



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIGENOTÓXICA DE LA  
OLEORRESINA DEL JITOMATE (*Lycopersicon esculentum* L.)  
MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS  
IN VIVO CONTRA EL DAÑO PRODUCIDO POR LA  
DAUNORUBICINA”.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

**Díaz Vázquez Fabiola**

Directora

Dra. Raquel Cariño Cortés

Codirector

Dr. Jorge Mendoza Pérez



Pachuca, Hgo., Febrero 2010.



**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO EN EL INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD EN LOS LABORATORIOS DE FARMACIA, NUTRICIÓN Y BIOTERIO, EN APOYO DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS EN EL ÁREA DE CIENCIAS AMBIENTALES DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL Y EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACION QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO.**



## INDICE

<b>T E S I S</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>I) MARCO TEÓRICO</b> .....	11
<b>1.1 Relación entre la dieta y el cáncer</b> .....	11
<b>1.2 Relación entre la mutación y el cáncer</b> .....	12
<b>1.3 Daunorubicina (Dau)</b> .....	14
<b>1.4 Agentes antimutagénicos</b> .....	17
<b>1.5 el jitomate: variedades y sus componentes</b> .....	18
<b>1.6 Licopeno</b> .....	19
<b>1.7 Antecedentes experimentales de la oleorresina y del licopeno</b> .....	21
<b>II) PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	23
<b>III) JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>IV) OBJETIVOS</b> .....	25
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	25
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	25
<b>V) HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>VI) METODOLOGIA</b> .....	26
<b>6.1 Tipo de estudio</b> .....	26
<b>6.2 Material biológico</b> .....	26
<b>6.3 Reactivos y equipo</b> .....	26
<b>6.4 criterios de inclusión</b> .....	27
<b>6.5 criterios de exclusión</b> .....	27
<b>6.6 Población de estudio y acondicionamiento de animales</b> .....	27
<b>6.7 Toma de muestras</b> .....	27
<b>6.8 Frotis sanguíneo</b> .....	27
<b>6.9 análisis estadístico</b> .....	27
<b>6.10 Metodología general</b> .....	28
<b>6.11 Extracción de la oleorresina</b> .....	29
<b>6.12 Identificación del Licopeno</b> .....	30
<b>6.12.1 Espectrofotometría Infrarroja</b> .....	30

6.12.2	<i>Espectrofotometría de UV-VIS</i>	31
6.12.3	<i>Espectrofotometría de Fluorescencia</i>	31
6.12.4	<i>Espectrofotometría de Masas</i>	31
6.12.5	<i>Cromatografía de Gases</i>	32
6.12.6	<i>Resonancia Magnética Nuclear</i>	32
6.13	<i>Cuantificación del Licopeno</i>	32
6.14	<i>Diseño experimental del ensayo Genotóxico y Antigenotóxico</i>	34
6.15	<i>Prueba de Micronúcleos (MN)</i>	35
VII)	<b>RESULTADOS</b>	37
7.1)	<i>Espectrofotometría Infrarrojo</i>	37
7.2)	<i>Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis)</i>	38
7.3)	<i>Espectrofotometría de fluorescencia</i>	39
7.4)	<i>Espectrofotometría de masas</i>	39
7.5)	<i>Cromatografía de gases</i>	41
7.6)	<i>Resonancia Magnética Nuclear</i>	41
7.7)	<i>Rendimiento de la oleorresina</i>	42
7.8)	<i>Genotoxicidad de la Oleorresina</i>	42
7.9)	<i>Antigenotoxicidad de la Oleorresina</i>	44
VIII)	<b>DISCUSIÓN</b>	47
8.1	<i>obtención, identificación y cuantificación del licopeno en la oleorresina</i>	47
8.2	<i>evaluación de la genotoxicidad de la oleorresina (licopeno)</i>	48
8.3	<i>Antigenotoxicidad de la oleorresina (licopeno)</i>	50
IX)	<b>CONCLUSIONES</b>	53
X)	<b>RECOMENDACIONES</b>	54
XI)	<b>PERSPECTIVAS</b>	55
XII)	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	56
XIII)	<b>ANEXOS</b>	62

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Cuadro 1.</b> Antecedentes experimentales de la Oleorresina y Licopeno	16
<b>Cuadro 2.</b> Componentes con actividad clínica de dieta usados en quimioprevención	58
<b>Cuadro 3.</b> Contenido de Licopeno en alimentos	48
<b>Figura 1.</b> Estructura de la daunorubicina	9
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de acción de la daunorubicina	10
<b>Figura 3.</b> Estructura del licopeno	13
<b>Figura 4.</b> Separación de las fases de extracción de la oleorresina del jugo de jitomate	24
<b>Figura 5.</b> Formación de micronúcleos durante el proceso de eritropoyesis y su observación microscópica en sangre periférica	30
<b>Figura 6.</b> Muestra de MN visto por microscopio.	30
<b>Figura 7.</b> Espectrofotometría Infrarroja de la Oleorresina	31
<b>Figura 8.</b> Espectrofotometría UV-Vis de la Oleorresina	32
<b>Figura 9.</b> Espectrofotometría de Fluorescencia de la Oleorresina	33
<b>Figura 10.</b> Espectrofotometría de Masas de la Oleorresina	34
<b>Figura 11.</b> Espectrofotometría de Masas de la Oleorresina utilizando Tándem iónico modo NICI.	34
<b>Figura 12.</b> Cromatografía de Gases de la Oleorresina	35
<b>Figura 13.</b> Resonancia Magnética Nuclear de la Oleorresina	35
<b>Figura 14.</b> Genotoxicidad de la Oleorresina	36
<b>Figura 15.</b> Citotoxicidad de la Oleorresina	37
<b>Figura 16.</b> Antigenotoxicidad de la Oleorresina	38
<b>Figura 17.</b> Anticitotoxicidad de la Oleorresina	39
<b>Figura 18.</b> Obtención de la oleorresina y prueba de MN	61

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	<b>Ácido Desoxirribonucleico</b>
<b>CDCI3</b>	<b>Cloroformo deuterado</b>
<b>CD1+</b>	<b>Cepa a la que pertenecen los ratones</b>
<b>Dau</b>	<b>Daunorubicina</b>
<b>ENC</b>	<b>Eritrocitos Normocrómicos</b>
<b>ENCMN</b>	<b>Eritrocitos Normocrómicos micronucleados</b>
<b>EPC</b>	<b>Eritrocitos policromáticos</b>
<b>EPCMN</b>	<b>Eritrocitos policromáticos micronucleados</b>
<b>FAO</b>	<b>Food and Agriculture Organization</b>
<b>i.p.</b>	<b>Vía intraperitoneal</b>
<b>IR</b>	<b>Infrarrojo</b>
<b>MN</b>	<b>Micronúcleos</b>
<b>OMS</b>	<b>Organización Mundial de la Salud</b>
<b>RMN</b>	<b>Resonancia Magnética Nuclear</b>
<b>UV-VIS</b>	<b>Ultravioleta Visible</b>
<b>v.o.</b>	<b>Vía oral</b>

## RESUMEN

La dieta es un factor importante en la etiología y desarrollo de diferentes tipos de cáncer, su efecto ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista experimental y epidemiológico. Debido a lo cual en los últimos años se ha incrementado la búsqueda de alimentos y de nuevos compuestos naturales que posean una toxicidad reducida, así como una alta disponibilidad de consumo en la dieta humana, situación en la que se encuentra el jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.), en esta hortaliza existe el licopeno, un caroteno que posee propiedades antioxidantes, cardio y nefroprotectoras. Por lo tanto, en el presente trabajo se planteó la extracción de la oleorresina del jitomate hasta su evaluación biológica sobre los efectos provocados por la daunorubicina, un agente antineoplásico utilizado en el tratamiento de leucemias agudas y tumores sólidos tanto en niños como en adultos. El procedimiento desarrollado fue de la siguiente manera: 1) se obtuvo la oleorresina del jitomate mediante extracción soxhlet, identificándose por medio de las técnicas espectrofotométricas ultravioleta-visible, infrarrojo, fluorescencia, de masas, resonancia magnética nuclear y cromatografía de gases; obteniéndose un rendimiento de 13.12 % de licopeno presente en la oleorresina; 2) extraída la oleorresina se comprobó su ausencia de genotoxicidad con la técnica de micronúcleos (MN), mediante la administración a 3 lotes de ratones de la cepa CD1<sup>+</sup>, un testigo negativo (0.1 ml/10 g de aceite de maíz), y con la oleorresina (3 y 10 mg/kg). Finalmente, se evaluó la capacidad antigenotóxica de la oleorresina mediante la dosificación a cinco lotes de cinco animales cada uno: testigo negativo, daunorubicina (Dau) ( 4 mg/kg), y tres lotes combinados con 3, 10 y 30 mg/kg de la oleorresina más Dau (4 mg/kg), ambos estudios tuvieron una duración de una semana de tratamiento y otra de recuperación, tiempo en el cuál se tomaron muestras sanguíneas a las 0, 72, y 144 h durante el tratamiento y finalmente a las 216 y 288 h.

Los resultados indicaron que el método de extracción es reproducible y la oleorresina obtenida mostró que el licopeno se encontró en mayor proporción de acuerdo a las técnicas espectrofotométricas mencionadas. En cuanto a la genotoxicidad, se demostró que la oleorresina no mostró efecto clastogénico ni citotóxico, con respecto a la antigenotoxicidad se observó que todas las dosis combinadas disminuyeron el daño producido por la Dau pero en mayor porcentaje la dosis de 30mg/kg, por lo que la oleorresina que contiene al licopeno es un agente que protege al material de la célula y en especial al DNA contra agentes mutagénicos productores de radicales libres.

**Palabras clave:** Dieta y cáncer, jitomate, licopeno, genotoxicidad, radicales libres, micronúcleos, daunorubicina, espectrofotometría.

## **ABSTRACT**

Diet is an important factor in the etiology of different types of cancer. Its effect has been widely studied from an experimental and from an epidemiologic point of view. Because of this, in the search of food and of new natural compounds that have reduced toxicity, as well as high availability, is tomato (*Lycopersicon esculentum*) in which lycopene is found. Lycopene is a carotenoid the forms part of the  $\beta$ -carotenoides, which poses antioxidant, cardioprotectant and renalprotectant effects. Therefore, the objective of this paper was to obtain, identify and evaluate the genotoxic and antigenotoxic agents, and the extraction of oleoresin from tomatoes in order to perform a biologic evaluation of the effects cased by daunorubicin, an antineoplastic agent used in the treatment of leukaemias in children and adults. In order to achieve this, the following procedure was used: oleoresin was obtained from tomatoes using a soxhlet extraction procedure. The identification was made by using espectrophotometric, UV-VIS, infrared, fluorescence, mass spectrometric, nuclear magnetic resonance, and gas chromatography techniques, obtaining a performance of 13.12 % of lycopene contained in the oleoresin. After this, the absence of genotoxicity was checked by using a micronucleous assay (MN). This was made by the administration of the oleoresin (3 and 10 mg/kg) to three groups of CD1 + mice, a negative witness (0.1 mL/10 g of corn oil). Finally, the antogenotoxic capacity was evaluated by the administration, to five lots of animals, (five animals per lot), one negative witness, daunorubicin (4 mg/kg), and three combined batches with 3, 10 and 30 mg/kg of the oleoresin plus Dau (4 mg/kg), in a study that consisted in one week of treatment and another week for recovery, during which blood samples were taken at 0, 72 and 144 hours during treatment and finally at 216 and 288 hours.

The results indicated that the method of extraction can be reproduced and that the oleoresin obtained showed that the lycopene was found in a larger proportion according to the espectrophotometric techniques used. In relation to the genotoxicity, it was proved that the oleoresin did not cause clastogenic or cell toxic effects. Regarding antigenotoxicity, it was observed that all the doses combined diminished the damaged produced by the Dau, specially the larger dose (30mg/kg), therefore,

the oleoresin that contains the lycopene is an agent that protects the cell material, specially the DNA, against mutagen agents producers of free radicals.

**Key words:** diet and cancer, tomato, lycopene, free radicals, genotoxicity, daunorubicin, micronucleous, espectrophotometric assay.

## I) MARCO TEÓRICO

### ***1.1 Relación entre la dieta y el cáncer***

La dieta es un factor importante en la etiología y desarrollo de diferentes tipos de cáncer, su efecto ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista experimental y epidemiológico. Los factores dietéticos estudiados engloban desde macronutrientes como las grasas hasta micronutrientes como sustancias antioxidantes, pasando por grupos de alimentos concretos tales como frutas y verduras, hasta patrones completos de alimentación. <sup>(1)</sup>

En los últimos años se han incrementado los casos de diversos tipos de cáncer, siendo esta enfermedad la tercera causa de morbi-mortalidad por lo que el cáncer es considerado como uno de los mayores problemas de salud pública tanto a nivel mundial como nivel nacional. <sup>(2)</sup>

Las causas del cáncer son multifactoriales y están muy asociadas con el tipo de dieta ya sea en cuanto a la tendencia en el consumo exclusivo de cierto grupo de alimentos, a la cantidad excesiva en su consumo y a la manera de preparación de los mismos que conllevan a una mala alimentación. Es por eso que diversos estudios experimentales sugieren que el uso de alimentos y/o micronutrientes con propiedades antioxidantes, tales como la vitamina C, la vitamina E, los folatos, los flavonoides y los carotenoides tienen un efecto benéfico sobre el riesgo de padecer algún tipo de cáncer, así mismo para combatir este mal se propone utilizarlos en combinación con diversos medicamentos antineoplásicos los cuales tienen diferentes mecanismos de acción como: a) efecto de intercalarse en las bases del ácido desoxirribonucleico (DNA), b) interacción con membranas, c) ruptura de cadenas de DNA, d) producción de radicales libres, provocando la muerte celular o la apoptosis, mecanismo de acción que ejercen no únicamente sobre las células tumorales sino que también conlleva a los efectos adversos tales como el cardiotoxicidad irreversible durante el tratamiento subcrónico de las leucemias agudas en niños y adultos. <sup>(3)</sup>

Considerando lo anterior es indispensable proponer una medida de quimioprevención que consiste en la utilización de determinadas sustancias químicas, naturales o

sintéticas con la función de impedir o revertir una neoplasia maligna invasora, además de que esta estrategia es diferente a la quimio o radioterapia, las cuales desafortunadamente se emplean cuando ya existe la neoplasia y tienen reacciones adversas muy graves. <sup>(3)</sup>

La administración o consumo de sustancias en la prevención del cáncer es una posibilidad real, partiendo de la base que dicha enfermedad puede evitarse o controlarse mediante la interferencia de los factores que intervienen en la iniciación (cambios genéticos iniciales), en la promoción (progresión de la célula iniciada en el proceso carcinogénico con cambios fenotípicos) o en la progresión (daños irreversibles). <sup>(4)</sup>

Los agentes empleados hasta el momento en la quimioprevención han demostrado actividad antimutagénica, antiproliferativa y antioxidante en mayor o menor grado, tales propiedades se han observado en algunos extractos y metabolitos como los fitoquímicos, sustancias biológicamente activas que se encuentran en los alimentos de origen vegetal que no son nutrientes esenciales para la vida, pero tienen efectos positivos en la salud, se encuentran en su forma natural en las plantas (frutas, vegetales, legumbres, granos enteros, nueces semillas, hongos, hierbas y especias) con funciones específicas en la célula que ayudan a disminuir o revertir el daño producido por algún mutágeno. Un ejemplo claro se puede observar en los carotenoides, grupo químico al que pertenece el licopeno, del cual existen algunos antecedentes que demuestran su uso en la quimioprevención propiedad atribuida a su capacidad antioxidante. <sup>(5)</sup>

### ***1.2 Relación entre la mutación y el cáncer***

Las mutaciones son cambios al azar en la cantidad, cualidad (forma) y arreglo de los genes que se transmiten en las replicaciones celulares, con la posibilidad de manifestarse como una alteración cromosómica y/o como un cambio fenotípico en los organismos afectados. Aunque las mutaciones constituyen la base evolutiva natural de cualquier organismo vivo, también pueden ser responsables de alteraciones reproductivas en células germinales y en células somáticas, provocando

enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, alzheimer y el envejecimiento.<sup>(6)</sup>

Todos los seres vivos están expuestos a la acción de diferentes agentes tóxicos, físicos, químicos o biológicos que pueden provocar efectos bioquímicos, fisiológicos o alterar el material genético, repercutiendo en el desarrollo de una enfermedad crónico degenerativa. La exposición a dichos agentes puede ser aguda, cuando en una sola dosis se absorbe una gran cantidad del compuesto, o bien subcrónica o crónica cuando la exposición es continua a dosis bajas durante tiempos moderados o prolongados respectivamente. Es por esto, que la respuesta tóxica que se presenta depende de la concentración y características del tóxico así como del tiempo de exposición al mismo.<sup>(7)</sup>

Los agentes genotóxicos son sustancias que afectan principalmente al material genético de las células, se caracterizan por presentar propiedades físicas y químicas que les permiten interactuar directa o indirectamente con los ácidos nucleicos y que por lo tanto poseen actividad mutagénica y/o carcinogénica. Cuando se presenta la interacción con el ácido desoxirribonucleico (DNA), la alteración puede ser reparada produciéndose o no el daño genético.<sup>(7,8)</sup>

La replicación y reparación del ADN no son procesos perfectos y en muchas ocasiones ocurren alteraciones espontáneas en la integridad genética. Asimismo, las mutaciones resultan de la exposición de los organismos a los agentes mutágenos, los cambios en la estructura del ADN se deben principalmente al rompimiento de los cromosomas y al rezago anafásico durante la mitosis lo que genera alteraciones en la secuencia de los genes.<sup>(9)</sup>

Los mutágenos son compuestos químicos que son capaces de alterar la información contenida en la secuencia de bases del ADN ocasionando efectos adversos a la salud humana, ya que presentan cierta afinidad por las bases nitrogenadas de los nucleótidos, provocando una modificación química en alguna de estas bases y alterando la complejidad del ADN o impidiendo su replicación.<sup>(10)</sup>

En general los mutágenos se han clasificado en físicos (radiaciones), biológicos (virus) y químicos con diferentes mecanismos de acción entre estos se encuentran

diversos agentes ambientales y fármacos, este último grupo es el más amplio y entre los agentes con dicha capacidad se puede mencionar a las antraciclinas que son un grupo de medicamentos utilizados en el tratamiento de diversos tipos de cáncer los cuales se mencionan a continuación:

- DAUNORUBICINA o ADRIAMICINA.: Se utiliza asociada con otros antineoplásicos en leucemias, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer de mama metastásico, de pulmón,
- EPIRUBICINA.: Se utiliza en linfomas malignos, carcinoma de pulmón, mama, gástrico, hígado, páncreas, etc. El problema es que es todavía más cardiopática que la daunorubicina.
- BLEOMICINA: Se emplea en cáncer de testículo, enfermedad de Hodgkin y otros linfomas.
- MITOMICINA: Puede tener utilidad en melanomas, cáncer de estómago y de páncreas.
- MITOXANTRONA: Se utiliza en leucemias y linfomas no Hodgkin. También en cáncer de próstata y hepatocelular. Sus efectos adversos más característicos son cardiovasculares, gastrointestinales y hematológicos o sanguíneos.<sup>(11)</sup>

### **1.3 Daunorubicina (Dau)**

Es un antibiótico que pertenece al grupo de las antraciclinas que se obtiene del hongo *Streptomyces peucetius* var. *Caesius*, posee actividad en el tratamiento de leucemias agudas, tiene una estructura base de tetraciclina unida a un enlace glucosídico de la daunosamina (figura 1).

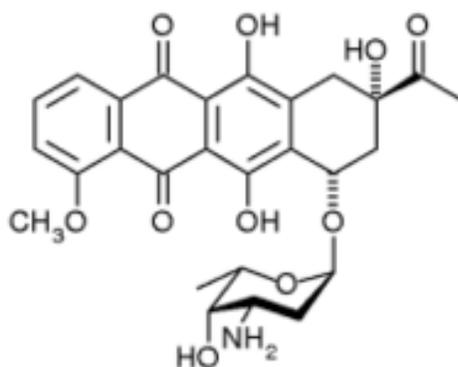


Fig.1: Estructura de la Daunorubicina: [content.answers.com/.../200px-Daunorubicin.png](http://content.answers.com/.../200px-Daunorubicin.png)

Posee actividad antineoplásica contra leucemias granulocíticas crónicas y tumores sólidos mediante los siguientes mecanismos:

- Por intercalación en las bases del ADN : Forma un complejo ternario con la topoisomerasa II y el ADN, provocando la inhibición de la replicación y de la transcripción. <sup>(12)</sup>
- Unión covalente a metabolitos reactivos: Uno de los mecanismos de daño al ADN más importante es la transferencia química de electrones. La reducción de un electrón de la antraciclina, catalizada por flavoproteínas produce el radical de semiquinona de la antraciclina el cual puede transferir un electrón el oxígeno para regenerar al radical hidroxilo ( $^{\circ}\text{OH}$ ). Cuando se une al ADN nuclear, la Dau puede ser metabólicamente activada para producir radicales libres que dañan al ADN. <sup>(13,14)</sup>
- Interacción con membranas: La Dau tiene una alta afinidad por el hierro inorgánico, Fe (III) en sistemas biológicos generando una alta producción de radicales libres principalmente lo hidroxilo los cuales provocan la ruptura de cadenas de ADN. <sup>(15)</sup>
- Producción de radicales libres
- Inhibición de la topoisomerasa II

- Activación de la apoptosis.

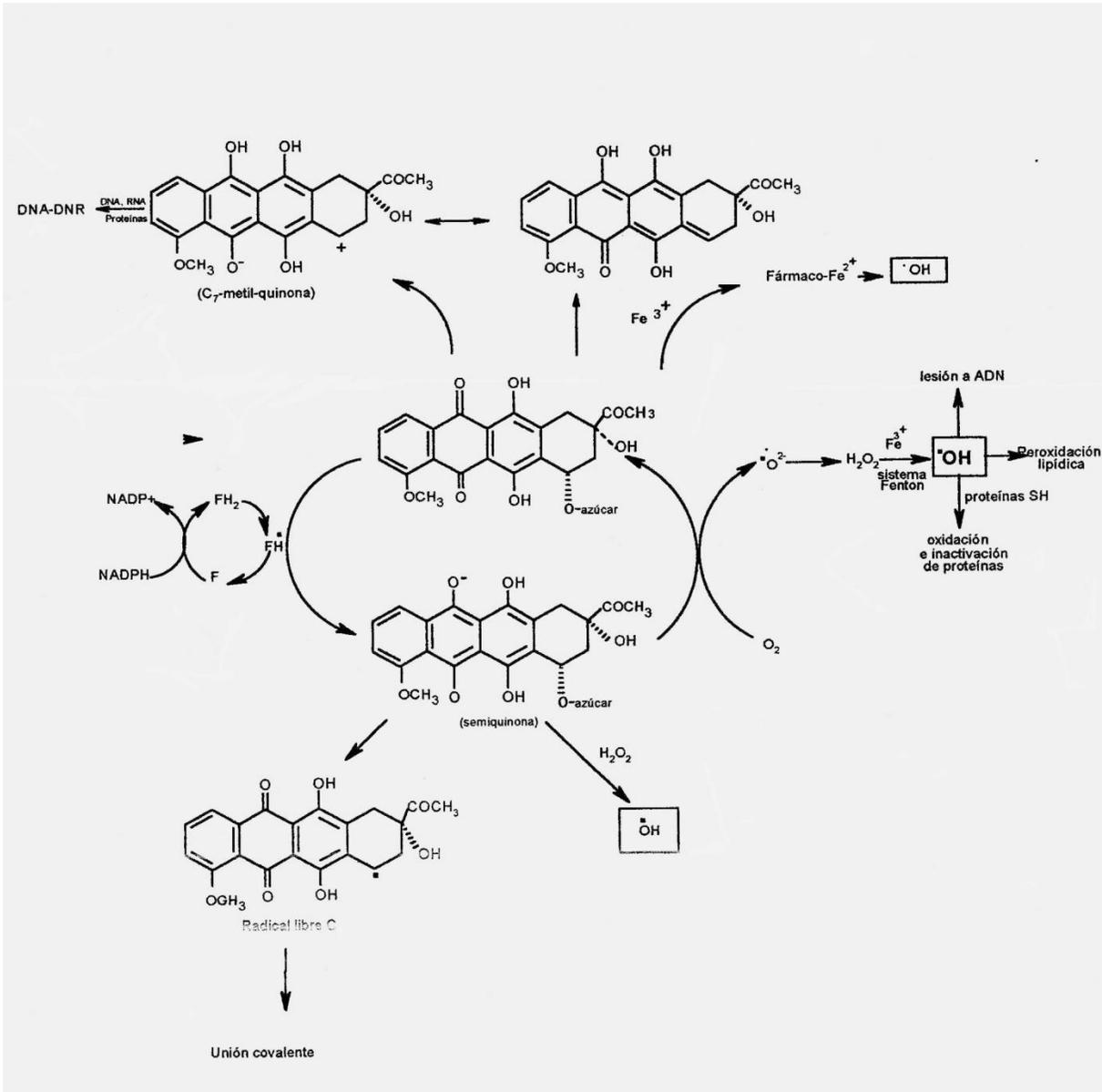


Fig. 2: Mecanismos de activación de la daunorrubicina, formación de radicales libres y sus implicaciones biológicas <sup>(16)</sup>

La Dau se aplica por vía intravenosa y se distribuye rápidamente. El principal paso metabólico es su reducción a daunorrubicinol, el agente citotóxico activo; tanto este como su forma original son sustratos de glucosidasas microsomales presentes en la mayoría de los tejidos ya que son enzimas que hidrolizan a la Dau. Después de la inyección intravenosa, los niveles plasmáticos de Dau disminuyen rápidamente conforme el fármaco es distribuido en los tejidos.

Hay rápida acumulación de esta molécula en corazón, riñones, pulmones, hígado y bazo. Sus manifestaciones tóxicas son depresión de la médula ósea, estomatitis, alopecia, disturbios gastrointestinales y manifestaciones dermatológicas. La cardiotoxicidad es el principal efecto adverso, es irreversible y se caracteriza por taquicardia, arritmia, disnea e hipertensión. <sup>(17)</sup>

Tal y como ya se mencionó los agentes mutagénicos pueden ser de diferentes tipos así como su exposición puede realizarse de forma espontánea o de forma inducida como es el caso de la daunorubicina en este estudio ya que es un agente genotóxico que puede provocar efectos adversos comunes como graves alteraciones en el material genético, por lo que sería de suma importancia administrarlos en conjunto con otras sustancias que protejan al organismo de dicha toxicidad, a este tipo de sustancias se les conoce como antimutagenos.

#### **1.4 Agentes antimutagénicos**

Son sustancias que contrarrestan el daño mutagénico, pueden ser naturales o sintéticos e intervienen en las diferentes fases del proceso carcinogénico mediante al bloqueo de mutágenos a los órganos blanco, ya sea impidiendo su bioactivación o aumentando la actividad de enzimas que los inactivan. <sup>(18/)</sup>

Se les ha encontrado principalmente en (frutas, vegetales, legumbres, granos enteros, nueces semillas, hongos, hierbas y especias e indiscutiblemente en hortalizas como el jitomate.

### **1.5 El jitomate: variedades y sus componentes**

El jitomate por su clasificación taxonómica como (*Lycopersicon esculentum* L.) representa uno de los alimentos más ampliamente consumidos a nivel nacional y mundial, se encuentra en diferentes, entre los que se puede mencionar al jitomate bola, saladet, guaje, cherry y silvestre.

Esta hortaliza es una buena fuente de compuestos polifenólicos, tales como flavonoides, ácido hidroxicinámico, principalmente la naringenina (flavonona) y el ácido clorogénico, en concentraciones que van desde 8 hasta 42 mg/kg y de 13-38 mg/kg de jitomate fresco; además por cada 100 g de jitomate aportan solamente 18 Kcal. La mayor parte de su peso es agua y el segundo constituyente en importancia son los hidratos de carbono, ya que contiene azúcares simples que le confieren un ligero sabor dulce y algunos ácidos orgánicos que le otorgan el característico sabor. Es una fuente importante de ciertos minerales como el potasio y el magnesio, además de que contiene vitaminas como la B1, B2, B5 y la vitamina C. <sup>(19)</sup>

El licopeno y el  $\beta$ -caroteno son los principales pigmentos encontrados en el jitomate, donde el contenido de licopeno es 10 veces mayor que el  $\beta$ -caroteno. Los jitomates son la fuente principal de licopeno en la dieta humana, conteniendo aproximadamente de 40 a 180 mg/kg de peso fresco. <sup>(20)</sup>

En relación a los carotenoides, estos son un grupo de pigmentos orgánicos con función antioxidante y según la coloración que aporten, pueden clasificarse de la siguiente forma:

**Carotenos:** Son compuestos hidrocarbonados que aportan la coloración rojiza o anaranjada a las frutas y verduras. Son los principales precursores de la vitamina A y su transformación ocurre en hígado e intestino delgado. Existen tres tipos principalmente el  $\beta$ -caroteno, el  $\alpha$ -caroteno y el licopeno.

**Xantofilas:** presentan funciones oxigenadas que dan de la coloración amarilla a diferentes plantas o frutas y actúan como protectores frente a la radiación solar. Entre los más comunes se encuentran la Zeaxantina, la Luteína y la Capsantina. <sup>(17)</sup>

Es importantes considerar que la concentración y tipo de carotenoides varia tanto en las variedades de frutas, como dentro de un mismo fruto o legumbre; es decir en el jitomate maduro, el carotenoide mayoritario es el licopeno que lo contiene en aproximadamente en un 83% y en porcentaje también importante, se encuentra el  $\beta$ -caroteno, entre un 3-7%, y otros como son el  $\gamma$ -caroteno, que al igual que el  $\beta$ -caroteno tienen actividad provitamínica A, fitoeno, fitoflueno, etc., además el contenido en licopeno aumenta con la maduración de los jitomates y puede presentar grandes variaciones según la variedad, condiciones del cultivo como el tipo de suelo y clima, tipo de almacenamiento, etc. La cantidad de licopeno en los tomates de ensalada está alrededor de 3000  $\mu\text{g}/100\text{g}$ . De forma general, el contenido de licopeno es menor en los tomates cultivados en invernadero, en cualquier estación, que en los tomates producidos al aire libre durante el verano, así como también el contenido de licopeno es menor en frutos que se recolectan verdes y maduran en almacén en comparación con los frutos madurados en la tomatara. <sup>(21)</sup>

### 1.6 Licopeno

Es un caroteno de tipo acíclico y de estructura sencilla con una cadena alifática formada por 40 átomos de carbono, como ya se mencionó es el principal componente del jitomate, es altamente lipofílico y posee una gran cantidad de dobles enlaces conjugados (Fig. 2). <sup>(20)</sup>

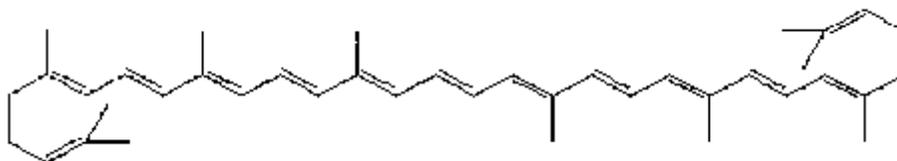


Fig. 2: Estructura del licopeno: [www.dict.uh.cu/Bib\\_Dig\\_Food/ot-doc/alimfunc.htm](http://www.dict.uh.cu/Bib_Dig_Food/ot-doc/alimfunc.htm)

Además del jitomate, la sandía y la toronja que lo contienen en gran cantidad, pero en general se puede encontrar en verduras y frutas que presentan colores rojos o

naranjas intensos, lo mismo, se ha encontrado en subproductos del jitomate como las salsas, jugos, jitomate frito y el condimento de jitomate. <sup>(19)</sup>

Es importante considerar que existen algunos factores que afectan su asimilación en el organismo, como la madurez de la hortaliza, las distintas variedades o la forma de cocinarlo. Aunque se ha observado que cuanto más rojos y más maduros están los jitomates, mayor es el contenido en este pigmento. Algunas variedades como los "tipo pera", son diez veces más ricos en licopeno que un jitomate de ensalada de unos 200 gramos, que contiene alrededor de 4 miligramos. <sup>(19)</sup>

También la manera en que el licopeno se incorpora o absorbe a nuestro organismo, es diferente y depende de la forma en que se consume; aunque se ha observado que su absorción se facilita cuando se mezcla con aceites.

Las investigaciones confirman que la absorción intestinal del licopeno es mucho mejor (hasta 2,5 veces más) si se consume cuando se calienta como las salsas, que en la fruta o jugo natural, debido a que el licopeno se absorbe mejor a través de las grasas y aceites por su liposolubilidad y con temperaturas altas se rompen las paredes celulares del fruto, que son las que dificultan la absorción del licopeno. <sup>(22)</sup>

El licopeno se encuentra presente en el organismo humano en sangre en una cantidad aproximada de 30 µg/dl teniendo posteriormente un tiempo de vida de 12-20 horas, se acumula generalmente en los tejidos adiposos, no se transforma y tiene interacción con la colestiramina, colestipol, el aceite mineral, el orlistato, β-caroteno, los triglicéridos de cadena mediana, la pectina, y los aceites. <sup>(23)</sup>

Su obtención por síntesis química aún no está totalmente establecida, los sistemas de extracción son costosos y el licopeno *per se* presenta una baja estabilidad, debido a que es fotosensible y fácilmente oxidable, por lo que se ha limitado su utilización como colorante alimenticio ya que solo se extrae de fuentes naturales a la cual se le denomina oleoresina que es una exudación resinosa natural de color rojizo procedente del jitomate, extraída de materia botánica usando solventes. Está

formada casi en su totalidad por una mezcla de aceite esencial y resina que contiene licopeno y  $\beta$ -carotenos.

Se le atribuyen no sólo funciones antioxidantes, sino también las siguientes propiedades:

- Favorece la disminución del colesterol en sangre: La oxidación celular ocurre de manera natural, afectando a todos los tejidos, incluyendo también a los elementos grasos del plasma sanguíneo, especialmente al llamado colesterol malo (LDL).
- Se cree que reduce el crecimiento neoplásico, propiedad observada en cáncer de pulmón, vejiga, estómago y cuello del útero y que puede estar relacionada con la capacidad de inhibir a los radicales libres que se producen continuamente. Además también interfiere en las rutas metabólicas, con la expresión de genes implicados en funciones de reparación y en el control del ciclo celular. <sup>(21)</sup>

### **1.7 Antecedentes experimentales de la oleorresina y del licopeno**

En la tabla 1 hace referencia a los estudios experimentales y epidemiológicos realizados con la oleorresina y con el licopeno en los últimos años, ya que demuestran efectos positivos del licopeno contra diferentes tipos de daño por cáncer en algún órgano específico, por varios mecanismos de acción mediante tres fases de experimentación que son *in vitro*, *in vivo* y el consumo directo en humanos demostrando en los tres niveles su alto poder para contrarrestar el daño, ya sea solo o en combinación con otras sustancias con base a estos resultados se pretendió demostrar el efecto de la oleorresina contra el efecto producido por un medicamento antineoplásico ya que no existen antecedentes al respecto.

**Cuadro 1:** Antecedentes experimentales de la oleorresina y licopeno.

<b>Estudio</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
<i>In vitro</i>	Actividad antioxidante y antiproliferativa en líneas de células cancerosas, actividad antimetastásica y aumento de la síntesis de enzimas protectoras.	Van, B. y cols., 2008.
<i>In vitro</i>	El licopeno es un agente quimiopreventivo sobre el daño cromosómico producido por el peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).	Scolastici, C. y cols., 2008.
<i>In vitro</i>	µg/ml de licopeno protegen a linfocitos sobre el daño que produce la radiación gamma.	Srinivasan M y cols. 2009.
<i>In vitro</i>	Efecto protector del β-caroteno y licopeno sobre células de adenocarcinoma.	Palozza, P. y cols., 2009.
<i>In vivo</i>	El licopeno y extracto de jitomate disminuyó el hepatocarcinoma inducido por la dietilnitrosamina en ratas.	Wang, Y. y cols., 2008.
<i>In vivo</i>	Acción protectora del licopeno a dosis de 1 y 2 mg/kg al día, más vit. E de 50 mg/kg de Vit. E, disminuyeron significativamente el daño al miocardio ocasionado por el estrés oxidativo en ratas.	Parvin, R. y cols., 2008.
Humanos	Dieta rica en jitomate y licopeno a 24, 48 y 72 h actúan en la reducción de cáncer, disminución en proliferación celular del grupo con licopeno a las 24 h.	Burguess, LC. y cols., 2008.
Humanos	Licopeno a dosis de 15 mg/día disminuyó síntomas y proliferación del cáncer en pacientes diagnosticados con hiperplasia prostática benigna y disminución del antígeno prostático después de 6 meses.	Schwarz, S. y cols., 2008.
Humanos	Asociación entre consumo de licopeno en jitomate,	Ferreira,

	frutas que lo contienen y derivados disminuyeron el daño crónico de cáncer y daño cardiovascular.	AL. y cols., 2007.
Humanos	Carotenoides presentes en frutas y verduras pueden contribuir a la protección contra el cáncer renal.	Lee, Je. y Cols., 2009.

## II) PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El cáncer es la primera causa de mortalidad en las mujeres y la segunda entre hombres. En el año 2005 se produjeron 63,128 defunciones por esta causa, siendo responsable del 12.7% del total de fallecimientos en México. El papel de la dieta en el desarrollo del cáncer es un factor importante que ha sido ampliamente estudiado desde diferentes aspectos incluyéndose la investigación animal y humana.

Y en virtud, de que no existe un tratamiento idóneo para su control es necesario buscar sustancias que reduzcan la posibilidad de desarrollar algún tipo de cáncer o en su defecto, disminuir los efectos adversos producidos por la quimioterapia principalmente por antineoplásicos como la daunorubicina.

En la búsqueda de compuestos protectores existen estudios que demuestran que dicha estrategia se pueden encontrar sustancias presentes en los alimentos, como en el caso de la oleorresina y el licopeno que tienen propiedades antioxidantes, cardioprotectores, antimutagénicos, nefroprotectores, que disminuyen progresivamente diferentes tipos de cáncer como el de pulmón, colon, mama, próstata, es por eso que es necesario seguir profundizando en el estudio de esta sustancia como posible agente quimiopreventivo. Además, no se han evaluado sus efectos en un experimento subcrónico a nivel de sangre periférica contra la Dau, mediante la técnica de micronúcleos.

¿La oleorresina tendrá actividad antígenotóxica contra el daño producido por la daunorrubicina en ratones?

### III) JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado que el consumo de jitomate y productos derivados del mismo (pastas, purés) están inversamente relacionados con la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas. El licopeno y el  $\beta$ -caroteno son los principales pigmentos contenidos en la oleorresina del jitomate, éste es la principal fuente de licopeno en la dieta humana, por lo tanto puede ser una alternativa quimiopreventiva, ya que ha demostrado que posee actividad cardioprotectora y efectos antimutagénicos frente a diversos agentes genotóxicos, así como protección contra el daño renal, el cáncer gástrico y el cáncer de colon. Efectos que se han atribuido principalmente a sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, no se ha estudiado en un modelo antigenotóxico *in vivo* frente a agentes antineoplásicos productores de radicales libres como la daunorubicina, lo cual contribuiría a considerar la conveniencia de utilizarlo en la coadministración y quimioprevención en humanos.

Hasta la fecha, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), todavía no cuentan con suficientes evidencias para considerar al licopeno como un agente quimioprotector, por lo que aun se encuentra en la fase II de estudios clínicos( cuadro 2). Por lo tanto, es necesario realizar más estudios que contribuyan a dilucidar el efecto del licopeno sobre diversos agentes y en el caso de la presente investigación contra el daño genotóxico provocado en este caso por la daunorubicina en un modelo experimental *in vivo*.

Así la obtención de la oleorresina que contiene al licopeno se obtuvo a partir del jitomate ya que el costo comercial es muy elevado, es por eso que para garantizar la pureza de la oleorresina se llevaron a cabo las técnicas espectrofotométricas que indican la autenticidad de los componentes, además de que la oleorresina contiene carotenos que actúan en sinergia con el licopeno contenido para una mejor protección.

## **IV) OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

- Evaluar la capacidad antigenotóxica de la oleorresina del jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.) mediante la técnica de micronúcleos *in vivo* contra el daño producido por la daunorubicina.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Obtener la oleorresina del jitomate por medio de una extracción soxhlet.
- Identificar grupos químicos característicos del licopeno por medio de espectrofotometría de UV-VIS, Infrarrojo, fluorescencia, masas, Resonancia Magnética Nuclear y cromatografía de gases.
- Cuantificar el licopeno presente en la oleorresina por medio de una ecuación reportada por Cardona y ríos.
- Evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad de la oleorresina mediante la técnica de micronúcleos.
- Evaluar la antigenotoxicidad y anticitotóxicidad de la oleorresina.

## **V) HIPÓTESIS**

Si el licopeno es una sustancia con poder antioxidante, entonces protegerá a los animales tratados con la daunorubicina y dicho efecto protector se confirmara con la disminución en la cuenta de ENCMN y la normalización de la relación de células jóvenes con respecto a células maduras (EPC/ENC).

## VI) METODOLOGIA

El jitomate bola utilizado en el presente experimento fue adquirido en la central de abasto de la Cd. de Pachuca de Soto, Hidalgo durante los meses de noviembre de 2008 y marzo de 2009, procedente del estado de Querétaro.

**6.1 Tipo de estudio:** el estudio fue de tipo experimental, prospectivo y longitudinal.

**6.2 Material biológico:** se usaron ratones macho cepa cd1+ con un peso aproximado de  $20 \pm 2$  g, mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura ( $27^{\circ}\text{C}$ ), humedad 45%, ciclos luz-oscuridad de 12x12 h, obtenidos del bioterio del instituto de ciencias de la salud de la uaeh.

### **6.3 Reactivos y equipo:**

Hexano (J.T.Baker), colorante Giemsa (Merck), buffer de fosfatos  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Sigma-Aldrich), y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Sigma-Aldrich) a  $\text{pH} = 6.8$ , aceite de inmersión, alimento teklad global para roedores 18% proteína, esterilizable (2018Sn Harlan laboratorios), Rubilem (Iemery).

- Microscopio binocular (marca Olympus CX21FS1)
- Rotavapor marca BUCHI R 200
- Bomba de vacío BUCHI Vacuum Pump V-700
- Refrigerante Neslab RTE17 Digital One
- Espectrofotómetro de masas (Perkin Elmer AutoSystem XL)
- Espectrofotómetro Infrarrojo (Nexus 470 FT-IR E.S.P. Nicolet)
- Espectrofotómetro de UV-VIS (Jenway 6505)
- Espectrofotómetro de Fluorescencia
- Espectrofotómetro de RMN
- Cromatografía de Gases
- Balanza Analítica (Vibra AF-R220E)
- Báscula digital (AWS digital pocket scale AMW-550)
- Estufa (Fisher Scientific)
- Bordex (Barnstead Thermolyne type 16700 Miter)

**6.4 criterios de inclusión:** ratones machos de la cd1+ con un peso aproximado de 18-22g.

**6.5 criterios de exclusión:** todos los animales enfermos durante el período de adaptación y en la fase experimental y hembras.

**6.6 Población de estudio y acondicionamiento de animales:** Se usaron 44 ratones macho de la cepa cd1+, obtenidos del bioterio de la universidad autónoma del estado de hidalgo en el instituto de ciencias de la salud e instalados en jaulas de plástico con rejillas de acero inoxidable con bebedero y cama de aserrín, una vez instalados se dejaron por unos días para el periodo de aclimatación y un día antes del experimento se dejaron con 8 hrs de ayuno.

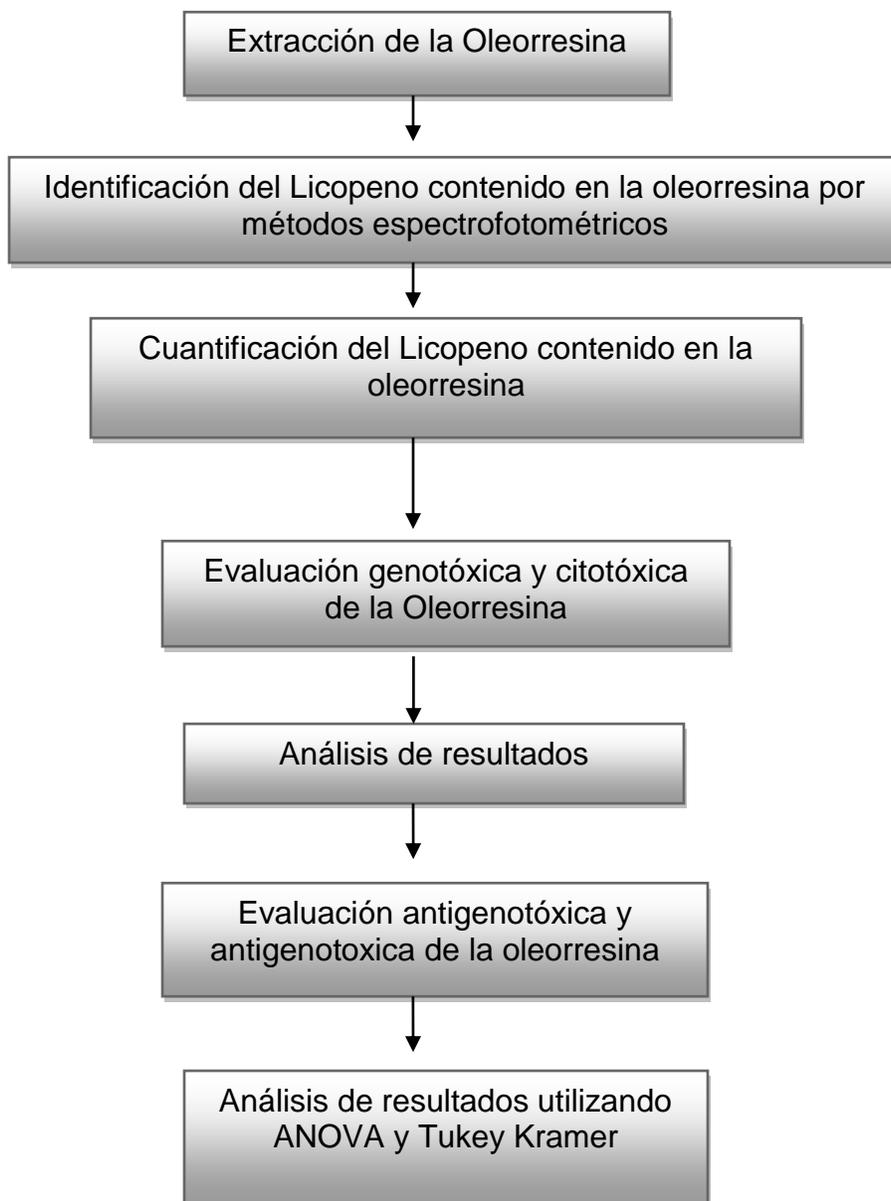
**6.7 Toma de muestras:** se tomaron muestras sanguíneas de manera individual, se inmovilizaron los animales procurando que la cola pudiera manipularse, se desinfecto con etanol al 70% y se corto aprox. 1mm de la punta de la cola con tijeras de disección desinfectadas.

**6.8 Frotis sanguíneo:** la primera gota de sangre se eliminó, la segunda gota fue depositada en un portaobjetos previamente desengrasado y con otra laminilla se procedió a realizar el frotis con un ángulo de 45°, se dejaron secar a temperatura ambiente, se marcaron y posteriormente se fijaron en metanol por 10 minutos.

Una vez fijadas las laminillas se llevaron a tinción para lo cual en un vaso coplin que contenía el colorante Giemsa se sumergieron durante 20-25 minutos; al termino de este tiempo se lavaron con agua y se dejaron secar para su análisis al microscopio.

**6.9 análisis estadístico:** los resultados se expresaron como la media de cada grupo las diferencias entre los lotes y tiempos fueron evaluados por un análisis de varianza (anova) de dos vías con un nivel de significancia de  $p < 0.001$ , teniendo como variables independientes al tiempo y al tratamiento. el análisis estadístico fue realizado con el programa sigma stat 2.03 y evaluado con la prueba de tukey-kramer.

## 6.10 Metodología general



## 6.11 Extracción de la oleorresina

La extracción de la oleorresina del jitomate se realizó mediante el siguiente esquema.

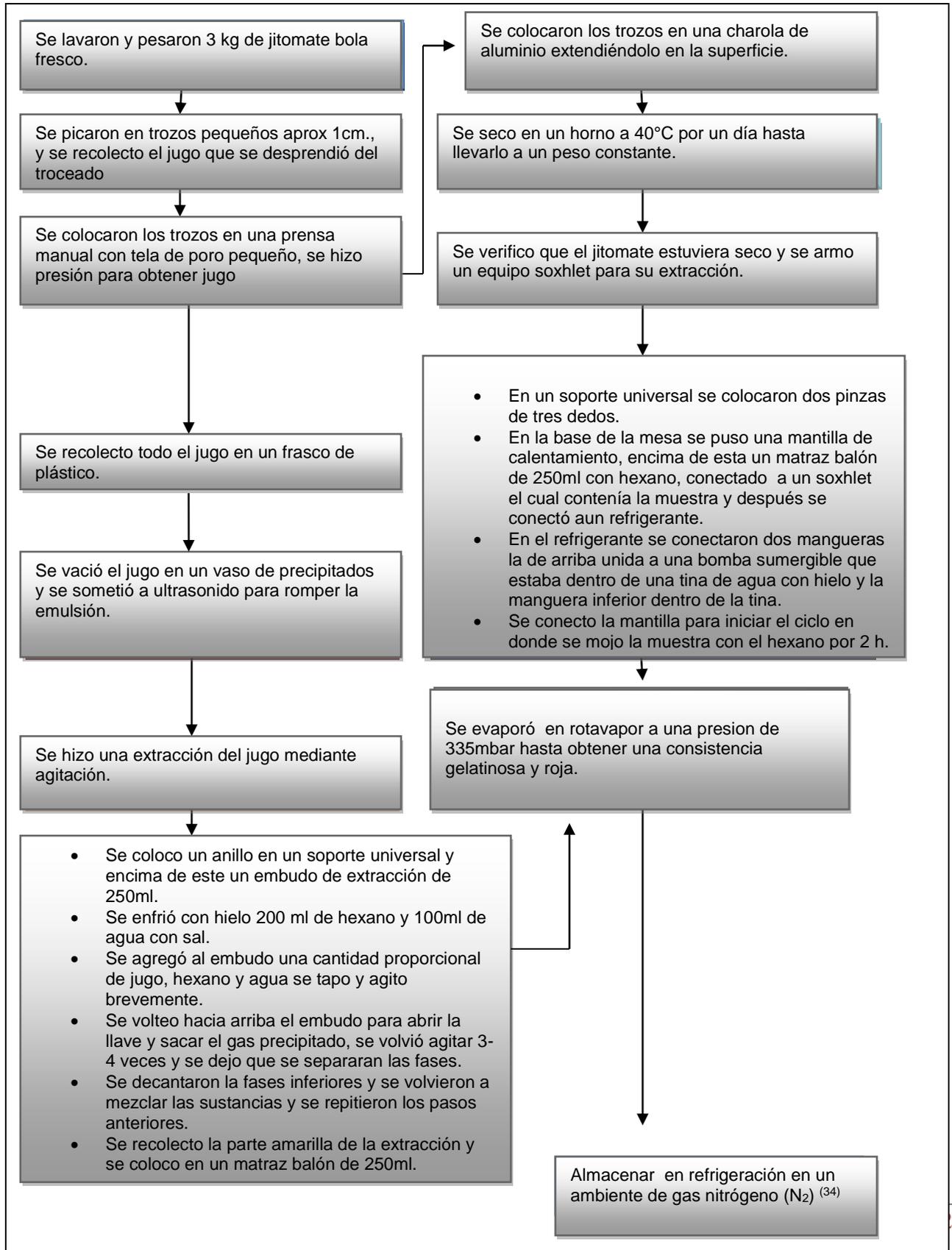




Fig. 4: separación de fases de extracción de la oleorresina jugo de jitomate.

## **6.12 Identificación del Licopeno**

Después de obtener la oleorresina se identifico por técnicas espectrofotométricas para identificar los componentes de esta, así como también comprobar que la ausencia de contaminantes en el extracto.

### **6.12.1 Espectrofotometría Infrarroja**

Es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético, puede ser utilizada para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra, se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y posiblemente el acoplamiento vibracional.

Si la molécula recibe luz con la misma energía de esa vibración, entonces la luz será absorbida si se dan ciertas condiciones. Para que una vibración aparezca en el espectro infrarrojo, la molécula debe someterse a un cambio en su momento dipolar

durante la vibración. Los enlaces pueden vibrar de seis maneras: estiramiento simétrico, estiramiento asimétrico, tijeras, rotación, giro y “wag”. <sup>(35)</sup>

### **6.12.2 Espectrofotometría de UV-VIS**

La espectrometría de UV-VIS, mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra. La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría UV/VIS puede usarse para determinar la concentración de una solución. <sup>(35)</sup>

### **6.12.3 Espectrofotometría de Fluorescencia**

Es un tipo de espectroscopia electromagnética que analiza la fluorescencia de una muestra, utiliza un haz de luz, por lo general luz ultravioleta, que excita los electrones de las moléculas de ciertos compuestos y provoca que emitan luz de una menor energía, generalmente luz visible. <sup>(35)</sup>

### **6.12.4 Espectrofotometría de Masas**

La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas por su diferente masa. Es una técnica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para mostrar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas de muestra y obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. <sup>(35)</sup>

En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para afectar la ionización. En la técnica clásica de impacto electrónico, algunas de las moléculas ionizadas del analito explotan en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante así como los iones residuales constituyen el espectro de masas. <sup>(35.36)</sup>

### **6.12.5 Cromatografía de Gases**

Es un método de análisis para la separación e identificación de todo tipo de sustancias orgánicas volátiles y análisis cualitativo y cuantitativo de los componentes de una mezcla.

La muestra se inyecta por un puerto que se encuentra a una temperatura más alta que la de ebullición de las sustancias a analizar. El vapor pasa a una columna que está dentro de un horno de temperatura regulada, donde ocurre la separación. A la salida de la columna hay un detector y su señal se envía a una computadora para obtener el cromatograma. El tiempo de análisis varía de menos de un minuto a 1-2 horas. <sup>(35,36)</sup>

### **6.12.6 Resonancia Magnética Nuclear**

Es una técnica que explota las propiedades magnéticas de ciertos núcleos. Las aplicaciones más importantes para su uso en química orgánica son la espectrometría RMN de protones y la de carbono-13. En principio, la RMN es aplicable a cualquier núcleo que posea espín.

Cuando se sitúan dentro de un campo magnético, los núcleos activos de RMN (como el 1 H, o el 13 C) absorben a una frecuencia característica del isótopo. La frecuencia de resonancia, la energía de la absorción y la intensidad de la señal son proporcionales a la fuerza del campo magnético. <sup>(35)</sup>

### **6.13 Cuantificación del Licopeno**

Para demostrar la presencia del licopeno se utilizó la técnica de espectrofotometría UV-VIS en donde se hizo un barrido de 400 a 600nm de longitud de onda dando como resultado tres picos consecutivos en donde el pico más alto a 475 nm muestra la concentración del licopeno y los picos de a lado corresponden a  $\beta$  carotenos según reporta la bibliografía. También se leyó la absorbancia del compuesto dando un factor numérico que se utilizó sustituyendo en una ecuación (ver fórmula) citada en la bibliografía para obtener el rendimiento del licopeno. <sup>(34)</sup>

- El matraz a ocupar se llevo a peso seco en una estufa por 24 hrs, posteriormente se agrego el hexano con la muestra proveniente de la extracción para rotaevaporar y obtener la oleorresina en gramos que fue la diferencia de peso del matraz antes y después de la evaporación.

$$\frac{\mu g \text{ licopeno}}{100 \text{ g de pulpa}} = \frac{A * V(ml) * 10^4}{E * m(g)} * 100g$$

**A= ABSORBANCIA**

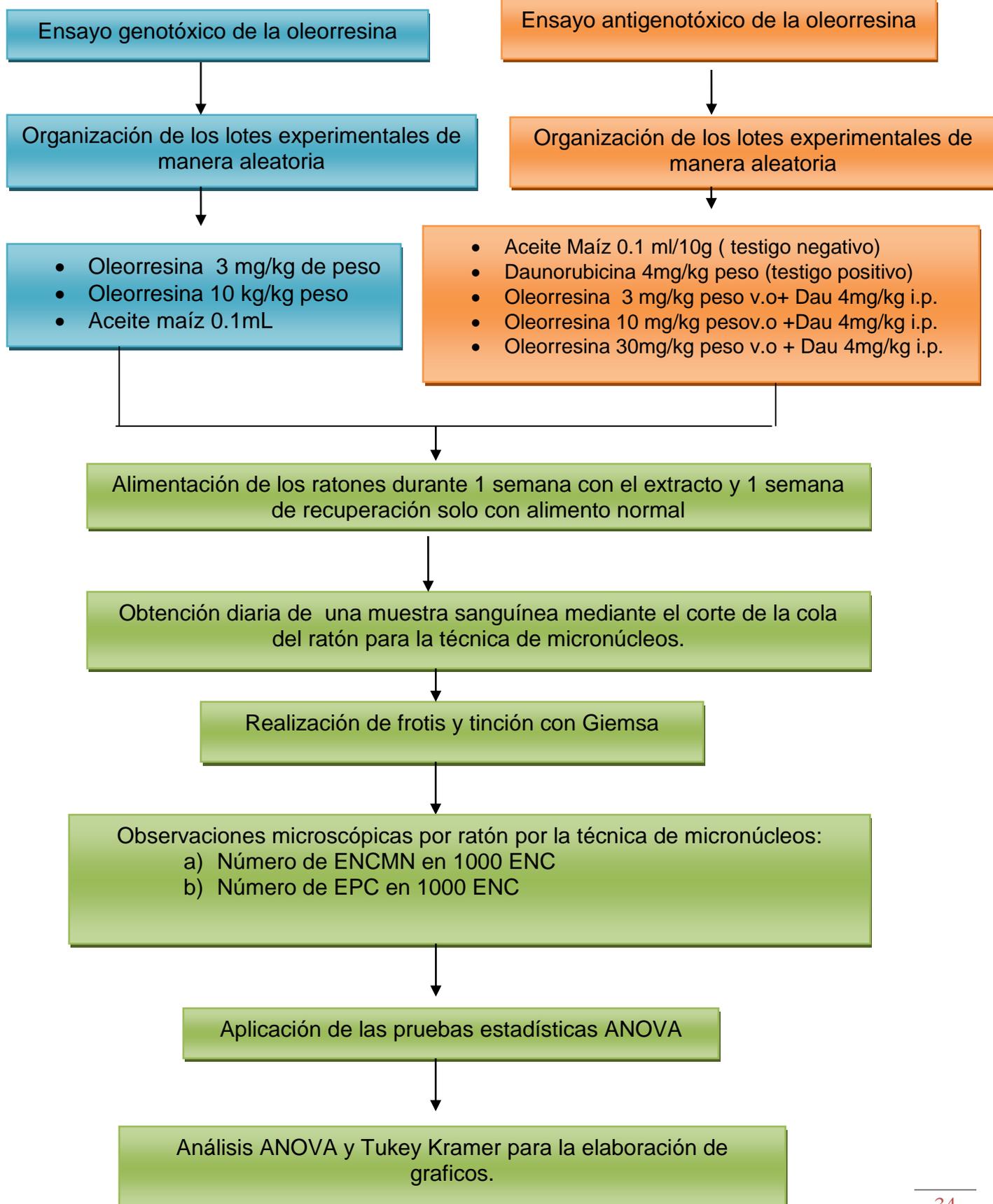
**V= VOLUMEN DEL DISOLVENTE**

**E= CONSTANTE 3310**

**m= PESO EN GRAMOS DEL MATERIAL DEL MATRAZ**

**g= gramos**

## 6.14 Diseño experimental del ensayo Genotóxico y Antigenotóxico



### **6.15 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS (MN)**

La evidencia de fragmentos intracitoplasmáticos de cromatina en eritrocitos circulantes, permite evaluar el daño ocasionado por agentes causantes de rezago anafásico durante la mitosis o de compuestos que dañan el material genético provocando rupturas; por lo tanto el método de micronúcleos se considera útil y recomendado internacionalmente por la EEC (Comunidad Económica Europea) y la OECD (Organización Europea para la Cooperación y el Desarrollo) como parte de los requerimientos mínimos para la evaluación de la seguridad toxicológica de nuevos productos farmacéuticos, mediante la determinación del daño cromosómico en células anucleadas como los eritrocitos, o bien en el citoplasma de células nucleadas como los linfocitos o las espermatogonias. <sup>(37.38)</sup>

La eritropoyesis es un proceso que se efectúa en la médula ósea e incluye numerosas divisiones celulares que se inician a partir de una célula hematopoyética madre y culmina con la diferenciación del eritrocito. En las últimas etapas del proceso se pueden observar dos tipos celulares, los eritrocitos policromáticos (EPC), que son células inmaduras que contienen ARN y sintetizan ciertas proteínas, éstas obtienen el hierro que necesitan para la síntesis de hemoglobina, mediante la unión de la proteína plasmática transportadora de hierro o transferrina, a receptores específicos de la superficie de la célula (CD71). Al completar su síntesis de hemoglobina, los EPC disminuyen de tamaño, pierden su receptor de transferrina y terminan su maduración convirtiéndose en ENC. Durante las etapas previas a la formación de estos dos tipos de eritrocitos, las células sanguíneas pueden ser atacadas por xenobióticos y sufrir lesiones cromosómicas que se manifiestan como MN, los cuales permanecen en el eritrocito, aun cuando el núcleo principal se haya expulsado (fig. 3). El hecho de que en un estudio agudo el monitoreo de la presencia de MN se realice en eritrocitos policromáticos (EPC), se debe a que estas células jóvenes (reticulocitos) son producidas y liberadas durante el tiempo de estudio (de 1 a 4 días). Es por ello que constituyen una forma eficaz de evaluar la capacidad clastogénica de los compuestos en un tiempo corto.

Los EPC presentan una coloración que incluye a la basofilia y la eosinofilia. Como todavía contienen ácido ribonucléico se observan con un tinte azulado violáceo, su tamaño es un poco mayor al de los eritrocitos normocrómicos y son células que proceden de los normoblastos que pierden su núcleo antes de que la hemoglobinización sea completa, generalmente un aumento en su número indica una eritropoyesis aumentada. De tal forma que a demás de identificar el potencial genotóxico del xenobiótico, es posible sugerir su citotoxicidad cuantificando de la relación que existe entre los EPC y los eritrocitos normocrómicos (ENC). (39,40)

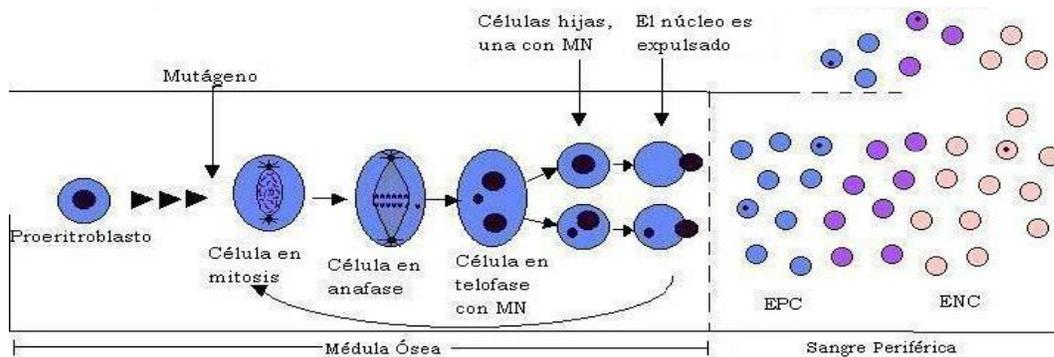


Fig. 5: Formación de micronúcleos durante el proceso de eritropoyesis y su observación microscópica en sangre periférica. Modificado de Madrigal y cols., 2002.

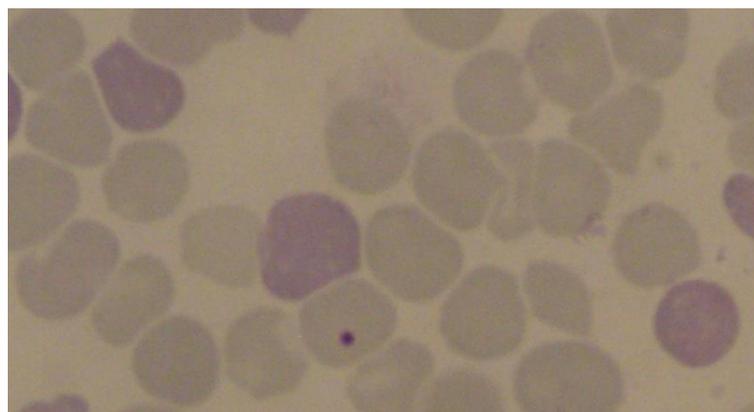


Fig. 6: Muestra de MN visto por microscopio.

## VII) RESULTADOS

### 7.1) *Espectrofotometría Infrarrojo*

El espectro que permitió identificar la presencia del licopeno en la oleorresina por su absorción en la región infrarroja se muestra en la figura 4. Se puede observar que el licopeno tuvo una absorción máxima a 3000 nm, indicando la presencia de dobles enlaces conjugados.

### Espectrofotometría infrarroja de la oleorresina

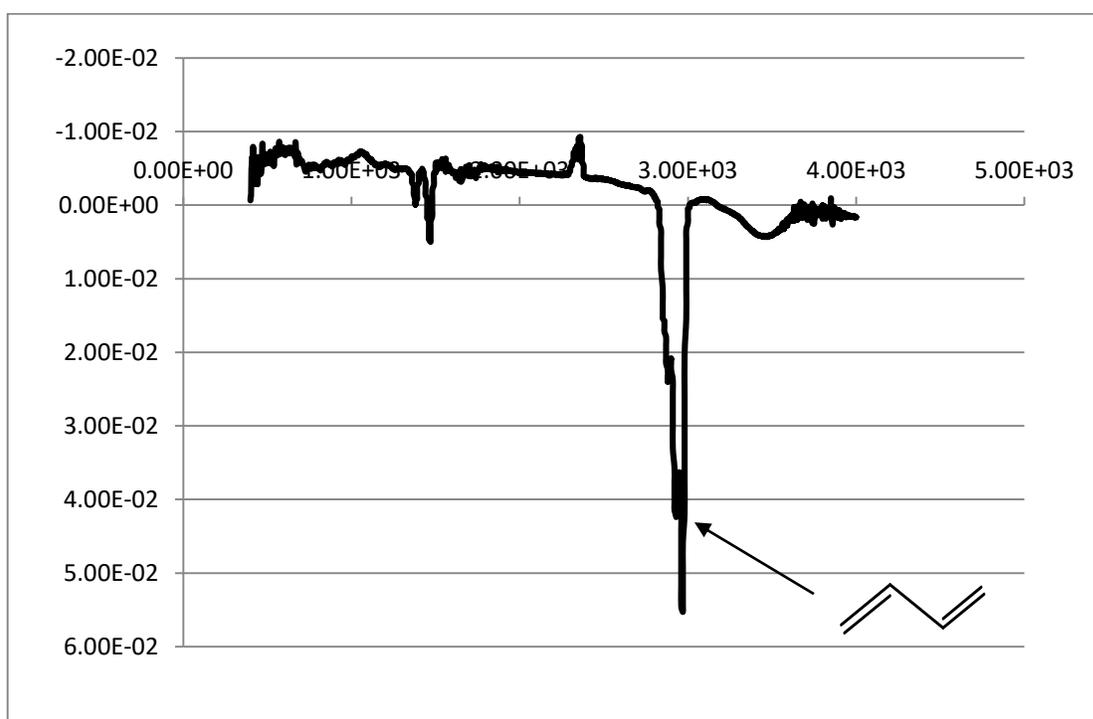


Fig. 7: Estrechamiento C-H, doble enlace conjugado: 3,000  $\text{cm}^{-1}$  (Silverstein, 1991).

De acuerdo a las tablas de identificación para compuestos formados por dobles enlaces conjugados, la banda de estrechamiento C-H presenta su máxima absorbancia a 3000 nm por lo que comparando dichas tablas con la gráfica obtenida, coinciden con la estructura del extracto ya que el licopeno está formado por carbonos e hidrógenos que es su principal estructura, también los picos que acompañan se describen como carotenoides contenidos en la oleorresina. <sup>(36)</sup>

## 7.2) Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

### Espectrofotometría de UV-Vis de la oleorresina

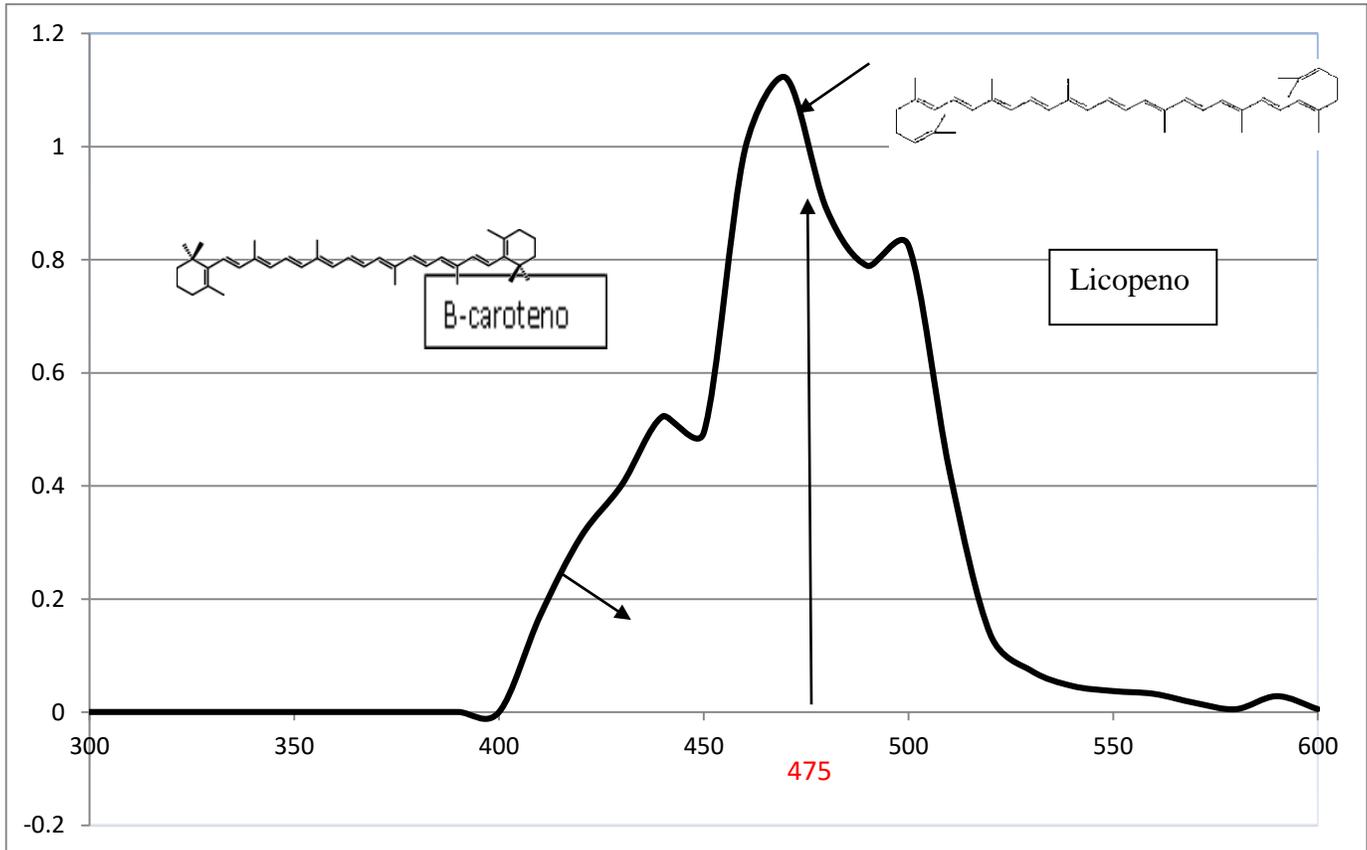


Fig. 8: Se indica que la máxima absorción del licopeno contenido en la oleorresina fue a 475 nm

Las referencias bibliográficas señalan, la absorbancia máxima del licopeno en hexano a 474nm por lo que en la grafica obtenida del extracto (licopeno) corresponde a la señalada en la bibliografía. <sup>(36)</sup>

### 7.3) Espectrofotometría de fluorescencia

#### Espectrofotometría de fluorescencia de la oleoresina

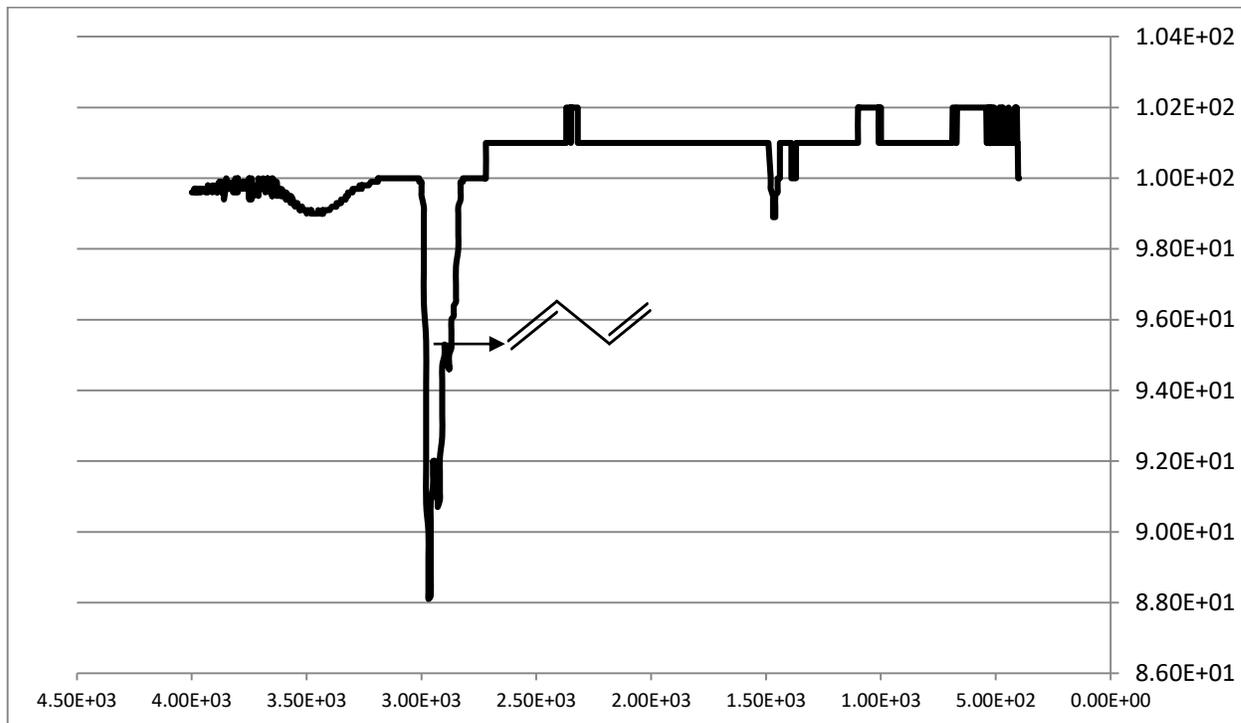


Fig. 9: Se muestra la presencia de licopeno a una longitud de onda de 3000cm<sup>-1</sup>.

De acuerdo a las tablas de identificación para compuestos formados por dobles enlaces conjugado, la banda de estrechamiento C, H presenta su absorbancia a 3000 nm por lo que comparando dichas tablas con la grafica que se presenta coinciden con la estructura del extracto (licopeno) ya que está formado por carbonos e hidrógenos que es su principal estructura, también los picos que acompañan se describen como carotenoides propios del extracto. <sup>(36)</sup>

### 7.4) Espectrofotometría de masas

El rompimiento de masas se realizó mediante impacto electrónico (EI) en donde se presentan los rompimientos másicos (m/z) característicos del licopeno, su pico molecular y su ion principal.

## Espectrofotometría de masas de la oleorresina

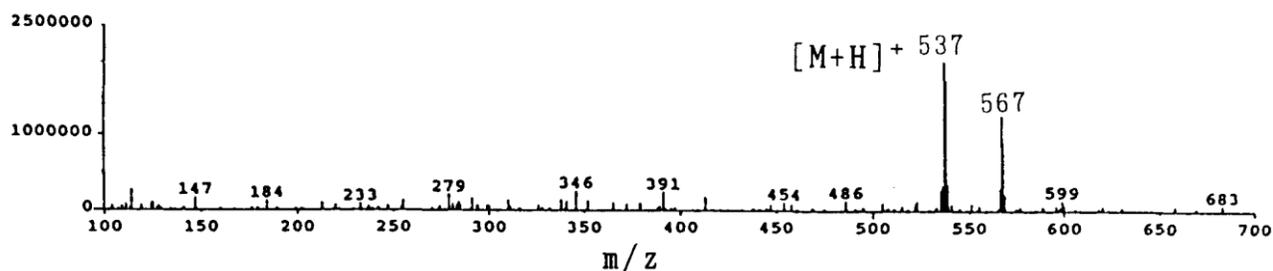


Fig. 10: Espectro inicial de masas de licopeno obtenido con un equipo HP GC-TANDEM(TOF)MS que es un sistema de cromatografía de gases con colector de cuádruplo combinado con un detector de tiempo de vuelo.

## Espectrofotometría de masas utilizando Tandem iónico (TOF) en el modo NICI

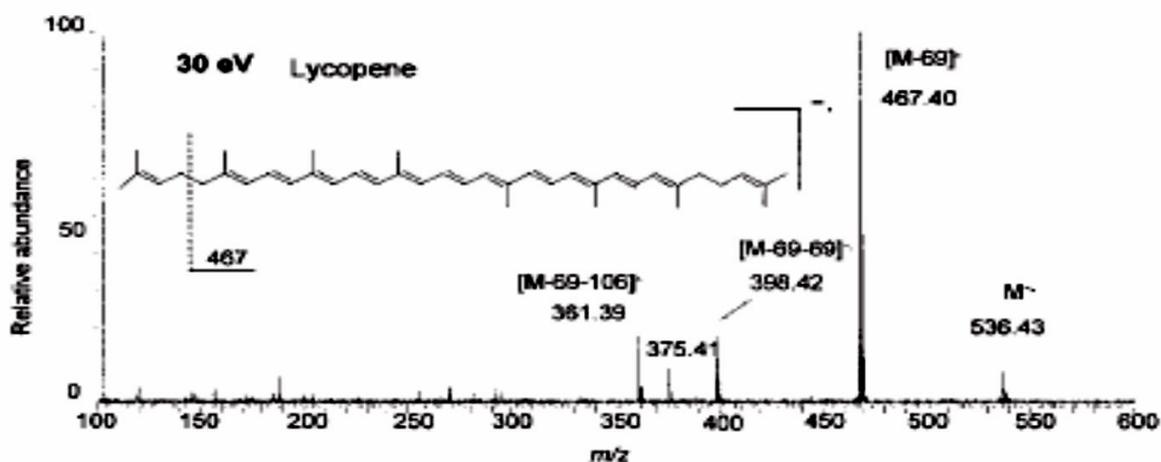


Fig. 11: Espectro de tándem iónico del Ion radical  $m/z$  536.43 del licopeno con el modo NICI (ionización química del Ion negativo). La disociación inducida por colisión fue realizada con gas Argón a 30 eV.

## 7.5) Cromatografía de gases

### Cromatografía de Gases de la oleorresina

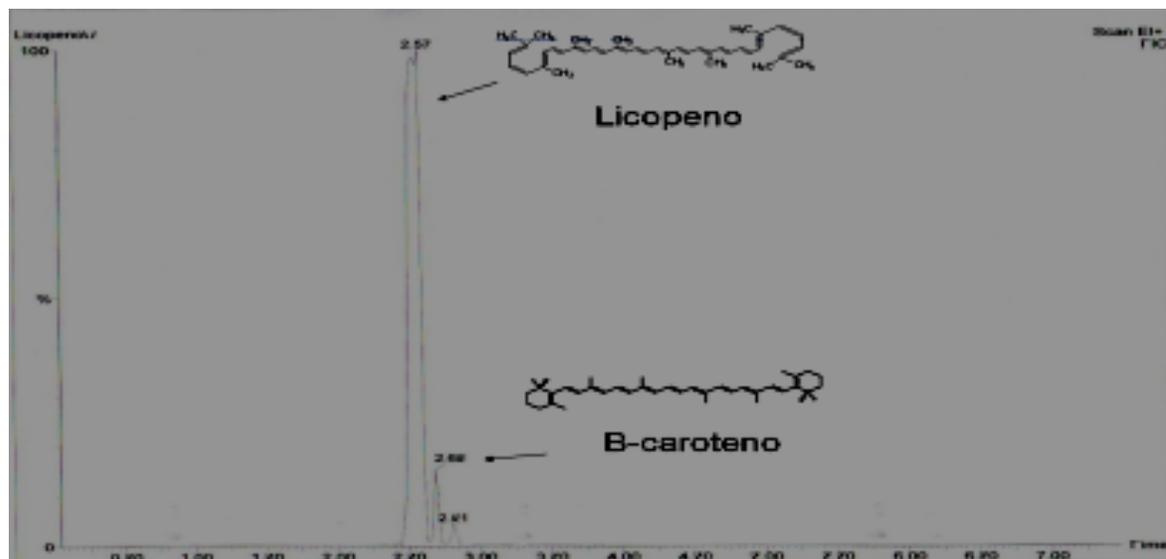


Fig. 12: Gráfica experimental que muestra la presencia de licopeno por la técnica de Cromatografía de gases. El tiempo de retención para el licopeno es de 2.57 min. B-caroteno es 2.68 y el compuesto minoritario, posible descomposición del licopeno aparece a los 2.81.

## 7.6) Resonancia Magnética Nuclear

### Resonancia Magnética Nuclear de la oleorresina



Fig. 13: Espectro de RMN de H (protón) utilizando  $\text{CDCl}_3$  (cloroformo deuterado) como disolvente. Se observa a campo alto las señales de metilos y a campo bajo a 5ppm los grupos conjugados C-H que contiene el licopeno.

### 7.7) Rendimiento de la oleorresina

$$\frac{\mu\text{g licopeno}}{100 \text{ g de pulpa}} = \frac{1.426 * 4(\text{ml}) * 10^4}{3310 * 1.143} * 100\text{g} = 150\text{mg licopeno}$$

Rendimiento: 150mg licopeno

### 7.8) Genotoxicidad de la Oleorresina

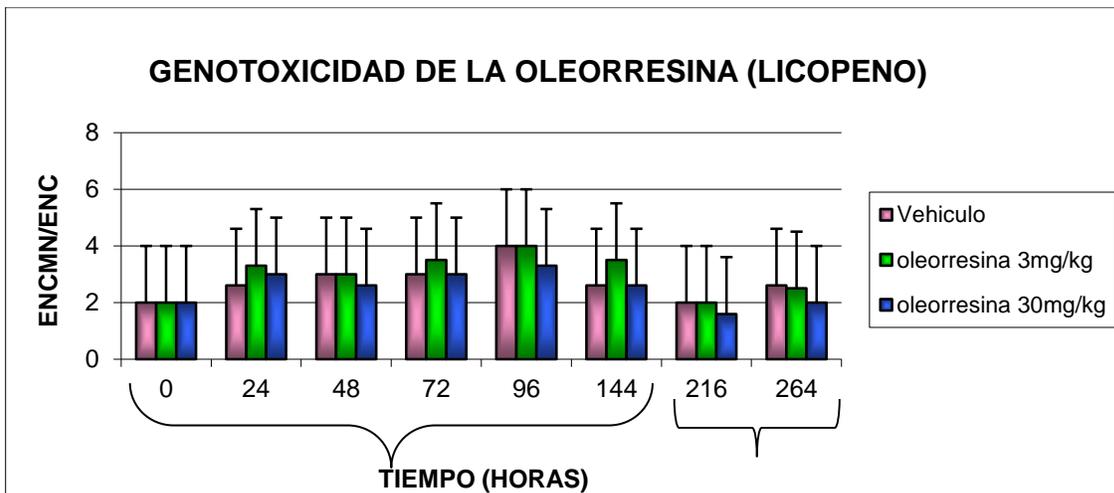


Fig. 14: Evaluación de la genotoxicidad de la oleorresina del jitomate en sangre periférica de ratones CD1+.

La evaluación del efecto genotóxico de la oleorresina del jitomate (licopeno) en sangre periférica de ratón se muestra en la figura 11, cada barra representa el número promedio de ENCMN encontrados en cada lote y en cada tiempo correspondiente ya sea de tratamiento (0-144 h) y de recuperación (218 y 264 h).

Se puede observar que no hubo diferencia estadísticamente significativa de los lotes administrados con 3 y 30 mg/kg de la oleorresina con respecto al vehículo a lo largo del experimento (0 a 264 h), por lo que se deduce que la oleorresina no provocó daño genotóxico en eritrocitos normocrómicos micronucleados procedentes de sangre periférica de ratón.

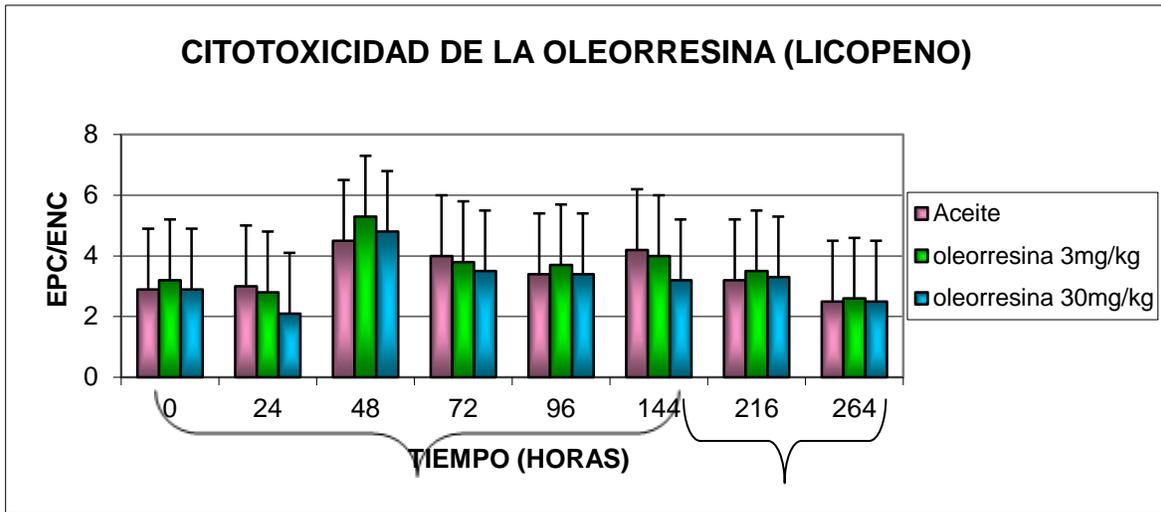


Fig.15: Evaluación de la citotoxicidad de la oleorresina del jitomate en sangre periferica de ratones CD1+.

Además se verificó la citotoxicidad de la oleorresina del jitomate (licopeno), expresada como el porcentaje de la relación EPC/ENC, en donde se puede observar que no hubo diferencias significativas entre los grupos combinados con respecto al grupo negativo tanto en el periodo de tratamiento como de recuperación, por lo tanto la oleorresina no tuvo efecto tóxico sobre médula ósea.

## 7.9) Antigenotoxicidad de la Oleorresina

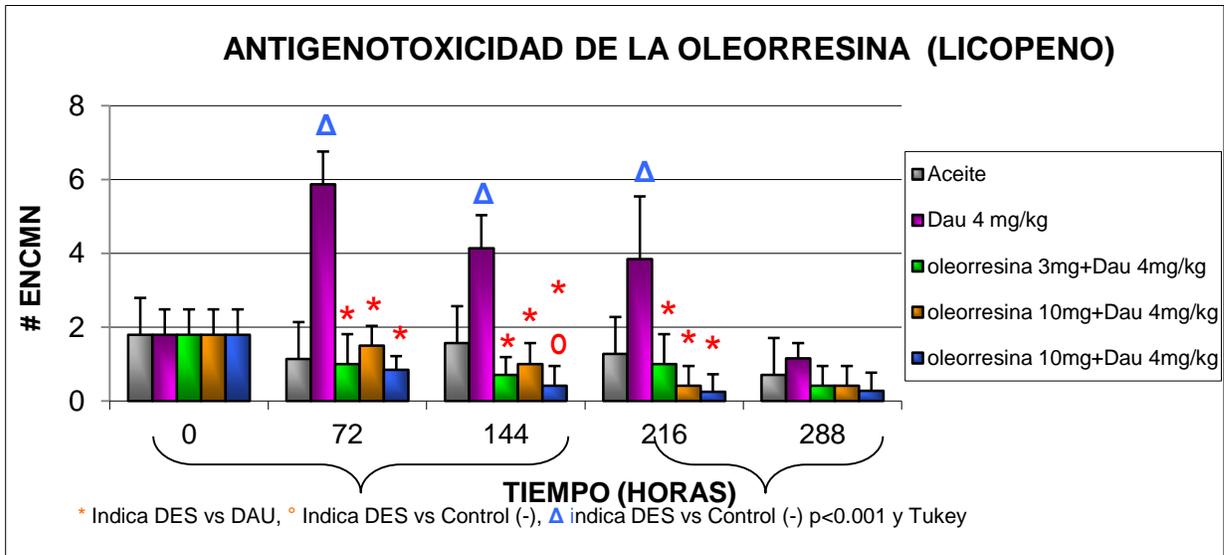


Fig.16: Efecto antígenotóxico de la oleorresina del jitomate sobre el daño producido por la daunorubicina (Dau) en sangre periférica de ratón CD1+.

En la figura 13 se muestra el efecto de la oleorresina, la daunorubicina y la oleorresina más daunorubicina en sangre periférica de ratón, expresado como el número de eritrocitos normocrómicos micronucleados desde el tiempo 0, 72, 144, 216 y 288 horas de muestreo. Los datos se analizaron estadísticamente, los cuales demostraron que el número de ENCMN fue de 1.8 en el lote testigo. El control negativo (aceite de maíz) que durante el tiempo de tratamiento y de recuperación no tuvo variación significativa entre ellos manteniéndose los valores constantes durante todo el experimento

Por el contrario, los animales administrados con la daunorubicina mostraron un efecto genotóxico significativo a partir de las 72 h, lo cual representa un aumento de 70% con respecto a la basal, permaneciendo así la diferencia a las 144 h (69 %), y 216 h (64%). Mientras que en la semana de recuperación se observó que la genotoxicidad disminuyó y no mostró diferencia significativa a las 288 h.

En cambio la coadministración de la oleorresina a dosis de 3, 10 y 30 mg/kg de peso seguida de 4mg/kg de peso de Dau redujo el daño en comparación con el control positivo (Dau) desde las 72 h, hasta las 216 h el efecto protector a las 72 h fue de 83, 75 y 86%; a las 144 h de 83, 76 y 90%, y a las 216 h de 74.1, 89.1 y 93.6 % respectivamente, siendo la dosis mayor (30mg/kg) a las 144 h la que tuvo un efecto antigenotóxico mayor.

Se observó que a las 288 h ya no se manifestó daño genotóxico de ningún lote de estudio en comparación con el control negativo.

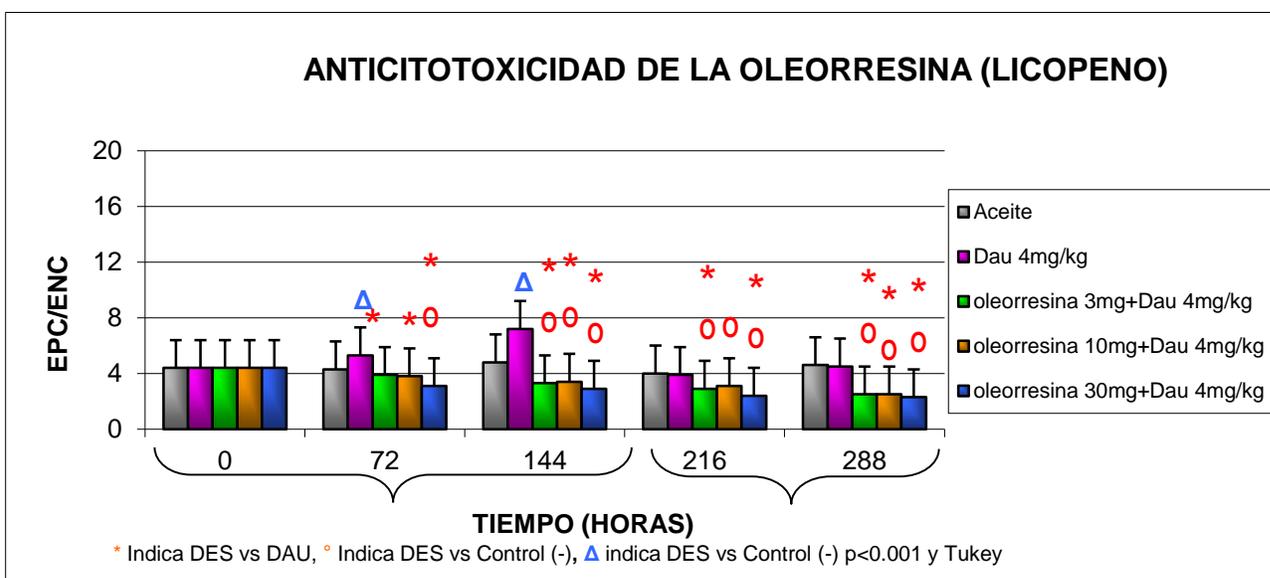


Fig. 17: Efecto citotóxico de la oleorresina del jitomate sobre el daño producido por la daunorrubicina (Dau) en sangre periférica de ratón CD1+.

Los resultados de la figura 14 mostraron el efecto de la oleorresina (licopeno), la daunorrubicina y la oleorresina en combinación con daunorrubicina en sangre periférica de ratón, expresado el % de la relación entre el número de eritrocitos policromáticos o jóvenes y los eritrocitos normocromáticos o maduros considerando un total de 1000 células en el eje de las abscisas y en las ordenadas los cambios en cuanto al tiempo del experimento, en donde se puede observar que el grupo testigo negativo (aceite de maíz) la relación de EPC/ENC es de 4.4%

En cuanto al grupo que pertenece al testigo positivo (Dau) se observó daño citotóxico significativo a partir de las 72 h, el cual fué de 17%, a las 144h de 39%, y a las 288h fue 3%, siendo éste último no significativo. El mayor efecto citotóxico también se observó a las 144 h, mientras que en la semana de recuperación no mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto a la basal.

En cuanto a la administración combinada de la oleoresina (licopeno) más Dau en las dosis mencionadas se observó que se redujo el daño en comparación con el testigo positivo (Dau), mostrando a las 72 h 26.5, 28.4 y 41.6 % de reducción significativa del daño, protección que se mantuvo a las 144 h con un 54.2, 52.8 y 59.8 %; a las 216 h 25.7, 20.6 y 38.5 % y hasta las 288 h 44.5, 44.5 y 48.9 %, mostrando que a las 144 h fue su pico máximo de protección de la dosis combinada de 30 mg/kg de peso disminuyendo la genotoxicidad por la Dau.

## VIII) DISCUSIÓN

### **8.1 obtención, identificación y cuantificación del licopeno en la oleorresina**

Se comprobó la reproducibilidad de la técnica de obtención de la oleorresina a partir del jitomate (*Lycopersicum esculentum L.*) utilizado cotidianamente para el consumo humano, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Cardona y Ríos, <sup>(34)</sup> en donde a partir del jitomate obtuvieron la oleorresina por medio de la técnica de arrastre con hexano en una extracción soxhle, y para calcular el rendimiento utilizaron una fórmula a partir de la cantidad de oleorresina contenida en el matraz después de la extracción. Los resultados obtenidos coinciden con este artículo, sin embargo, no coincide con el rendimiento obtenido por una técnica reportada por Karimi. <sup>(41)</sup> en el cual el rendimiento es superior a lo obtenido en nuestro experimento, debido posiblemente a variaciones en la técnica ya que utilizaron disolventes de arrastre de bajo, intermedio y alta polaridad mezclándolos para el arrastre de la muestra, también a que en este estudio se tomó como rendimiento el total de extracto obtenido en el matraz después de la rotaevaporación.

La identificación cualitativa del extracto se hizo mediante técnicas espectrofotométricas como la de UV-VIS, que se basa en medir la intensidad de luz que pasa a través de una muestra y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra, así dando una intensidad por encima de la inicial mostrando que dentro de la muestra está presente el compuesto, espectrofotometría de infrarrojo (IR) en donde se busca la composición de una muestra, a base de enlaces químicos de la sustancia con frecuencias de vibraciones específicas identificando la cadena más sencilla del compuesto en este caso C=H, espectrometría de fluorescencia que excita los electrones de las moléculas de ciertos compuestos y provoca que emitan luz a cierta longitud de onda dependiendo de los enlaces C=H, la espectrofotometría de masas es una técnica usada para identificar compuestos desconocidos, para mostrar la estructura y propiedades químicas de moléculas que en este caso fueron C=H, cromatografía de gases que es una técnica para el análisis de separación e identificación de todo tipo de sustancias orgánicas volátiles y análisis cualitativo y cuantitativo de los componentes de una mezcla que

en este caso es la oleorresina que contiene licopeno y  $\beta$ -carotenos, y por último RMN que es una técnica que explota las propiedades magnéticas de ciertos núcleos expresados en campos según el disolvente y el compuesto a analizar, de acuerdo a todas las técnicas realizadas en comparación con las longitudes de onda encontradas concuerdan con un estudio de extracción e identificación de licopeno hecho por Arándiga Gemma, <sup>(42)</sup> en el cual el método de extracción es similar y su identificación a base de la oleorresina indica que el licopeno se encuentra en mayor proporción, a una longitud de onda de 475nm acompañado a una menor longitud por el  $\beta$  caroteno así demostrando la similitud con lo encontrado, además de su identificación por análisis de compuestos orgánicos. <sup>(36,43)</sup>

En cuanto a la cuantificación se hizo mediante la fórmula de Cardona y Ríos <sup>(34)</sup> en donde dependiendo de los kg de jitomate utilizado para la extracción es el rendimiento de licopeno en mg, utilizando la cantidad de oleorresina obtenida de la extracción, los ml en que fue disuelta, su absorción en el espectro de UV-VIS datos que concuerdan con lo obtenido en el experimento.

## **8.2 evaluación de la genotoxicidad de la oleorresina (licopeno)**

Como ya se ha hecho mención existen alimentos que contienen de forma natural carotenoides que son pigmentos que dan un color naranja o rojizo, entre los cuales podemos encontrar el licopeno al cual se le han atribuido numerosos efectos protectores por lo que en los últimos años ha sido blanco para su investigación en donde se ha encontrado su alto poder antioxidante. En un estudio en donde se ha comprobado que disminuye el daño por oxidación en el ADN con el consumo diario y en un período prolongado en humanos de alimentos ricos en antioxidantes como frutas y verduras, <sup>(44)</sup> un efecto cardioprotector ya que en combinación con la vitamina E en un mecanismo sinérgico se demostró que protegió al miocardio disminuyendo el daño necrótico, <sup>(29)</sup> nefroprotector ya que un consumo de carotenos y vitaminas como la C y E ayudan a disminuir el riesgo de padecer cáncer de riñón <sup>(45)</sup> y antimutagénico ya que otros estudios demuestran que el consumo de licopeno

disminuye la aparición y las complicaciones de cáncer de próstata, pulmón, hígado, y colon. <sup>(46)</sup>

De acuerdo a los antecedentes en los cuales se utiliza al licopeno como antioxidante en este estudio se decidió evaluar la genotoxicidad de la oleorresina del licopeno obtenida con la técnica de micronúcleos, la cual permitió evaluar tanto la genotoxicidad como la citotoxicidad de compuestos, es muy importante ya que diversos autores han coincidido con la observación de que los eritrocitos son células que permiten evaluar de manera rápida y eficaz alteraciones en la actividad de la médula ósea y el material genético cuando son expuestos a diversos xenobioticos. <sup>(47, 48, 49)</sup> ya que según Mrdanovic <sup>(50)</sup> en un diseño experimental para medir el daño clastogénico al ADN utilizó la técnica de micronúcleos para cuantificar la genotoxicidad y citotoxicidad producida por el fullereno. De acuerdo a la cuenta basal se ENCMN, en otro estudio que se acerca más a lo realizado en el experimento es la utilización de la cepa CD1+, midiendo la genotoxicidad por la técnica de micronúcleos en un estudio agudo en donde se reporto un promedio de 4 EPCMN/EPC <sup>(51)</sup>, por otro lado en un estudio por Mersh <sup>(52)</sup>, administro como control negativo aceite de maíz en la cepa CD1+ para evaluar la genotoxicidad del B(a)P y la antigenotoxicidad de *Toxicodendron quercifolium* encontrando que su valor de EPCMN/ENC fue de 3.

Los resultados de la genotoxicidad demuestran que la oleorresina no es un agente productor de micronúcleos ya que la cuenta obtenida de EPCMN/ENC en el experimento es de 1.8 al inicio y manteniéndose sin diferencia estadísticamente significativa en las etapas de tratamiento como la de recuperación lo cual es una cifra menor a la reportada en estudios anteriores por lo que se puede deducir que el extracto no produjo daño en la médula ósea de los animales, debido posiblemente a la capacidad antioxidante del licopeno acompañado sinérgicamente con el  $\beta$ -caroteno, los cuales demuestran que según estudios anteriores tienen mejor efecto protector cuando se administran juntos. <sup>(29,45)</sup>

### **8.3 Antigenotoxicidad de la oleorresina (licopeno)**

Para medir la antigenotoxicidad el diseño experimental se realizó utilizando como vehículo para la administración de la oleorresina y como control negativo al aceite de maíz debido a que se ha reportado que a dosis de 0.1mL en una exposición prolongada no ocasiona daño genotóxico en ratones, y en combinación con diferentes dosis de betacarofileno contrarrestan el daño al ADN producido por la adriamicina (un análogo de la daunorubicina) a dosis de 2.5 mg/kg en un estudio *in vivo* en donde se observó que la adriamicina provoca la liberación de radicales libres dañando la producción normal de células sanguíneas, provocando un aumento en la relación de eritrocitos policromáticos sobre eritrocitos normocromáticos, pero por otra parte la combinación de este medicamento con el caroteno disminuye la relación de EPC/ENC a su nivel basal. <sup>(53)</sup>

La daunorubicina es un medicamento que forma parte de la antraciclinas que tienen contribuciones a la acción antineoplásica y citotóxica, se transforma a un metabolito activo llamado daunorubicinol que fundamentalmente tiene capacidad para intercalarse entre los pares de bases adyacentes de ADN y fijarse con intensidad, inhibiendo a la topoisomerasa II, formando un complejo ternario de gran estabilidad que facilita la rotura irreversible de cadenas sencillas y dobles del ADN, además forman radicales libres por reducción enzimática que pueden provocar rupturas y/o alquilación de bases nucleotídicas en el ADN provocando la mielodepresión en mayor grado en la serie blanca que en la roja y plaquetas. <sup>(54)</sup>

Para la dosis de Daunorubicina a administrar se partió con la administración de 2.5 mg/kg con un pico máximo de daño a las 72 horas en la cepa NIH<sup>(47)</sup> que es reportada en la bibliografía pero en esta ocasión en los ensayos previos se observó que a esta dosis no provocaba daño significativo en la cepa CD1+ en medula ósea, por lo que después de varias pruebas aumentando las dosis se llegó a la administración de 4 mg/kg de peso que demostraba genotoxicidad y citotoxicidad en los ratones a partir de las 72 horas. <sup>(55)</sup>

La genotoxicidad de la daunorubicina se encontró que tuvo un pico máximo de daño a las 72 horas posteriores a la administración con lo que concuerda con el estudio

antes mencionado lo que indica que es el periodo en el que ejerce su efecto, manteniéndose hasta las 144 h, mostrando altos niveles de EPCMN, en cuanto al periodo de recuperación a las 216 h se mantiene el daño toxico debido a que a esta hora es el pico máximo de la ultima dosis administrada, pero a las 288 h la toxicidad desaparece ya que los niveles en comparación al los demás lotes no indica diferencia estadísticamente significativa.

En cuanto a la oleorresina es importante mencionar que está formada principalmente por licopeno que forma parte de los beta carotenos que son un grupo de pigmentos de color rojizo que se encuentran en los alimentos de manera natural cuya composición química es enlaces sencillos y dobles de carbono e hidrogeno, debido a esto su principal función es actuar como antioxidante atrapando radicales libres principalmente las especies reactivas de oxigeno (ERO), de acuerdo a esto en un estudio que se realizó sobre betacarotenos contenidos en una alta proporción en verduras, frutas cítricas y bayas en personas fumadoras y no fumadoras en donde de manera cotidiana se consumieron estos grupos de alimentos y después se les hizo una frecuencia de alimentos para calcular la cantidad de betacarotenos que habían ingerido por semana, mes, y veces al mes, así cuantificando por cada 100g, al final demostrando que su consumo disminuyó el riesgo a padecer cáncer de pulmón en los fumadores protegiendo al ADN del daño oxidativo. <sup>(56)</sup>

Otro antecedente reportado al respecto, en el cual el objetivo fue examinar el efecto de diferentes concentraciones de licopeno (1.0, 2.0 y 4.0  $\mu\text{M}$ ) sobre la proliferación y apoptosis de líneas celulares de linfocítica crónica. Los resultados mostraron que el licopeno ejerció una dosis dependiente por lo que se deduce que el efecto anti-proliferativo depende de la dosis que se administre y del tipo de células malignas que se trate. <sup>(57)</sup>

Por otro lado, acercándonos más hacia el mecanismo mediante el cual el licopeno actúa según Heber David <sup>(58)</sup> en un estudio que realizó en donde dice que la combinación de concentraciones de licopeno con la vitamina D3 sinérgicamente tienen un efecto en la proliferación, diferenciación y progresión del ciclo celular en

la leucemia, además que la combinación de licopeno mas la luteína (flavonoide) actúan sinérgicamente potenciando el efecto antioxidante que puede estar relacionado con la posición específica de los carotenoides en las membranas por todo lo anterior considerando que tiene interacciones con otros fitoquímicos, inhibición de colesterolemias, modulación de enzimas, inhibición de inflamación dan evidencias de que el licopeno puede tener efectos benéficos en la etiología de enfermedades crónicas.

Por todo lo anterior, al licopeno se le han atribuido propiedades específicas que ayudan a combatir o disminuir el daño ocasionado por un agente mutagénico.

Con respecto a la evaluación antigenotóxica los resultados muestran que hubo un cambio significativo con dosis combinada de 30mg/kg de peso a las 72, 144 y 216 h con respecto al control positivo ya que como se ha mencionado el licopeno y los  $\beta$ -carotenos tienen un efecto antioxidante, ya que actúa como secuestrador de radicales libres que fueron producidos por la exposición a la daunorubicina, y un mejor efecto cuando es combinado sinérgicamente con algún otro fitoquímico en este caso el  $\beta$ -caroteno , por lo que se le atribuye la propiedad de protección y reparación del ADN después de una exposición prolongada al mutágeno.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que el objetivo principal que era evaluar la antigenotoxicidad del licopeno contra el daño producido por la daunorubicina se pudo comprobar ya que según artículos consultados el licopeno tiene grandes propiedades para reparar el daño al DNA y en ninguna ocasión se había realizado en un modelo experimental como el utilizado lo que origina la búsqueda de mecanismos específicos de protección, y una alternativa de tratamiento para padecimientos de alta demanda en todo el mundo.

## IX) CONCLUSIONES

- La técnica de extracción de la oleorresina a partir del jitomate fue reproducible.
- El rendimiento de la oleorresina fue 1.4 g con 13.12% de licopeno.
- La espectrofotometría ultravioleta-visible, infrarrojo, RMN, fluorescencia, espectrofotometría de masas y cromatografía de gases, permitieron identificar la presencia de licopeno en la oleorresina que coinciden con los picos de absorción reportados en la literatura con un elevado grado de pureza.
- La oleorresina obtenida no presentó genotoxicidad ni citotoxicidad después de una administración aguda
- 4 mg/kg de daunorubicina son capaces de producir genotoxicidad y citotoxicidad significativa en medula ósea de ratones CD1+, aumentando en un 70% el número de eritrocitos normocrómicos micronucleados a las 72 h, y estimulando en un 39% la eritropoyesis a las 144 h.
- 30 mg/kg de la oleorresina son suficientes para disminuir significativamente la genotoxicidad y la citotoxicidad de la daunorubicina a partir de las 72 h en un modelo subcrónico.

## X) RECOMENDACIONES

La tabla 3 nos muestra el contenido de licopeno en algunos alimentos en mg., por lo que se estableció una recomendación al consumo humano con la dosis que mejor protección obtuvo en el experimento que fue de 30 mg/kg de peso, aproximándolo a una persona de un peso promedio en la elaboración de un menú al día.

**CUADRO 3:** Contenido de licopeno en alimentos

ALIMENTO	MEDIDA	GRAMOS (g)	CONTENIDO/MEDIDA	
			(µg)	(mg)
Jitomate	1 jitomate	123	3165	3.165
Jitomate Cherry	1 pieza	17	437	0.437
Salsa de tomate enlatada	1 taza	245	37122	37.122
Puré de tomate sin sal	1 taza	250	54385	54.385
Sandia	1 taza	152	6889	6.889
Sandia	1 rebanada grande	286	12962	12.962
Salsa cátsup	1 paquete	15	2551	2.551
Repollo o col roja	1 taza	70	14	0.014
Espagueti con salsa de tomate lista para servir	1 taza	250	39975	39.975

Fuente: USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 16

Como ejemplo se tomo lo siguiente:

Mujer 50kg

Recomendación 30mg/kg de licopeno = $30 \times 50 = 150$ mg licopeno

De acuerdo a la tabla se pueden cubrir los requerimientos elaborando una pasta de espagueti rojo utilizando dos tazas de puré de tomate conteniendo 110 mg, plato fuerte a base de salsa roja de jitomate 1 taza 37mg y como complemento ½ taza de sandia de postre que aporta 3.5 mg.

La ingesta es de  $110 + 37 + 3.5 = 150.5$ mg de Licopeno que protegería contra el daño producido por radicales libres.

## **XI) PERSPECTIVAS**

Como se observó, la oleoresina que contiene licopeno y  $\beta$ -caroteno demostraron que tienen la propiedad de disminuir y proteger contra la exposición a agentes mutagénicos, productores de radicales libres, por lo que debido a estas propiedades se pretenden realizar más estudios que contribuyan a su uso en diferentes modelos experimentales, para posteriormente darle una utilidad en la que sea accesible para la población vulnerable y que padece algunos tipos de cáncer por lo que se propone la elaboración de un producto alimenticio funcional que proporcione los beneficios a la salud a bajo costo.

## XII) REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kumar, V.; Cotran, R.; Robbins, S. 1995. *Patología Humana*. 5a edición, (ed) Interamericana-McGraw-Hill, México, p. 204-208.
2. Día Mundial del Cáncer.  
Dirección:<http://www.inegi.gob.mx>. Actualización: 30/04/09.  
Acceso: 26/08/09
3. Sánchez, V.; Serra, L. 2004. *Dieta y Cáncer*. Universidad Politécnica de Valencia, 1, : p 2,3
4. LIU, R.H. 2004. "Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action". *J. Nutr.* 134 (12S): 3479S-3485S.
5. Nutrientes, Bioquímica, Fitoquímicos  
Dirección:[http://www.alimentacionynutricion.org/es/index.php?mod=content\\_detail&id=74](http://www.alimentacionynutricion.org/es/index.php?mod=content_detail&id=74) actualización: 08/2005  
Acceso: 24/09/2005
6. Weisburger, J.H. 2001 "Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future". *Mutat. Res.* 480-481: 23-35.
7. Rodriguez, A R. *Las toxinas ambientales y sus Efectos Genéticos*. La ciencia desde México. F. C. E. CONACYT, México. Pp. 1-8
8. Vega, G.S. Toxicología II, Toxicocinética. En: *Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales*. Vol. 4, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS. OMS. 325-332
9. Gardner, E. J., Simmons, M.J., Snustad, D.P. 1991. *Principes of Genetics*, 8<sup>th</sup> ed. John Wiley and Sons, Inc. New York. pp. 182,183
10. L'Heritier, P. *La Gran Aventura de la Genética*. Conacyt. Ed. Castell Mexicana, México. 120-143
11. Fármaco  
Dirección:<http://www.eccpn.aibarra.org/temario/seccion10/.../anexo1>.  
Actualización: 07/09/09. Acceso: 07/12/09.

12. Aibel, S.; Londos, G. 1989. Daunorubicin and doxorubicin anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimic* 66:333-352.
13. Calabresi, P.; Chabner, A. 1991. Agentes antineoplásicos, en Goodman, G.A. Rall, WT. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª edición, (ed) Panamericana, México, pp, 1171-1222.
14. Keizer, H.; Pinedo, H.; Schuuthuis, G.; Joenje, H. 1990. Doxorubicin (Adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanism of cytotoxicity. *Pharmacol Ther.* 47:219-231.
15. Kostoryz, L.; Yourtee, M. 2001. Oxidative mutagenesis of doxorubicin Fe (III) complex. *Mutat res.* 490:131-139.
16. Cariño, R. 2002. "Evaluación de la actividad antioxidante de la naringina y su capacidad antigenotóxica contra el daño producido por la Daunorrubicina". Tesis de Maestría realizada en el Instituto Politécnico Nacional (IPN). Pp. 17, 20, 47 y 48.
17. Calabresi, P., Chabner, A. B. Agentes antineoplásicos, en Goodman, G.A., Rall, W.T. Ed *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 8ª. Ed. Panamericana, México pp 1171-1222.
18. Cohen, L. 2002. A review of Animal Model Studies of Tomato carotenoids, Lycopene, and Cancer Chemoprevention, *Exp. Biol. Med.* 227(10):864-868.
19. Base de datos de nutrients USDA  
*Dirección:* <http://www.ars.usda.gov> Actualización 2006  
*Acceso:* 24/09/09
20. Bugianesi, R.; Salucci, N.; Leonardi, C.; Ferracane, R.; Catasta, G.; Azzini, E.; Maiani, G. 2004. Effect Of Domestic Cooking on Human Bioavailability of Naringenin, Chlorogenic Acid, Lycopene and  $\beta$ -Carotene in Cherry Tomatoes. *Eur. J. Nutr.* 43(6):360-366.
21. Paul, D.; Fraser, Romer, S.; Cathie, A.; Shipton, B.; Mills, J. W.; Kiano, M.; Drake, R., Wolfgang, S. and Peter M. Bramley. 2002. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(2):1092-1097

22. The official website of the Organic Lycopene (Licopeno)  
Dirección: <http://www.lycopene.it>  
Acceso: 24/09/ 09 12: 48pm
23. Fernández, V.; Cámara, M.; Quintela, JC. 2007. Ingredientes Bioactivos del Tomate: licopeno. *Nutr. Clin. Diet. Hosp.* 27:166
24. Van, Breemen.; Pajkovic, N. 2008, Multitargeted therapy of cancer by lycopene, *Cancer Lett.* 269(2):339-51
25. Scolastici, C.; Alves de Lima, RO.; Barbisan, LF.; Ferreira, AL.; Ribeiro, DA.; Salvadori, DM. 2008. Antigenotoxicity and Antimutagenicity of Lycopene in HepG2 cell line Evaluated by the Comet Assay and Micronucleus test. *Toxicol In Vitro.* 22(2):510-4
26. Srinivasan, M.; Devipriva, N.; Kalpana, Kb.; Menon, VP. 2009. Lycopene: An Antioxidant and Radioprotector against Gamma-radiation-induced cellular damages in cultured human lymphocytes, *Toxicology.* 262(1):43-9.
27. Palozza, P.; Bellovino, D.; Simone, R.; Boninsegna, A.; Cellini, F.; Monastra, G.; Gaetani, S. 2009. Effect of beta-carotene-rich tomato lycopene beta-cyclase (tlcy-b) on cell growth inhibition in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Br. J. Nutr.* 102(2):207-14.
28. Wang, Y.; Ausman, LM.; Greenberg, AS.; Russell, RM.; Wang, XD. 2009. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Int. J. Cancer.*
29. Parvin, R.; Akhter, N. 2008. Protective effect of tomato against adrenaline-induced myocardial infarction in rats. *Bangladesh Med Res Counc Bull.* 34(3):104-8
30. Burgess, LC.; Rice, E.; Fischer, T.; Seekins, JR. 2008. Lycopene has limited effect on cell proliferation in only two of seven human cell lines in a vitro system with. *Toxicol in vitro.*22(5):1297-300.
31. Schwarz, S.; Obermüller, UC.; Hellmis, E.; Koch, W. 2008. Lycopene inhibits disease progression in patients with benign prostate hyperplasia. *J. Nutr.* 138(1):49-53.

32. Ferreira, AL.; Favero, DM.; Munhoz, MC.; Souza, N.; Correa, RC.; Jama, E.; Shiguero, L.; Bojikian, B.; Placido, MS. 2007. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutation Research*. 631(1): 26-35
33. Lee, JE.; Mannisto, S.; Spiegelman, D.; Hunter, DJ.; Bernstein, L.; van den Brandt, PA. 2009. Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18(6):1730-9.
34. Cardona, E.; Rios, L. 2006. Extracción del caroteno de licopeno del tomate Chonto.
35. Espectrofotometria  
Dirección: [www.espectrometria.com](http://www.espectrometria.com)  
Acceso 17/06/09
36. Silverstein, R.M., Clayton, G. y Morrill, T. 1991. Infrared Spectrometry. En: *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, (ed) Dennis Sawick, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA. Pp. 106, 107, 299.
37. Madrigal, B.E.; Álvarez, G.I.; Molina, J.D.; Moreno, L.M. 2002. El estudio de micronúcleos en la evaluación del daño producido por agentes ambientales. Temas de actualidad en microbiología, ambiente y salud. Roche G.R., Martínez L.I., López O.J.F. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México pp. 267-287.
38. Salomone, F.; Tice, R.; Wild, D. 1987. Guidelines for the conduct of micronucleous assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat. Res.* 189(2):103-112.
39. Mac Gregor, J. 1990. The in vivo erythrocyte micronucleus test: Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 14(3):513-522.
40. Schlegel, R.; Mac Gregor, J. 1983. A rapid screen for cumulative chromosomal damage in mice: accumulation of circulating micronucleated erythrocytes. *Mutat. Res.* 113(6):481-487

41. Karimi, G.; Ramezani, M.; Abdi, A. 2005. Effects of lycopene and tomato extract. *Phytother Res.* 19(10):912-4.
42. Arándaga, G.; Díaz, S. 2008. *Estudio del licopeno del tomate como colorante natural desde la perspectiva analítica e industrial.*
43. Química Orgánica II, Espectroscopia ultravioleta y visible : color y colorantes, Departamento de Química Universidad Nacional del Sur.
44. Collins, A. 2005. Assay for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenol<sup>1-4</sup>. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 81:261S-7S.
45. Hu, J.; La Vecchia, C.; Negri, E.; Desmeules, M.; Mery, L. 2009. Dietary vitamin C, E, and carotenoid intake and risk of renal cell carcinoma. *Cancer Causes Control.* (Epub)
46. Muzandu, K.; Ishizuka, M.; Sakamoto, KQ.; Shaban, Z.; El Bohi, K.; Kasuzaca, A.; Fujita, S. 2006 .. Efecto del licopeno y betacaroteno sobre el peroxinitrito en las modificaciones celulares. *Toxicol Appl Pharmacol.* 215 (3): 330-40
47. Chaubey, R.; Bhilwade, H.; Chauhan, P. 1993. Studies on the migration of micronucleated erythrocytes from bone marrow to the peripheral blood in irradiated Swiss mice. *Int J. Radiat Biol.* 63(2):239-245.
48. Salomone, F.; Movournin, H. 1994. Bone Marrow Micronucleus assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies,. *Environ Mol Mutagen.* 23(4):239-273.
49. Zuñiga, G. 2001. Variation of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to age: an increment of micronucleated polychromatic erythrocytes after the administration of colchicines. *Environ Mol Mutagen.* 37:173-177.
50. Mrdanovic, J.; Solajic, S.; Bogdanovic, V.; Stankov, K. 2009. Effects of fullereneol C(60)(OH)(24) on the frequency of micronuclei and chromosome aberrations in CHO-K1 cells. *Mutat Res (Epub)*

51. Villani, P.; Cordelli, E.; Leopardi, P.; Siniscalchi, E. 2007. Evaluation of Genotoxicity of oral exposure to tetravalent vanadium *in vivo*. *Science Direct.*, 11-18.
52. Mersch, V.; Kassie, F.; Bohmer, S.; Qing, W.; Sobel, R. 2004. Extract of Toxicodendron quercifolium caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cells of CD1 mice. *Food and Chemical Toxicology.*42(10)1611-1617.
53. Molina, D.; Álvarez, I.; Madrigal, E. 2009. Clastogenicity of Beta-Caryophyllene in mouse. *Biol Pharm Bull.* 32(3)520-522.
54. Flores, J. 2005. *Farmacología humana*, , 4ª edición, Ed Masson, Barcelona España. pág. 1069
55. Venkatesh, P.; Shantala, B.; Jagetia, GC.; Rao, KK.; Baliga, MS. 2007. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow a:micronucleus study. *Integr Cancer Ther.* 6(1):42-53.
56. Nyberg, F.; Hou, S.; Pershagen, G.; Lambert, B. 2003. Dietary fruit and vegetables protect against somatic mutation *in vivo*, but low or high intake of carotenoids does not. *Carcinogenesis.* 24(4):689-696.
57. Salman, H.; Bergman, M.; Djaldetti, M.; Bessler, H. 2007. Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines. *Biomed Pharmacother.* 61(6):366-9.
58. Heber, D.; Yi Lu, Q. 2002. Overview of Mechanism of Action of Lycopene, University of California Center for Human Nutrition. *Exp Biol Med.* 227(10):920-923.
59. Bowen, P.; Chen, L.; Stacewicz, S.; Duncan, C.; Sharifi, R.; Ghosh, L.; Kim, H. 2002. Tomato Sauce Supplementation and Prostate Cancer: Lycopene Accumulation and Modulation of Biomarkers of Carcinogenesis. *Exp Biol. Med.* 227(10):886-893.

### XIII) ANEXOS

#### GLOSARIO

**Antioxidante:** Molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, que se da a través de la transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante.

**Cáncer:** es un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas conocidas como cancerígenas o cancerosas, con crecimiento y división más allá de los límites normales, invasión del tejido circundante y a veces, metástasis.

**Carotenoides:** Son pigmentos orgánicos que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias.

**Citotoxicidad:** efecto de un agente sobre la integridad celular produciendo la muerte de la célula.

**Clastogénico:** propiedad de algunos agentes físicos o químicos para inducir mutaciones. Sinónimo de mutagénico.

**Eritrocito:** Es el elemento más maduro de la eritropoyesis. Su misión fundamental es la captación de oxígeno y su transporte a los tejidos. Son elementos anucleados de color rosado y de forma redondeada u oval con una depresión o zona más clara en el centro.

**Eritrocito normocrómico:** Eritrocito maduro, célula que ha perdido el núcleo, sin embargo posee la capacidad de producir hemoglobina.

**Eritrocito policromático:** eritrocito joven, presenta aún ácido ribonucleico, y mitocondrias.

**Eritropoyesis:** proceso de formación de eritrocitos o glóbulos rojos.

**Espectrofotometría:** es el método de análisis óptico que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

**Genotoxicidad:** Efecto producido por un agente sobre el material genético.

**Micronúcleo:** fragmento de ADN presente en las células después de un proceso de división celular y que no forma parte del núcleo central.

**Mutación:** es una alteración o cambio en la información genética (genotipo) de un ser vivo y que, por lo tanto, va a producir un cambio de características, que se presenta súbita y espontáneamente, y que se puede transmitir o heredar a la descendencia.

**Mutagenesis:** es la producción de mutaciones sobre DNA, clonado o no.

**Mutagenicidad:** propiedad de una sustancia química de causar cambios permanentes en las características genéticas de un organismo.

**Mutagénico:** Compuesto o agente que induce mutaciones, como la luz UV, o algunos compuestos químicos.

**Neoplasia:** Proliferación de células, de manera persistente, anormal y relativamente autónoma de una serie de alteraciones estructurales en determinadas células con capacidad de transmisión a otras células.

**Xenobiótico:** compuesto externo a un organismo vivo que interacciona con él, generalmente a través de alteraciones metabólicas.

**Cuadro 2.** Componentes con actividad clínica de la dieta usados en quimioprevención <sup>a</sup>

Químicos	Nutrientes	Fuente	Fase clínica	Tipo de cáncer
Vitaminas	Vitamina D Ácido fólico Vitamina E Ácido Ascórbico	Productos de la dieta Vegetales Aceites vegetales Vegetales y frutas	II-III II I III II II	Adenomas de intestino grueso <sup>b</sup> Linfoma periférico de cel. T <sup>c</sup> Cáncer colorectal <sup>d</sup> Pacientes quimioterapia <sup>e</sup> Leucemia mielógena aguda <sup>f</sup> Mieloma múltiple <sup>g</sup>
Minerales	Calcio Selenio	Productos lácteos y vegetales Vegetales, frutas, cereales, granos, carnes y pescado.	II-III III III	Adenoma de int. grueso <sup>b</sup> Cáncer de pulmón <sup>h</sup> Pólipos adenomatosos colorectales
<b>Carotenoides</b>	<b>Lycopeno</b>	<b>Jitomates</b>	<b>II</b>  <b>No especificado</b>	<b>Uremia, asociado con carcinoma urorectal.</b> <b>Subjetivamente saludable<sup>i</sup></b>
Flavonoides	Genistein	Frijoles de soya,	II II	Cáncer de mama <sup>j</sup> Mujer saludable <sup>k</sup>

	Proantocianidina	productos de soya  Vegetales, frutas y té negro.	II I	Cáncer pancreático <sup>l</sup> Mujer postmenopausica <sup>k</sup>
Ácido fenólico	Resveratrol  Curcumina  Epigallocatequina-3-galato	Uvas, vino tinto  Tumerico, pollo, mostaza.  Té verde	I-II I II II No especificado  II II II I	Cáncer de colon Subjetivamente saludable Cáncer colorectal Cáncer pancreático Fumadores <sup>m</sup> Mieloma múltiple <sup>n</sup>  Leucoplasia Oral Cáncer cervical <sup>o</sup> Fumadores <sup>p</sup> Cáncer esofagico <sup>q</sup>

- a) Tipo de tratamiento: quimioprevención, quimioprotección, quimiosensación/potenciación.
- b) y/o calcio
- c) Con pralatrexato y Vitamina B12.
- d) Folato- depletado contra suplemento de folato en la dieta para la prevención de cáncer colorectal el pacientes con alto riesgo de neoplasia colorectal.
- e) Prevención, quimioterapia- induciendo neuropatía periférica en pacientes bajo curación neurotóxica en quimioterapia por cáncer.
- f) Con trióxido de arsénico.
- g) Con bortezomib y melpalan.
- h) Previamente prescrito fase I.

- i) Previniendo cáncer de próstata.
- j) Con gemcitabine hidrocliclorado.
- k) Alto riesgo de cáncer de mama.
- l) Aberrante.
- m) Con gemcitabine hidrocliclorido y erlotinib hidrocliclorido.
- n) Con o a través de bioperine.
- o) En pacientes con virus del papiloma humano y bajo estado de neoplasia cervical intraepitelial.
- p) Con daño obstructivo crónico pulmonar.
- q) Con esófago de Barrett`s.



Fig. 18: Obtención de la oleorresina y prueba de MN.