estos resultados pueden tomarse como indicativos de que el GV puede también alterar el ADN proveniente de leucocitos de la sangre del individuo receptor después de la transfusión para producir bases de ADN hidroxiladas. Si este proceso es suficientemente intenso, los leucocitos podrían morir, y esto explicaría la depresión en el conteo de los glóbulos blancos (10). Si,

en cambio, este proceso es menos intenso y el daño no es reparado y ocurre en el ADN, pueden resultar células transformadas como resultado de la transfusión.

En el presente trabajo se intentó prevenir estos efectos genotóxicos del GV en el individuo receptor usando algunos antioxidantes como el α -tocoferol, el ácido lipóico o N-acetil cisteína. Las bases racionales de esta estrategia se basan en el conocimiento de que los efectos dañinos del GV se consideran vinculados a su capacidad para generar especies reactivas del oxígeno (ROS) capaces de dañar no sólo al ADN sino también proteínas y lípidos (10). Los antioxidantes se sabe que son capaces de bloquear los efectos pro-oxidantes dañinos iniciados por los ROS (25) (26). Los tres antioxidantes seleccionados tienen uso aceptado clínicamente para prevenir o tratar efectos dañinos de diversos compuestos mediados por ROS (25-27).

Estos ensayos solo pretenden evidenciar que estos antioxidantes son capaces de bloquear total o parcialmente los efectos genotóxicos del GV sobre los leucocitos. No significa que se pretenda tratar al donante con ellos antes de donar. Solo ilustran lo que sucedería en el receptor al recibirlo frente al GV que incorporó con la sangre tratada con este compuesto en las bolsas de transfusión.

Bajo las condiciones experimentales empleadas en el presente trabajo, la administración previa de α -T previno de manera significativa pero sólo moderada la acción genotóxica del GV (Tabla II). Más efectivo que el α -T mostró ser el LA (Tabla III). En un experimento inicial se ensayó una dosis menor (125 mg/kg), extrayendo la sangre a las 3 horas después de la administración de LA. Luego se incrementó la dosis de LA (550 mg/kg) y se obtuvo la sangre justo a la media hora después resultando que el grado de los efectos preventivos del LA aumentó significativamente. Es importante considerar que el LA, en contraste con el α -T, es degradado rápidamente bajo las condiciones *in vivo* (17).

El LA, sin embargo, tiene un beneficio adicional. En efecto, pudo observarse un efecto directo químico destructivo y significativo sobre el GV (Fig. 1). Este comportamiento podría tener un significado práctico importante si el LA se utilizara para bloquear los efectos mutagénicos potenciales del GV en el individuo receptor. El GV remanente presente después de 24 horas de la acción tripanosomicida en la sangre del donante podría ser destruido por el LA no tóxico antes de la transfusión pero también el LA podría administrarse al individuo receptor de la sangre antes de la transfusión. Ambos procedimientos pueden producir alternativamente un efecto preventivo por el LA (administrado bajo las formas farmacéuticas disponibles oxidadas) *in vivo*, atribuible a su rápida transformación a la forma de ácido dihidrolipoico (26). Esta forma reducida es un agente reductor poderoso capaz de regenerar α -T y también ácido ascórbico, y esta propiedad está ligada a la presencia de dos grupos sulfhidrilo vecinos presentes en su molécula (25)(26).

La interesante capacidad de este antioxidante que contiene grupos SH para prevenir la mutagenicidad del GV y para destruir químicamente cualquier remanente de GV en la sangre posterior a la acción tripanosomicida llevó a ensayar el NAC para ver si éste tenía un efecto potencial preventivo. El NAC es un antioxidante efectivo, contiene un grupo SH libre y es una fuente adecuada de niveles de glutatión (GSH) en los tejidos(25)(26). Es menos tóxico que el aminoácido relacionado cisteína y puede ser administrado ya sea oralmente o *iv* (26). A la dosis y tiempo empleados el NAC probó ser más efectivo que el α -T o el LA (Tabla IV).

Todos estos experimentos preliminares abren la posibilidad de ofrecer una respuesta a los efectos que varios estudios previos mostraron concernientes a las acciones linfopénicas, mutagénicas y carcinogénicas del GV, cuando se lo usa como tripanosomicida durante la transfusión sanguínea en áreas o circunstancias donde el control de la sangre no es posible. En efecto, existe la posibilidad de que después de las 24 horas de exposición de la sangre al GV necesarias para eliminar al *T. cruzi*, se efectúe ya sea el agregado de LA o de NAC a la misma o la administración de LA o de NAC al individuo receptor de la sangre. Existe también la posibilidad de hacer ambas cosas. Todas estas alternativas deben ser ensayadas rigurosamente porque la utilización del GV tiene la ventaja de poseer una interesante historia de uso para evitar la transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión, que merece ser considerada cuando el control previo de la sangre o su disponibilidad no es factible.

Es conveniente en este punto analizar las potenciales ventajas, desventajas y dificultades para una eventual aplicación práctica de estas propuestas y compararlas con la realización de serología rápida ej. por inmunocromatografía (IC) que permitiría excluir de transfusiones la sangre tratada (ver ej WL Check Chagas de Laboratorios Wiener).

1) La técnica IC sería útil para excluir dadores de sangre infectada con *T. cruzi*. En zonas endémicas por Chagas (o que lo han sido por años) puede haber importante cantidad de personas con sangre infectada aunque los vectores hayan sido controlados. Se perdería una cantidad importante de dadores en momentos de alta necesidad.

2) Un resultado negativo por la técnica IC no excluye la posibilidad de infección por *T. cruzi*. Se puede obtener un resultado falso negativo en muestras con niveles bajos de anticuerpos anti *T. cruzi*.

3) Pueden obtenerse resultados falsos positivos en las siguientes situaciones: enfermedades autoinmunes, tuberculosis, lupus eritematoso sistémico, embarazo, vacunación contra hepatitis B y otras inmunizaciones, hemodiálisis, enfermedad hepática, otras parasitosis como leishmaniasis y otras enfermedades infecciosas diferentes a Chagas (HIV, HTLV, hepatitis C, hepatitis B, sífilis, etc.). Existen algunos datos aún limitados sobre estas interferencias. Estos falsos positivos conducirían a su vez a eliminar muestras útiles potencialmente, cosa que no ocurriría de usar como biocida al GV. De hecho se requiere ejecutar otros dos ensayos adicionales para confirmar.

4) Lo deseable para trabajo rápido es obtener sangre entera capilar. Ello implica tener que realizar la prueba inmediatamente. Si se empleara otro método de obtención de sangre o suero o plasma (ej. punción venosa), dificultaría la posibilidad de efectuar estos ensayos en situaciones de campo y se agregarían más tiempos al proceso.

5) La ejecución correcta y confiable del procedimiento debiera estar a cargo de un bioquímico o un laboratorista calificado y entrenado en la ejecución e interpretación concreta. Ello agrega complejidad al manejo de la emergencia.

6) Cada ensayo requiere leer los resultados entre los 25 y 35 minutos (después de los 35 minutos pueden obtenerse resultados erróneos).

7) Muy recientemente Rodrigues Coura y Borges-Pereira explícitamente señalaron la gran necesidad de la existencia de un *test* rápido con alta sensibilidad, especificidad y estabilidad para ser empleado en condiciones de campo y en bancos de sangre en casos de emergencias en distintas áreas geográficas en las cuales existen diferentes cepas y clones de *T. cruzi* circulando y esta necesidad no está satisfecha aún (28).

Se concluye que es totalmente factible que cuando este tipo de técnicas de diagnóstico rápido sean aún más rápidas, más específicas y menos dependientes de personal calificado y que los bancos de sangre en todas las zonas (endémicas y no-endémicas) dispongan de suficiente material en emergencias, estos procedimientos reemplazarán al antiguo pero probadamente eficaz procedimiento que emplea GV. La administración al receptor de antioxidante o su adición a la sangre a transfundir después de las 24 horas necesarias para eliminar al *T. cruzi*, podría mejorar el procedimiento que emplea solo GV.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado económicamente por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y la Universidad Nacional de General San Martín (UNSAM).

CORRESPONDENCIA

DR. JOSÉ A. CASTRO

Centro de Investigaciones Toxicológicas (UNIDEF, MINDEF-CONICET).

J. B. de La Salle 4397,

B1603ALO VILLA MARTELLI, Buenos Aires, Argentina.

Tel-Fax: 54-11-4709-5911

E-mail: jcastro@citedef.gob.ar

Referencias bibliográficas

- Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas' disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 Suppl 1: 31-40.
- Schmunis GA, Cruz JR. Safety of the blood supply in Latin America. *Clin Microbiol* 2005; 18: 12-29.
- Moraes-Souza H, Bordin JD. Strategies for prevention of transfusion – associated Chagas' disease. *Tranfus Med Revs* 1996; 10: 161-70.
- Flores-Chávez M, Fernández B, Puente S, Torres P, Rodríguez M, Monedero C, *et al.* Transfusional Chagas' disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin Infect Dis* 2008; 46: e44-7.
- Leiby DA, Herron Jr RM, Garratty G, Herwaldt BL. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in US blood donors with serologic evidence of infection. *J Infect Dis* 2008; 198: 609-13.
- Lescure MA, Jacques C, Guillon P, Maggioni S, Fattacioli MC, Mussat T. T Ending the heart transplanted patient. *Soins* 2008; 727: 31-3.
- Manzardo C, Treviño B, Gómez i Prat J, Cabezas J, Monguí E, Clavería I, *et al.* Communicable diseases in the immigrant population attended to in a tropical medicine unit: epidemiological aspects and public health issues. *Travel Med Infect Dis* 2008; 6: 4-11.
- Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiological surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 (Suppl. 1): 17-30.
- WHO. Special programme for Research and Training in Tropical Diseases. Meeting on development on trypanocidal compounds for sterilization of blood TDR/CHA/BS/84 1984; 3: 1-14.
- Docampo R, Moreno SN. The metabolism and mode of action of gentian violet. *Drug Metab Rev* 1990; 22: 161-78.
- Littlefield NA, Blackwell BN, Hewitt CC, Gaylor DW. Chronic toxicity and carcinogenicity studies of Gentian Violet in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1985; 5: 902-12.
- Aidoo A, Gao N, Neft RE, Schol HM, Hass BS, Minor TY *et al.* Evaluation of the genotoxicity of gentian violet in bacterial and mammalian cell systems. *Teratog Carcinog Mutagen* 1990; 10: 449-62.
- Bernacchi AS, Franke De Cazzulo B, Castro JA. Trypanocidal action of 2,4-dichloro-6-phenylphenoxyethyl diethylamine hydrobromide (Lilly 18947) on *Trypanosoma cruzi*. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 399-404.
- Esteva M, Ruiz AM, Stoka AM. *Trypanosoma cruzi*: methoprene is a potent agent to sterilize blood infected with trypanomastigotes. *Exp Parasitol* 2002; 100: 248-51.
- Franke de Cazzulo BM, Bernacchi A, Esteva MI, Ruiz AM, Castro JA, Cazzulo JJ. Trypanocidal effect of SKF525A, proadifen, on different developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* 1998; 58: 415-8.
- Castro JA, Sasame H, Sussman JR, Gillette JR. Diverse effects of SKF 525A and antioxidants on CCl₄-induced changes in liver microsomal P-450 content and ethylmorphine metabolism. *Life Sci* 1968; 7: 129-36.
- Cremer DR, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of α -lipoic acid (ALA). *Regul Toxicol Pharmacol* 2006; 46: 29-41.
- Valles EG, de Castro CR, Castro JA. N-acetyl cysteine is an early but also a late preventive agent against Carbon Tetrachloride-induced liver necrosis. *Toxicol Lett* 1994; 71: 87-95.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1998; 175: 184-91.
- Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the comet assay. *Radiat Res* 1990; 122: 86-94.
- Gad SC. Statistics for toxicologists. En: AW Hayes (Ed.), *Principles and Methods in Toxicology*. Philadelphia Taylor and Francis; 2001, pp. 285-364.
- Nussenzweig V, Sonntag R, Biancalana A, De Freitas JP, Amato Neto V, Kloetzel J. Action of certain dyes on *T. cruzi* *in vitro*. The use of gentian violet to prevent the transmission of Chagas' disease by blood transfusion. *Hospital* 1953; 44: 731-44.
- Au W, Pathak S, Collie CJ, Hsu TC. Cytogenetic toxicity of Gentian Violet and Crystal Violet on mammalian cells *in vitro*. *Mutat Res* 1978; 58: 269-76.
- Hartman A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, *et al.* Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet Assay. *Mutagenesis* 2003; 18: 45-51.
- Flora SJ. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloids exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2: 191-206.
- Flora SJ. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med* 2011; 51: 257-81.
- Kanter MZ. Comparison of oral and i.v. acetylcysteine in the treatment of acetaminophen poisoning. *Am J Health Syst Pharm* 2006; 63: 1821-7.
- Rodrigues Coura J, Borges-Pereira J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45 (3): 286-96.

Aceptado para su publicación el 16 de agosto de 2013