



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**EFFECTO QUIMIOPROTECTOR DEL JUGO DE
TUNA EVALUADO MEDIANTE LA TÉCNICA DE
MICRONÚCLEOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

LUIS FERNANDO GARCÍA MELO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARIA DEL CARMEN ALEJANDRA HERNÁNDEZ CERUELOS

I. ÍNDICE

I. Índice	
II. Índice de figuras y tablas	
III. Introducción	1
IV. Marco teórico	2
4.1 Importancia terapéutica de las plantas y sus frutos	2
4.2 Historia de las cactáceas	2
4.3 Descripción e importancia de la tuna	4
4.4 Propiedades nutricionales y químicas de la tuna	5
4.5 Principales propiedades de los fitoquímicos de la tuna	6
4.5.1 Vitamina C	8
4.5.2 Vitamina A	8
4.5.3 Vitamina E	8
4.5.4 Betalaínas	9
4.5.5 Flavonoides	9
4.5.6 Carotenoides	9
4.6 Quimioprevención	10
4.7 Radicales libres y antioxidantes	10
4.8 Material Genético	12
4.9 Toxicología Genética	13
4.10 Clasificación de los agentes mutagénicos	14
4.11 Mecanismo de acción de los agentes alquilantes	16
4.12 Metil metanosulfonato	17
4.12.1 Características físicas y químicas	17
4.12.2 Aspectos farmacocinéticos y efectos tóxicos del MMS	17
4.12.3 Mecanismos de acción del MMS	18
4.13 Evaluación de los agentes con posibles propiedades quimioprotectoras	18
4.14 Importancia de la prueba de micronúcleos	20
4.14.1 Desarrollo eritropoyético	20
4.14.2 Características generales de la prueba de MN	21

V.	Justificación	24
VI.	Hipótesis y objetivos	25
VII.	Metodología	26
	7.1 Preparación de las 3 muestras del JT	26
	7.2 Determinación de capacidad interceptora de radicales libres del JT mediante el ensayo del radical difenilpicrilhidracil (DPPH)	26
	7.3 Elección de la variedad de JT con mayor capacidad antioxidante para la realización del ensayo genotóxico y antigenotóxico	27
	7.4 Ensayo genotóxico y antigenotóxico del JTRP	29
VIII.	Resultados	33
IX.	Discusiones	41
X.	Conclusiones	50
XI.	Referencias bibliográficas	51
XII.	Abreviaturas y símbolos	65
XIII.	Anexo I	66

II. ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Taxonomía del Nopal	4
Cuadro 2. Análisis Químico de pulpa de tuna y jugo de tuna	6
Cuadro 3. Análisis químico de tres tipos de tuna	7
Cuadro 4. Clasificación de los diferentes tipos de evaluación quimioprotectora	19
Cuadro 5. Concentraciones de los reactivos con capacidad interceptora de radicales libres utilizados en el ensayo del DPPH	27
Cuadro 6. Administración de sustancias experimentales del ensayo genotóxico	29
Cuadro 7. Administración de sustancias experimentales del ensayo antígenotóxico	30
Figura 1. Estructura de DNA	12
Figura 2. Estructura del compuesto metil metanosulfonato	17
Figura 3. Mecanismo de alquilación del MMS con la guanina	18
Figura 4. Proceso de producción de eritrocitos	20
Figura 5. Proceso de producción de MN	22
Figura 6. Diagrama general para la determinación de la capacidad interceptora de radicales libres utilizando al DPPH	28
Figura 7. Imagen al microscopio donde se muestra EPC (en color morado), ENC (en color marrón), EPCMN (en color morado con un punto negro) y MN (punto negro)	31
Figura 8. Diagrama general del ensayo de micronúcleos	32
Figura 9. Promedio de los pesos corporales de los ratones tratados con JT y MMS durante 3 semanas	33
Figura 10. Capacidad interceptora de radicales libres del JT de las tres variedades	35
Figura 11. Ensayo genotóxico del jugo de tuna roja-púrpura	36
Figura 12. Ensayo antígenotóxico identificación de EPCMN	37
Figura 13. Ensayo antígenotóxico identificación de EPC	38

RESUMEN

El fruto de tuna así como el nopal han sido alimentos tradicionales del pueblo mexicano desde tiempos prehispánicos; recientemente ha surgido un gran interés científico con respecto al valor nutricional y los beneficios que se le han encontrado hacia la salud, esto debido a el contenido de vitaminas, carbohidratos, proteínas, grasas y minerales ofreciendo una alternativa que puede aumentar el consumo de esta fruta y por consiguiente contribuir a una dieta más saludable; además de los nutrientes mencionados, la tuna presenta otros es compuestos que son de igual importancia y contribuyen a su posible impacto en la salud humana, entre los que podemos mencionar, a las betalaínas, a carotenoides, a flavonoides y algunos compuestos fenólicos (CF); es decir compuestos con alto potencial antioxidante. En la presente investigación se evaluó el efecto antioxidante del jugo tuna utilizando la técnica DPPH, en donde se analizaron 3 variedades de jugo de tuna (roja-púrpura, blanca-verde y amarilla-anaranjada) a concentraciones de 250, 500, 750, y 1000 mg/mL.

Los resultados indicaron que el jugo de tuna roja-púrpura (JTRP) en todas las concentraciones fue el que presentó mayor capacidad para interceptar radicales libres en comparación con el testigo positivo que fue el 2,2-difenil-1-picrilhidracil. Dicho resultado permitió elegir que variedad de jugo de tuna que era más factible para realizar el ensayo de micronúcleos (MN) en ratón, con la finalidad de analizar el potencial genotóxico y antígenotóxico, de este modo los resultados favorecieron a los JTRP a concentración de 1000, 750, 500 y 250 mg/mL. En el ensayo biológico este tipo de tuna no es un agente inductor de MN, ni con capacidad citotóxica, por el contrario, puede reducir el número de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN). En este sentido se observó, que JTRP en una dosis de 25 mL/Kg de peso corporal de ratón (dosis que corresponde a la concentración de 750 mg/mL) presentó el mayor efecto antígenotóxico contra el metil metanosulfonato (MMS) a las 48h de tratamiento, observándose un efecto protector de aproximadamente el 87%. Con respecto a las otras dosis (16.5 y 8.3 mL/Kg) se observó que ambas presentan un efecto antígenotóxico a las 48h que corresponde a un efecto protector de aproximadamente el 44%. En relación al efecto anticitotóxico del JTRP se observa que las dosis de 25 y 16.5 mL/Kg fueron las de mayor potencial para proteger a las células de la médula ósea del daño ocasionado por el MMS. Nuestros resultados indicaron que la especie roja-púrpura de tuna es la que mayor quimioprotección presenta lo que sugiere realizar más estudios para confirmarlo.

III. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha incrementado la inquietud por estudiar diferentes productos naturales que puedan ayudar al bienestar general en los humanos desde el alivio de enfermedades pasajeras (como la gripe) hasta enfermedades crónico degenerativa como el cáncer (Zourgui y col, 2009).

Con respecto a los productos naturales que mas se han estudiado, se pueden mencionar aquellos relacionados a la toronja, a la naranja, a la uva, al arándano e indiscutiblemente a las cactáceas; este último grupo ha tenido un impacto relevante como plantas de ornamento, como fuente de alimento y para la producción de forraje. Dentro de las cactáceas mas usadas en nuestro país se encuentra el nopal, el cual es una planta que desde nuestros antepasados se utilizó en el aspecto medicinal para diferentes malestares, como tratamiento del dolor y la inflamación, control de la diarrea y disminución de la tos (Merin y col, 1987; Zou y col, 2005); también se ha utilizado su fruto, la tuna, a la cual se le ha atribuido la capacidad para disminuir la fiebre.

La tuna era utilizada por los aztecas como alimento, colorante y fruto medicinal; algunos estudios muestran a la tuna como una fuente importante de compuestos fenólicos (CF), capaz de prevenir enfermedades inflamatorias, cardiovasculares y crónico-degenerativas (como cáncer, diabetes mellitus y atero esclerosis). Entre los compuestos que se han logrado identificar se encuentran los carotenoides, betalaínas, flavonoides y algunas vitaminas como la E y C (Zou y col, 2005). Datos recientes han puesto de manifiesto que la tuna contiene un alto valor nutricional debido a la presencia de sus vitaminas, de sus antioxidantes y de sus minerales (Ca^{2+} , Fe^{2+} , y P) (Stintzing y col, 2005; Tesoriere y col, 2005).

Por estos motivos, esta investigación esta encaminada a identificar la capacidad del jugo de tuna para interceptar radicales libres y comprobar su capacidad quimioprotectora producida por un agente alquilante como lo es el metil metanosulfonato (MMS).

IV. MARCO TEORICO

4.1 IMPORTANCIA TERAPUETICA DE LA PLANTAS Y SUS FRUTOS

De los más de 170 países que existen en el mundo, doce son considerados los de mayor diversidad en cuanto a plantas y frutos; dentro de este pequeño grupo de países, se encuentra México ocupando el 4° lugar después de Brasil, Colombia y China. Esta situación se manifiesta en la rica tradición ornamental así como en el uso de diferentes plantas medicinales; específicamente, nuestro país ha aportado muchas especies de plantas y frutas, que han sido motivo de estudio por tener la capacidad de disminuir malestares y/o enfermedades (Guzmán y col, 2005), dentro de estas se puede mencionar al orégano que ha mostrado propiedades antimicrobianas y un buen potencial antioxidante; además existen algunos informes sobre su efecto antimutagénico y anticarcinogénico. (Arcila y col, 2005). Otro fruto muy estudiado es la naranja ya que por su mezcla compleja de macro y micronutrientes (vitaminas, polifenoles y minerales) también ha mostrado una buena capacidad antioxidante (Franke y col, 2005). Estudios realizados en el 2004 indicaron que la toronja tiene poder antioxidante, un efecto antitumoral e inhibe el cáncer de mama en ratas hembras (Álvarez y col, 2004). Así mismo, el arándano ha sido motivo de estudio durante los últimos años por sus propiedades hipoglicémicas, antiinflamatorias, vasodilatadoras, hipolipidémicas y antioxidantes (Canter y Edzard, 2004).

En el caso de las cactáceas, las cuales son plantas ornamentales donde se centra el objetivo de esta investigación, se conoce que tienen un alto contenido de proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas; por lo que, en nuestro país son utilizadas además de alimento, como fuente medicinal ya que reducen los niveles de colesterol, regulan la presión arterial, controla la acidez gástrica, disminuyen la patología ocasionada por úlceras, fatiga, glaucomas, fragilidad capilar, dolores reumáticos y heridas de piel (Gurrieri y col, 2000).

4.2 HISTORIA DE LAS CACTACEAS

Desde la época prehispánica, las cactáceas se han utilizado como fuente de alimento, de bebida, materia prima para la obtención de medicinas y para la construcción de viviendas, han servido para la elaboración de mantas y herramientas; tal fue su

importancia que algunas especies de cactáceas llegaron a ser consideradas deidades (Anaya, 2003).

Documentos del siglo XVI, como son el *Códice Florentino* (Sahagún, 1982) y la *Historia de las Plantas de Nueva España* (Hernández, 1946), mencionan el conocimiento de los mexicas sobre las especies de cactáceas, incluida el nopal. Ellos las diferenciaban por el color de la flor y el fruto, y en algunos casos por la presencia de espinas y la forma de su fruto. En el caso del nopal, los *Mexicas* lo denominaron *nopalli* y a las tunas dulces se les llamaba *nochtli* y a las ácidas *xoconochtli*; también diferenciaron las formas silvestres de las cultivadas, llamándolas *tenopalli* o *azcanochtli*.

Taxonomicamente, el nopal es conocido como *Opuntia Picus-indica*, nombre que proviene de un antiguo pueblo de origen griego, en donde el científico Tournefort observó una planta con espinas y la denominó *Opus* u *Opuntia*. Las especies de *nopalli* mencionadas en el código floren pertenecen a *Opuntia amyclaea*, *O. ficus-indica*, *O. Megacantha*, *O. Streptacantha* y *O. imbricata* (Martínez y Barajas, 1991; Anaya, 2003). Actualmente, se sabe que en México existen aproximadamente 300 especies del género *Opuntia*; Bravo (1978) registró 104 especies y variedades y debido a que estas especies varían en gran medida a las condiciones ecológicas, la taxonomía del nopal se ha complicado. Sin embargo, Corrales (2003) elaboró una clasificación que tal vez no sea la mejor pero es la mas idónea (Cuadro 1) (Reynolds y Arias, 2003).

La tuna con más de 25,000 años de existencia, ayudó a los primeros pobladores de América a subsistir proporcionándoles alimento, medicina y su cáscara sirvió de forraje para animales silvestres y domésticos. Se convirtió en un producto de gran tradición y símbolo a lo largo de la historia de nuestro país, pues está presente en el jeroglífico de la gran Tenochtitlan. Los *Mexicas* apreciaban mucho a las tunas ya que se las podían comer curdas y cocidas, también las utilizaban para disminuir la fiebre, aliviar úlceras, para mitigar el calor excesivo, como agente astringente y antidiarreico (Lara y Márquez 1996; Anaya, 2003). Excavaciones realizadas en donde existió la ciudad de Tenochtitlan permitieron encontrar semillas carbonizadas en buen estado, lo que facilitó la identificación de 10 especies de tuna (Anaya, 2003).

Cuadro 1. Taxonomía del Nopal

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Caryophyllales</i>
Familia	<i>Cactaceae</i>
Subfamilia	<i>Opuntioideae</i>
Tribu	<i>Opuntieae</i>
Género	<i>Opuntia</i>
Subgénero	<i>Opuntia</i>
Especie	<i>O. ficus-indica</i>
Nombre binomial	<i>Opuntia ficus indica</i>
Nombre vulgar	<i>Nopal</i>

(Corrales, 2003)

Tanta es la importancia de la tuna que aparece como parte del símbolo de la fundación de Tenochtitlan, en el escudo nacional y en el de la ciudad de México (Aguilar y Pérez, 2004); es por eso que se dice que es de origen mexicano, y se cree que Colón lo pudo haber llevado a Europa, y los mismos españoles lo diseminaron en América y parte Europa; los moros lo llevaron al norte de África y los portugueses lo introdujeron en Brasil, Angola y la India (Flores y col, 1995).

4.3 DESCRIPCIÓN E IMPORTANCIA DE LA TUNA

Las tunas son bayas esféricas, cilíndricas o elípticas, frecuentemente presentan color amarillo pálido a rojo púrpura, y en ocasiones se han observado combinaciones de amarillo/verde o amarillo/rojo. Son frutos polispérmicos, carnosos, cubiertos por espinas finas de 3mm de longitud; su tamaño es de 7 a 9cm de largo, con aproximadamente 6cm de ancho y con un peso de entre 86 a 146g; anatómicamente las tunas pueden ser en forma no umbilicado hasta profundamente umbilicada (parte de la tuna que se une con el nopal), con el umbílico de 3 a 8mm de profundidad. La cáscara está formada por una pared delgada (2 a 4mm de grosor) y la pulpa es del mismo color

que la cáscara, es carnosa, jugosa, y de ligeramente a muy dulce (12.4-15.5 °Brix). Las semillas son lenticuladas a elipsoidales, con un numero aproximado de 188 a 335 por tuna (Felker e Inglese, 2003; Reyes y col, 2005)

En épocas de fructificación atraen a las aves y mamíferos que se alimentan de ellas y así se mantiene la diseminación de las semillas; bajo la acción de los ácidos digestivos y una vez eliminada en el excremento de los animales, pueden germinar hasta la formación de nuevos nopales. Cuando madura la tuna, los funículos de los óvulos se llenan de azúcares, así como de otras sustancias nutritivas y son los que constituyen la pulpa comestible y dulce, una vez madura queda adherida al cladiodo durante 2 ó 3 meses. Normalmente, la maduración de las diferentes especies de tuna dulce se da en los meses de junio a agosto extendiéndose hasta finales de octubre (Filardo, 2001).

Actualmente la industrialización de la tuna es muy promisoría, ya que son diversas las alternativas, se ha propuesto la elaboración de frutas glaseadas, dulces, mermeladas, caramelo líquido, pulpa para helados y yogurt, bebidas alcohólicas, vinagre y jugo natural, gasificado y saborizado; en algunas regiones de América se fabrican productos en forma artesanal como la fruta en almíbar, pasas y arropo. De la tuna se pueden obtener mucílagos, pectinas, celulosa, colorantes, aceite comestible de la semilla, y azúcares (glucosa y fructosa) que se pueden emplear para la producción de proteína unicelular, alcohol, aguardiente y jarabes fructosados (aditivos edulcorantes o espesantes) para la industria alimentaría (Flores y col. 1995). En general, la tuna se ha usado como fruto medicinal ya que se la ha atribuido capacidad como diurético, descongestivo, antidiabético y antitusivo. En México se consume la tuna ácida para disminuir los niveles de azúcar y el colesterol de la sangre. Diversos estudios han sugerido otras importantes propiedades medicinales dentro de las que se incluyen anticancerígeno, antiinflamatorio, antiviral y antioxidante (Reyes y col, 2005).

4.4 PROPIEDADES NUTRICIONALES Y QUÍMICAS DE LA TUNA

El buen contenido de vitaminas, carbohidratos, proteínas, grasas y minerales (Cuadro 2) ofrece una alternativa tecnológica que puede aumentar el consumo de esta fruta y por consiguiente contribuir a una dieta más saludable (Sáenz y Sepúlveda, 2001).

Cuadro 2. Análisis químico de la pulpa y del jugo de tuna

Determinación	Pulpa de Tuna (g/100g)	Jugo de Tuna (g/100g)
Humedad	84-90	88
Proteína	0.2-1.6	0.5
Grasa	0.09-0.7	0.5
Fibra	0.02-3.1	0
Ceniza	0.3-1.0	0.2
Carbohidratos	10-17	10.8
	mg/100g	mg/100g
Ca ²⁺	12.8-59	18
Fe ²⁺	0.4-1.5	0.42
P	15-32.8	20.55
Mg ²⁺	13-63	25

(Filardo, 2001, Piga, 2004).

Además de los nutrientes mencionados, la tuna presenta otros es compuestos (Cuadro 3) que son de igual importancia y contribuyen a su posible impacto en la salud humana, entre los que podemos mencionar, a las betalaínas, carotenoides, flavonoides y algunos CF, que en conjunto se denominan fitoquímicos (Sáenz y Sepúlveda, 2001).

4.5 PRINCIPALES PROPIEDADES DE LOS FITOQUÍMICOS DE LA TUNA

Los fitoquímicos son compuestos que tienen efectos benéficos para la salud y se pueden encontrar en prácticamente todas las verduras y frutas, incluyendo a la tuna (Aponte y col, 2008). En este caso, tanto el fruto mismo como su cáscara son una fuente importante de tales componentes, los cuales aumentan el valor nutricional de la fruta, incrementan el su consumo, propician una dieta mas saludable y favorecen el diseño de nuevos alimentos funcionales (Sáenz, 2004). La tuna, además de los fitoquímicos, contiene fibra dietética constituida por diferentes componentes, destacando la celulosa, la hemicelulosa y la lignina por su propiedad de ser resistentes a las enzimas digestivas (Spiller, 1992; Periago y col, 1993). Estas fracciones de fibra tienen efectos fisiológicos distintos, ya que asocian con la reducción de los niveles de glucosa y de colesterol, actúan en la estabilización del vaciamiento gástrico, tienen la capacidad de retener agua

(aumento del peso de las heces), favorecen el intercambio iónico, la absorción de ácidos biliares, minerales, vitaminas y otros nutrimentos; es por eso que la tuna se consume generalmente con todo y semillas ya que estas aportan una interesante cantidad de fibra. Muñoz y col (1995) han informado sobre las cantidades variables de fibra en tuna, en donde mencionan que esto depende de cada especie, para *Opuntia streptacantha* es de 2.73% y para *O. ficus- indica* 11.38% (Sáenz, 2004; Sáenz y cols., 2004).

Cuadro 3. Análisis químico de tres tipos de tuna

Componente	Pulpa Amarilla	Pulpa Purpura	Pulpa Verde
Flavonoides (µg/100g)	2.7	3.7	2.1
Carotenoides(µg/100g)	1.48	3.47	1.45
– Caroteno	0.08	0.16	0.06
– Caroteno	1.2	3.9	1.25
Licopeno	0.18	0.27	0.12
Fitoflueno	0.02	0.03	0.02
Betalainas (mg/L)	82.9	626.1	0.5
Betaxantinas	76.3	195.8	0.4
Betacianinas	6.6	431	0.1
Vitamina C (mg/L)	70.2	95.4	51.1
Vitamina A (UI)	41	41	41
Total Vitamina E (µg/100g)	115	111.5	114
– Tocoferol	69	68.5	67
– Tocoferol	16	14	5
– Tocoferol	30	29	32
Compuestos Fenólicos (mg/L)	247	660	242

(Mercado, 2004; Stintzing y col, 2005; Tesoriere y col, 2005).

La mayoría de los fitoquímicos presentes en la tuna destacan por potencial antioxidante, es decir, por su capacidad para interceptar radicales libres. A continuación se mencionan las principales propiedades de los fitoquímicos presentes en la tuna:

4.5.1 Vitamina C

También llamado ácido ascórbico, es una querolactona con diversas actividades fisiológicas, una de ellas es actuar como cofactor de múltiples enzimas implicadas en la síntesis de colágeno, carnitina, catecolaminas, hormona antidiurética, oxitocina, colecistocinina, y en el metabolismo de algunos medicamentos. Además ayuda a la protección de la p-fenil-pirúvico-oxidasa, estimula la síntesis de componentes de la matriz intercelular, es antioxidante, favorece la absorción intestinal del hierro y tiene acción moduladora del sistema inmune (Díaz y col, 1994).

4.5.2 Vitamina A

Compuesto fenólico ligeramente amarillo denominado retinol; suele encontrarse en forma de ésteres retinil de cadena larga y una vez que es metabolizada se activa a un aldehído (retinal) y al ácido retinoico, es por esto, que casi el 90% de la vitamina A en el cuerpo se encuentra almacenada en el hígado. El resto se deposita en la grasa, pulmones y riñones; ayudando a mantener y reparar los tejidos corporales, a favorecer la resistencia a las infecciones, a desarrollar y mantener el sistema nervioso, funciona como antioxidante, produce la púrpura visual necesaria para la visión nocturna, interviene en el crecimiento óseo y es necesaria para la diferenciación de células basales en células epiteliales de las mucosas (Ruano y col, 2006).

4.5.3 Vitamina E

Compuesto liposoluble que protege la parte lipídica de las células, especialmente la membrana celular, esta vitamina agrupa a una serie de 8 compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles subdividiéndose cada uno en α , β , γ y δ todos ellos sintetizados por las plantas. El α -tocoferol es la forma más ampliamente distribuida y activa en el ser humano mientras que el δ -tocotrienol es el menos activo. La vitamina E participa en la formación de glóbulos rojos y fibra muscular, tiene una potente actividad antioxidante ya que inhibe la oxidación de constituyentes celulares como las lipoproteínas de baja densidad (LDL); previniendo o retrasando enfermedades cardiacas, también protege contra el cáncer estimulando funciones inmunitarias e induciendo apoptosis, tiene la capacidad de bloquear carcinógenos que provocan daño cromosómico, lo cual se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Arvizu y Yahia, 2007; Singha y col, 2008).

4.5.4 Betaláínas

Las betaláínas son polifenoles, las más abundantes son las betacianinas (rojas) y las betaxantinas (amarillas), ambas se consideran alcaloides derivadas de la tirosina, fundamentalmente con un núcleo de ácido betalámico; estos compuestos pueden ser encontrados en el betabel, remolacha, tuna y otros más. Entre las actividades terapéuticas con las que se le relaciona esta su potencial antioxidante, antiinflamatorio, antimalarial, y actividad antitumoral; influye directamente en la resistencia a lesiones hepáticas, al igual disminuye la presión sanguínea, también ayuda en afecciones de piel y a la protección de los rayos UV (Svenson y col, 2008; Castellar y col, 2008).

4.5.5 Flavonoides

Comprenden un amplio grupo de compuestos polifenólicos que aparecen de forma espontánea en casi todas las plantas superiores. Poseen un origen biosintético común y, por ese motivo, un mismo elemento estructural básico con diferentes grados de oxidación, dando lugar a las distintas familias estructurales (flavonas, flavonoles, flavanonas, catequinas, antocianos, isoflavonas, chalconas y auronas). La mayoría de los flavonoides se encuentran en forma de heterósidos, y entre los azúcares que entran a formar parte de su estructura se incluyen la D-glucosa, la L-raminosa, la glucoraminosa, la galactosa y la arabinosa. La presencia generalizada de los flavonoides en los alimentos implica su consumo regular en una dieta normal, aunque varía la cantidad diaria dependiendo de los hábitos dietéticos de una población determinada (Hertog y col, 1993; Borrella y Fontoura, 2002; Martínez, 2002; Pérez, 2003). Estos inhiben la carcinogénesis por reducción de los niveles poliaminas, estas últimas están presentes en todas las células ya que ayuda al crecimiento de y proliferación celular. Así mismo favorecen los efectos de la vitamina C (Fukuda y col, 1997).

4.5.6 Carotenoides

Estructuralmente son tetraterpenos derivados de la unión de 8 unidades de isopreno que origina un esqueleto de 40 átomos de carbono, en general se clasifican en dos grandes grupos: carotenos (estrictamente hidrocarburos) y xantofilas; los carotenos alfa, beta y gama son los más importantes debido a que protegen a las membranas celulares y tienen importantes funciones relacionadas con la salud de nuestros ojos y mucosas, también fortalecen el sistema inmunológico y ayudan a prevenir las enfermedades

cardiovasculares; algunos estudios han mostrado que los carotenoides inhiben la acción mutagénica de diversos carcinógenos y previenen la transformación oncogénica producidas por la luz ultravioleta, por lo que su impacto mas relevante se enfoca a su capacidad antioxidante (Madrigal y Viveros, 1996; Sánchez y col, 1999; Slattery y col, 2000).

4.6 QUIMIOPREVENCIÓN

El termino quimiopreención expresa el intento deliberado de frenar o revertir el proceso de las células premalignas hacia la malignidad; esta estrategia para prevenir el cáncer es una alternativa diferente a la quimioterapia la cual contiene los siguientes fundamentos, que las etapas del proceso carcinogénico, especialmente la iniciación y la promoción, se han podido modificar en sistemas *in vitro*. Otra es que los compuestos pertenecientes a distintas familias químicas como las vitaminas, iones metálicos, fenoles, tocoferoles, tioles y proteínas han mostrado propiedades antimutagénicas y/o anticarcinógenicas. Y por ultimo las evidencias epidemiológicas y experimentales indican que los agentes químicos ambientales, incluyendo los factores dietéticos, un importante papel en el desarrollo del cáncer (Madrigal y Viveros, 1996).

Los agentes quimiopreventivos se agrupan en tres partes de acuerdo a su acción; los inhibidores de proliferación celular, que actúan al reducir la actividad enzimática o estrogénica; los agentes bloqueadores de la carcinogénesis, que incluye a compuestos inductores de la actividad de enzimas carcinógeno-desintoxicadoras como es el caso de la glutathion S-transferasa; y los antioxidantes cuya actividad principal se refiere a la interacción con los carcinógenos, de manera que interfieren con sus sitios electrolíticos o rompen radicales libres (Madrigal y Viveros, 1996).

4.7 RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES

Los Radicales Libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado (aquél que ocupa una órbita atómica o molecular por sí mismo), pueden existir de forma independiente y que, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media (Mitjavila y col., 2001; Boots y col., 2008).

La generación de RL no se ha de relacionar siempre con su toxicidad debido a que la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos. La producción de RL ocurre como un subproducto del metabolismo oxidativo celular, particularmente en el hígado, dicho metabolismo aumenta con la ingesta de los alimentos, presencia de tóxicos o cualquier otro agente externo capaz de provocar el llamado estrés oxidativo. De todo el conjunto de ROS los primeros que se forman *in vivo* son el súperoxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Gutiérrez, 2007).

Los efectos dañinos de los RL están controlados en el organismo humano mediante un amplio espectro de antioxidantes de origen endógeno (como la glutatión, albúmina, transferrina, ceruloplasmina, haptoglobulina, hemopexina, ácido úrico, bilirrubina, albúmina) así como de origen exógeno que se consumen a través de la dieta como son vitaminas, carotenoides, iones metálicos y CF (Gutteridge, 1995; Ballester y Honores, 1996). Dependiendo de su mecanismo de acción los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios o terciarios. Los primarios impiden la formación de radicales libres (como los quelantes de metales de transición), en el segundo caso, tenemos a los interrumpen la reacción de propagación (como los tocoferoles y el ácido ascórbico) y/o los que desplazan a las especies reactivas de oxígeno (como los carotenoides, glutatión y la mayoría de enzimas antioxidantes); finalmente, los terciarios son aquellos que reparan el daño causado a las RL o eliminan aquellas moléculas que se han estropeado (Kumpulainen y Salonen, 1999).

Muchos compuestos antioxidantes presentan un solo mecanismo de acción, pero otros como por ejemplo los CF pueden tener acciones combinadas. Los compuestos fenólicos estabilizan los radicales libres al ceder un hidrógeno de sus grupos hidroxilos, formándose un puente de hidrógeno entre dos grupos cercanos. El grado de actividad de los CF y de otros muchos antioxidantes, está relacionado con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula (Filipe y col, 2001; Fuhrman, 2000; Ramón y col, 1996; Bravo, 1998). Cabe destacar que dentro del organismo debe existir un equilibrio entre la concentración de RL y los mecanismos protectores, ya que si este se altera pueden dañarse diferentes moléculas, incluyendo al material genético (Nordmann, 1993).

4.8 EL MATERIAL GENÉTICO

El material genético es la entidad que contiene la información a partir de la cual, todos y cada uno de los seres vivos del planeta desarrollan sus rasgos de acuerdo a su especie; de manera que todas las características morfológicas y fisiológicas de los organismos dependen de su constitución genética y de su interrelación con el ambiente en donde se desarrollan (Hernández, 1996; Lantigua, 2004). Las células contienen dos copias del material genético completo, por consiguiente cuando la célula se divide, el material se organiza en una serie de estructuras llamadas cromosomas. Cada cromosoma posee una contraparte que tiene el mismo largo y forma (con excepción de aquellos que determinan el sexo) y ambos contienen la información genética del mismo rasgo, sin embargo, uno deriva del padre y el otro de la madre (Lisker, 2001).

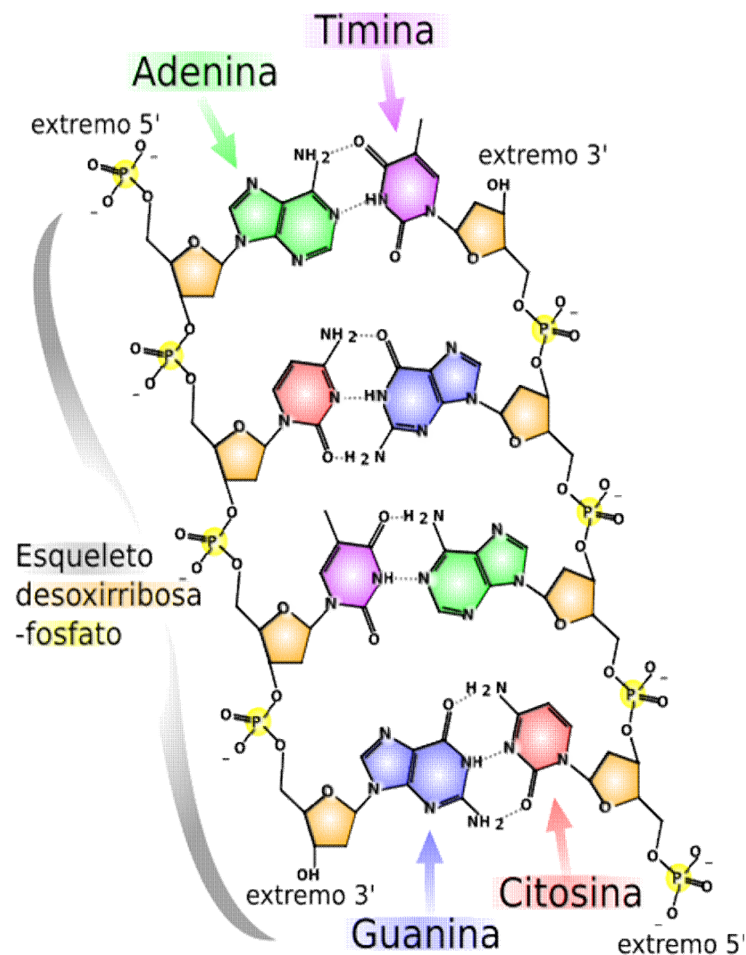


Figura 1. Estructura del DNA

Los cromosomas están formados por ácido desoxirribonucleico (DNA) e histonas que son moléculas proteicas; el DNA contiene la información genética y las histonas juegan un papel importante en los mecanismos de regulación génica (Lisker, 2001); el ácido desoxirribonucleico esta constituido por cadenas de nucleótidos (Figura 1) y cada uno de ellos esta constituido por tres diferentes componentes; un grupo fosfato, un azúcar (en este caso, la desoxirribosa) y una base nitrogenada (BN) (Repetto, 1997) .

4.9 TOXICOLOGÍA GENÉTICA

La toxicología genética se refiere al estudio de las causas y mecanismos involucrados en la expresión del daño al material genético, el cual como se mencionó en los párrafos anteriores, al estar constituido por bases nitrogenadas (púricas y pirimídicas) es susceptible a ser alterado por sustancias extrañas con acción directa o indirecta como pueden ser los mutágenos (Klassen, 2008 y Brusick, 1990). Se puede decir que es una disciplina cuyo objetivo es estudiar las mutaciones inducidas por agentes físicos, químicos y biológicos, e identificar las interacciones y mecanismos de acción, así como la manera en que se pueden evitar dichos danos (Cuenca y Ramírez, 2004).

En este sentido, es conveniente mencionar que una mutación se refiere a cualquier cambio en uno o varios pares de BN que pueden provocar alteraciones en la estructura o en el número de cromosomas y por consiguiente danos notables en la conformación estructural del DNA (Snustad, 1997; Nelson y Cox, 2000). Los cambios puede incluir una porción tan grande de un cromosoma que sea visible al microscopio o pueden ser tan pequeñas (submicroscopicas) como alteración en una sola BN (Lisker, 2001).

Solarí (1999) y Gardner (2003) organizaron las alteraciones del material genético en función del lugar y de la manera en que se presentan, clasificándolas de manera general en:

- Somáticas.- Cuando el cambio solo afecta al soma del individuo y por tanto no se transmitirá a su descendencia.
- Germinales: Cuando puede ser transmitida por los gametos a la descendencia, perpetuándose en la especie y originando individuos que llevan la mutación, tanto en sus células somáticas como en las líneas germinales.
- Cromosómicas o génicas: Aquellas que afectan al número y/o estructura de los cromosomas o a los genes (Solarí, 1999).

- Espontáneas: Aquellas que se presentan sin causa conocida; pueden ser realmente espontáneas, las que resulten de un bajo nivel de errores metabólicos inherentes, es decir errores durante la replicación del DNA, o bien que sean causadas por mutágenos presentes en el medio ambiente.
- Inducidas: Aquellas producidas directa o indirectamente por el hombre o que son resultado del uso frecuente de ciertos agentes con potencial mutagénico (Gardner, 2003).

4.10 CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES MUTAGÉNICOS

Tanto en la naturaleza como por acción del hombre de manera sintética o semisintética, los agentes mutagénicos se han clasificado en físicos, químicos y biológicos.

a) Mutágenos físicos

En esta categoría se incluyen principalmente radiaciones electromagnéticas que son producidas por transiciones electrónicas entre niveles de energía atómica (UV, Rayos X), y por decaimiento radioactivo en los núcleos atómicos (como los Rayos γ), así mismo, por radiaciones de partículas producidas en núcleos inestables con exceso de neutrones (decaimiento beta) o por fisión nuclear (decaimiento alfa) cuyos productos pueden ser: partículas α , partículas β , neutrones y protones (Melts, 1991).

b) Mutágenos biológicos

Esta categoría incluyen virus y bacterias; los más conocidos son el virus del papiloma humano (VPH) que produce cáncer cervical, el virus de Epstein-Barr que puede ocasionar linfomas (como ejemplo, el cáncer de las células blancas) y los virus de la hepatitis B y C que están relacionados con el cáncer de hígado.

c) Mutágenos químicos

Este grupo es el más extenso, ya que se conocen diversos productos químicos tanto naturales como sintéticos con dicha capacidad, dentro de los más relevantes se pueden mencionar a:

- Análogos de bases.- Aquellos que debido a su similitud estructural con las BN pueden provocar errores en la cadena del DNA, provocando que la replicación sea ineficiente y dando como resultado errores de lectura que a

su vez incorpora bases erróneas en la copia de DNA. Dentro de este grupo tenemos al 5-Bromouracilo o la 2-Aminopurina que se incorporan en el DNA ocasionando transiciones que generalmente están relacionadas con AT a GC (Von Borstel, 1986).

- Agentes que reaccionan directamente con el DNA.- Son aquellos que ocasionan cambios químicos en las bases nitrogenadas provocando un apareamiento incorrecto. Como es el caso del ácido nitroso (HNO_2), el cual desamina a la adenina a hipoxantina y la citosina a uracilo (por lo que la hipoxantina se aparea con la citosina; uracilo con adenina) produciendo transiciones AT ----> GC y/o GC ----> AT. Otro caso muy frecuente, es el de la hidroxilamina (NH_2OH) que reacciona con la citosina donde el grupo amino es reemplazado por un grupo hidroxilamino por lo que provoca que la citosina se aparee con la adenina produciéndose transiciones GC ----> AT (Van Zeeland y cols., 1995)
- Agentes intercalantes.- Son moléculas planas que se insertan entre dos pares de bases de la cadena de DNA ocasionando su separación durante la replicación. Esta conformación anormal puede conducir microinserciones o microdeleciones en el material genético, originando mutaciones por corrimiento de lectura; las acridinas y el bromuro de etidio son un ejemplo claro de este tipo de agentes (Van Zeeland y cols., 1995).
- Agentes alquilantes.- Son considerados carcinógenos, mutágenos, teratogénos e inmunosupresores. Este tipo de agentes al interactuar con el material genético, frena la replicación y por ende la división celular, además las mutaciones ocasionadas a las células pueden ser letales, siendo esta la base para utilizarlos como agentes terapéuticos en procesos neoplásicos (Hernández, 1996). Estos agentes dan como resultado un daño producido denominado como alquilante, debido a que sustituyen un grupo alquilo, amino o ceto por un átomo de hidrógeno en compuestos orgánicos, preferiblemente el DNA, su principal efecto es un incorrecto apareamiento entre las BN o la producción de roturas espontáneas (Little y col, 1993).

4.11 MECANISMOS DE ACCION DE LOS AGENTES ALQUILANTES

Como ya se menciona, los agentes alquilantes se consideran las sustancias mutagénicas con mayor potencia, ya que presentan mas de un mecanismo de interacción con el DNA. Estos agentes tienen la característica de formar electrófilos muy potentes como los carbocationes u otros intermediarios que forman enlaces covalentes con sitios blancos como los grupos fosfato, amino, sulfhídrico, hidroxilo, carboxilo e imidazol presentes en las moléculas de los organismos (Sawicki y Sawicki, 1969; Kaina y col 1993). En general, su acción es relativamente cicloinespecífica, ya que pueden reaccionar con las células en cualquier momento, incluso en fase G1; ya que los polinucleótidos son más susceptibles a la alquilación cuando sus estructuras se encuentran en situación de cambio o de desparejamiento durante el proceso de replicación. Por lo tanto, la alquilación será más eficaz al final de la fase G1 y en la fase S (Gardner, 2003)

Aunque son muchos los componentes celulares que sufren el proceso de alquilación (DNA, RNA, proteínas y membranas) y los grupos fosfato son preferentemente los que interactúan con estos los agente, son las bases nitrogenadas las más afectadas (Little y col, 1993). Por ejemplo, con la mecloretamina, la posición más activa es el nitrógeno 7 (N7) de la guanina. Su alquilación produce importantes cambios en las propiedades químicas de la guanina; la carga positiva generada en el anillo imidazólico, lo hace más lábil, favoreciendo la forma de tautómero enólico; como consecuencia, la guanina puede mostrar preferencia por emparejarse con la timina en lugar de hacerlo con la citosina; para así favorecer una hidrólisis, desestabilizando localmente el DNA y realizando una escisión de la cadena; finalmente, puede abrirse el anillo imidazólico ocasionando la despurinización (Flórez, 1997). También se ha relacionado un mecanismo en el que la alquilación ocasionada por estos agentes activan procesos de reparación, lo cual ocasiona transversiones y desfaseamientos, además de dar una reparación defectuosa (Godman, 1996). Otro mecanismo consiste en transferir el grupo alquilreactivo al centro activo de una cisteína, como ocurre en el caso de tener una O6-metilguanina-DNA-metiltransferasa, que es una enzima presente en las células de mamíferos, lo cual reduce la tasa de mutaciones puntuales, las alquiltransferasa representan el principal mecanismo de protección en contra de los agentes alquilantes (Hernández, 1996). Existen muchos agentes dentro de esta categoría, tales como las mostazas nitrogenadas y sulfuradas, las nitrosaminas, el etil y el metil metanosulfonato (EMS y MMS).

4.12 METILMETONOSULFONATO

4.12.1 Características físicas y químicas

Es un compuesto formado químicamente por 2 moléculas de metano y 1 grupo sulfato (Figura 4), es ligeramente soluble (a 25 ° C) en solventes poco polares, presenta un punto de ebullición de 203° C, estable en el medio ambiente, de forma líquida e incolora. Sus usos principales son como catalizador en la elaboración de polímeros, en la alquilación, en reacciones de esterificación y en la investigación sobre la quimioterapia carcinogénica (IARC, 1999).

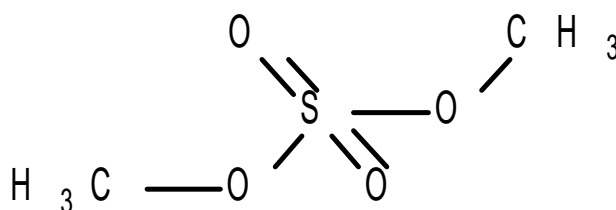


Figura 2. Estructura del compuesto metil metanosulfonato

4.12.2 Aspectos farmacocinéticos y efectos tóxicos del MMS

Observaciones realizadas en humanos han indicado que la ingestión de MMS da como resultado náusea, vómitos, disminución de la agudeza visual, y anormalidades en sangre (Bateman y cols., 1966). En ratones, se ha observado que después de ser inyectados por vía intraperitoneal es absorbido rápidamente por el tracto digestivo, se distribuye en pulmón, bazo, corazón, epidermis, cerebro, testículos, sangre y músculo esquelético (Cumming y Walton, 1970), dependiendo de la dosis puede provocar edemas pulmonares, linfomas, diferentes tumores siendo los mas comunes aquellos de medula espinal, de piel, músculos y neurogénicos en la descendencia (Kleihues y col, 1972; Swann y Magee, 1969); generalmente, es excretado mediante la vía renal aunque también hay antecedentes que se puede eliminar por sudor, el cabello, heces fecales y leche materna (IARC, 1999).

En relación a su capacidad mutagénica, existen pruebas que indican que da positivo en la prueba Ames y produce otras alteraciones mutagénicas tanto *in vivo* como *in vitro* (Kleihues y col, 1972; Bateman y col, 1996). Esta plenamente establecido su potencial carcinogénico, ya que produce tumores en las fosas nasales, en sistema nervioso, en bazo, entre otros órganos, además de actuar como agente promotor de cáncer de piel y

de linfomas (Bateman y col, 1996). En células germinales y somáticas de roedores, así como en cultivos celulares induce aberraciones cromosómicas, rupturas de cadena sencilla y doble. En *Drosophila melanogaster* ocasiona mutaciones ligadas al sexo (IARC, 1999).

4.12.3 Mecanismos de acción del MMS

El MMS es un agente alquilante monofuncional con actividad neoplásica mutagénica y es considerado un carcinógeno directo, es decir, no requiere de conversión metabólica para ejercer su efecto y alquilar al DNA. Generalmente, se une a la doble cadena del material genético en el N7 de la guanina y en el Nitrógeno 3 (N3) de la adenina, produciendo compuestos como metil-guanina y metil-adenina (Figura 5).

Otras alteraciones que ocasiona el MMS sobre el DNA son las depurinaciones y rompimiento de cadenas sencillas. En el DNA se forman sitios apurínicos y apirimídicos, así como enlaces fosfodiéster y entrecruzamientos en la doble cadena (Madrigal y col, 1998).

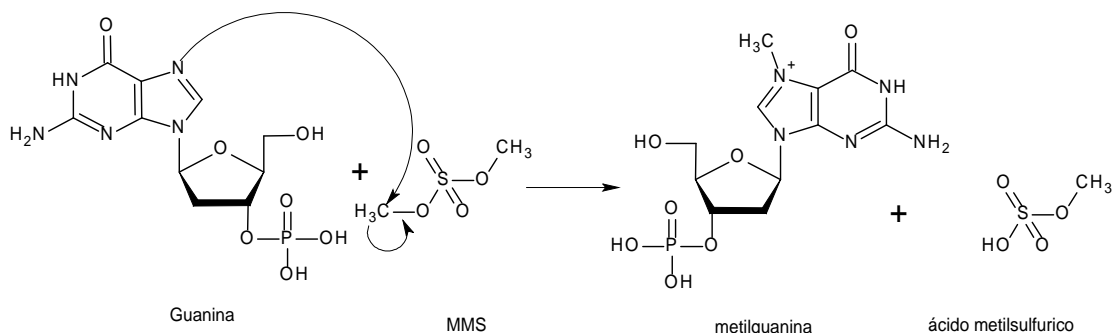


Figura 3. Mecanismo de alquilación del MMS con la guanina (Madrigal y Col, 1998).

4.13 EVALUACIÓN DE LOS AGENTES CON POSIBLES PROPIEDADES QUIMIPROTECTORAS

Debido a que desde hace tiempo se ha sugerido que el cáncer tiene relación con alteraciones del material genético, en especial con las mutaciones, es justificable y necesario el desarrollo y el adecuado manejo de sistemas de prueba que permitan detectar la capacidad genotóxica y antigenotóxica de los compuestos; lo cual permitiría confirmar la propiedad quimi protectora de las sustancias. En este sentido, existen diversas pruebas para evaluar la genotoxicidad y antigenotoxicidad de las sustancias, que en general se han clasificado de la siguiente manera (Cuadro 4).

Cuadro 4. Clasificación de los diferentes tipos de evaluación quimioprotectora

Clasificación de evaluación	Tipo de ensayo
Evaluación de daño y reparación de DNA	Detecciones directas
	Bacterianos
	Para la reparación de daños en células de mamíferos
Evaluación en células procariontes	De mutación inversa (de Ames)
	De mutación transversa (resistencia a al arabinosa)
Evaluación en células eucariotas no de mamíferos	Fúngicos en mutaciones de genes
	Con hongos para aneuploidias
	Fúngicos induciendo recombinación
	En Planta
	En <i>Drosophila</i>
Evaluación en mamíferos	<i>In vitro</i> para presentar mutaciones
	<i>In vivo</i> en células somáticas
	Transgénicos
Mutagénesis en células germinales	Medición de los daños del DNA
	Mutaciones de genes
	Aberraciones cromosómicas
	Mutaciones dominantes letales
	Aneuploidias
Evaluación citogenética en mamíferos	Aberraciones cromosómicas
	Micronúcleos
	Intercambio de cromátidas hermanas
	Aneuploidia de células en mitosis

(Hoffman y Preston, 2008)

4.14 IMPORTANCIA DE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

4.14.1 Desarrollo eritropoyético

En el proceso de formación de los glóbulos rojos o eritrocitos (Figura 6), se produce la multiplicación celular con un aumento progresivo de hemoglobina y una disminución del tamaño nuclear hasta su completa desaparición en la célula adulta (Guyton y Hall, 2001).

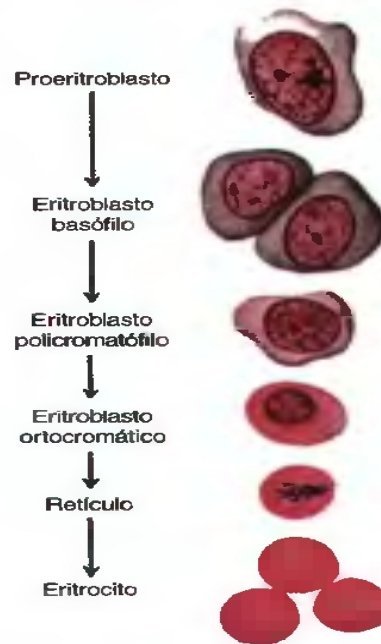


Figura 4. Proceso de producción de eritrocitos

La primera célula que puede identificarse como perteneciente a la serie roja es el Proeritroblasto; con una estimulación apropiada, se forma un gran número de estas células a partir de las células madre CFU-E (unidad formadora de colonias de eritrocitos); una vez que aparece el proeritroblasto, se divide varias veces más formando finalmente muchos eritrocitos maduros; las células de la primera generación se denominan eritroblastos basófilos porque se tiñen con colorantes alcalinos, en este momento la célula ha acumulado muy poca hemoglobina (Ladero, 2006); en las generaciones siguientes las células se llenan de hemoglobina hasta una concentración aproximadamente de 34%, el núcleo se condensa y empequeñece y el resto nuclear final sale de la célula (Guyton y Hall, 2001), al mismo tiempo, se reabsorbe el retículo endoplásmico; en este estadio la célula recibe el nombre de reticulocito porque todavía contiene una pequeña cantidad de material basófilo, formado por restos del

aparato de Golgi, mitocondrias y algunos otros organelos citoplasmáticos, durante esta fase los reticulocitos de la médula ósea entran en los capilares sanguíneos por diapédesis (estrujamiento a través de los poros de la membrana capilar), el material basófilo restante de los reticulocitos desaparece normalmente en uno a dos días, con lo que las células se convierten entonces en eritrocitos maduros; Dada la corta vida de los eritrocitos, su concentración entre todos los eritrocitos de la sangre suelen ser algo menor del 1% (Guyton y Hall, 2001; Best y Taylor, 1999).

4.14.2 Características generales de la prueba de MN

El análisis de metafase requiere tiempo y habilidad considerable, por lo que se han desarrollado análisis citogenéticos más simples, de los cuales el ensayo de micronúcleos se ha convertido en el más importante; la prueba de los micronúcleos fue desarrollada por Schmid y col (1976), basándose en que son estructuras limitadas de membrana que contienen fragmentos de cromosomas o a veces cromosomas que no fueron incorporados al núcleo de una célula hija en la mitosis (Ma y col, 1995; Hoffman y Preston, 2008); más explícitamente, durante la división celular el material genético contenido en el núcleo se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea durante la replicación y posterior división del DNA, debido a roturas cromosómicas, al efecto de radiaciones y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo; cuando esto ocurre, el material genético que se desprende, queda excluido y no se incorpora correctamente al nuevo núcleo de la célula hija, origina un núcleo de menor tamaño que el primario denominado MN (Zalacain y col, 2005). Dicho ensayo se puede realizar en linfocitos, en líneas celulares e indiscutiblemente en aquellas células que no tienen un núcleo definido, los eritrocitos (Hoffman y Preston, 2008).

En este modelo, los eritrocitos constituyen la manera más eficaz de evaluar la afección de la actividad medular, así como la capacidad clastogénica de los compuestos en corto tiempo; la razón de que en un estudio agudo se monitoree la presencia de eritrocitos policromáticos (EPC), radica en el hecho de que son células jóvenes (reticulocitos) recientemente liberadas a la circulación. Los EPC presentan una coloración mezclada entre basofílica y eosinofílica, por lo que tienen un tinte azul violáceo, en cuanto a su tamaño este es generalmente mayor que el de los eritrocitos normocrómicos (ENC) (Madrigal, 2000). La coloración de EPC se debe a la presencia de ácido ribonucleico, ya

que en el momento de su diapédesis hacia la circulación falta aproximadamente 20% del contenido de hemoglobina, por lo que aún conserva parte del aparato ribosómico para terminar la síntesis y construir de esta manera una célula madura (Figura 7) (Deimling y col, 2009).

Las diferentes características de los agentes como la necesidad de ser activado por el metabolismo (bioactivación), el tiempo que tarda en llegar al órgano o tejido y en ser eliminado del organismo (farmacocinética), o su acción toxica en la célula (citotóxicidad) pueden afectar el tiempo de aparición de los eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en la sangre, por lo que las variaciones de tiempo óptimo de análisis hacen prácticamente imposible comparar las eficiencias de inducción de MN en diferentes agentes (Morales y col, 1994), es por eso que hay que tener en cuenta que dichos agentes tienen diferentes mecanismos, los dos más frecuentemente involucrados son: a) La inhibición de la polimerización de la proteína que forma los microtúbulos del huso acromático denominada tubulina; esto tiene consecuencias sobre la migración cromosómica y la producción de células aneuploides es decir que no tiene el complemento normal de cromosomas, y b) La producción de rupturas cromosómicas (Morales y col, 1997).

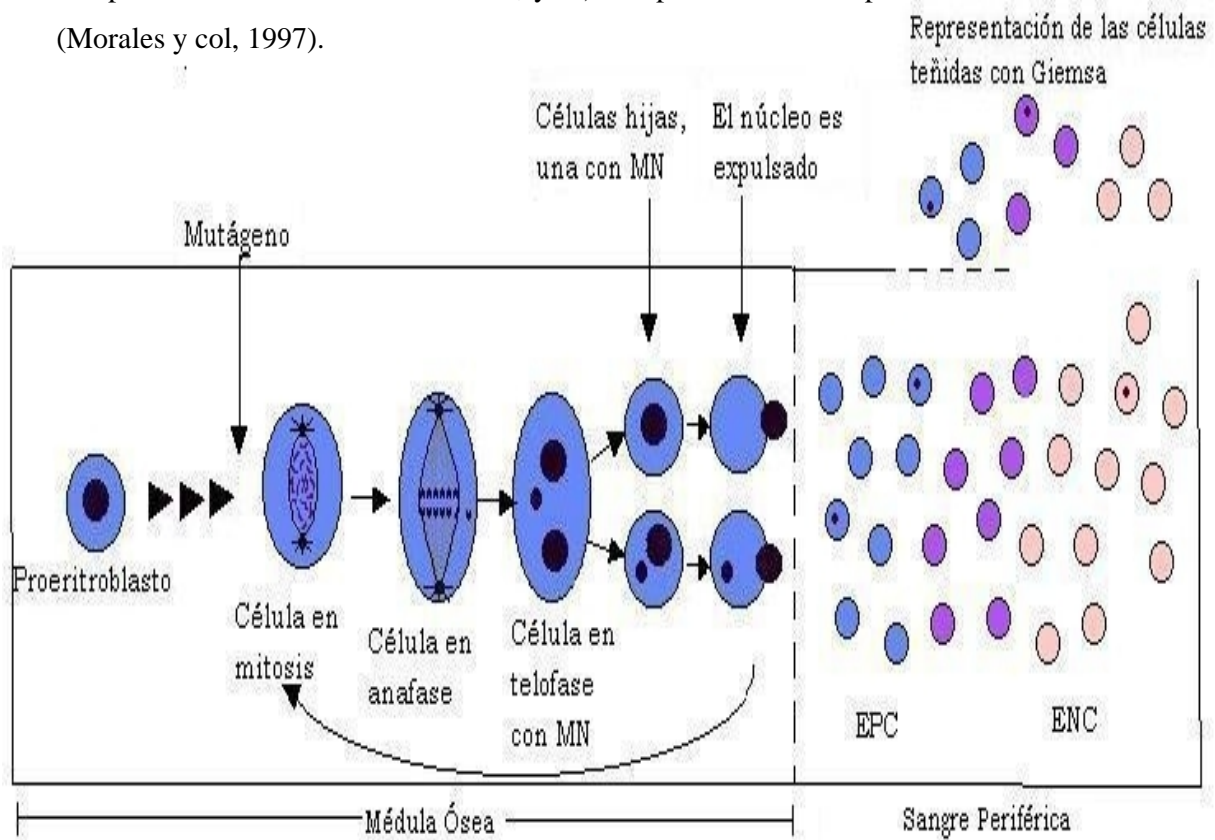


Figura 5. Formación de micronúcleos durante la eritropoyesis.

Al comienzo de los años setenta. Schmid y col, así como Haddle iniciaron los estudios para determinar que parámetros podrían servir como indicadores útiles de daño citogenético en la medula ósea *in vivo*. Este trabajo llevo a la conclusión de que la incidencia EPCMN era un indicador útil en el daño citogenético; en medula ósea. En base a este trabajo fue posible el desarrollo de una prueba simple *in vivo*, en donde la identificación de EPCMN, nos permite evaluar el daño citogenética, esta prueba es ampliamente usada y referida (Morales y col, 1998).

El ensayo de micronúcleos en sangre periférica fue originalmente creado para ser aplicado únicamente en ratones, ya que esta especie animal es incapaz de eliminar los eritrocitos micronucleados en la sangre. Sin embargo, estudios recientes en ratas también mostraron que forman micronúcleos en las mismas células jóvenes (EPCMN) y pueden ser observables en sangre periférica. Asimismo, existen diversos antecedentes de que la prueba de MN también es un biomarcador importante de daño usado en los humanos y animales como lo demuestran algunos autores (Mc Gregor y col, 1990; Morales y col, 1994; Ma y col, 1995; Van y col, 1995; Hernández, 1996; Morales y col, 1997; Morales y col, 1998; Cuenca y Ramírez, 2004; Deimling y col, 2009).

V. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el ser humano esta constantemente expuesto a diversos agentes mutagénicos y carcinogénicos, es necesario prevenir de alguna manera sus efectos, por lo que una opción viable es el consumo de compuestos denominados quimiopreventivos, los cuales se pueden encontrar en fármacos, en plantas e indiscutiblemente en los alimentos. En este ultimo caso, se sabe que algunos alimentos contienen sustancias con potencial antioxidante que secuestran los radicales libres que se producen durante la biotransformación de algunos mutágenos; en el caso específico de la tuna, es conocida su alta ingesta en nuestro país desde tiempos prehispánicos como alimento y planta medicinal; desafortunadamente, pocos son los estudios científicos relacionados con su capacidad terapéutica, sin embargo, se le ha involucrado con actividades antiinflamatorias, control de afecciones cardiovasculares, disminución de problemas asmáticos y artritis; esto debido a su composición nutricional que en general esta constituida por un alto contenido de fibra insoluble, ácidos grasos, proteínas, minerales, vitaminas, carotenoides, flavonoides y betalainas lo que hacen a la tuna un buen candidato para ser un agente quimioprotector sobre el material genético. Es por esto, que la finalidad del presente estudio es evaluar el efecto antioxidante de las tres variedades de tuna para seleccionar la de mayor potencial y probarla en un modelo animal para determinar su potencial quimoprotector que permitirá abrir un nuevo campo de estudio a este fruto e incrementar la información sobre su potencial quimiopreventivo

VI. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

- Si el jugo de tuna presenta propiedades antioxidantes entonces se le puede considerar una sustancia quimioprotectora al evitar o contrarrestar el efecto tóxico del metil metanosulfonato sobre el material genético.

Objetivo General:

- Determinar el potencial antioxidante y la capacidad antigenotóxica del jugo de tuna en ratón.

Objetivos particulares:

1. Evaluar y comparar el potencial antioxidante de tres variedades (blanca-verde, amarilla-anaranjada y roja-purpura) de jugo tuna.
2. Seleccionar la variedad con mayor potencial antioxidante para determinar su posible efecto genotóxico y citotóxico por medio del ensayo de micronúcleos.
3. Analizar el efecto antigenotóxico y anticitotóxico del jugo de tuna con mayor potencial antioxidante sobre el daño al material genético producido por el metil metanosulfonato por medio del ensayo de micronúcleos

VII. METODOLOGÍA

7.1 Preparación de las 3 muestras del jugo de tuna

Los tres tipos de tuna (verde-blanco, amarillo-anaranjado y roja púrpura) se adquirieron en la comunidad de Emiliano Zapata, Hidalgo. Se procedió a la obtención del jugo de tuna (JT) en sus tres variedades para lo cual se limpiaron las tunas en agua y se eliminaron las semillas, posteriormente, se introdujeron a un extractor de jugos (Marca Turmix) y finalmente el extracto de tuna se filtró al vacío para después mantenerse en congelación a -70 C hasta el momento de realizar el experimento.

7.2 Determinación de capacidad interceptora de radicales libres del JT mediante el ensayo del radical difenilpicrilhidracil (DPPH).

Esta parte del estudio tuvo como finalidad determinar la capacidad secuestradora de radicales libres (RL) de las tres variedades de tuna (blanca-verde, amarilla-naranja y roja-púrpura) para lo cual se utilizó la técnica descrita por Burtis y Bucar (2000), cuyo procedimiento fue el siguiente:

- a) Inicialmente, se preparó una solución metanólica al 0.004% (grado reactivo con bajas concentraciones de Fe marca JT Baker) del radical estable DPPH.
- b) Posteriormente se prepararon soluciones metanólicas de las tres variedades del JT de acuerdo al Cuadro 5.
- c) Se adicionaron 50 μ l de cada solución del JT en un tubo de ensaye que contenía 5 mL de la solución metanólica del DPPH, (se realizó por triplicado), además se consideraron 5 tubos de la solución metanólica del DPPH como testigo control. Todos los tubos fueron agitados mecánicamente e incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- d) Transcurrido este periodo se leyeron en un espectrofotómetro (Marca Jenway) a una absorbancia de 517 nm.
- e) Finalmente, los datos fueron analizados con la prueba t de Student mediante el programa estadístico Instant 3.0 y se compararon con el reactivo de DPPH. (Figura 6).

Cuadro 5. Concentraciones de los reactivos con capacidad interceptora de radicales libres utilizados en el ensayo del DPPH

REACTIVO	CLAVE	CONCENTRACIÓN mg/mL
Vitamina E	Vit E	1
JT blanca-verde	JTBV100	100
JT blanca-verde	JTBV250	250
JT blanca-verde	JTBV500	500
JT blanca-verde	JTBV750	750
JT blanca-verde	JTBV1000	1000
JT amarilla-anaranjada	JTAA100	100
JT amarilla-anaranjada	JTAA250	250
JT amarilla-anaranjada	JTAA500	500
JT amarilla-anaranjada	JTAA750	750
JT amarilla-anaranjada	JTAA1000	1000
JT roja-púrpura	JTRP100	100
JT roja-púrpura	JTRP250	250
JT roja-púrpura	JTRP500	500
JT roja-púrpura	JTRP750	750
JT roja-púrpura	JTRP1000	1000

7.3 Elección de la variedad de JT con mayor capacidad antioxidante para la realización del ensayo genotóxico y antigenotóxico.

Una vez analizada la comparación de las concentraciones de los tres tipos de JT con la vitamina E y el DPPH, se eligió la que mayor capacidad antioxidante tenía, la cual se utilizó para la prueba de genotoxicidad y antigenotoxicidad por medio del ensayo de MN.

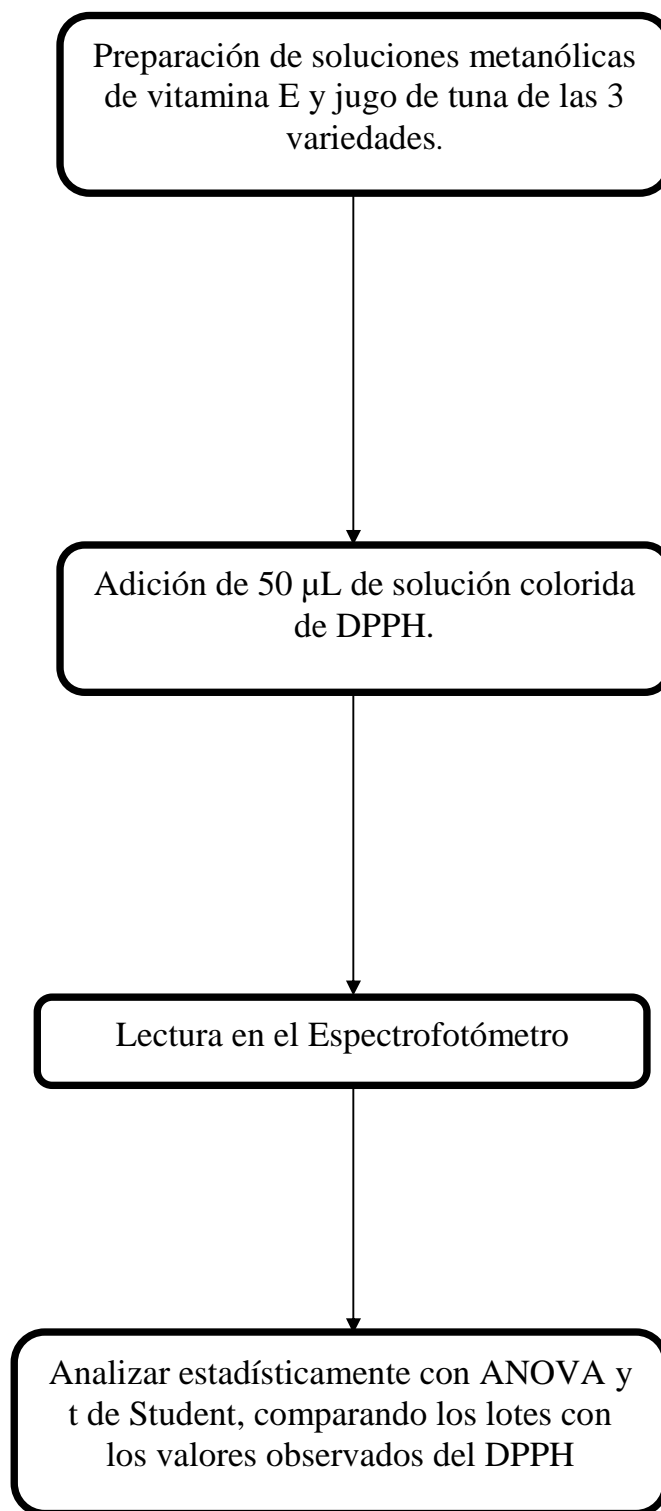


Figura 6. Diagrama general para la determinación de la capacidad interceptora de radicales libres utilizando al DPPH.

7.4 Ensayo genotóxico y antigenotóxico del JTRP

Inicialmente, se utilizaron 36 ratones machos de la cepa NIH con un peso aproximado de 32 ± 3 g los cuales fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, dichos animales se mantuvieron en el laboratorio de toxicología durante periodo de adaptación de aproximadamente 8 días, en donde se pesaron, se marcaron y se mantuvieron en condiciones ambientales con periodos alternos de luz/oscuridad de 12h durante. Además fueron colocados en jaulas de acrílico utilizando una cama de aserrín de pino estéril, la manutención consistió en alimento balanceado comercial (nutricubos) y agua purificada, *ad libitum* hasta alcanzar un peso adecuado para el ensayo.

Posteriormente, se inicio el ensayo genotóxico, para lo cual, los ratones fueron nuevamente pesados, marcados y organizados en cuatro lotes experimentales, cada uno conformado por seis individuos. A partir de esta organización, las sustancias fueron administradas de acuerdo al Cuadro 6.

Cuadro 6. Administración de sustancias experimentales del ensayo genotóxico.

Lote	Clave	JTRP (mg/Kg)
Negativo	Control	-----
Dosis alta de JT	JTDA	25
Dosis media de JT	JTDM	16.5
Dosis baja de JT	JTDB	8.3

El lote negativo se conformó con animales que fueron administrados con agua a una dosis de 25 mg/Kg. En el estudio genotóxico las sustancias fueron administradas por vía oral mediante el uso de una cánula metálica. Dicho ensayo se realizó durante una semana quedando tres tiempos, tiempo Inicial (0h), intermedio (24h) y final (48h).

Una vez concluido el ensayo anterior, se procedió a realizar la evaluación antigenotóxica del JTRP; de igual manera, los ratones fueron pesados, marcados y organizados en seis lotes experimentales, cada uno conformado por seis individuos. Y de acuerdo al Cuadro 7 se administraron las sustancias experimentales.

En el lote control se administraron los animales con agua a una dosis de 25 mL/Kg, se incluyó un control del JTRP con una dosis de 25mg/Kg. Un control positivo del mutágeno a una dosis de 40 mg/Kg y tres lotes combinados del MMS mas JT en diferentes dosis (25, 16.5 y 8.3 mg/Kg); tanto el agua como el JT fueron administrados por vía oral mediante una cánula metálica, a diferencia del MMS que se administró mediante una inyección vía intraperitoneal.

El estudio antigenotóxico tuvo una duración de 3 días (que corresponde en horas al tiempo 0, 24, 48, y 72) y todos los animales que conformaron los lotes experimentales se mantuvieron bajo las mismas condiciones experimentales de alimento y cama sanitaria.

Cuadro 7. Administración de sustancias experimentales del ensayo antigenotóxico.

Lote	Clave	JTRP (mg/Kg)	Mutágeno (mg/Kg)
Negativo	Control	-----	-----
Positivo	MMS	-----	40
Control JT	JT	25	
Combinado 1	JTDA	25	40
Combinado 2	JTDM	16.5	40
Combinado 3	JTDB	8.3	40

Tanto para el ensayo genotóxico y antigenotóxico se tomaron muestras sanguíneas en los tiempos marcados, para lo cual se cortó el extremo apical de la cola de cada uno de los ratones presionando hacia la parte distal, las gotas de sangre fueron colocadas en los extremos de diferentes portaobjetos previamente lavados (con detergente convencional) y desengrasados (en etanol durante 24h). A partir de cada gota, se realizaron frotis auxiliándose de un segundo portaobjetos, que a manera de rastrillo, forman un ángulo de aproximadamente 45° y la muestra se extiende por capilaridad en el portaobjetos “rastrillo”. Realizado este procedimiento, las laminillas se secan al aire y se fijaron en metanol.

Una vez obtenidas las laminillas, se realizó la tinción con una solución de Giemsa al 4% preparada con 2mL de colorante más 5mL de buffer de fosfatos pH 6.8 y 43mL de agua destilada. Las laminillas permanecieron en el colorante durante 15min y finalmente se lavaron con agua del grifo y se dejaron secar a temperatura ambiente para su observación al microscopio.

La observación de las laminillas se realizó en un microscopio óptico compuesto (Marca Olympus) utilizando el objetivo de 100X con aceite de inmersión y obteniendo una imagen tal como lo muestra la Figura 9. Se realizaron dos cuentas por laminilla, la primera fue la relación de la frecuencia EPC/ENC la cual se relaciona con la citotóxicidad y se obtiene por la frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos totales; también se cuantificó frecuencia de EPCMN/ en 1000 EPC, lo cual es una medida relativa a la genotóxicidad y antigénotoxicidad. La clasificación de los parámetros a evaluar durante la observación al microscopio se presenta en la Figura 7.

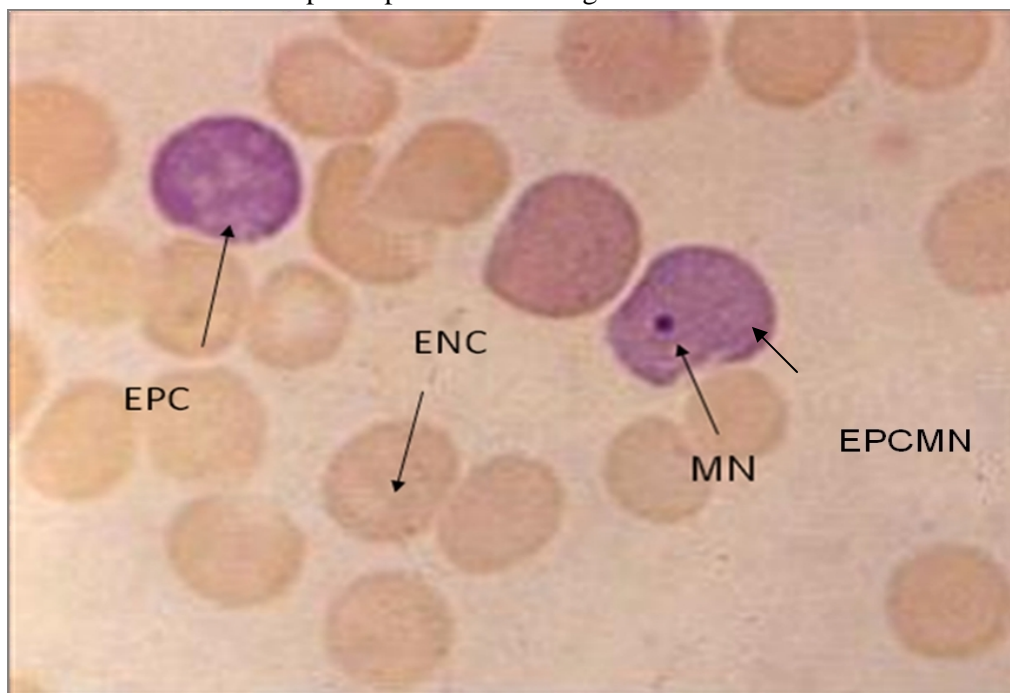


Figura 7. Imagen al microscopio donde se muestra EPC (en color morado), ENC (en color marrón), EPCMN (en color morado con un punto negro) y MN (punto negro).

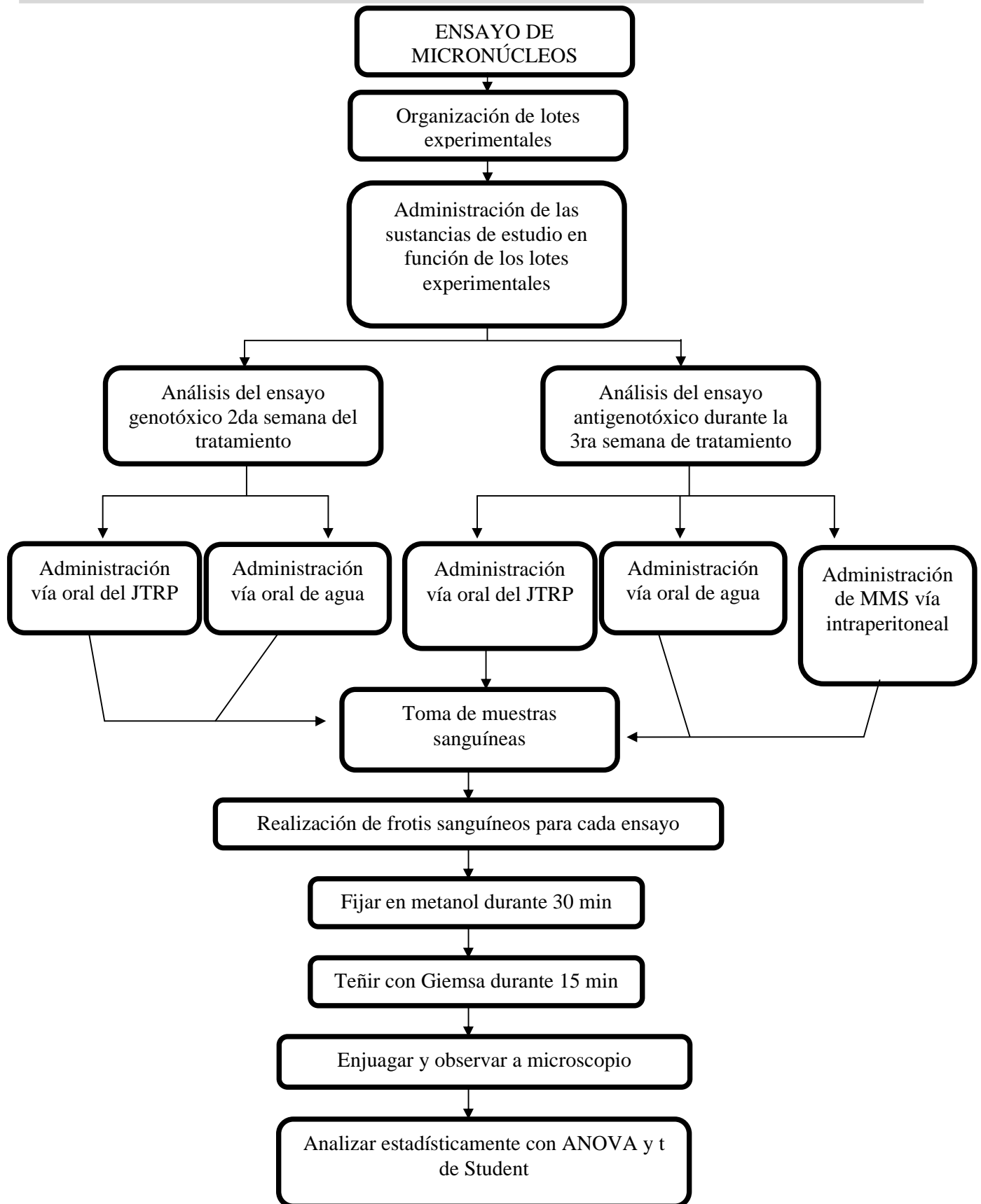


Figura 8. Diagrama general del ensayo de micronúcleos

VIII. RESULTADOS

Determinación de peso corporal de los ratones

Como se puede observar en la Figura 9, el peso corporal de los ratones se encuentran entre un rango 35 ± 3 g, los valores semanales para cada lote fueron comparados por una Análisis de varianza (ANOVA) $p>0.05$ esto sin observar resultados con diferencias significativas entre si; en donde las medias para cada semana son 35.08g, 36.88g y 36.90g, de acuerdo a cada semana (1,2 y 3) respectivamente. Obteniendo como resultado, un tratamiento no dañino significativamente en el peso de los animales, ya que este es un parámetro de toxicidad.

Determinación de la capacidad interceptora de radicales libres del JT de las tres variedades mediante el ensayo del radical DPPH.

Al analizar la vitamina E, la cual es conocida por su alta capacidad antioxidante, con una concentración de 1.0 mg/mL, se observa un decremento en cuanto a la absorbancia, con lo que se comprueba la capacidad interceptora de radicales libres.

Por otra parte, analizando los resultados de los JT se comprueba que los tres tienen un efecto antioxidante, esto al comparar cada uno de los jugos (blanca-verde, amarillo-anaranjado y roja-púrpura) en sus diferentes concentraciones (250, 500, 750 y 1000 μ L/mL de JT) contra DPPH observando que existen diferencias significativas, por lo que se menciona que los tres variedades de JT son captadores de RL, exceptuando a la concentración de 100 μ L/mL en la que no se encuentran diferencias significativas para ninguno de los JT. Al comparar cada una de las concentraciones de JT entre si, se obtiene que en la concentración 1000 μ L/mL de solución, el JTRP tiene diferencias significativas con respecto a JTAA y JTBV, cabe mencionar que estos (JTAA y JTBV) jugos no tienen diferencias significativas entre si. Para la concentración 750 μ L/mL es notable que el JTRP tiene diferencias significativas de los demás JT a las mismas concentraciones; al igual que en la concentración anterior los JTAA y JTBV no tienen diferencias significativas al ser comparados entre ellos. Para la concentración 500 μ L/mL de solución, el JTRP tiene diferencias significativas con respecto a los JTAA y JTBV; de igual forma estos dos últimos jugos no tienen diferencias significativas. Y por

ultimo la concertación 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de solución, de igual manera que en las anteriores el JTRP es el que tiene diferencias significativas con respecto a los demás jugos y al igual que en las concentraciones anteriores los JTAA y JT BV no tiene diferencias significativas; por lo cual se establece que este efecto fue dependiente de la concentración y que los tres son buenos interceptores de radicales libres siendo el mejor interceptor de radicales libres el jugo de tuna roja. Es notable que el potencial de intercepción de radicales libres es mucho menor que el de la vitamina E. De este modo (Instant 3.0) fue como se selecciono el JT para los ensayos genotóxico y antigenotóxico durante 2 semanas. Esto puede ser observado más claramente en la Figura 10.

Ensayo genotóxico del JTRP.

En el ensayo genotóxico los ratones fueron administrados con JTRP, observando que no se obtuvieron eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) durante este periodo, por lo que se puede manifestar que no existió algún efecto clastogénico causado por el JTRP, por lo que no se consideró importante representar gráficamente los resultados para este ensayo. En la Figura 11 se describe la relación de EPC/ENC para el efecto citotóxico; en el periodo basal no existe diferencia significativa alguna por lo que nuestros ratones eran candidatos adecuados para empezar el tratamiento. Con lo que respecta a los tiempos 24 y 72h no existe diferencia significativa que nos indique que existió algún daño citotóxico provocado por JTRP en ninguna de las dosis.

Ensayo antigenotóxico del JTRP.

Con respecto al ensayo antigenotóxico después de ser administrados dos semanas con JTRP se administró el compuesto MMS, el cual es el mutágeno y observó que al comparar los lotes JT, JTDA, JTDM, JTDB y MMS contra el lote grupo control en el tiempo 0h no se encuentran diferencias significativas, en el tiempo 24h encontramos diferencias significativas para todos los lotes exceptuando JT, en el tiempo 48h existe diferencias significativas para cada uno de los lotes excluyendo a JT, y por ultimo en el tiempo 72h encontramos que no existe diferencia significativa para cada lote. Para el MMS (grupo control positivo), los siguientes lotes JTDA, JTDM y JTDB fueron comparados con el mismo MMS se encontraron diferencias significativas para los siguientes tiempos 24h y 48h, pero para 72h no se encontraron diferencias significativas

por lo que se demuestra que el jugo de tuna tiene un efecto antígenotóxico esto puede deberse a los compuestos fitoquímicos del fruto que actúan como antioxidante.

Para la relación EPC/ENC comparamos los lotes JT, JTDA, JTDM JTDB y MMS con el grupo control; en el tiempo 0h, 24h y 48h no se encontraron diferencias significativas entre los lotes y el grupo control, en el tiempo 72h se observa una diferencia significativa del lote MMS. Comparando los lotes con el grupo MMS se puede identificar que no se encuentran diferencias significativa con respecto a 0h, 24h y 48h, con lo que respecta a 72h se encuentran diferencias significativas para el lote JTDA, por lo que se demuestra que no existió algún daño citotóxico con respecto al grupo MMS; lo cual puede ser observado en la Figura 13.

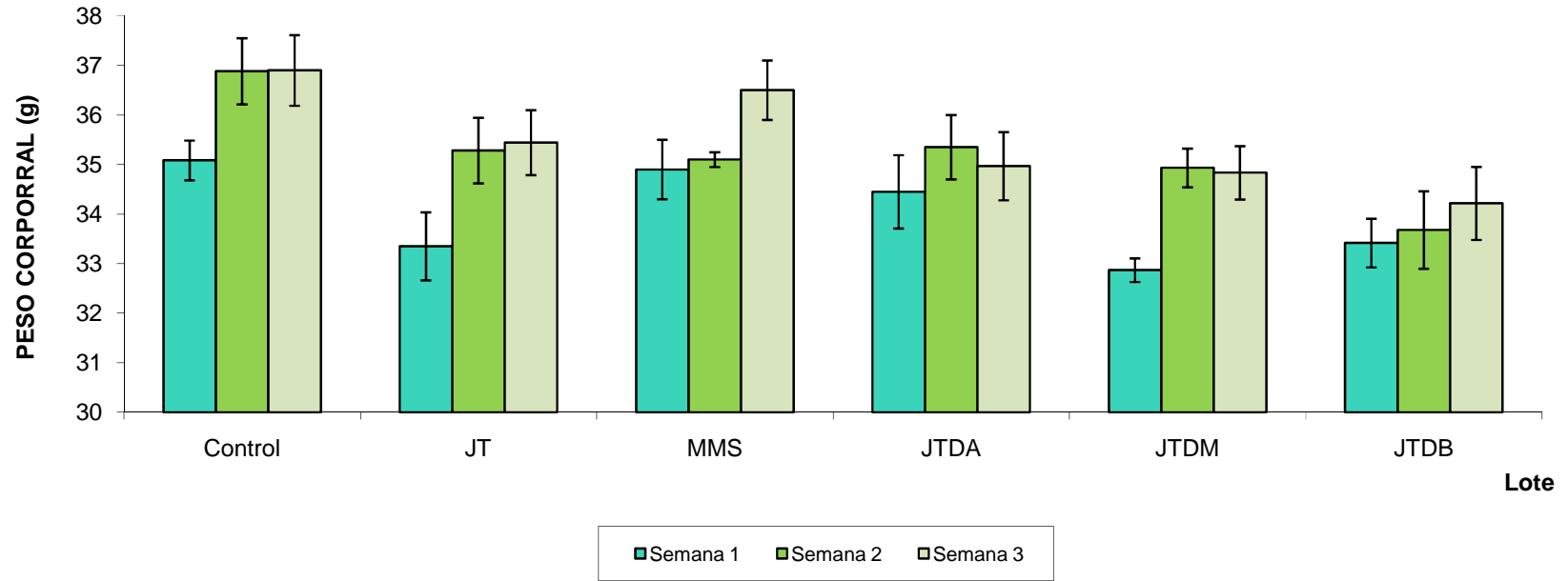


Figura 9. Promedio de los pesos corporales de los ratones tratados con JT y MMS durante 3 semanas.

Lote control (Agua), jugo de tuna (JT), MMS (metil metanosulfonato), JTDA (jugo de tuna dosis alta), JTDM (jugo de tuna dosis media) y JTDB (jugo de tuna dosis baja).

ANOVA y t Student

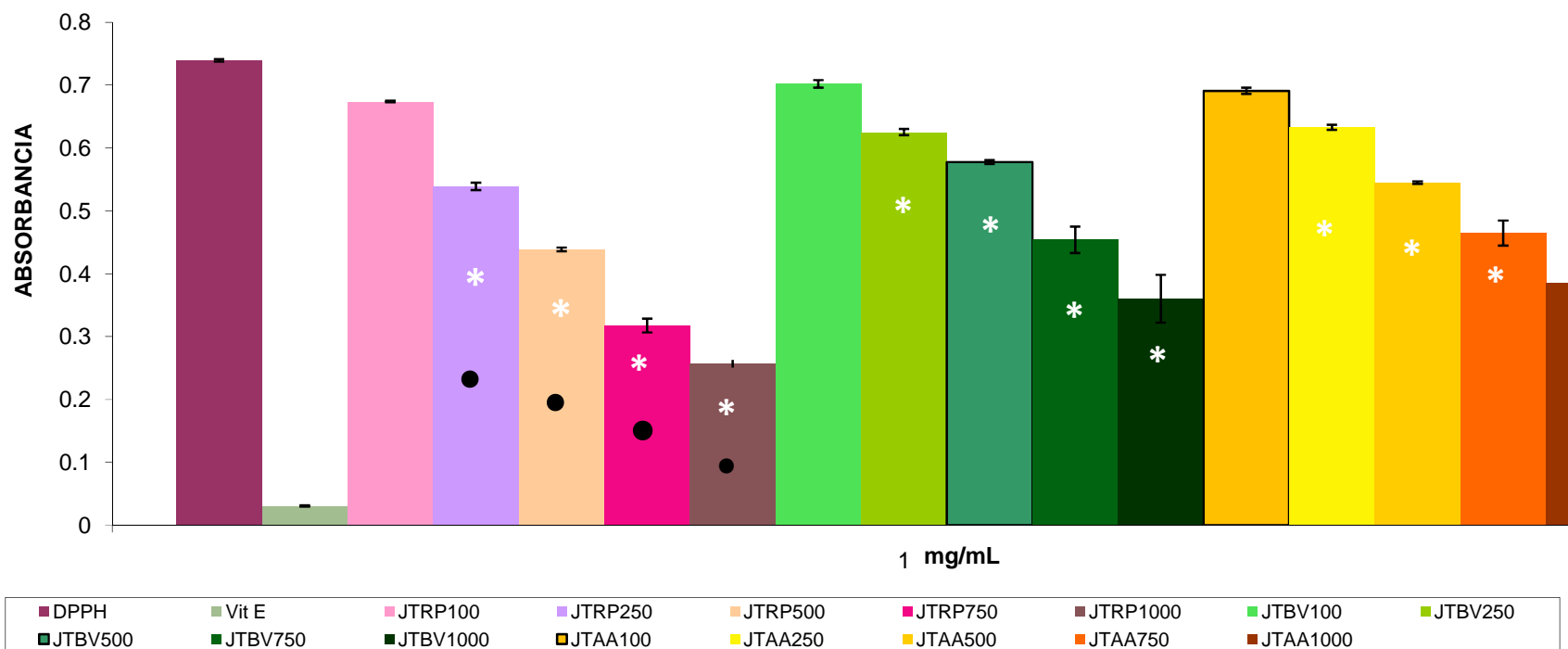


Figura 10. Capacidad interceptora de radicales libres del JT de las tres variedades.

Las concentraciones para cada lote fueron las siguientes: DPPH [4%], Vitamina E [1 mg/mL] y 100, 250, 500, 750 y 1000 µL/mL de solución, para cada uno de las variedades de tuna.

Control vitamina E (Vit E), jugo de tuna roja-púrpura (JTRP), jugo de tuna blanca-verde (JTBV) y jugo de tuna amarilla anaranjada (JTAA).

*Reducción significativa de la absorbancia con respecto a DPPH anova y T de student $p > 0.05$

•Diferencia significativa para interceptar radicales libres anova y T de student $p > 0.05$

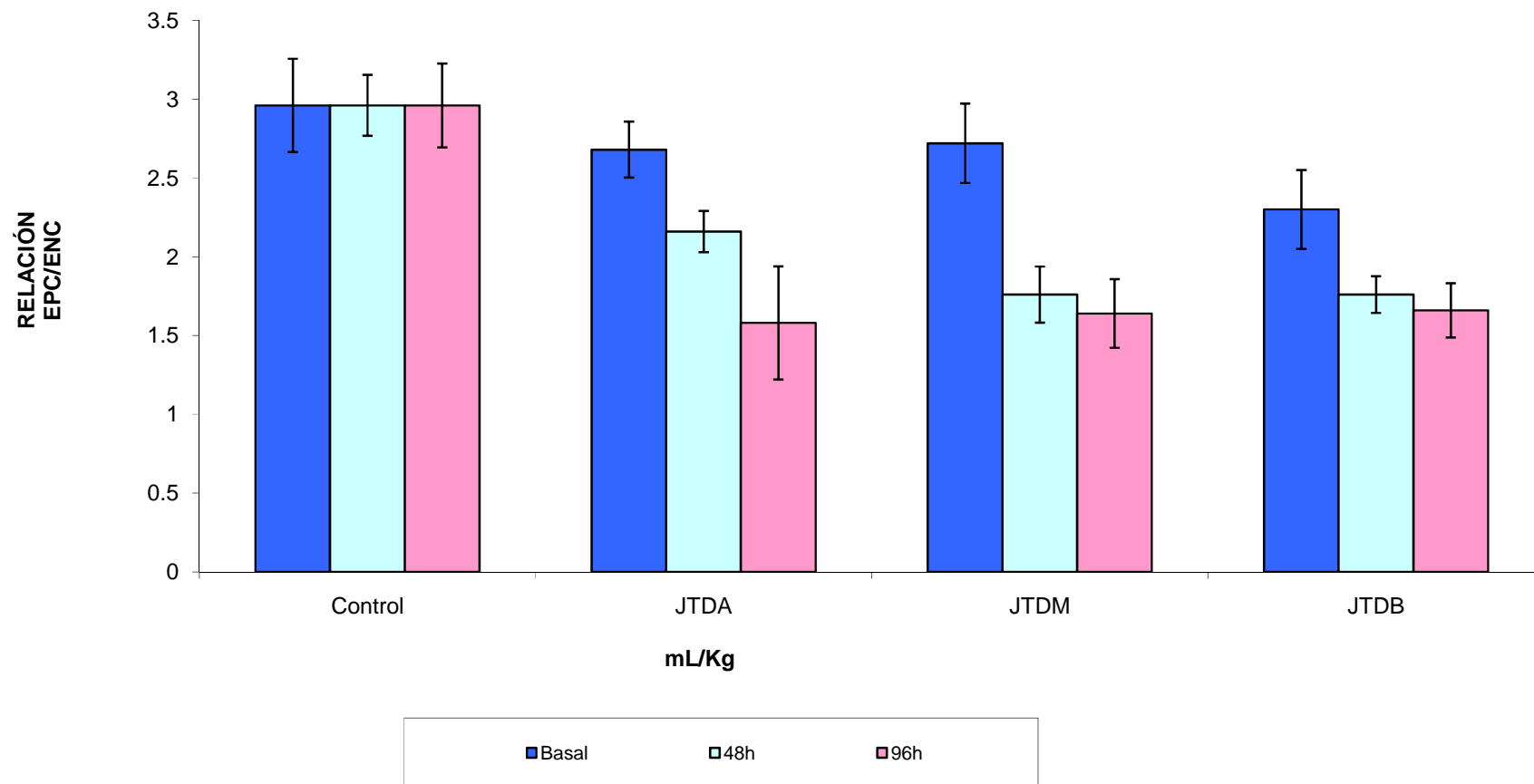


Figura 11. Ensayo citotóxico del JTRP.

Agua (control), jugo de tuna dosis baja (JTDB), jugo de tuna dosis media (JTDM) y jugo de tuna dosis alta (JTDA).

ANOVA y t Student

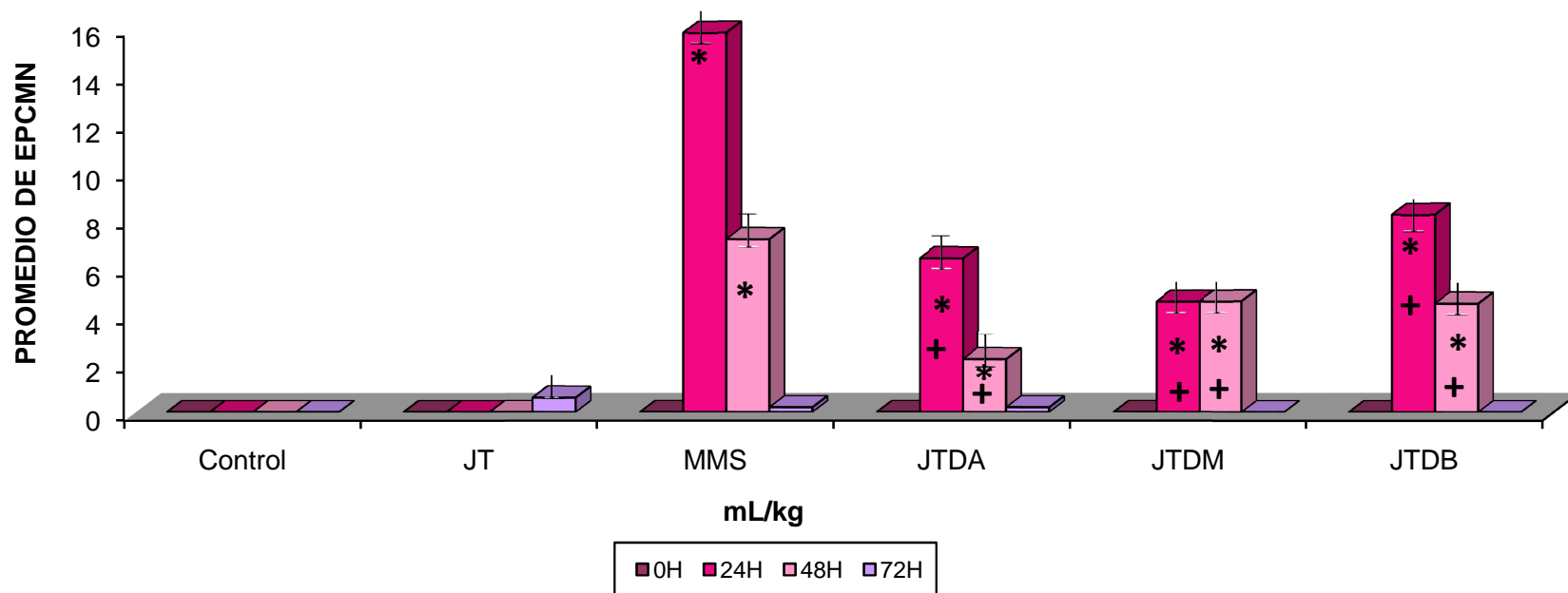


Figura 12. Ensayo antigenotóxico identificación de EPCMN.

Agua (control), jugo de tuna roja-púrpura (JT), metil metanosulfonato (MMS), jugo de tuna dosis alta+MMS (JTDA), jugo de tuna dosis media+MMS (JTDM) y jugo de tuna dosis baja+MMS (JTDB).

* Diferencia significativa ANOVA y t Student $P < 0.05$ comparado con el grupo control.

+ Diferencia significativa ANOVA y t Student $P < 0.05$ comparado con el MMS.

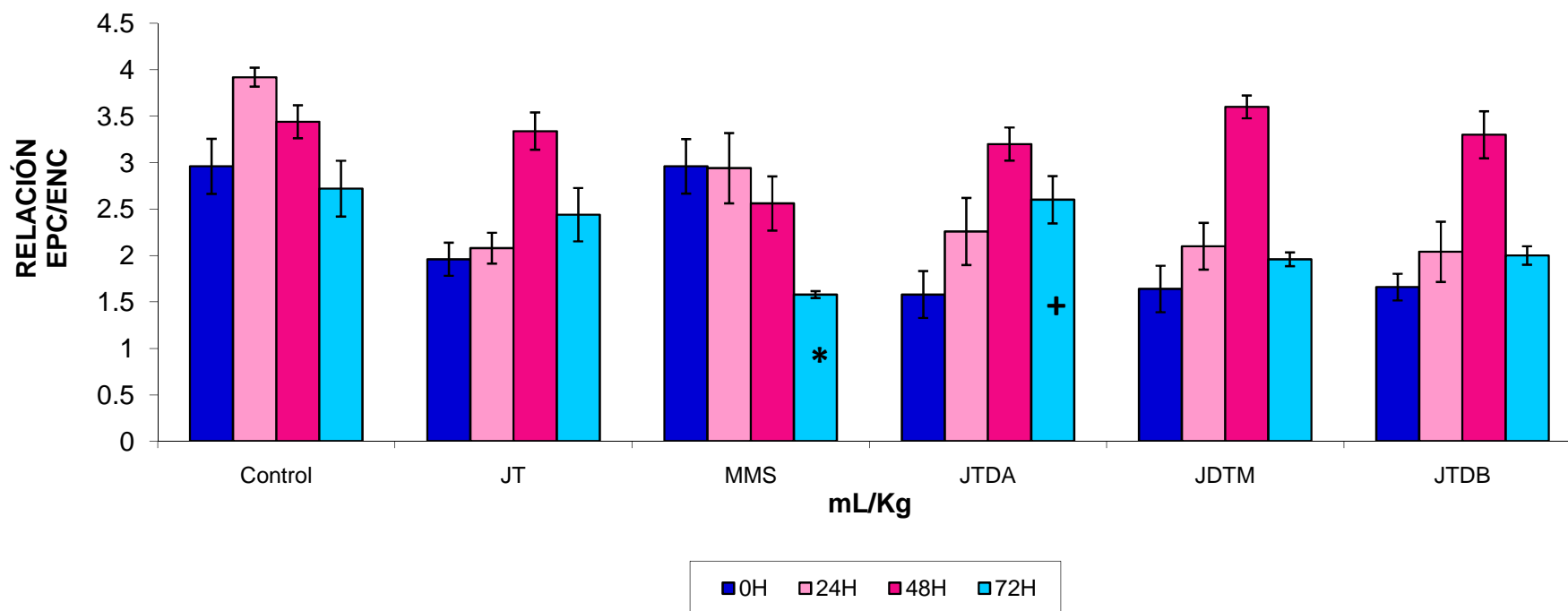


Figura 13. Ensayo anticitotóxico

Agua (control), jugo de tuna roja-púrpura (JT), metil metanosulfonato (MMS), jugo de tuna dosis alta+MMS (JTDA), jugo de tuna dosis media+MMS (JDTM) y jugo de tuna dosis baja+MMS (JTDB).

* Diferencia significativa ANOVA y t Student $P < 0.05$ comparado con el grupo control

+ Diferencia significativa ANOVA y t Student $P < 0.05$ comparado con el MMS

IX. DISCUSION

Se han logrado avances notables en los últimos veinte años en relación a la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares de la prevención y progresión del cáncer (Zou y col, 2005). Sin embargo, el campo en el desarrollo de agentes eficaces y seguros para la prevención y tratamiento contra el cáncer sigue siendo lento, ineficiente y costoso, con escasa información del tema, que le ofrezca tanto a la población en general como a la genéticamente predispuesta, con posibilidades de realizar una prevención primaria (dieta saludable, no fumar, evitar el alcohol) y al mismo tiempo disminuir las secuelas en aquellos pacientes que fueron tratados con quimioterapia, medidas que de una u otra manera puedan combatir la recurrencia de dicha enfermedad. La clave para una eficaz quimioprevención es la identificación de un agente que a dosis bajas pueda inhibir el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas sin efectos tóxicos secundarios (Zou y col, 2005), desafortunadamente, los antecedentes han evidenciado que los agentes con esta capacidad pueden actuar benéficamente en pequeñas cantidades pero en altas dosis el efecto se reinvierte. Las frutas y hortalizas garantizan un alto consumo de fitoquímicos (flavonoides, betalainas, carotenoides, vitamina A, C y E), que parecen estar implicados en muchos procesos celulares para la protección de los diferentes efectos nocivos producidos por diversos xenobióticos; una fruta con antecedentes quimiopreventivos altamente consumida en nuestro país es la tuna (Kapiszewska y col, 2005), la cual como se mencionó en la introducción que ha sido utilizada de manera ancestral como alimento tradicional y como fruto medicinal, estos dos beneficios sumados a sus propiedades antioxidantes que están relacionadas a los fitoquímicos presentes en su estructura química (compuestos fenólicos y algunas vitaminas), la han llegado a considerar un candidato idóneo para clasificarlo como agente quimioprotector (Stintzing y col, 2005); es por esto, que los resultados de nuestro experimento están aportando nuevos conocimientos sobre este tema y al mismo tiempo abren el campo de estudio para continuar abordando sus propiedades benéficas.

En este sentido, es conveniente mencionar que el peso corporal, parámetro analizado en el presente estudio, ha constituido durante mucho tiempo uno de los principales indicadores de posibles trastornos orgánicos en los estudios de toxicidad. (Guevara y col, 2003); por lo que los resultados indican que el JT no produce alguna alteración observable que haga pensar en un efecto tóxico en el peso corporal de los animales tratados durante tres semanas, lo que sugiere que no es un riesgo considerable al

ingerirlo (Yamisleydi y Trapero, 2007); sin embargo, debate la idea tradicional de que si se consumen cactáceas (en especial nopal y tuna), se puede disminuir de peso, por lo cual es importante destacar en este estudio el JT fue previamente filtrado eliminando las semillas, que como se sabe contiene un alto contenido de fibra y que es en general el factor responsable de que al ser ingeridos estos alimentos se observe una disminución en el peso de las personas, algo que no sucedió en los animales de experimentación de esta investigación (Stintzing y col, 2005).

Por otra parte, el impacto que tienen los RL en la salud humana es un tópico de gran relevancia desde mucho tiempo atrás, debido que es un detonador de posibles enfermedades crónico-degenerativas, aspecto que ha dado pauta a considerar de gran importancia el consumir verduras y/o frutas que contengan antioxidantes. Actualmente uno de los ensayos más empleados para la detección del potencial antioxidante de algún compuesto, es el ensayo del DPPH; esta es una técnica rápida para la detección de actividad antioxidante de compuestos capaces de donar hidrogeno a los RL haciéndolos más estables (Soberón y col, 2006); el DPPH es un radical libre, estable a temperatura ambiente y que produce un color púrpura en solución metanólica; cuando este radical se reduce en la presencia de una molécula antioxidante se transforma en difenilpicrilhidracina dando un viraje de color (de púrpura oscuro a amarillo claro), es por eso que el potencial antioxidante de una sustancia es proporcional a la disminución en la absorbancia de la solución de DPPH (Sundararajan y col, 2006); en este caso, el JT fue comparado contra otro compuesto con capacidad interceptora de RL muy comprobada, como lo es la vitamina E, siendo de especial atención su presencia para la protección de las membranas celulares. Si se hace un análisis más profundo de esta comparación, se puede observar que el JT fue menos potente que el control de la vitamina E, lo cual se puede explicar si consideramos que esta vitamina esta en forma más pura y en mayor concentración que la encontrada en el jugo; no obstante, sugiere que el JT (en especial el tipo JTRP), actúa de manera semejante a dicha vitamina, la cual al ser también un fenol interrumpe las cadenas de peroxidación de los lípidos insaturados y al mismo tiempo también forma un radical de alta estabilidad, baja agresividad e incapaz de continuar con la reacción de oxidación en cadena. (Ballester y Honorem, 1996). Asimismo, los resultados obtenidos de la disminución de la absorbancias de DPPH debido a la intercepción de RL por los JT, hace pensar que el efecto antioxidante está vinculado con el total de compuestos fenólicos (CF) presentes

en cada uno de los tres tipos de JT, lo cual también ha sido mencionado por diferentes estudios en donde indican que su capacidad antioxidante se debe a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en su composición química (Kanner y col, 2001; Qui y col, 2002; Galati y col, 2003; Stintzing y col, 2005; Butera y col, 2008; Corral y col, 2008; Tesoriere y col, 2004, 2005, 2005 y 2008). En este aspecto, Butera y col (2008) mencionan que el JT de color rojo, amarillo y verde tienen un alto potencial antioxidante por lo que son muy eficaces en la donación de electrones y/o donación de protones de H^+ ; tal como sucedió en este estudio en donde la actividad antioxidante fue dependiente de la concentración del JT, es decir que a mayor concentración de jugo mayor fue la capacidad secuestradora de radicales libres (Kuskoski y col, 2005). Por otra parte, observamos que la mejor respuesta fue obtenida por el JTRP, donde se ha identificado una correlación más alta para los compuestos fenólicos totales, en segundo lugar para las betacianinas y las betaxantinas y por último el ácido ascórbico, lo que nuevamente sugiere que la mayor actividad antioxidante se encuentra en los compuestos fenólicos (Stintzing y col, 2005). En resumen, podemos pensar que los diferentes tipos de JT contienen todos estos CF pero en especial el JTRP es donde se encuentra en mayores concentraciones que en los otros dos (JTBV y JTAA). De este modo, un estudio que respalda nuestra idea es el realizado por Aguilera y col.(2008) con el fruto del higo (*Ficus carica*) quienes sugieren que la capacidad antioxidante es debida a la pigmentación del higo y que esta se caracteriza por ser una fruta púrpura oscura, conteniendo altas concentraciones de polifenoles esto puede relacionarse con el JTRP y compararse ya que los pigmentos que dan el color rojo a la tuna son las betalainas y otros CF con capacidad antioxidante (Escribano y col, 1998); del mismo modo un estudio realizado por Muñoz y col (2008) demuestran que las frutas y/o vegetales ayudan a la captación de RL, esto dado por los CF similares a los presentes en el JT, y dice que al evaluar la capacidad antioxidante y el contenido de CF, concluyen que la actividad antioxidante obtenida por el método DPPH está correlacionada con el contenido de compuestos fenólicos totales como lo son las betaxantinas, betacianinas, flavonoides, -carotenos, vitamina C, E y A (Ramos y col, 2008); con respecto a la tuna, probablemente esto puede deberse a los grupos hidroxilo existentes en la estructura química de los CF que pueden proporcionar el componente necesario para la estabilización de radicales libres (Saravana y col, 2008); Tesorie y col (2004) realizaron ensayos con pulpa de tuna en la que administran 500g de pulpa de tuna en personas sanas y observan una mejoría de la condición oxidativa de las LDL, demostrando así

que el JT tiene efecto antioxidante. Entre los polifenoles más importantes contenidos en la tuna roja están las betalainas las cuales pueden ser responsables del efecto antioxidante y de las cuales poco se ha investigado (Tesoriere y col, 2004), por lo que es importante seguir esta línea de investigación para poder confirmar a que concentración y cual de las betalaínas es la más competente para inhibir el efecto causado por los RL o evitar la formación de los mismos.

Con respecto al daño oxidativo, hay que recordar que es una de las más potentes y omnipresentes amenazas que enfrentan los organismos vivos por lo que la acumulación intracelular de RL pueden surgir de diferentes agentes tóxicos que pueden perturbar a la célula y así al sistema de defensa antioxidante; como resultado se muestran daños en las principales clases de macromoléculas biológicas (Zourgui y col, 2008) y principalmente aquellas alteraciones en el DNA, ya que es el principal objetivo en el que puede inducir cambios en la estructura para así formar mutaciones y/o activar la muerte celular, situación denominada apoptosis (Singha y col, 2008). Durante las últimas décadas, el estrés oxidativo ha sido señalado como importante componente de varios procesos patológicos y biológicos como el envejecimiento, la inflamación, carcinogénesis Parkinson, Huntington, etc. (Zourgui y col, 2008), por lo tanto, se presta mucha atención al estudio de productos naturales, que pueden contrarrestar los efectos perjudiciales del estrés oxidativo y prevenir múltiples enfermedades humanas. En esta línea, los diferentes tipos de frutas y hortalizas se han reevaluado y reconocido como valiosas fuentes antioxidantes que pueden prevenir estrés oxidativo (Zourgui y col, 2008); es por eso que en este estudio se utilizó el JT como fuente natural y del cual realizamos la evaluación de la frecuencia de micronúcleos *in vivo*, como indicador de daño genético y que es una de las principales pruebas de genotoxicidad recomendadas internacionalmente por las agencias reguladoras para la seguridad de los productos naturales; en esta prueba se sugiere que un aumento de la frecuencia EPCMN en ratones tratados es un indicador de los daños inducidos al cromosoma (Zaizuhana y col, 2006). Con respecto a nuestros resultados, observamos que no sucedió algún clastogénico producido por el JTRP ya que no se indujo a la formación de EPCMN; asimismo, la inhibición de la proliferación celular en la médula ósea pone de manifiesto la citotoxicidad (Zaizuhana y col, 2006), aspecto que tampoco sucedió en el ensayo; por lo que se puede pensar que el JTRP no presentó citotoxicidad en ninguna de las dosis, es decir que no existió disminución de EPC (o eritrocitos inmaduros en nuestros conteos

de 1000 ENC). Este resultado se puede comparar con un estudio parecido que fue realizado por Rodrigo y col (2007) en donde evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad de la *Opuntia soehrensii*, donde no detectó daño alguno en su modelo biológico (ensayo de mutación y recombinación somática en alas de *Drosophila melanogaster*), esto debido al sinergismo de los CF de dicho extracto. Por otra parte Zorgui y col (2008 y 2009) realizaron estudios acerca de *opuntia ficus indica* donde señalan que sus resultados sugieren que una dosis de 25, 50 y 100 mg/kg de peso corporal demuestran claramente que al ser administrada en los animales no encuentran algún efecto tóxico (mortalidad, peso corporal, tamaño y forma del hígado y el riñón). Debido a todo esto es importante realizar estudios más a fondo acerca del posible daño que pudiera tener el JT en diferentes modelos biológicos para corroborar lo ya mencionado.

Con referencia al efecto tóxico del metil metanosulfonato sobre el material genético, se observó que el mutágeno es un inductor de genotoxicidad y citotoxicidad debido a que es agente alquilante monofuncional, reconocido por su capacidad de interactuar directamente con el DNA tanto *in vitro* e *in vivo* produciendo daños en diferentes modelos experimentales; diversos estudios han indicado que el MMS no requiere activación metabólica, es decir es un agente directo; Esta propiedad nos sugiere considerar que los compuestos naturales presentes en los vegetales y especias pueden interactuar directamente con los grupos radicales de metilo e inactivarlos por reacción química, lo que hace posible que los fitoquímicos puedan impedir la interacción del MMS con el DNA, aportando sitios nucleofílicos para el ataque del mutágeno (Pascucci y col, 2005; Schwartz y Kmiec, 2005; Mezzoug y col, 2006).

Considerando lo anterior y relacionándolo con el efecto antigenotóxico del JT contra el MMS, podemos pensar que probablemente la genoprotección lo hicieron los compuestos químicos del JTRP en sus diferentes concentraciones al reducir los daños causados por MMS, es decir interceptar al radical metilo de la estructura química del mutágeno.

Normalmente en este tipo de tratamientos por extractos, la antígenotoxicidad está dada por la sinergia de la mezcla de los componentes que pueden participar en el efecto observado, sin embargo, no es posible establecer de manera particular el efecto individual de cada componente del JT; por lo cual podemos sugerir, considerando que los fenoles al encontrarse en mayor proporción puedan ser los responsables directos de la anti-metilación producida por este agente alquilante; protegiendo y reduciendo la

alquilación del DNA en particular en los sitios nucleófilicos como lo son los átomos de nitrógeno y evitar así una despurinización y despirimidización (Franke y col, 2005).

En estudios específicos que han realizado a la mayoría de los CF que forman parte del JTRP, demuestran su capacidad antioxidante, así mismo su función benéfica para la salud. Algunos, flavonoides como la quercetina que también está presente en la composición química del JT (Tesoriere y col, 2005; Galati y col, 2003) posiblemente puedan unirse a los polímeros biológicos (como algunas enzimas) y al mismo DNA, lo que hace suponer que exista la quelación de iones metálicos transitorios, (tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) catalizar el transporte de electrones y depurar a los RL; como tal vez pudieron actuar en el ensayo animal.

Debido a este hecho, se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones (Nordmann, 1993; Martínez y col, 2002; Borrella y Fontoura, 2002; Pérez, 2003; Muñoz y col, 2007; Cemeli y col, 2009).

Otras actividades que merecen ser destacadas por acción de los flavonoides son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombóticas y antiinflamatorias en donde se ha podido demostrar que estos retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos (Nordmann, 1993; Martínez y col, 2002; Borrella y Fontoura, 2002; Pérez, 2003; Muñoz y col, 2007; Cemeli y col, 2009), de esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. Un claro ejemplo del potencial citoprotector de los flavonoides se encuentra en los fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxinabutionina (un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa) (Nordmann, 1993; Martínez y col, 2002; Borrella y Fontoura, 2002; Pérez, 2003; Muñoz y col, 2007; Cemeli y col, 2009).

Por otro lado y resaltando lo que ya se menciona, también hay evidencias de que los flavonoides son eficientes para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro así mismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir la oxidación de las LDL *in vitro* y reducir la citotóxicidad (Nordmann, 1993; Martínez y col, 2002; Borrella y Fontoura, 2002; Pérez, 2003; Muñoz y col, 2007; Cemeli y col, 2009).

En el caso de los polifenoles como la vitamina C que como se ha descrito anteriormente también que forma parte del JTRP y la cual también pudo actuar en el sinergismo de los CF en el ensayo antígenotóxico y genotóxico, por lo que investigaciones realizadas mencionan que tiene funciones muy importantes en la prevención del cáncer, enfermedades del corazón y el aumento de la función inmune. Estudios *in vivo* sugieren que es capaz de contrarrestar a los RL de manera eficiente, por lo tanto, reducen el daño al DNA y a los protoncogenes, es decir, aquellos genes supresores de tumores que ayudan a explicar el por que se desencadena un proceso neoplásico dentro de la célula; asimismo, esta vitamina es utilizada como una donante de electrones, como parte de la interacción entre el hierro y ferritina (Kaya, 2003; Cemeli y col, 2009). Fuera de las células, la vitamina C actúa en conjunción con la vitamina E, presentándose en las membranas de lípidos para eliminar a los RL y prevenir la peroxidación lipídica. Logrando de esta manera ayudar a prevención de la oxidación de LDL, que se cree que pueden provocar la aterosclerosis (Kaya, 2003; Cemeli y col, 2009). Por otra parte, la vitamina A como el retinol, su equivalente en los animales, son importantes antioxidantes. En el caso del β -caroteno puede ser convertida en el mucosa intestinal en dos moléculas de vitamina A, dependiendo de la presencia de la enzima β -caroteno dioxigenasa; sin embargo, la mayoría de los carotenoides no son capaces de generar la vitamina A; la gama completa de actividades de antioxidantes de la vitamina sigue siendo incompleta; lo poco que se sabe es que se ha encontrado que esta disminuye el daño provocado al DNA por compuesto anticancerígenos en células *in vitro*. (Cemeli y col, 2009). Los carotenoides le deben sus funciones principalmente a la capacidad de absorber la luz por lo que su papel principal es dar color, sin embargo también esta bien establecida su función como antioxidante, participando en la desactivación RL que se pueden producir o no durante el metabolismo de la célula; estos son altamente reactivos y ricos en electrones por lo que reaccionan principalmente con O_2^- e OH^- mediante un proceso en el que se transfiere la energía de altos niveles de excitación a un triplete del carotenoide; este último puede regresar a su estado basal liberando calor, pero en otros casos pueden adicionarse grupos OH^- al triplete o formarse epóxidos, apocarotenos o apocarotenales con la consecuente modificación de la molécula original. (Sánchez y col, 1999; Cemeli y col, 2009). Es importante considerar que la vitamina E funciona en general como un antioxidante biológico, previniendo la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y de las proteínas ricas en radicales con azufre; este papel deriva de su estructura molecular, ya que se comporta como una

molécula liposoluble capaz de fijar radicales libres del tipo O_2^- , O_2^{2-} y OH debido a su grupo fenólico. La inhibición de la peroxidación lipídica en las membranas por la vitamina E evita la acumulación de hidroperóxidos, porque aquel funciona como un “canal molecular” a través del cual los radicales abandonan la zona hidrocarbonada de las membranas; esta vitamina al ser oxidada, forma radicales hidroquinonas estables que no perturban la química celular y que posteriormente son regenerados químicamente a la misma, mediante la aceptación de un electrón proveniente de agentes reductores como la vitamina C. Por esta función antioxidante, la vitamina E se considera como un importante elemento protector en el desarrollo de enfermedades relacionadas con los procesos oxidativos, como enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, cuadros infecciosos, reumáticos y neurológicos, pancreatitis y el envejecimiento (Brigelius y Traber, 1999; Marquez y col, 2002). En el caso de las betalainas han sido estudiadas pero no tan a profundidad como otros compuestos y se ha encontrado en estudios *in vitro* e *in vivo* que poseen actividad antioxidante en medios biológicos humanos como en LDL, la membrana celular y en las células enteras, al igual que puede llegar a modular el proceso de ROS o sea controlarlo (Tesoriere y col, 2008). Butera y col (2002) menciona que las betalainas pueden captar RL según los estudios que realizaron, al igual en el estudio que realizó Stintzing y col (2005); otro estudio es el que realizó Cai y col (2001) con las betalainas del amaranto donde demostró que tienen una fuerte actividad antioxidante, en comparación con el típico antioxidantes (ácido ascórbico, rutina y catequina), por lo que sugiere que la betalainas puedan convertirse en una útil fuente de antioxidantes naturales y colorantes naturales. Algo que es importante decir es que aun no sea ha logrado estudiar el mecanismo de acción de las betalaínas para destruir los RL (Gentile y col, 2004). En concreto la mayoría de los autores hace referencia a que el poder antioxidante del JT el cual se debe al sinergismo de todos los compuestos mencionados que si uno no existiera en el fruto no se lograría tener la eficiencia para poder combatir cada una de las patologías estudiadas por los diferentes autores, como lo son la diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones (Martínez y col, 2002), algo importante que dice Galati y col (2003) es que el JT puede mejorar las úlceras provocadas por el alcohol. Y por ultimo uno de los pocos estudios donde se puede llegar a corroborar nuestros resultados o acercarse a lo encontrado en este estudio fue lo realizado por Zorgui y col (2009) donde indican que el uso de *opuntia ficus indica* es mas eficiente que la vitamina E y alude el poder preventivo de esta por lo que además, esto podría ser

relevante, ya que es muy posible que la absorción de complejos derivados de las mezclas de esta planta y sus frutos puedan modular la genotoxicidad de fármacos contra el cáncer y por lo tanto, pueden reducirse las posibilidades de desarrollar tumores secundarios. Es por todo lo anterior que se abre todo un panorama de estudio para verificar los posibles mecanismos quimioprotectores, tanto de la planta, como en especial del fruto (tuna), para así poder conseguir mejor calidad de vida, libre de todas las patologías mencionadas durante todo el proyecto.

X. CONCLUSIONES

- El jugo de tuna tiene actividad antioxidante, el efecto fue dependiente de la concentración y fue mayor la actividad para el jugo de tuna roja-púrpura.
- El jugo de tuna no modifica el peso de los animales de experimentación siendo este uno de los principales parámetros de toxicidad.
- El jugo de tuna roja-púrpura en todas las concentraciones estudiadas no presenta citotóxicidad ni genotóxicidad.
- El jugo de tuna roja-púrpura presenta potencial antígenotóxico protegiendo eficazmente a los ratones del efecto causado por el metil metanosulfonato.
- El efecto quimioprotector es dosis dependiente.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aguilar-Enríquez M.L. y Pérez Olvera C.P. La flora del escudo nacional mexicano. *Rev. Polibotánica*. 2004. 18:53-73.

Aguilera-Ortiz M., Reza-Vargas M.C., Barre-Bichir K.A. y Ramírez-Baca P. Capacidad antioxidante de polifenoles en Higo (*Ficus carica*). 2008. 165-169.

Álvarez-González I., Madrigal-Bujaidar E., Martino-Roaro L. y Espinosa-Aguirre J.J. Antigenotoxic and antioxidant effect of grapefruit juice in mice treated with daunorubicin. *Toxicol Lett*. 2004. 152(3):203-11.

Anaya M.A. Historia del uso de opuntia como forraje en México, en: Estudios FAO: Producción y protección vegetal. 2003. pp. 4-25.

Arcila L.C., Loarca P.G. y Lecona U.S. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN*. 2004. 54(1): 100-111.

Arvizu-de-León y Yahia-Kazuz, E. La tuna (*opuntia ficus*), ¿Que tan buena fuente es de vitamina E?; en: memorias de la universidad autónoma de Querétaro. 2007. pp. 1-16.

Ballester M. y Honorem A. Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico *Med. Clin*. 1996. 107:13, 509-515.

Barcelos G.R., Shimabukuro F., Maciel M., y Cólus I.M.S. Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells. *Tox. in Vitro*. 2007. 21:1468-1475.

Bateman, J.R., Peters R.L., Hazen J.G. y Steinfield J.L. Methyl methane sulfonate. Phase I. Clinical Study. *Cancer Chem*. 1996. 50:675-682.

Best C. y Taylor N. Sangre, linfa y líquidos tisulares; Bazo y sistema reticuloendotelial; en: Fisiología Humana. Ed. Universitaria S.A. 1999. 3:81-82.

Boots AW, Haenen GRMM y Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eu J Pharmacol* 2008. 585(2-3): 325-337.

Borrella J. C. y Fontoura A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less). DC. *Asteraceae* (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2002. 12(2): 63-67.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998. 56:317-33.

Brigelius R. y Traber M. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB J.* 1999. 13:1145-1155.

Brusick D. Principles of genetic toxicology. 2ª edición. Ed. Plenum Pub. Corp. USA. 1990. pp. 2-18.

Butera D., Tesoriere L., Di-Gaudio F., Bongiorno A., Allegra M., Pintaudi A., Kohen R. y Livrea M. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*opuntia ficus indica*). Fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and Indicaxanthin *J. Agric. Food Chem.* 2002. 50:23, 6895-6901.

Cai Y., Sun M. y Corke H. Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.* 2003. 51(8): 2288-2294.

Canter P.H. y Edzard E. Anthocyanosides of *vaccinium myrtillus* (Bilberry) for night vision—A systematic review of placebo-controlled trials. *Surv Ophthalmol.* 2004. 49(1): 38-50.

Castellar R., Obón J.M., Alacid M. y Fernández-López J.A. Color properties and stability of betacyanins from *opuntia* fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2003. 51: 2772-2776.

Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res* 2009. 28-35

Corral-Aguayo M. Yahia E., Carrillo-López A. y González-Aguilar G. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight. *Hort. Crops J. Agric. Food Chem.* 2008. 56(22): 10498-10504.

Corrales J. Fisiología y tecnología poscosecha de la tuna y el nopalito. En: Corrales J. Flores C. Nopalitos y tunas. Producción, comercialización, poscosecha e industrialización. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo Edo. De México. 2003. pp. 117-131.

Cuenca P. y Ramírez V. Mutagénesis ambiental y el uso de biomarcadores para predecir el riesgo de cáncer. *Rev. Biol. Trop.* 2004. 52(3):585-590.

Cumming, R.B. y Walton M.F. Fate and metabolism of some mutagenic alkylating agents in the mouse. Ethyl methane-sulphonate and methyl methanesulphonate at sublethal dose in hybrid males. *Mutat Res.* 1970. 10:365-377.

Deimling L.I., Machado F.L., Welker A.G., Peres L.M. y Santos-Mello R. Micronucleus induction in mouse polychromatic erythrocytes by an X-ray contrast agent containing iodine. *Mutat. Res.* 2009. 672(1): 65-68.

Díaz-Pérez J.L., Sanz-de-Galdeano C., Gardezabal J. y Aguirre A. Ácido ascórbico en dermatología. *Piel.* 1994. 9: 319-22.

Escribano J., Pedreño M.A., García Carmona F., y Muñoz R. Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Rev. Phytochem. Anal.* 1998. 9:124 391-397.

Felker P. e Inglese P. Short term and long term research needs for *opuntia picus-indica* (l) Mill. Utilization in arid areas. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* 2003. 5: 131-151.

Filardo S. Una contribución al estudio etnobotánico de la zona del Alto Mezquital y propuesta biotecnológica para el aprovechamiento de la tuna (género *Opuntia*, subgénero *opuntia*) en tres comunidades hñahñus del estado de Hidalgo, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México. 2001. pp. 8-15.

Filipe P., Lanca V., Silva J.N., Morliere P., Santus R y Fernandes A. Flavonoids and urate antioxidant interplay in plasma oxidative stress. *Rev. Mol Cell Biochem.* 2001. 221:79-87.

Flores C., Luna E. Y Ramírez P. (1995). Mercado mundial de la tuna. *Aserca.* 83-95.

Flórez J. Quimioterapia antineoplásica II. Agentes alquilantes. Antibióticos. Agentes varios; en: Farmacología humana de Flórez Jesús Ed. Masson S.A. 3ra ed. Barcelona, España. 1997 10: pp. 1139-1160.

Franke, S.I.R., Prá, D., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P. y da Silva, J. Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an *in vivo* analysis *Mutagenesis.* 2005. 20, 279–283

Fuhrman B., Volkova N., Rosenblat M. y Aviram M. Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Rev. Antioxid Redox Signal.* 2000. 2:491-506.

Fukuda K, Ohta T, Oshima Y, Ohashi N, Yoshikawa M, y Yamazoe Y. Specific CYP3A4 inhibitors in grapefruit juice: furocoumarin dimers as components of drug interaction. *Pharmacogenetics* 1997. **7**: 391–396

Galati E.M., Mondello M.R., Giuffrida D., Dugo G., Natalizia M., Pergolizzi S. y Taviano M.F. Chemical characterization and biological effects of sicilian *opuntia ficus indica* (L.) Mill. Fruit juice: Antioxidant and antiulcerogenic activity. *J. Agric. Food Chem.* 2003. 51:17, 4903-4908.

Gardner E. J. DNA Its Mutation, Repair, and Recombination en: Principles of Genetics de Gardner E.J. Ed The McGraw–Hill 8ed. pp. 2003. 12: 315-356.

Gentile C., Tresoriere L., Allegra M., Livrea M.A. y D'Alessio P. Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004. 1028: 481–486.

Guevara O., Rodriguez T., Pérez C., León F., Rodriguez A., Castañeda A. y Vega J.L. Ensayo de toxicidad aguda oral de un fitofármaco obtenido a partir del pseudotallo de *Musa paradisiaca* L. *Acta Farm. Bonaerense.* 2003. 22:1 57-97.

Gurrieri S., Micelli L., Lanza C.M., Tomaselli F., Bonomo R.P. y Rizzarelli, E. Chemical characterization of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) and perspectives for the storage of its juice. *J. Agric. Food Chem.* 2000. 48:5424-5431.

Gutiérrez S.J. Daño al hígado por radicales libres derivados del oxígeno en: Alcohol, alcoholismo y cirrosis. Un enfoque multidisciplinario. De José A. Morales González. Ed Ciencia al día. Pachuca, Hidalgo, México. 2007. 8: pp. 97-110.

Gutteridge J.M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Rev. Clin Chem* 1995. 41:1819-28.

Guyton A. y Hall J. Células sanguíneas, inmunidad y coagulación de la sangre en Tratado de Fisiología Medica de Guyton y Hall. Ed Mc Graw Hill. 10ª ed. México D.F. 2001. 32: pp. 465-469.

Guzmán M.S.H., Pacheco I.T., Avilés M.J., Acosta G.J.A., López R.M. y Guevara L.R. Potencial de las plantas de uso común en México como fuente de compuestos fenólicos, hierro y vitamina C. *Agricultura Técnica en México.* 2005. 31(2):115-123.

Hernández-Ceruelos M.C.A. Efecto anticlastogénico de la clorofilina en contra del nitrito de sodio evaluado en ratones cepa NIH. Tesis de Licenciatura. 1996. pp. 10-37.

Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Katan M.B. y Krombout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Rev. Nutr. Cancer*. 1993. 20: 21-29.

Hoffmann G.R. y Preston R.J. Genetic toxicology; en: Casarett and Doull's Toxicology the basic science of poisons de Curtis D. Klaassen. Ed. McGraw-Hill. 7nd ed. Editor Curtis D. Klaassen, Ph.D. Kansas, USA. 2008. 9: pp. 381-416.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Some anti-thyroid and related substances, *Nitrofurans and Ind. Chem*. 1999. 7: 253-260.

Kanner J., Harel S. y Granit R. Betalains A New Class of Dietary Cationized Antioxidants. *J. Agric. Food Chem*. 2001. 49(11): 5178-5185.

Kapiszewska M, Sołtys E, Visioli F., Cierniak A y Zajęc G. The protective ability of the mediterranean plant extracts against the oxidative DNA damage. The role of the radical oxygen species and the polyphenol content. *J Physiol Pharmacol*. 2005. 56(1):183-197.

Klassen C. Toxicology genetic in: Casarett and Doull's Toxicology. Toxicology the basic science of poisons de Curtis D. Klaassen. Ed. McGraw-Hill. 7nd ed. Editor Curtis D. Klaassen, Ph.D. Kansas, USA. 2008. 9: pp. 381-416

Kleihues, P., Mende C. y Reucher W. Tumors of the peripheral and central nervous system Induced in BD-rats by prenatal application of methyl methanesulfonated. *Eur J Cancer*. 1972. 8:641-645.

Kumpulainen J.T. y Salonen J.T. Antioxidants, lipid peroxidation and cardiovascular diseases, natural antioxidants and anticarcinogenesis nutrition, health and disease, *Chem Soc Rev.* 1999. 3-8.

Kuskoski E.M., Asuero A.G., Troncoso A.M., Manzini-Filho J. y Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas.* 2005. 25(4):726-732.

Ladero Q. Análisis hematológico clínico; en: Manual de Normon Govantes B., Lorenzo V. y Govantes E. Ed. Laboratorios Normon S.A. 8va ed. Tres Cantos, Madrid. 2006. 2: pp. 85-87.

Lantigua-Cruz A. Introducción a la Genética Médica. Ed. Ciencias Médicas. La Habana Cuba. 2004. pp. 16-27.

Lara O.F. y Márquez C. Plantas medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica. UNAM. México, DF. 1996. p.137.

Lisker R. Introducción a la Genética. Ed. El manual moderno SA de CV. México DF. 2001. pp. 6-181.

Little J.B. Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1993. 7: 337-352.

Ma T., Zhou J., Loarca F. G., Arreola G. y Lecona S. Mouse-erythrocyte micronucleus (mus-emn) assay on the clastogenicity of industrial wastewater. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 1995. 11: 95-98.

Madrigal B.E. y Viveros M.E. La prevención química del cáncer. *Rev. Int Nac Cancerológica.* 1996. 42(1): 37-41.

Madrigal B.E., Díaz B.S., Cassini M., Márquez P. y Revuelta P. *In vivo* and *in vitro* antigenotoxic effect of nordihydroguaiaretic acid against SCEs induced by methyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* 1998. 419:163-168.

Madrigal-Santillan E.O. Efecto inhibitorio del manano contra el daño genotóxico por la aflotoxina B1 *in vivo*. Tesis de maestria. 2000. pp. 20-21.

Márquez M., Yopez C. y Sutil-Naranjo R. Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E. *Invest. clín, set.* 2002. 43(3):191-204.

Martínez R.E. y Barajas, B. Estudio etnobotánico de las plantas medicinales en el mercado Libertad “Sanjuán de Dios” del área metropolitana de Guadalajara, Jal. Tesis Licenciatura. Facultad de Agronomía. Universidad de Guadalajara. 1991. 100-101.

Martínez S., Gallego J., Culebras M. y Tuñon J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 2002. 17(6):271-278.

Martínez V. C. y Gómez A. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 2002. 23(4):185-200.

Mc-Gregor T., Wher M., Henika R., y Shelby D. The *in vivo* erythrocyte micronucleus test. Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Rev. Fundam. Appl. Toxicol.* 1990. 14:513-522.

Melts M. Physical mutagens; en: Genetic Toxicology de Robert H. Heflich Ed. CRC Press 1991. 203-256.

Mercado E. Cultivos no tradicionales y su potencial de exportación como frutos mínimamente procesados en México. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro. México. 2004. 12-25

Merin U., Gagel S., Popel G., Bernstein S. y Rosenthal, I. Thermal degradation kinetics of prickly-pear-fruit red pigment. *Rev. J. Food Sci.* 1987. 52:485-486.

Mezzoug N., Abrini J., Muñoz-Serano A., Alonso-Moraga A., Mohamed I. Study on antigenotoxic effects of Moroccan medicinal plants and spices using the *white/white* + somatic assay in *Drosophila*. *African J. Trad., Complementary and Alternative Med.* 2006. 3(3): 22-31

Morales R., Vallarino K. y Rodriguez R. No radioadaptive response to micronucleated polychromatic erythrocyte (MN-PCE) induction in murine peripheral blood *in vivo*. *Envirom. Molec. Mutagen.* 1997. 29: 289-295.

Morales R., Vallarino K., Mercader M. y Rodríguez R. Induction of micronuclei by acute and chronic exposure *in vivo* to gamma rays in murine polychromatic erythrocytes. *Mutation Res.* 1994. 341: 47-51.

Morales R. y Vallarino K. Pharmacokinetic parameters determined from the clastogenic activity of ethylnitrosourea (ENU) and dimethylnitrosamine (DMN) in mice *in vivo*. *Mutation Res.* 1998. 412: 315-322.

Mitjavila MT, López D y Sáiz MP. Los radicales libres y su implicación en procesos fisiológicos y patológicos. *NCP Documenta* 2001. 258: 5-11.

Muñoz O., Copaja S., Speisky H., Peña R. y Montenegro G. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Quim. Nov.* 2008. 30(4): 848-851.

Muñoz-de-Chávez M., Chávez A., Valles V. y Roldán, J.A. The nopal: a plant of manifold qualities. *World Rev. Nutr. Diet.* 1995. 77:109-134.

Nelson D. y Cox M. Lehninger: Principios de Bioquímica. Ed. Omega. ed. 3ra. Barcelona, España 2000. pp. 1073-1089.

Nordmann, R. Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants. *CR Seances Soc. Biol. Fil.* 1993. 187: 277-285.

Pascucci B., Russo M.T., Crescenzi M., Bignami M. y Dogliotti E. The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase b defective mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2005. 33: 280-288.

Pérez G. Los flavonoides antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2003. 22(1):48-57.

Periago M.J., Ros G., López G., Martínez M.C. y Rincón F. The dietary fiber components and their physiological effects. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 1993. 33: 229-246.

Piga A. Cactus Pear: A Fruit of Nutraceutical and Functional Importance. *J.Prof. Ass. Cactus Develop.* 2004. 6: 9-22

QiuYingkun, Chen Yingjie, Pei Yupin, Matsuda Hisashi and Yoshikawa Masayuki. Constituents with Radical Scavenging Effect from *Opuntia dillenii*: Structures of New -Pyrone and Flavonol Glycoside. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2002. 50(11):1507-1510.

Ramón J.R., Alonso M.B., Rubio S., Ramón B.M., Plaza-Celemín L. y Mostaza J.M. Antioxidantes de la dieta y enfermedad coronaria. *Rev. Clin Cardiolvasc* 1996. 14:29-38.

Ramos-Llica E., Castañeda-Castañeda B. e Ibáñez-Vásquez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev. Acad. Perú Salud.* 2008. 15: 42-46.

Reiter R., Dun-Xian T., Cabrera J. y D'Arpa D. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Rev. Biol. Signals Recept.* 1999. 8: 56-63.

Repetto M. Toxicología Fundamental 3er ed, Ed. Díaz Santos. España. 1997. pp. 21-23.

Reyes-Agüero J., Aguirre-Rivera J. y Flores-Flores J. Variación morfológica de *Opuntia* (cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Interciencia*. 2005. 30: 476-484.

Reynolds S. y Arias-Jiménez E. El nopal (*Opuntia* spp.) como forraje. Estudios FAO: Producción y protección vegetal. 2003. 169 -183.

Rodrigo, G. Actividad Genotóxica de *Opuntia soehrensii*, evaluada por el Test de Mutación y Recombinación Somática en *D. melanogaster*. *BIOFARBO*.2007. 15(1):61-66.

Ruano-Ravina A., Figueiras A., Freire-Garabal M. y Barros-Dios J.M. Antioxidant vitamins and risk of lung cancer. *Rev. Curr Pharm Des*. 2006; 12:599-612.

Sáenz C. Compuestos funcionales y alimentos derivados de *opuntia* spp.; en: El nopal, tópicos de actualidad de Esparza G., Valdez R. y Méndez S. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 2004. pp. 211-222.

Sáenz C. y Sepúlveda E. Cactus Pear Juices. *J of the Profess. Assoc. For cactus Develop*. 2001. 1-10.

Sáenz C., Sepúlveda E. y Matsuhiro B. *Opuntia* spp. mucilage's: a functional component with perspectives. *Rev. J. Arid Environ*. 2004. 57: 275-290.

San R., Ramadevi G., Wagner V.O., Young R.R., y Jacobson-Kram D. Genetic toxicology; en: Handbook of oxicolgy de Derelanko Michael J. Ed. CRC Press LLC. 2da ed. USA. 2002. 15:603-624.

Sánchez A., Flores L., Langley E., Martín R., Maldonado G. y Sanchez S. (1999). Carotenoides. Estructura, función, biosíntesis, regulaciones y aplicaciones. *Rev. Lat. Micro*. 41:175-191 pp.

Saravana K., Avijit M., Vanitha J., Venkateshwaran K., Kamalakannan K. y Sivakumara T. Evaluation of Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Selected Indian Medicinal Plants. *Rev. Phcog Mag.* 2008. 4(13):143-147.

Sawicki E. y Sawicki C.R. Analysis of alkylating agents: Application to air pollution. *Ann NY Acad Sci.* 1969. 163:895-920.

Schwartz T.R. y Kmiec E.B. Using methyl methanesulfonate (MMS) to stimulate targeted gene repair activity in mammalian cells. *Gene Ther Mol Biol.* 2005. 9:193-202.

Singha M., Kaurb P., Sandhira R. y Kirana R. Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. *Mutation Res.* 2008. 654:145-149.

Slattery M L., Benson J., Curtin K. Ma K.N., Schaeffer D. y Potter J.D. Carotenoids and colon cancer. *Am J Clin Nutr.* 2002. 71(2):575-82.

Soberón J.R., Sgariglia M.A. y Sampietro D.A. Identificación de principios activos antioxidantes en infusión de *tripodanthus acutifolius* (Ruíz & Pavón) van thiegen. *XIV Jornadas de jóvenes investigadores de AUGM.* 2006. 1-10.

Solari A.J. Genética Humana. Ed. Panamericana. 1999. pp. 80-83.

Spiller G. Definition of dietary fiber. en: Dietary fiber in human nutrition. Florida, Estados Unidos de América. 1992. pp. 15-18.

Sundararajan R., Haja N., Venkatesan K., Mukherjee K., Saha B., Bandyopadhyay A. y Mukherjee P. Cytisus scoparius link - A natural antioxidant. *BMC Compl. and Alter. Med.* 2006. 6(1): 1-8.

Stintzing F, Herbach K., Mosshammer M., Calre R., Weiguang Y., Selleppan S., Akoh C., Buch R. y Felker P. Color belain pattern and antioxidant properties of cactus pear (opuntia spp) clones. *J Agirc. Food Chem.* 2005. 35:442-451.

Svenson J, Smallfield BM, Joyce NI, Sansom CE y Perry NB. Betalains in Red and Yellow Varieties of the Andean Tuber Crop Ulluco (*Ullucus tuberosus*). . *J Agric. Food Chem.* 2008. 38: 543-571.

Swann P.F. y Magee P.N. Induction of rat kidney tumors by ethyl methanesulphonate and nervous tissue tumors by methyl methanesulphonate and ethyl methanesulphonate. *Nature.* 1969. 223:947-949.

Tesoriere L., Allegra M., Butera D. y Livrea M.A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: Potential health effects of betalains in humans. *Ame J Cli Nutr.* 2004. 80:941–945.

Tesoriere L., Butera D. y D'Arpa D. Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Rev. Free Radical Res.* 2003. 37:689–696.

Tesoriere L., Butera D., Pintaudi M., Allegra M., y Livera M.A. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with Vit. C. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004. 80:391–395.

Tesoriere L., Fazzari M., Allegra M. y Livrea M.A. Biothiols, taurine, and lipidsoluble antioxidants in the edible pulp of Sicilian cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing. *J. Agric. Food Chem.* 2005. 53 (20):7851–7855.

Tirillini B. Grapefruit: the last decade acquisitions. *Fitoterap.* 2000. 71(1): S29-S37.

Van-Zeeland A., Jansen J.G., Groot A., Van-Hees S., Corrie M.M., Van T., Christel W., Veld-Malgorzata Z. Zdzienicka-Lohman P.H.M. y Vrieling H. Mechanisms and biomarkers of genotoxicity. Molecular dosimetry of chemical mutagens. *Toxicol Lett.* 1995. 77(3) 49-54.

Von-Borstel R.C. Chemical mutagens, principles and methods for their detection, & rdquor. *Rev Environ Mutagen.* 1986. 9(2):229-231.

Yamisleydi-Moreno A. y Trapero-Quintana Y.M., Acute oral toxicity of o-vanillin. *Rev Cubana Farm.* 2007. 4(21):8-10.

Zaizuhana S., Puteri J., Noor M., Baharuddin N., Ashikin Y., Hussin M., Rohana A. y Zakiah I. The *in vivo* rodent micronucleus assay of Kacip Fatimah (*Labisia pumila*) extract. *Trop. Biomed.* 2006. 23(2): 214–219

Zalacain M., Sierrasesúмага L. y Patiño A. (2005). The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *An Sist Sanit Navar.* 2005. 153-198.

Zou D., Brewer M., Garcia F., Feugang J.M., Wang J., Zang R., Liu H., y Zou C. Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutr J.* 2005. 4: 25-37.

Zourgui L., Bousema I., Ayed Y., Hassen B. y Wafa H. The antigenotoxic activities of cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes against the mycotoxin zearalenone in Balb/c mice: Prevention of micronuclei, chromosome aberrations and DNA fragmentation. *Food Chem Toxicol.* 2009. 10:1106–1112.

Zourgui L., Golli E., Bouaziz C., Hassen B. y Wafa H. Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone in Balb/C mice. *Food Chem Toxicol* 2008. 46:1817–1824.

XII. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

- ANOVA:** Análisis de varianza.
- DNA:** Ácido desoxiribonucleico
- RNA:** Ácido ribonucleico.
- BN:** Base nitrogenada
- CF:** Compuestos fenólicos.
- CFU-E:** Unidad formadora de colonias de eritrocitos.
- DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidracil.
- EMS:** Etil metanosulfonato.
- ENC:** Eritrocitos normocrómicos.
- EPC:** Eritrocitos policromáticos.
- EPCMN:** Eritrocitos policromáticos micronucleados.
- Epo:** Eritropoyetina.
- JT:** Jugo de tuna
- JTAA:** Jugo de tuna amarilla-anaranjada
- JTBV:** Jugo de tuna blanca-verde
- JTRP:** Jugo de tuna roja-púrpura
- LDL:** Lipoproteínas de baja densidad.
- MetOH:** Metanol.
- MMS:** Metil metanosulfonato.
- MN:** Micronúcleos.
- N7:** Posición 7 donde se encuentra el Nitrógeno de la guanina.
- N3:** Posición 3 donde se encuentra el Nitrógeno de la adenina.
- NH₂OH:** Hidroxilamina.
- NIH:** National Institute of Health, USA.
- ROS:** Especies reactivas de oxígeno.
- VPH:** Virus del papiloma humano.
- RL:** Radicales libres.
- O₂⁻:** Súperoxido.
- OH[·]:** Radical hidroxilo.
- H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno.
- HNO₂:** Ácido nitroso
- Vit E:** Vitamina E

JTDA: Jugo de tuna dosis 25 mg/Kg

JTDM: Jugo de tuna dosis 16.5 mg/Kg

JTDB: Jugo de tuna dosis 8.3 mg/Kg

XIII. ANEXO I

MATERIAL

Material de cristalería

Vasos de precipitados

Vidrios de reloj

Tubos de ensayo

Portaobjetos

Material diverso

Extractor de jugos (Turmix)

Vortex (Thermolyne)

Celdas de cuarzo

Espectrofotómetro de uv/visible (Jenway)

Balanza analítica

Jeringas de insulina

Filtros de celulosa

Sonda epigástrica metálica

Tijeras quirúrgicas

Jaulas de acrílico

Pinzas

Espátulas

Microscopio óptico (Olympus)

Aserrín estéril

Bebederos

Talco

Torundas

Marcadores

Material biológico

50 ratones machos cepa NIH

Muestras de jugo de tuna (blanca-verde, amarilla-anaranjada y roja-púrpura)

Reactivos

2,2-difenil-1-picrilhidrazil (JT Baker)

Giemsa (Sigma)

Metil metanosulfonato (Sigma)

Aceite de inmersión (Zaizz)

Metanol (JT Baker)

Agua inyectable (Pisa)

Fosfato de sodio (JT Baker)

Fosfato de potasio (JT Baker)

Agua desionizada

Vitamina E (Sigma)

Agua purificada (Bonafont)