



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIGENOTÓXICA DE
FENOLES CONTENIDOS EN FRESA (*FRAGARIA X ANANASSA*)
EN LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO EXPUESTOS A
BENZO[K]FLUORANTENO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SANDRA MARISOL MENDEZ BASTIDA



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el Centro de Ciencias de la Atmósfera, por el asesoramiento y la enseñanza desde el inicio de este proyecto.

A la M. en C. Ana Rosa Flores Márquez, no solo por el apoyo técnico sino, también, moral brindado durante y después del trabajo de laboratorio realizado. Por todo el asesoramiento y la paciencia para continuar con un HAP que parecía imposible.

A la Dra. Eva Aguirre Hernández, por ayudarnos en la elaboración de los extractos, el liofilizado de fresa y todo el apoyo teórico sobre los fitoquímicos.

Al Dr. Omar Amador Muñoz, por permitirnos usar las instalaciones de su laboratorio dentro del CCA y brindarnos el material necesario.

A Susana Zacarías por siempre ser mi compañera y amiga durante el desarrollo de este proyecto, por pasar días enteros seguidos en el laboratorio, por los videos de Dross y por tener la paciencia de llegar hasta aquí, ¡SÍ SE PUDO!

A mi familia: mi mamá, mi hermana, Luis y Tiano, por estar cuando los necesité y brindarme siempre el apoyo que no sabía que necesitaba; mi papá, por estar pendiente a la distancia; mi abuelita por tener una sonrisa y la palabra que necesitaba; Guby y Kili por no perderse ni una noche de desvelos. Son la mejor familia que pude tener.

A Victoria Carrillo, por siempre alimentarme y sobre todo por ser un apoyo incondicional en todos los aspectos, nada en el laboratorio sería posible sin ti. De verdad muchas gracias.

A Denisse, Norberto, Pablito, Javier y a todo el laboratorio de Citogenética Humana por ser un constante apoyo, una fuente inagotable de aprendizaje y por resolver todas mis dudas.

A todos los que valientemente nos prestaron sus venas para empezar a trabajar: Ullises, José Miguel, los amigos de Susana y a los dos donadores que quedaron seleccionados: César Montes y César Martiñón.

DEDICATORIA

A mi mamá, María Margarita Bastida González, por siempre ser mi ejemplo de mujer fuerte, dedicada e independiente. Este logro es principalmente tuyo.

INDICE

1	Resumen	6
2	Introducción	8
2.1	Contaminación ambiental	8
2.2	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	10
2.3	Metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos	11
2.4	Fitoquímicos	13
2.5	Ensayo cometa	15
3	Antecedentes	17
4	Justificación	21
5	Objetivos	22
5.1	Objetivo general	22
5.2	Objetivos particulares	22
6	Hipótesis	23
7	Material y Método	23
7.1	Obtención del extracto acuoso de fresa	23
7.2	Aislamiento de linfocitos por gradiente de densidad	24
7.3	Viabilidad y conteo celular	25
7.4	Determinación de la concentración de extracto etanólico y acuoso de fresa para uso en la citotoxicidad y genotoxicidad	26
7.5	Fracción enzimática S9	26
7.6	Preparación del estándar de Benzo[a]pireno y Benzo[k]fluoranteno	27
7.7	Tratamiento de linfocitos aislados con liofilizado de fresa y HAPs	27
7.8	Ensayo cometa	28
7.9	Análisis estadístico	29
8	Resultados	29
8.1	Extracto etanólico y acuoso de fresa	29
8.2	Genotoxicidad inducida con B[a]P con y sin extracto de fresa	33
8.3	Genotoxicidad inducida con B[k]F con y sin extracto de fresa	38
9	Discusión	41
9.1	Extracto acuoso de fresa	41
9.2	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	43
9.3	Extractos en presencia de HAP	46
10	Conclusiones	48
11	Referencias	49
12	Anexo	56

1 Resumen

Las fresas, *Fragaria x ananassa*, son un alimento rico en fibra, fructosa, ácidos grasos insaturados y una gran cantidad de compuestos fenólicos, por lo que se han realizado múltiples estudios con diversos extractos de esta fruta, para probar *in vitro* e *in vivo* las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticarcinogénicas que se les han atribuido. Por otro lado, gracias al constante monitoreo de los contaminantes de la atmósfera de la Ciudad de México se ha encontrado que entre los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) más abundantes están los fluorados, en la presente investigación se utilizaron benzo[k]fluoranteno B[k]F y benzo[a]pireno B[a]P para inducir genotoxicidad y luego evidenciar la actividad antigenotóxica del extracto de fresa.

Inicialmente se realizaron varios experimentos encaminados a determinar la concentración del extracto acuoso de fresa que no tuviera efecto citotóxico ni genotóxico en linfocitos humanos aislados de sangre periférica. La viabilidad se obtuvo con la técnica de tinción dual y el daño genético se evaluó mediante el ensayo cometa. Posteriormente, se verificó la genotoxicidad que tanto el B[a]P como el B[k]F ejercen en los linfocitos. Del primer HAP se utilizaron cuatro concentraciones: 20, 40, 60 y 80 μM por 4 horas. Los parámetros para cuantificar el daño, obtenidos con el analizador de imágenes Comet Assay IV, fueron la longitud de la cauda (LC), el % de ADN en la cauda (% ADN) y el momento de la cauda (MC). En los resultados se evidenció una respuesta dependiente de la concentración a excepción de 60 μM que mostró una respuesta más baja. Con el B[k]F se emplearon 10, 21, 44, 87, 175 y 350 μM , que mostraron un nivel menor de daño que el B[a]P y no fue dependiente de la concentración, pues varió en las tres determinaciones.

Cuando los linfocitos se expusieron al B[a]P con el extracto de fresa, se observó una disminución de daño genotóxico en todos los parámetros, siendo 80 μM en donde fue más evidente, pues disminuyó 21.2, 46.5 y 60.4% la LC, el % ADN y el MC, respectivamente. Por otro lado, el efecto también se redujo en cotratamiento de B[k]F y extracto, la mayor respuesta se obtuvo en 87 μM , donde los porcentajes

de disminución fueron 35.7, 63 y 76% en la longitud, el % de ADN y el momento de la cauda.

Concluyendo así que tanto el B[a]P como el B[k]F indujeron daño genotóxico. El B[a]P mostró un comportamiento concentración-dependiente, mientras que B[k]F presentó variaciones entre cada concentración para los diversos parámetros y una respuesta menor que B[a]P. Asimismo, el extracto acuoso de fresa, abundante en polifenoles, logró disminuir la genotoxicidad inducida con ambos HAPs. Además, de que este trabajo es pionero en utilizar un liofilizado de fresa en presencia de B[k]F, un posible carcinógeno.

Debido a que en el presente estudio quedó demostrada la antigenotoxicidad de las fresas y por todas las propiedades benéficas de la salud que se le atribuyen, se recomienda ampliamente el consumo de esta fruta.

2 Introducción

2.1 Contaminación ambiental

El ser humano ha obtenido de la naturaleza todo lo necesario para vivir, no solamente para cubrir necesidades básicas, sino para llevar a cabo cualquier tipo de actividades. Los ecosistemas, que comprenden además de los seres vivos, el medio en el que se desarrollan así como sus relaciones, han sufrido cambios a lo largo del tiempo. En las últimas décadas, ha recibido bastante atención uno de los cambios más grandes del que hemos sido testigos: la contaminación ambiental. La cual se puede concebir como la presencia en el ambiente de sustancias o elementos no propios que son dañinos para los seres vivos o los ecosistemas, y que pueden incluirse en cualquier matriz, ya sea el agua, suelo o el aire.

La atmósfera es una mezcla de gases y partículas que cubren a la tierra y consta de tres capas: la troposfera, la estratosfera y la ionosfera, siendo el nitrógeno y el oxígeno sus principales componentes. Cuando se habla de contaminación atmosférica, se pueden identificar dos grandes fuentes emisoras: a) las naturales, que se refiere a los contaminantes que son producto de algún fenómeno natural como vulcanismo, incendios forestales, descomposición de materia orgánica, entre otros y b) las antropogénicas, que se refiere a los contaminantes que se generan derivado de las actividades humanas (Solís Segura y López Arriaga 2003, Capó Martí 2007).

Los contaminantes atmosféricos se pueden clasificar según los compuestos por los que estén formados (Jiménez 2001, Capó Martí 2007):

- Inorgánicos del carbono: el monóxido de carbono (CO) es un gas tóxico producto de la combustión del carbón, gas natural o petróleo, debido a que compite con el oxígeno por los sitios activos de la hemoglobina. Por otro lado, el dióxido de carbono (CO₂) es originado de la combustión de materia orgánica y de la respiración. Es necesario para llevar a cabo la fotosíntesis

pero en grandes concentraciones en la atmósfera retiene las radiaciones infrarrojas del sol por lo que se eleva la temperatura de la tierra.

- Derivados del azufre: el dióxido de azufre (SO_2) se forma por la oxidación de combustibles fósiles que contienen este elemento y la exposición continua al mismo provoca efectos negativos en el sistema respiratorio. También, son comunes los productos del óxido de azufre, que puede sufrir una oxidación catalítica en condiciones de alta humedad o un proceso fotoquímico, que además dependen de la presencia de otros compuestos como amoníaco o metales pesados, contenidos en aguas sulfhídricas, erupciones volcánicas, descomposición de materia orgánica, plantas de gas o refinerías.
- Hidrocarburos: formados de carbono e hidrógeno, a través de combustión incompleta, que pueden ser alifáticos como el propano, hexano y etileno, capaces de desplazar el oxígeno y llegar a ser asfixiantes; o cíclicos que pueden presentar diferentes propiedades tóxicas y anestésicas.
- Nitrógeno: el óxido nítrico es un gas inerte a temperatura normal, emitido por procesos industriales o quema de combustibles fósiles, se transforma por acción de la luz solar en óxido nitroso o dióxido de nitrógeno (NO_2), que irrita los pulmones y afecta el sistema cardiovascular, además en plantas inhibe el crecimiento y provoca la caída prematura de las hojas.
- Oxidantes fotoquímicos: los nitratos de peracilo son oxidantes fotoquímicos que se forman a partir de una serie de reacciones químicas entre hidrocarburos parcialmente oxidados, oxígeno, ozono y óxidos de nitrógeno, causan contracción e irritación de las vías respiratorias. El ozono es un gas que se encuentra de manera natural en la atmósfera, que absorbe gran cantidad de radiación proveniente del sol, se genera por la continua incidencia de radiación UV en moléculas de oxígeno que se transforman en oxígeno atómico, que al unirse con otras moléculas de oxígeno originan el ozono; en cambio, el ozono como contaminante se forma a partir de óxidos de nitrógeno e hidrocarburos principalmente. Al ser un compuesto oxidante, los daños que ocasiona son variados y dependen del tiempo de exposición.

- Metales: están presentes en la atmósfera plomo, berilio, cobre, cadmio, manganeso, entre otros, que proceden de fuentes antropogénicas como residuos industriales o los gases provenientes del parque vehicular. Los efectos que cada uno de éstos provoca son variados y van desde intoxicaciones ligeras hasta causar enfisema y cáncer pulmonar como en el caso del cadmio, o depositarse en los huesos y causar anemia como el plomo. Son particularmente peligrosos porque pueden ser acumulables en los organismos.
- Partículas: son mezclas de contaminantes que pueden clasificarse según su diámetro aerodinámico. Las que reciben más atención son la fracción respirable, es decir, las que tienen un diámetro aerodinámico menor a 10 μm (PM_{10}). Entre las cuales se identifican la fracción gruesa, con un diámetro dinámico entre 2.5 y 10 μm ($\text{PM}_{2.5-10}$); la fina menor a 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$) y la ultrafina menor a 1 μm (PM_1). Asociadas a las partículas puede haber compuestos como sulfatos, nitratos, amonio, sodio, cloro, carbono, componentes minerales, agua, metales, hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros (INECC 2011).

2.2 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos formados por anillos aromáticos que pueden estar agrupados en diferente forma, ya sea recta, angulados o ramificados (Mastandrea *et al.* 2005). Son poco solubles en agua, lipofílicos y altamente solubles en disolventes orgánicos (World Health Organization 2010).

Se forman a partir de la combustión incompleta de sustancias orgánicas como petróleo, gas, carbón, madera, basura, tabaco o al asar carne, que, una vez liberados, se pueden condensar y ser adsorbidos por partículas presentes en la atmósfera o por sí mismos formar partículas pequeñas que les permiten dispersarse a través del viento, por lo que se hallan en mezclas complejas. Como sustancias individuales, se pueden encontrar constituyendo parte de tintas o pinturas, plásticos,

monocristales, explosivos, fármacos, resinas, revestimiento para interiores de tuberías de agua, entre otros (ATSDR 1995, Mastandrea *et al.* 2005).

Como contaminantes atmosféricos, los HAP se distribuyen de acuerdo a su peso molecular; los de bajo peso molecular están constituidos de dos o tres anillos se encuentran en la fase de vapor, mientras que los de cinco anillos o más están asociados a material particulado. Los HAPs de peso molecular medio (cuatro anillos) pueden permanecer unidos a partículas o formar parte del vapor según la temperatura atmosférica. Químicamente, estos compuestos sufren fotooxidación pero el proceso puede retrasarse cuando están adsorbidos en partículas. Además, es posible que reaccionen con otros contaminantes como el ozono, radicales hidroxilo, dióxido de nitrógeno o sulfuro y formar nitro-HAP o dinitro-HAP (World Health Organization 2010).

Los HAPs además de estar en la atmósfera, se pueden encontrar en el agua y el suelo, dependiendo de su estructura y de sus características, así como de la disponibilidad de partículas sólidas a las que puedan adherirse, lo que hace más fácil su depósito. En estos ambientes, pueden ser degradados por diferentes hongos y microorganismos, lo que aumenta la probabilidad de bioconcentración en organismos que no pueden metabolizarlos (World Health Organization 2010).

2.3 Metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los HAP, al igual que otros xenobióticos son metabolizados en los organismos (Figura 1). El metabolismo de xenobióticos incluye dos fases. Durante la fase 1 se agrega un reactivo o se expone algún grupo funcional mediante diferentes reacciones como hidroxilación, desaminación, desulfuración, epoxidación, entre otras, mientras que durante la fase 2, los compuestos que se formaron en la fase 1 se convierten en metabolitos polares por medio de conjugación con ácido glucurónico, sulfato, acetato, glutatión, aminoácidos o por metilación, para poder ser excretados (Murray 2010).

Las reacciones de oxidación durante la fase 1, son catalizadas por el citocromo P450 o monooxigenasas, que son proteínas que se encuentran en membranas del retículo endoplásmico liso o en mitocondrias, en mayor cantidad en células hepáticas y enterocitos, los cuales son células epiteliales del intestino. Los principales citocromos P450 en el metabolismo de fármacos son de las familias CYP1, CYP2 y CYP3. Es importante mencionar que algunos xenobióticos se transforman de estados inactivos a activos biológicamente durante la fase 1 del metabolismo y son conocidos como promutágenos (Murray 2010).

Los HAPs son promutágenos, por lo que requieren de activación metabólica para ser eliminados del organismo. Existen tres vías por las que se pueden activar: 1) formación de diol-epóxidos; 2) generación de cationes radicales y 3) constitución de o-quinonas (Spink *et al.* 2008, World Health Organization 2010). Los mutágenos más potentes son los metabolitos intermedios pero no los compuestos originales.

Otro mecanismo mediante el cual los HAPs pueden inducir efectos es mediante la unión al receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), presente en el citosol. Una vez que un hidrocarburo aromático policíclico se une al AhR, el complejo se transloca al núcleo, en donde interactúa con el translocador nuclear de hidrocarburos de arilo (Arnt, por sus siglas en inglés). El heterodímero formado por Ahr-Arnt se une después a los elementos de respuesta a xenobióticos en las regiones reguladoras del citocromo P450 (CYP1) (Spink *et al.* 2008, Huang *et al.* 2011, Verma *et al.* 2012).

De esta manera, CYP1 se activa vía AhR. Las primeras reacciones del metabolismo son llevadas a cabo por CYP1 y epóxido hidrolasa. Al compuesto original se le agrega un oxígeno por CYP1 para formar epóxidos, estos metabolitos son mutagénicos y carcinogénicos. Los epóxidos se hidratan por epóxido hidrolasa para formar dihidrodioles. Otro camino para los epóxidos es sufrir espontáneamente arreglos no enzimáticos a intermediarios fenólicos, los cuales se forman a través de hidroxilación completa en posición C-3 y C-6. Los fenoles se vuelven a oxidar para constituir quinonas por hidroquinonas y radicales semiquinonas, que no son carcinogénicas pero producen especies reactivas de oxígeno que son responsables de efectos citotóxicos (Verma *et al.* 2012).

Los fenoles, quinonas y dihidrodiolos son conjugados a glucurónidos y éster sulfatos o son hidrolizados. Los dihidrodiolos que sufren otra oxidación forman dihidrodiolos epóxido, que son los últimos metabolitos genotóxicos e inducen aductos, al reaccionar su C bencílico con guanina del ADN. Algunos metabolitos también son agonistas de AhR, por lo que continúan metabolizándose y formando metabolitos carcinogénicos. Las quinonas diol-epóxido conjugadas con glutatión-S-transferasa pueden ser eliminadas por orina (Spink *et al.* 2008, Huang *et al.* 2011, Verma *et al.* 2012).

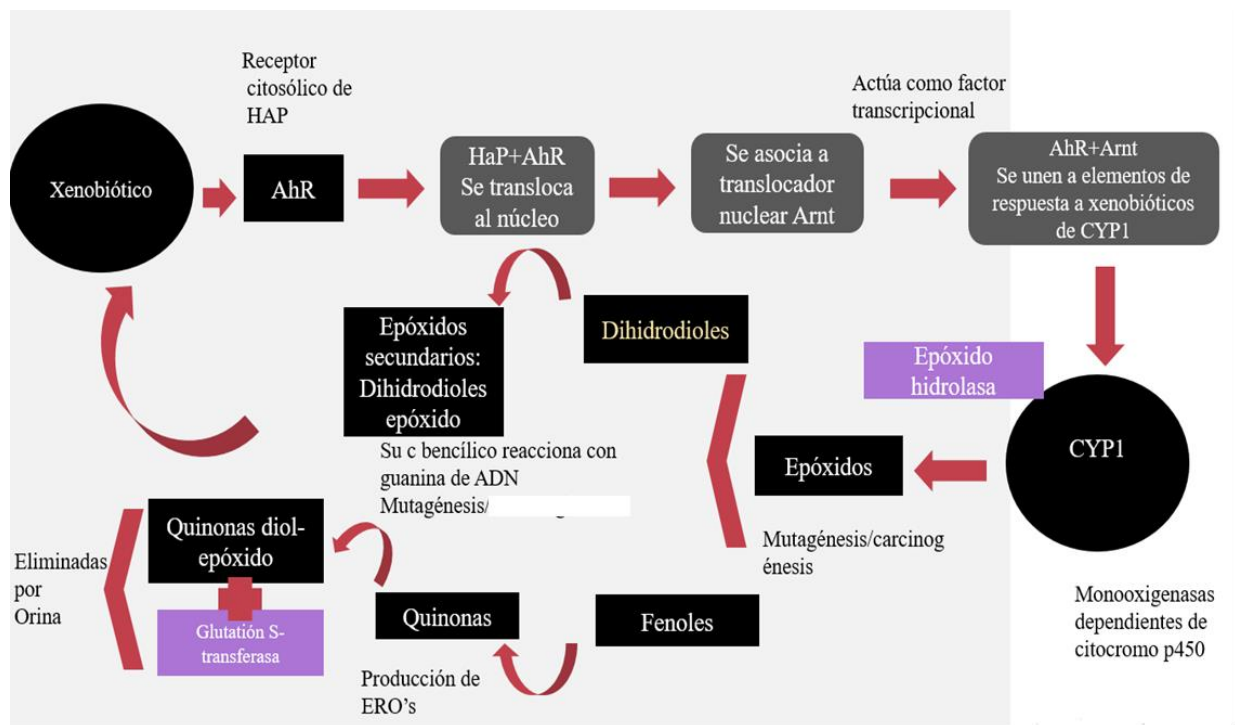


Figura. 1. Esquema del metabolismo de HAP. Iniciando con la unión del xenobiótico al receptor citosólico de hidrocarburos de arilo que lo transloca al núcleo para que interactúe con CYP1 y se lleven a cabo las reacciones de metabolismo de fase 1 y 2.

2.4 Fitoquímicos

Los fitoquímicos, son metabolitos secundarios producidos por las plantas, que les son útiles para una amplia variedad de funciones, como protección y defensa de

patógenos o atracción de insectos para polinización (Huang *et al.* 2016). Algunos fitoquímicos tienen efectos beneficiosos a la salud en seres humanos cuando son consumidos de sus fuentes más comunes (frutos, semillas, vegetales, partes aéreas). Para su estudio se han clasificado en seis grupos según su estructura química y sus características: carbohidratos, lípidos, terpenoides, ácidos fenólicos y alcaloides, así como metabolitos con nitrógeno (Huang *et al.* 2016).

La fresa del género *Fragaria* es perteneciente a la familia *Rosaceae* y ésta a su vez al orden *Rosales*, es una planta herbácea, perenne, con la raíz fasciculada porque de la base del tallo salen muchas raíces del mismo tamaño. Posee estolones, es decir, tallos rastreros que van produciendo más raíces adventicias conforme hacen contacto con el suelo. Las flores pueden ser perfectas y hermafroditas o imperfectas y unisexuales, son de color blanco y se agrupan en inflorescencias; una vez polinizadas, se forma un fruto agregado seco, de una sola semilla que recibe el nombre de aquenio. Las fresas son en realidad el receptáculo de cada flor engrosado con muchos aquenios, uno formado por cada carpelo (Angulo-Carmona 2009, SAGARPA 2017).

Existen diferentes variedades de fresas y la más común es *Fragaria x ananassa*, que es un híbrido de dos especies *F. chiloensis* y *F. virginiana*. La mayor parte de la producción de fresas se localiza en el hemisferio norte y destaca que es uno de los frutos más consumidos a nivel mundial debido a que con ellas se elaboran gran cantidad de productos alimenticios como mermeladas (Hancock *et al.* 2008).

Asimismo, las fresas *Fragaria x ananassa*, son un alimento rico en fibra, fructosa, ácidos grasos insaturados y una gran cantidad de compuestos fenólicos, entre ellos flavonoides (flavonoles y flavanoles), taninos hidrolizables y condensados (Giampieri *et al.* 2012). Entre los flavonoides principales se encuentran las antocianinas, siendo cianidina 3-O-glucósido, pelargonidina 3-monoglucósido y pelargonidina 3-O-diglucósido las que mayoritariamente abundan en las fresas (Basu *et al.* 2014, Forbes-Hernández *et al.* 2017). Los taninos hidrolizables más comunes en las fresas son los elagitaninos, mientras que los flavonoles más

encontrados son quercetina, canferol y el flavanol catequina (Basu *et al.* 2014, Forbes-Hernández *et al.* 2017).

Son muchos y muy variados los estudios que se han realizado con fresas como promotoras de la salud humana. Estudios epidemiológicos han arrojado datos convincentes entre la asociación de dietas saludables (consumo de frutas y verduras), haciendo especial énfasis en el consumo de fresas y otras moras, con efectos protectores contra hipertensión, inflamación, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Basu *et al.* 2014), asimismo, del efecto positivo que el consumo de fresas tiene en pacientes obesos, con niveles altos de colesterol y con síndrome metabólico (Chang *et al.* 2008).

2.5 Ensayo cometa

La genotoxicidad se puede definir como la capacidad que tiene algún agente para producir daño al material genético, el cual incluye además del ADN, sus componentes relacionados al desarrollo y comportamiento de los cromosomas, tales como proteínas de reparación, condensación, descondensación, formación del huso mitótico, etc. (Izquierdo-Vega *et al.* 2017).

Dichos agentes pueden causar efectos diversos: a) mutagénicos: producen cambios en genes o cromosomas, son clastogénicos si provocan rompimiento de cromosomas o aneugénicos si causan pérdida completa de cromosomas o pares de cromosomas; b) carcinógenos, si ocasionan transformaciones celulares que pasen por las tres fases de la carcinogénesis, iniciación, promoción y progresión y c) teratogénicos, que causan daño durante el desarrollo de los organismos. De la misma forma, hay fitoquímicos bioactivos capaces de reducir la mutagenicidad o la genotoxicidad, contenidos en frutos, vegetales o plantas medicinales (Izquierdo-Vega *et al.* 2017).

Existen diferentes técnicas que han permitido el estudio del daño que causan diversos agentes al material genético –como los contaminantes atmosféricos–, tales como ensayo de micronúcleos, aberraciones cromosómicas, intercambio de

cromátidas hermanas y electroforesis unicelular o ensayo cometa, entre otros (Dhawan *et al.* 2009).

El ensayo cometa, fue primeramente utilizado por Ostling y Johanson (1984), quienes desarrollaron una técnica de electroforesis en microgel en células individuales, que bajo condiciones neutras fue posible detectar rompimientos de cadena doble, lo cual limitó el uso del método. Posteriormente, Singh *et al.* (1988) modificaron la técnica y utilizaron un pH alcalino ($\text{pH} > 13$) para la electroforesis, lo que permitió mayor migración del material genético asociado a rompimientos de cadena doble, rompimientos de cadena sencilla principalmente, sitios alcali-lábiles, así como rompimientos de cadena sencilla asociada a sitios de escisión incompleta. Dichos autores, denominaron a la metodología electroforesis unicelular y su versión alcalina es la más utilizada internacionalmente. Ambos nombres, ensayo cometa y electroforesis unicelular son empleados indistintamente (Tice *et al.* 2000).

En las décadas posteriores y hasta la actualidad, el ensayo se ha modificado para poder identificar diferentes tipos de daño en las células, por lo que se ha introducido el uso de anticuerpos específicos para ciertas lesiones o proteínas de reparación de ADN. El uso del ensayo cometa se popularizó debido a que es posible reproducirlo con una gran variedad de células: en procariontes como *Escherichia coli*, y en eucariontes, por ejemplo en algas, peces, mejillones, anfibios, plantas, moscas, lombrices, roedores y por supuesto seres humanos. En este último caso, el ensayo cometa ha funcionado para detectar exposición ambiental y ocupacional (a plaguicidas y otros contaminantes), debido a que el daño medido indica exposición reciente y en etapas tempranas por lo que se pueden aplicar diferentes técnicas de control para el individuo (Dhawan *et al.* 2009).

Los linfocitos humanos aislados, son uno de los modelos frecuentemente utilizados en el ensayo cometa y según la sustancia a probar, se recomienda utilizar un sistema de activación metabólica (Tice *et al.* 2000). Dicho sistema de activación metabólica es la fracción microsómica S9, preparada a partir de hígado de ratas tratadas con Aroclor 1254 para inducir la actividad del metabolismo de xenobióticos. El liofilizado de hígado después es restituido en una mezcla que contiene agua,

amortiguador de fosfatos, cloruro de sodio, cloruro de potasio, glucosa-6-fosfato y NADP (Registre y Proudlock 2016).

3 Antecedentes

La Ciudad de México es una de las localidades más contaminadas del mundo, por lo que desde la década de los 90 se encuentra en monitoreo constante para identificar y cuantificar los contaminantes predominantes en su atmósfera. Villalobos-Pietrini *et al.* (2006), caracterizaron los compuestos orgánicos contenidos en la materia orgánica extraída (MOE) asociada a partículas PM₁₀ y encontraron que los HAPs más abundantes son benzo[ghi]perileno, coroneno, indeno[1,2,3-cd]pireno, seguido de reteno, fluoranteno y benzo[a]antraceno.

En 2009, se llevó a cabo otro estudio similar, en donde se identificaron los contaminantes contenidos en la materia orgánica extraída (MOE) asociada a PM_{2.5} y los HAPs más abundantes fueron coroneno, benzo[ghi]perileno, indeno[1,2,3-cd]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[e]pireno y benzo[j+k]fluoranteno (Amador-Muñoz *et al.* 2009). Debido a la presencia de hidrocarburos con fluoranteno en la atmósfera de la Ciudad de México, en este trabajo se probó el benzo[k]fluoranteno, además del benzo[a]pireno, el HAP más estudiado, para poder observar diferencias o semejanzas en su comportamiento.

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer, IARC por sus siglas en inglés (International Agency for Research on Cancer), ha clasificado sustancias químicas en los siguientes grupos, según las evidencias de carcinogénesis en seres humanos, en animales experimentales y los mecanismos por los que actúa (IARC 2010):

- Grupo 1: agentes carcinógenos para los seres humanos
- Grupo 2 A: probables carcinógenos para los seres humanos
- Grupo 2B: posible carcinógeno para los seres humanos
- Grupo 3: no clasificable por su carcinogenicidad en seres humanos.

El benzo[a]pireno forma parte del grupo 1. Es un HAP de alto peso molecular que consta de cinco anillos y es el compuesto más estudiado debido a su citotoxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad, además de que es bien conocido su metabolismo. Tras la activación metabólica de B[a]P por CYP1, se forman 2,3-, 4,5-, 7,8- y 9,10- epóxidos, que son metabolitos mutagénicos y carcinogénicos. El 7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido es el último metabolito carcinogénico y es el que forma aductos de ADN en posición N 2 de la guanina; esta actividad es atribuida a la presencia de un anillo epóxido en posición C-10 o región bahía (Verna *et al.* 2012).

La región bahía de un HAP es un anillo angular constituido por la fusión de un anillo de benceno saturado que es propenso a oxidación o formación de iones radicales pero inmune a conjugación y desintoxicación (Verna *et al.* 2012). La formación de aductos en el ADN es clave para la mutagenicidad y la carcinogenicidad. Se ha demostrado que las quinonas de B[a]P, Benzo[a]antraceno y Dimetilbenzo[a]antraceno causan mutaciones en p53 derivadas de la producción de especies reactivas de oxígeno de las o-quinonas formadas durante el metabolismo de los compuestos originales (Shen *et al.* 2006).

Asimismo, es bien conocida la actividad carcinogénica del B[a]P, pues se sabe que además de causar mutaciones en p53, inhibe la apoptosis y causa cambios en la expresión de genes necesarios para los mecanismos de reparación del ADN (Burdick *et al.* 2006, Glick *et al.* 2009, Tung *et al.* 2014). También se han inducido tumores dérmicos con dicho compuesto, orales y en vías respiratorias, en ratones, conejos, monos y cricetos (World Health Organization 2010).

El benzo[k]fluoranteno, es un agente posiblemente carcinógeno para los seres humanos, es decir, forma parte del grupo 2B de la IARC (2010). Es un compuesto de cinco anillos de color amarillo pálido, encontrado en gasolina de escape, humo de cigarro, aceites lubricantes, aceites de motor, alquitrán de hulla y emisiones de combustión de gasolina o carbón (World Health Organization 2010).

Al igual que el B[a]P, el B[k]F también sufre activación metabólica y los metabolitos formados resultan más mutagénicos que el compuesto original, en especial el identificado como 8,9-dihidro-8,9-dihidroxi B[k]f, que fue probado en *Salmonella*

typhimurium induciendo mutagenicidad (Weyand *et al.* 1988). Por otro lado, en diversos estudios se ha demostrado que dicho HAP no tiene actividad carcinogénica completa, pues actúa como iniciador de tumores en piel de ratones y en fibroblastos embrionarios de ratón (Laccasagne *et al.* 1967, Misaki *et al.* 2016), pero sin incidencia significativa en la formación de tumores en ratones recién nacidos en pulmón o hígado (La Voie *et al.* 1987). Asimismo, en células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano A549 y de hepatocarcinoma HepG2, se han encontrado bajos niveles de formación de aductos de ADN (Tarantini *et al.* 2010, Libalová *et al.* 2014).

En contraste, las fresas han sido ampliamente estudiadas gracias a las propiedades promotoras de la salud que se les han atribuido, principalmente a los compuestos fenólicos.

En extracto de acetona, se identificaron cerca de 40 compuestos fenólicos, entre los que se incluyen glucósidos de quercetina, canferol, cianidina, pelargonidina y ácido elálgico; con flavanoles, ácido p-coumárico y elagitaninos (Aaby *et al.* 2007). Por otra parte, en extractos metanólicos también se han encontrado ácido elálgico, glucósidos de pelargonidina, catequina, quercetina y canferol (Forbes-Hernández *et al.* 2017, Gasparrini *et al.* 2018).

Dichos compuestos son conocidos por su capacidad antioxidante, gracias a que pueden “barrer” algunos radicales libres como anión superóxido o peroxinitrito, así como antiinflamatoria, inhibir la actividad fisiológica de enzimas y receptores, previniendo el daño relacionado con el estrés oxidante y por quelación de metales de transición involucrados en formar radicales libres (Giampieri *et al.* 2013, Mojzer *et al.* 2016). Aaby *et al.* (2007), reportaron que los principales contribuyentes de la capacidad antioxidante de las fresas se debe en 24% a la vitamina C, en 19% a los elagitaninos y en 13% a las antocianinas.

Es importante mencionar que el estrés oxidante es un desequilibrio entre la generación de radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidante en el organismo, por lo que dichos radicales libres pueden causar ruptura de cadenas del ADN, entrecruzamientos, sitios abásicos o modificación de las bases, que pueden

desencadenar otro tipo de procesos como cáncer o enfermedades cardiovasculares (Valko *et al.* 2007, Konigsberg 2008).

De esta manera, han llamado mucho la atención los efectos antígenotóxicos de las fresas, entre los que destacan la desintoxicación de diversos agentes genotóxicos, protección contra el daño al ADN y disminución de la proliferación celular vía apoptosis (Basu *et al.* 2014). Lo que ha conducido a probar extractos de fresa en diferentes modelos biológicos.

Giampieri *et al.* (2014), probaron un extracto etanólico de fresa enriquecido con antocianinas en fibroblastos dérmicos humanos en estrés oxidante inducido por 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) y encontraron que aumentó la viabilidad, disminuyó el número de células apoptóticas y muertas, además de que se mejoró la función mitocondrial. El mismo grupo de estudio, realizó después pruebas con este agente para causar estrés oxidante en células de hepatocarcinoma HepG2, en presencia de extractos hidroalcohólicos de fresa y de los aquenios, donde ambos extractos demostraron contrarrestar el daño producido por especies reactivas de oxígeno (ERO) (Ariza *et al.* 2018).

También se ha evaluado el efecto sobre la inflamación causada por lipopolisacáridos de *Escherichia coli* en fibroblastos dérmicos humanos, donde se encontró que en presencia de un extracto de fresa se redujeron los niveles de ERO, el índice apoptótico y se mejoró la función mitocondrial (Gasparini *et al.* 2018).

Por otro lado, se ha probado que el extracto acetónico de fresa inhibió la proliferación en células de hepatocarcinoma humano HepG2 (Meyers *et al.* 2003). También tratamientos realizados con extractos acuosos de fresa, han demostrado inhibir la proliferación en una línea celular de cáncer de pulmón A549, así como disminuir la transformación celular neoplásica inducida por promotores de tumores y productores de ERO en células epidérmicas de ratón JB6-P, además de disminuir la actividad de AP-1 y de NF-kB, proteína importante en promover la proliferación celular y factor nuclear clave para elegir el destino de una célula hacia muerte celular programada o proliferación, respectivamente (Wang *et al.* 2005). Demostrando así,

los efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antiproliferativos y antitumorigénicos de extractos etanólicos, hidroalcohólicos, acetónicos y acuosos de fresa.

4 Justificación

La contaminación ambiental representa además de un problema ambiental, un conflicto de salud pública, debido a todas las sustancias a las que se está expuesto. Algunos de los contaminantes presentes en la atmósfera son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, que pueden ser carcinógenos para los seres humanos. Entre los que se han encontrado en la atmósfera de la CDMX, están los hidrocarburos con fluoranteno.

Por otro lado, el consumo de fresas dentro de la dieta de seres humanos ha resultado efectivo para mejorar la salud y como un método de protección contra diversos padecimientos como hipertensión, control de colesterol, inflamación, enfermedades cardiovasculares y cáncer, lo que ha llevado al estudio de sus fitoquímicos (Giampieri *et al.* 2013) .

Los extractos orgánicos de fresa obtenidos gracias a diferentes disolventes como alcoholes, acetona o el extracto acuoso liofilizado, han permitido estudiar la acción de los fitoquímicos como antioxidantes, antiinflamatorios, antiproliferativos y antitumorigénicos, cuando el modelo biológico se expone a una sustancia oxidante, mutagénica o genotóxica.

Una de las acciones que no se han probado de los extractos de fresa, es la antigenotoxicidad, por lo que se considera importante probarla induciendo daño al material genético con un genotóxico que no ha sido utilizado en conjunto con las fresas y al que los seres humanos estamos expuestos gracias a su presencia en la atmósfera: benzo[k]fluoranteno. Para lo cual se utilizará un modelo biológico que resulta más práctico que una línea celular, linfocitos humanos aislados de sangre

periférica, utilizando el ensayo cometa, que detecta daño de acuerdo a la migración de ADN de una sola célula.

Utilizar el ensayo cometa como técnica para detectar el daño genotóxico ofrece muchas ventajas: es un método sensible, es decir, capaz de detectar bajos niveles de daño al ADN; requiere de pocas células por muestra; es flexible en cuanto al uso de células que estén o no en proliferación; es de bajo costo; de fácil aplicación; se requieren pocas cantidades de las sustancias a probar y se necesita de un corto periodo de tiempo para realizarlo completo. Se utiliza como ensayo de escaneo en estudios para distinguir entre genotoxicidad y citotoxicidad o para discriminar entre carcinógenos genotóxicos y no genotóxicos, así como para identificar mutágenos o carcinógenos humanos (Tice *et al.* 2000, Dhawan *et al.* 2009, Koppen *et al.* 2017).

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Analizar el efecto que tiene el extracto acuoso de fresa, cuando se induce genotoxicidad en linfocitos aislados de sangre periférica humana con dos hidrocarburos aromáticos policíclicos, benzo[a]pireno y benzo[k]fluoranteno.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar las concentraciones de extracto etanólico y acuoso de fresa que sean incapaces de dañar citotóxica y genotóxicamente a linfocitos humanos aislados de sangre periférica.
- Evaluar el efecto genotóxico inducido con benzo[a]pireno en linfocitos humanos, mediante el ensayo cometa.
- Estimar el efecto del extracto acuoso de fresa ante la genotoxicidad inducida por benzo[a]pireno, utilizando el ensayo cometa.

- Detectar el efecto genotóxico inducido con benzo[k]fluoranteno en linfocitos humanos, a través del ensayo cometa.
- Evaluar el efecto del extracto acuoso de fresa frente a la genotoxicidad provocada por el benzo[k]fluoranteno, mediante el ensayo cometa.

6 Hipótesis

El benzo[a]pireno y el benzo[k]fluoranteno, dos hidrocarburos aromáticos policíclicos clasificados como carcinógeno y posible carcinógeno, respectivamente; causarán daño genotóxico en los linfocitos humanos aislados de sangre periférica, que disminuirá en presencia del extracto acuoso de fresa gracias a su alto contenido de compuestos fenólicos.

7 Material y Método

7.1 Obtención de los extractos de fresa

Se utilizaron 500 g de fresas frescas y lavadas. Dicho material vegetal se colocó en un vaso de precipitado con agua destilada y se calentó a fuego lento hasta que la mezcla entró en ebullición por un periodo de 10 minutos. Posteriormente, el contenido se filtró y colocó en varios matraces bola. A continuación se congeló la mezcla con nitrógeno líquido. Cuando todos los matraces estuvieron listos, se les colocó el tapón encerado para ajustarlos a la liofilizadora (HETO FD3). Se liofilizaron a -49 °C, diez horas, durante 5 días. El liofilizado se retiró de las paredes de los matraces con espátulas y se colocó en un frasco, el cual fue almacenado en oscuridad y a temperatura ambiente.

Para la obtención del extracto de etanol, 250 g de fresas se colocaron en un matraz Erlenmeyer y se maceraron con etanol anhidro durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, el macerado se filtró y se sometió a una destilación simple en un rotaevaporador RII (Büchi Labortechnik AG). Este procedimiento se realizó por

triplicado. Finalmente los extractos se reunieron en un frasco de vidrio, el cual se mantuvo en una cámara de vacío durante cuatro semanas para evaporar cualquier resto de disolvente.

7.2 Aislamiento de linfocitos por gradiente de densidad

Antes de comenzar el aislamiento, se mantuvieron por veinte minutos en incubadora a 37 °C tubos para centrifuga de 15 mL con los siguientes reactivos: dos tubos con 10 mL de solución Hank's, uno con 7 mL de solución Hank's, dos con 3.5 mL de Lymphoprep y un frasco con medio RPMI 1640. Una vez que transcurrieron los veinte minutos con los reactivos dentro de la incubadora, con una jeringa estéril y heparinizada se tomó una muestra sanguínea de 7 mL, de dos donadores masculinos sanos, es decir, que no padecieran de alguna enfermedad crónica, que no estuvieran en tratamiento médico y que no consumieran sustancias tóxicas. Previo a la toma de la muestra sanguínea, se les entregó una carta de consentimiento informado (Se anexa documento).

En condiciones de esterilidad, los 7 mL de sangre se mezclaron con 7 mL de solución Hank's con ayuda de una pipeta Pasteur. Una vez mezcladas, con la misma pipeta se transfirieron de manera ágil pero muy cuidadosa para no mezclar las fases, 7 mL a cada uno de los tubos con Lymphoprep o hasta que tuvieron el mismo volumen. Ambos tubos fueron centrifugados a 2010 rpm durante 20 minutos. Al sacar estos tubos de la centrifuga, fue posible observar cuatro capas, al fondo una muy densa y de color oscuro, que contiene eritrocitos y leucocitos, seguida de una capa de Lymphoprep, de color rosa muy claro (casi incoloro), una capa delgada de color blanquecino, que es la que contiene a los linfocitos y una superior de color más oscuro. De nuevo en condiciones de esterilidad, se retiró la mitad de la capa superior con una pipeta Pasteur y la capa blanca con los linfocitos de ambos tubos, se depositaron en uno de los tubos con 10 mL de solución Hank's. El tubo se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos.

Al tubo anterior se le retiró el sobrenadante y se le agregaron los 10 mL de solución Hank's restante. El botón celular se resuspendió y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. Al finalizar, se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 2.5 mL de medio RPMI 1640. Las células con medio fueron transferidas a un frasco estéril de boquilla ancha y con tapa, además se reservaron aproximadamente 100 µL de la suspensión celular en un microtubo de 0.6 mL.

7.3 Viabilidad y conteo celular

En oscuridad, a dos microtubos de 0.6 mL se les agregó 10 µL de colorante dual, constituido por bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína. Después de mezclar la suspensión celular que previamente se reservó en un microtubo, se agregaron 10 µL a cada uno de los tubos con colorante dual y se resuspendieron. Se mantuvieron en la incubadora a 36 °C durante 7 minutos, transcurrido este tiempo, se colocaron 10 µL de la suspensión en un portaobjetos, se aplicó un cubreobjetos (20 mm x 20 mm) y se observó al microscopio de fluorescencia. De manera aleatoria se contaron 100 células, de las cuales se registró el número de células vivas, observadas en color verde, y de células muertas, en color rojo brillante. Las células color naranja fueron consideradas como vivas. El conteo de células vivas y muertas fue realizado con la finalidad de obtener el porcentaje de viabilidad de los linfocitos. Cuando el porcentaje fue mayor al 95%, se continuó con el conteo celular.

Para el conteo celular, en el microscopio óptico después de realizar la iluminación Köhler y el contraste de fases, se enfocó la cuadrícula de la cámara de Neubauer y se retiró. De la alícuota de suspensión celular, después de resuspender se tomaron 10 µL que fueron colocados en la orilla de la cámara de Neubauer con el cubreobjetos. Se contaron las células en cada uno de los cuatro cuadrados extremos de la cuadrícula y se aplicó la siguiente fórmula para calcular el número de células por mililitro de la suspensión celular:

$$NC = \frac{(C1 + C2 + C3 + C4) 10,000}{4}$$

Donde:

NC= Número celular

C= Cuadrados extremos de la cuadrícula en donde se contaron las células

7.4 Determinación de la concentración de extracto etanólico y acuoso de fresa para uso en la citotoxicidad y genotoxicidad

Con el extracto etanólico, se realizó una serie de diluciones para determinar la concentración que no causara citotoxicidad ni genotoxicidad en los tratamientos posteriores. Del extracto se tomaron 0.14 g que fueron agregados a 2.5 mL de agua desionizada; la mezcla se pasó por filtros Millipore de 45 μm y se prepararon tres diluciones con un volumen final de 1000 μL y factor de dilución 1:10. Los linfocitos aislados de sangre periférica, se sometieron a un tratamiento durante 4 horas a las siguientes concentraciones finales: 500 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, se realizaron pruebas de viabilidad y se llevó a cabo el ensayo cometa detallado más adelante. El método descrito antes se llevó a cabo también con el extracto acuoso de fresa.

Una vez seleccionada la concentración de extracto acuoso de fresa, se probó en presencia de B[a]P en pretratamiento de 12 minutos (modificado de Giampieri *et al.* 2014) y en cotratamiento, es decir, con extracto y B[a]P durante 4 horas.

7.5 Fracción enzimática S9

La mezcla se realizó al 4%, en la que por cada 5 mL se agregaron 1.975 mL de agua destilada estéril, 2.5 mL de amortiguador de fosfatos 0.2 M a pH 7.4, 0.4 mL de NADP 0.1 M, 0.05 mL de solución 1 M de glucosa-6-fosfato, 0.2 mL de solución de $\text{MgCl}_2\text{-KCl}$ y 0.4 mL de fracción enzimática S9 marca Moltox. Para cada

experimento se preparó la fracción enzimática unos minutos antes de dejar las células con su respectivo tratamiento.

7.6 Preparación del estándar de benzo[a]pireno y benzo[k]fluoranteno

Se pesaron 0.002 g de benzo[a]pireno. Con ayuda de una microjeringa y dentro de una campana de extracción, se le agregó 1 mL de diclorometano y se disolvió. De esta primera dilución, se tomaron alícuotas para preparar las diferentes concentraciones utilizadas el mismo día en que se realizó el experimento correspondiente.

En cinco viales transparentes y previamente etiquetados, se colocaron los volúmenes correspondientes para las concentraciones de benzo[a]pireno, 20, 40, 60 y 80 μM , que se redujeron con nitrógeno hasta que todo el diclorometano se evaporó y el estándar se hizo visible en un color verde neón. A cada concentración se le agregó el 10% de su volumen final de DMSO y se agitaron en Vórtex por 2 minutos o hasta que el compuesto estuvo disuelto. Cada preparación se llevó a su volumen final con agua estéril y se agitaron en Vórtex durante dos minutos. Se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que fueron utilizados.

De la misma manera se prepararon las concentraciones de 10, 21, 44, 87, 175 y 350 μM de benzo[k]fluoranteno. Se tomaron como referencia las concentraciones utilizadas por Rodríguez-Romero *et al.* (2012).

7.7 Tratamiento de linfocitos aislados con liofilizado de fresa y HAPs

En microtubos de 1.5 mL se colocaron medio RPMI 1640, 50 μL de cada una de las concentraciones de HAPs, 50 μL de la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto acuoso de fresa (para que en el volumen final se redujera a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 50 μL de fracción enzimática S9 al 4% y el volumen de suspensión celular que contuviera 250 000 células, obteniendo un volumen final de 500 μL . Los microtubos se mantuvieron en incubadora a 37 °C durante 4 horas; una vez transcurrido el tiempo

de tratamiento, se llevó a cabo el ensayo cometa. Para todos los experimentos se incluyeron un testigo positivo (80 μ M de B[a]P) y un testigo negativo (DMSO 1%, disolvente de los HAPs) para asegurarse que las condiciones utilizadas fueran las correctas y este último para realizar las comparaciones estadísticas.

7.8 Ensayo cometa

Una vez que las cuatro horas del tratamiento llegaron a su fin, los microtubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos, cuando correspondió observar viabilidad después del tratamiento, se retiraron 950 μ L del sobrenadante, se agregaron 1000 μ L de medio RPMI 1640 para lavar las células y se centrifugaron una vez más. Si el experimento no requirió de observar viabilidad, se procedió a preparar las laminillas.

Las preparaciones se hicieron en un portaobjetos previamente cubierto con agarosa de punto de fusión normal y un cubreobjetos (24 mm x 50 mm), mezclando 10 μ L del botón de la suspensión celular y 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión, se colocaron en una charola fría y una vez que la agarosa estuvo solidificada, se retiró el cubreobjetos para colocar otra capa de agarosa. Cuando solidificó, se retiraron los cubreobjetos y las laminillas se introdujeron en solución de lisis fría (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, Tritón X-100 1%, DMSO 10%) durante una noche.

En condiciones de penumbra, las preparaciones se acomodaron en una cámara de electroforesis horizontal con amortiguador frío a un pH>13 durante 20 minutos para que se llevara a cabo el desenrollamiento del ADN y otros 20 minutos en electroforesis a 25 Voltios y 300 mA, para que el DNA con carga negativa, migrara hacia el ánodo.

Se removieron las preparaciones de la cámara de electroforesis y para retirar el exceso de alcalí, se realizaron tres lavados con una duración de cinco minutos cada uno en un amortiguador neutro de Tris 4 M. Al finalizar, se fijaron en etanol frío al 100%. Para observarlas al microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Carl Zeiss)

con filtro de excitación de 515-560 nm y filtro de barrera de 590 nm, fueron teñidas en oscuridad con 50 μ L de bromuro de etidio (2 μ g/mL). De cada laminilla, se registraron aleatoriamente 100 células utilizando el programa computarizado de análisis de imágenes Comet Assay IV (Perceptive Instruments).

7.9 Análisis estadístico

Del programa Comet Assay IV se obtuvieron tres parámetros: la longitud de la cauda (LC) expresada en μ m, el ADN de la cauda (% ADN) dado en porcentaje y el momento de la cauda (MC) en unidades arbitrarias. Se utilizó el programa GraphPad Prism 6. Para cada parámetro se aplicó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, que resultó ≤ 0.05 , por lo que se realizó un análisis de varianzas de Kruskal-Wallis con una prueba *post-hoc* de Dunn para identificar diferencias significativas entre los tratamientos con HAP y el testigo. Adicionalmente se hicieron pruebas de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas entre los tratamientos de HAP y los de HAP con extracto acuoso de fresa. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de $P \leq 0.05$.

8 Resultados

8.1 Extracto etanólico y acuoso de fresa

En la tabla 1 se muestran los porcentajes de viabilidad de los linfocitos expuestos al extracto etanólico durante 4 horas, en donde se notó un comportamiento concentración-dependiente, ya que cuando la cantidad de extracto fue más alta, 500 μ g/mL la viabilidad fue de 14%, mientras que en 5 μ g/mL la viabilidad apenas alcanzó el 70%, por lo que dicho extracto resultó citotóxico. El grupo de linfocitos en pretratamiento con el extracto etanólico, tuvo una viabilidad similar al grupo testigo. El mismo comportamiento concentración-dependiente se observó en la viabilidad de los linfocitos expuestos al extracto acuoso, a diferencia de que éste no resultó ser citotóxico (Tabla 2).

Para el caso de la genotoxicidad con el extracto etanólico durante 4 h, se observó un comportamiento dependiente de la concentración para los tres parámetros. Mientras mayor fue la concentración de extracto, más elevado fue el daño genotóxico observado, siendo 50 y 500 $\mu\text{g/mL}$ los grupos con diferencias significativas respecto del testigo, es decir, los grupos donde hubo más daño al material genético. Los linfocitos aislados expuestos al pretratamiento de 15 minutos con el extracto, no resultaron con daño genotóxico (Fig. 2).

De igual manera, en la caso de la genotoxicidad, el comportamiento del extracto acuoso solo fue dependiente de la concentración en la longitud de la cauda, mientras que el porcentaje de ADN y el momento de la cauda para los valores de 50 y 5 $\mu\text{g/mL}$ permanecieron bastante similares (Fig. 3), por lo que el único grupo que presentó diferencias significativas respecto al testigo, fue 500 $\mu\text{g/mL}$ en todos los parámetros medidos.

Tabla 1. Viabilidad de linfocitos con extracto etanólico de fresa

Concentración de extracto etanólico de fresa ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidad (%)
Testigo	96
5	70
50	59
500	14
500 en pretratamiento de 15 min	96

Tabla 2. Viabilidad de linfocitos con extracto acuoso de fresa

Concentración de extracto acuoso de fresa ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidad (%)
Testigo	96
5	96
50	78
500	68
50 en pretratamiento de 12min	93
500 en pretratamiento de 12 min	95

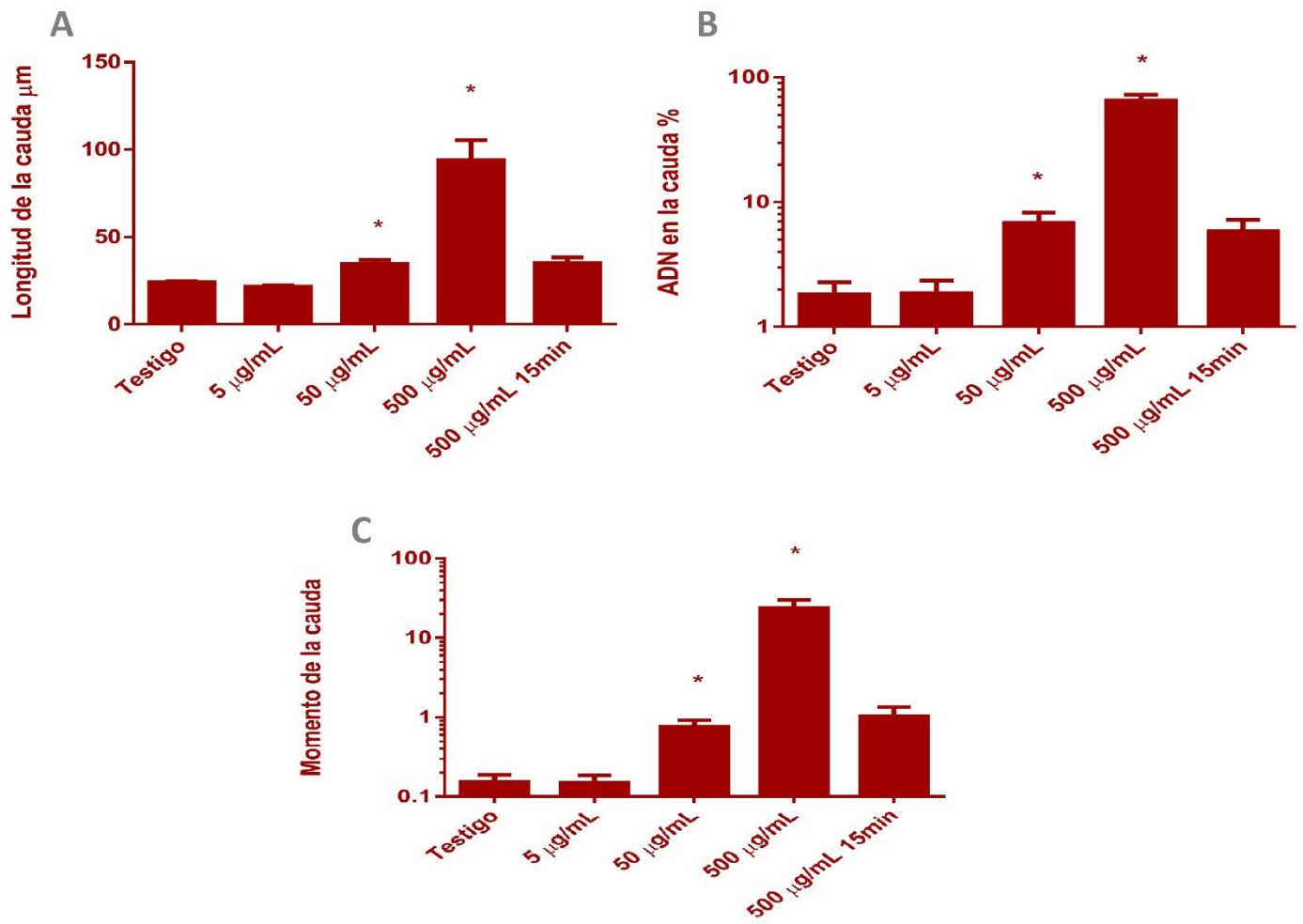


Figura 2. Evaluación de la genotoxicidad del extracto etanólico de fresa. Los linfocitos fueron expuestos a dicho extracto durante 4 h: (A) Longitud de la cauda, (B) ADN en la cauda, (C) Momento de la cauda. *indica diferencias significativas con grupo testigo, en prueba de Kruskal-Wallis y post-hoc Dunn $P \leq 0.05$.

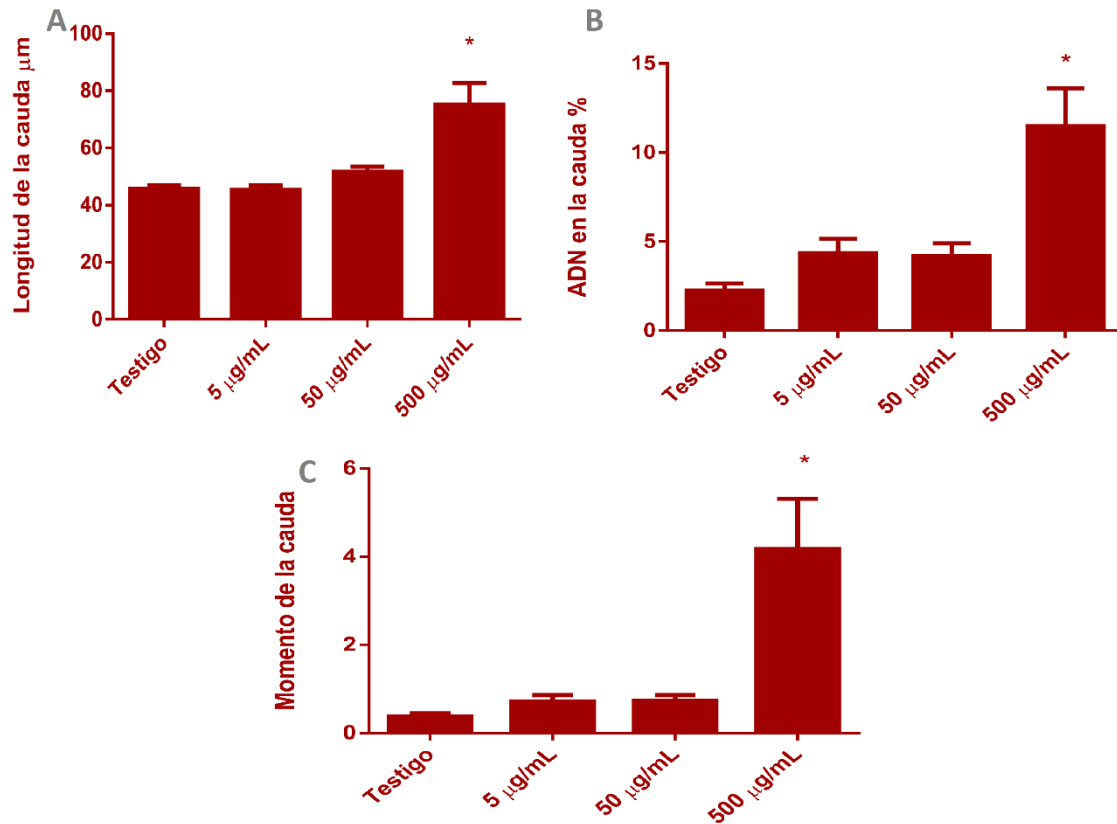


Figura 3. Evaluación de la genotoxicidad del extracto acuoso de fresa. Los linfocitos fueron expuestos a dicho extracto durante 4 h: (A) Longitud de la cauda, (B) ADN en la cauda, (C) Momento de la cauda. *indica diferencias significativas con grupo testigo, en prueba de Kruskal-Wallis y post-hoc Dunn $P \leq 0.05$.

Gracias a los resultados obtenidos con ambos extractos, para las pruebas siguientes se utilizó únicamente el extracto acuoso porque resultó no ser citotóxico y se obtuvieron mejores resultados en los ensayos de genotoxicidad. La viabilidad en pretratamiento de 12 minutos con el extracto acuoso fue similar al testigo (Tabla 2). En el caso de la genotoxicidad, se obtuvo que tanto la concentración de 50 µg/mL como la de 500 µg/mL son diferentes significativamente del grupo testigo en los tres parámetros utilizados, es decir, que resultaron genotóxicas (Fig.4), lo que contrasta con las altas viabilidades obtenidas.

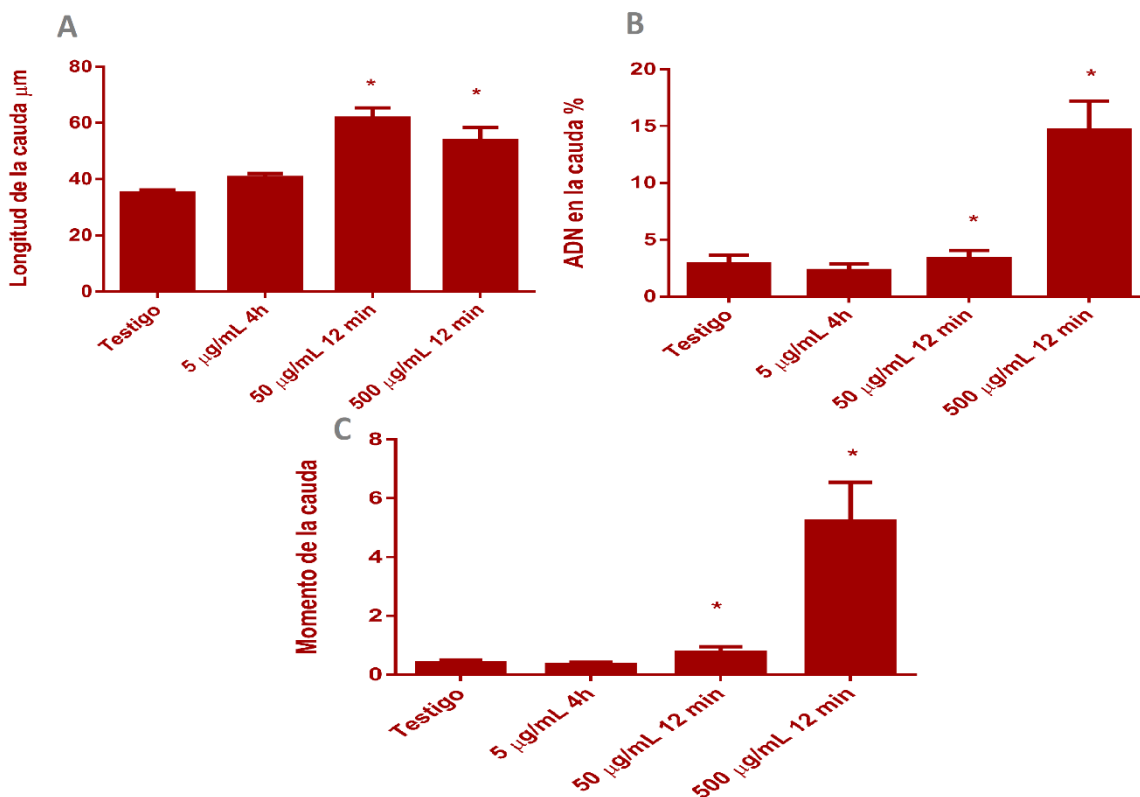


Figura 4. Evaluación de la genotoxicidad del extracto acuoso de fresa. Los linfocitos fueron expuestos a dicho extracto durante 4 h o a un pretratamiento con el extracto por 12 min: (A) Longitud de la cauda, (B) ADN en la cauda, (C) Momento de la cauda. *indica diferencias significativas con grupo testigo, en prueba de Kruskal-Wallis y post-hoc Dunn $P \leq 0.05$.

8.2 Genotoxicidad inducida con B[a]P con y sin extracto de fresa

Se probó la capacidad antigenotóxica del extracto acuoso de fresa en presencia de B[a]P a las concentraciones 20, 40, 60 y 80 μM , con 5 $\mu\text{g/mL}$ de extracto, además las mismas concentraciones se utilizaron sin extracto, todas durante 4 h. Para el caso de la viabilidad de cada uno de los tratamientos de B[a]P, se observó que cuando menor es la concentración de HAP, es mayor el porcentaje de viabilidad, con 20 μM se mostró una viabilidad de 94%, mientras que con 80 μM disminuyó a 85% (Tabla 4), por lo que ninguna de las concentraciones resultó ser citotóxica.

Se observó que en el caso de la longitud de la cauda, en todas las concentraciones hubo diferencias significativas cuando se comparó con el grupo testigo.

Adicionalmente, también hubo diferencias significativas cuando se compararon de manera pareada cada tratamiento con y sin extracto (Fig.5 A). Por otro lado, tanto el % ADN, como el momento de la cauda, presentan diferencias significativas entre sus respectivos grupos testigo, con y sin extracto. A diferencia de la LC, en estos dos parámetros, solo hubo diferencias entre los grupos con y sin extracto cuando las concentraciones de B[a]P fueron 20, 40 y 80 μ M (Fig.5 B y C).

Con la finalidad de identificar la magnitud de las diferencias entre cada grupo en presencia y ausencia del extracto de fresa, se calcularon los porcentajes de disminución de daño genotóxico para cada uno de los parámetros medidos y se muestran en la tabla 5. En el caso de la LC hubo una reducción del 14.09% al 21.20%. Para el % ADN, la disminución de daño va de 32.63% a 46.55%, mientras que para el MC el intervalo es de 42.72% a 60.46%. Conforme incrementó la concentración de B[a]P, todos los porcentajes aumentaron, a excepción de 60 μ M, que son 10.12%, 12.73% y 26.78%, respectivamente, que además, como se mencionó con anterioridad, resultaron no tener diferencias significativas entre el grupo con y sin extracto. De la misma manera, los porcentajes de viabilidad no se muestran diferentes en las cuatro concentraciones cuando los linfocitos estuvieron en tratamiento con el extracto y B[a]P.

Tabla 4. Viabilidad de linfocitos humanos expuestos a B[a]P y a B[a]P+ extracto de fresa

Concentración de B[a]P (μ M)	Viabilidad (%)	Concentración de B[a]P (μ M) + 5 μ g/mL de extracto	Viabilidad (%)
Testigo	95	Testigo	97
20	94	20	96
40	90	40	97
60	91	60	95
80	85	80	95

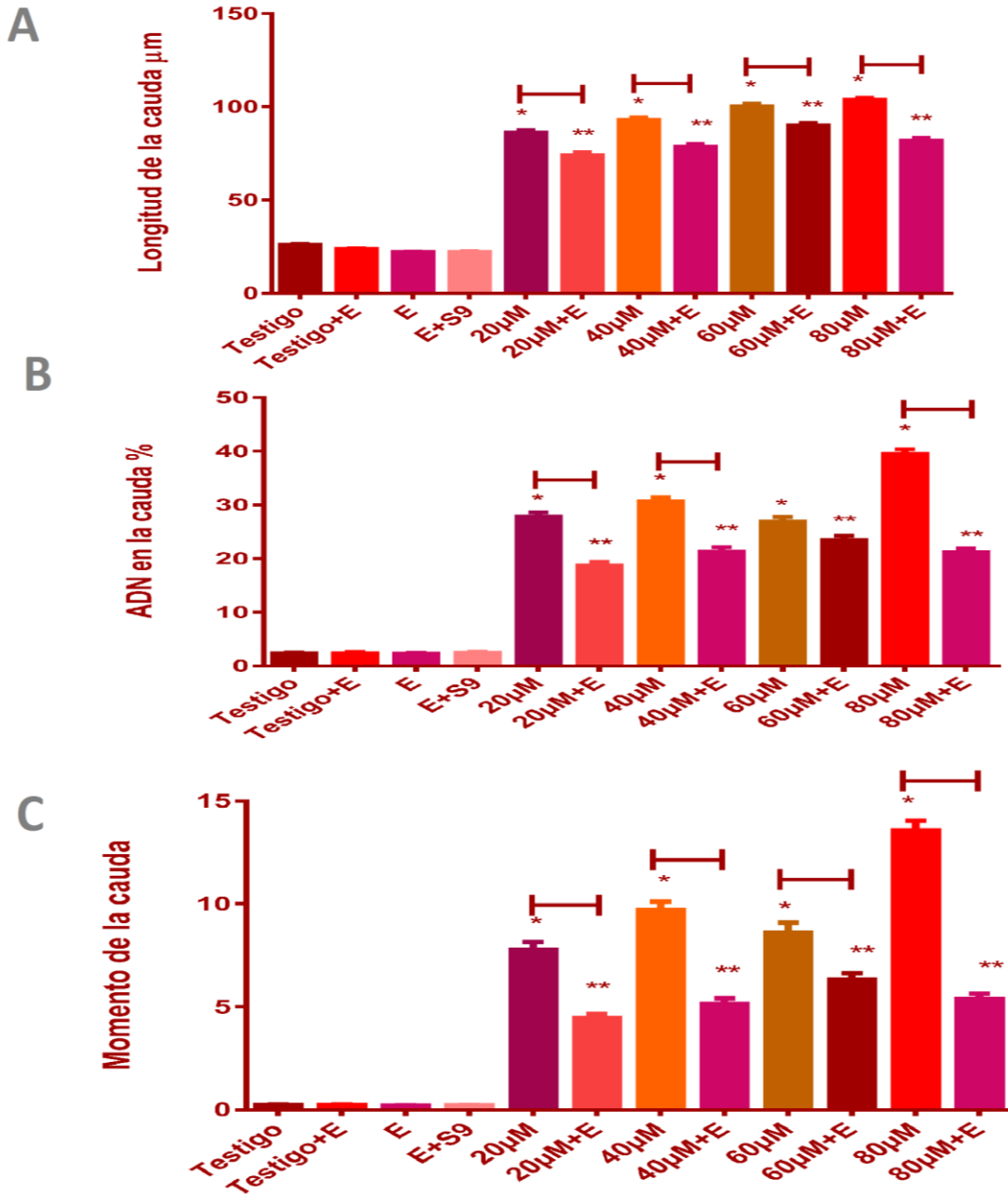


Figura 5. Evaluación de la genotoxicidad de B[a]P y antigenotoxicidad del extracto acuoso de fresa en presencia de B[a]P. Los linfocitos se expusieron a B[a]P para evaluar su genotoxicidad durante 4 h. Asimismo se expusieron a B[a]P con extracto durante el mismo tiempo; (A) Longitud de la cauda, (B) ADN en la cauda, (C) Momento de la cauda. *indica diferencias significativas con grupo testigo, ** indica diferencias significativas con grupo testigo+E en prueba de Kruskal-Wallis y post-hoc Dunn $P \leq 0.05$. La barra indica si hubo diferencias entre las mismas concentraciones con y sin extracto en prueba de Mann-Whitney $P \leq 0.05$.

Tabla 5. Antigenotoxicidad de extracto acuoso de fresa en linfocitos humanos expuestos a B[a]P

Concentración (μM) B[a]P+ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	% de disminución de daño en longitud de la cauda	% de disminución de daño en el porcentaje de ADN en cauda	% de disminución de daño en el momento de la cauda
20	14.09	32.63	42.72
40	15.38	30.45	46.88
60	10.16	12.73	26.78
80	21.20	46.55	60.46

Con base en los resultados obtenidos de genotoxicidad y antigenotoxicidad del extracto de fresa en linfocitos humanos expuestos a B[a]P, se seleccionó la concentración de 80 μM , para utilizarlo como testigo positivo en los experimentos con B[k]F. Además, se llevó a cabo otra ronda de experimentos para establecer si el extracto se agregaría en pretratamiento de 12 minutos o al mismo tiempo que el HAP. En ambos casos, los tres parámetros utilizados, LC, % ADN y MC, resultaron ser significativamente distintos a su respectivo grupo testigo (Fig. 6).

Se calcularon los porcentajes de disminución de daño genotóxico para cada uno de los parámetros. Los datos se presentan en la tabla 6. Para la concentración de 80 μM B[a]P + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en pretratamiento de 12 min, solo disminuyó el % ADN en la cauda en un 3.95%, para la longitud y el momento de la cauda, el daño genotóxico aumentó. En cambio con la concentración de 80 μM B[a]P + 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 4 horas, la disminución fue 7.77%, 38.62% y 46.95%, respectivamente.

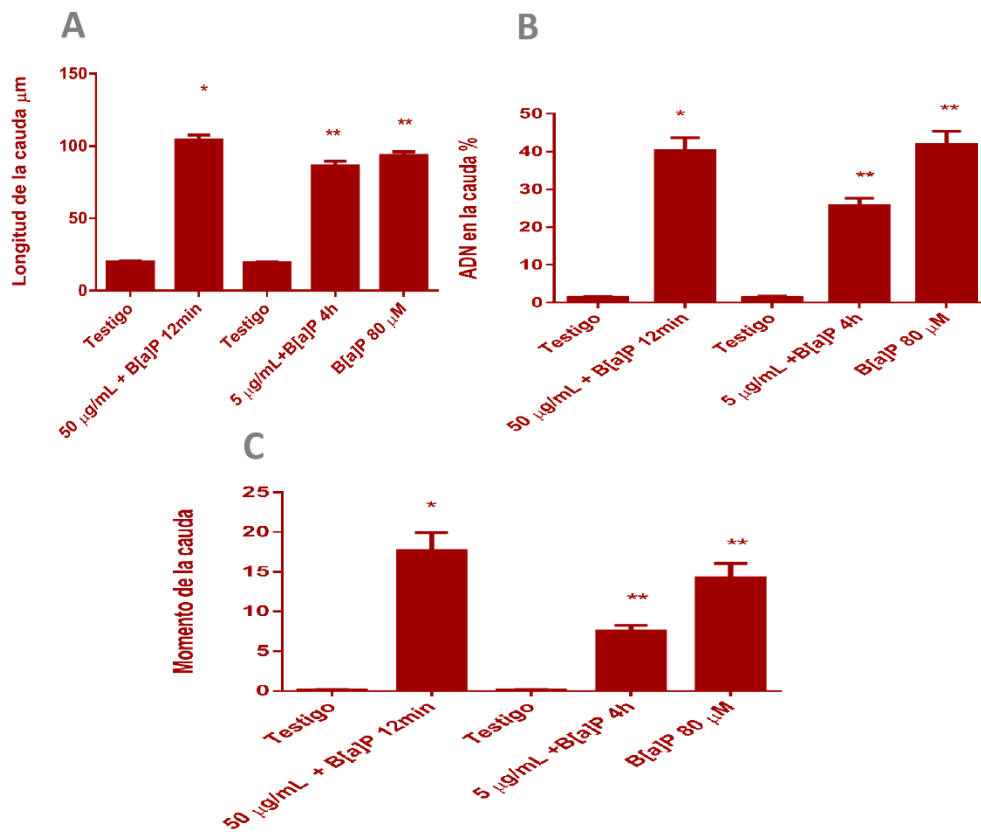


Figura 6. Evaluación de la genotoxicidad de B[a]P en presencia de extracto acuoso de fresa. Los linfocitos fueron expuestos a un pretratamiento de 12 min con 50 µg/ mL extracto de fresa y posteriormente durante 4 h a B[a]P, o a 5 µg/ mL de extracto con B[a]P por 4 h; A) Longitud de la cauda, (B) ADN en la cauda, (C) Momento de la cauda. * indica diferencias significativas con grupo testigo en pretratamiento de 12 min, ** indica diferencias significativas con grupo testigo por 4 h., en prueba de Kruskal-Wallis y post-hoc Dunn $P \leq 0.05$.

Tabla 6. Antigenotoxicidad de extracto de fresa en pretratamiento de 12 min y tratamiento de 4 horas en linfocitos humanos expuestos a 80 µM de B[a]P

80 µM B[a]P + liofilizado	% de disminución de daño en longitud de la cauda µm	% de disminución de daño en el porcentaje de ADN en cauda	% de disminución de daño en el momento de la cauda
50 µg/mL 12 min	+11.35	3.95	+24.24
5 µg/mL 4h	7.77	38.62	46.95

Los signos positivos antes del porcentaje, indican que hubo un aumento del daño genotóxico.

8.3 Genotoxicidad inducida con B[k]F con y sin extracto de fresa

Por los resultados obtenidos con B[a]P y el extracto, se decidió utilizar la concentración de 5 µg/mL durante 4 horas, debido a que fue más visible la disminución del daño genotóxico en los linfocitos.

Para los ensayos con B[k]F se usaron concentraciones de 10, 21, 44, 87, 175 y 350 µM. Tanto en la viabilidad de todos los tratamientos como en los parámetros medidos con el ensayo cometa, no se observó una clara relación entre el aumento de la concentración y la disminución del porcentaje de viabilidad, pues a pesar de que las concentraciones más altas de B[k]F, tienen los valores más pequeños, en las concentraciones menores, no es visible un patrón. El mismo comportamiento se observó en las viabilidades de los linfocitos cuando se expusieron a B[k]F y al extracto de fresa al mismo tiempo (Tabla 7).

En el caso de la genotoxicidad, todos los parámetros mostraron una respuesta más baja respecto del B[a]P. A pesar de que las concentraciones fueron ascendiendo al doble, no se observó una clara respuesta en función de la concentración, más bien se mantuvo constante o con muy pocas diferencias. Para la LC todos los grupos presentaron diferencias significativas cuando se compararon con el grupo testigo o con el testigo con extracto, según sea el caso. En 10, 44, 87 y 175 µM se evidenciaron diferencias significativas cuando se compararon los grupos con y sin extracto, revelando disminución de daño en presencia del mismo. En 21 µM se observó un aumento en la LC cuando se agregó el extracto de fresa y para 350 µM no hubo diferencias significativas (Fig. 7A).

En el caso del % ADN en la cauda y el momento de la misma, todos los grupos presentaron diferencias significativas cuando se compararon con su respectivo grupo testigo o testigo+ extracto. En 10, 44, 87, 175 y 350 µM se presentaron diferencias significativas cuando se compararon los grupos con la misma concentración en presencia y ausencia de liofilizado, mostrando también disminución del daño genotóxico para ambos parámetros, a excepción de 10 µM, donde aumentó el MC en presencia del extracto. En 21 µM no se encontró diferencia

significativa en presencia del extracto. En 21 μM no se manifestó diferencia significativa cuando se compararon los grupos con y sin liofilizado (Fig. 7 B y C).

En cuanto a los porcentajes de disminución de daño, coinciden con las figuras anteriores, en las cuales se puede observar que la LC aumentó para las concentraciones de 21 y 350 μM , en cambio para las demás, disminuyó de manera variada, dado que no se observa un patrón dependiente del aumento de la concentración de B[k]F. En los porcentajes de disminución del ADN en la cauda, en 87 μM se obtuvo mayor reducción (63%) y en 21 μM menor descenso de daño (9.16%). En el MC se muestra un aumento del 30.01% y del 11.01% para las concentraciones de 10 y 21 μM , respectivamente y de nuevo en 87 μM disminuyó en 76.10% siendo el grupo donde hubo mayor reducción del momento de la cauda (Tabla 8).

Tabla 7. Viabilidad de linfocitos humanos expuestos a B[k]F y B[k]F+ extracto de fresa

Concentración de B[k]F, (μM)	Viabilidad (%)	Concentración de B[k]F, (μM) +5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de fresa	Viabilidad (%)
Testigo	97	Testigo	97
10	90	10	91
21	94	21	95
44	95	44	96
87	93	87	95
175	86	175	93
350	84	350	92
B[a]P	85	B[a]P	94

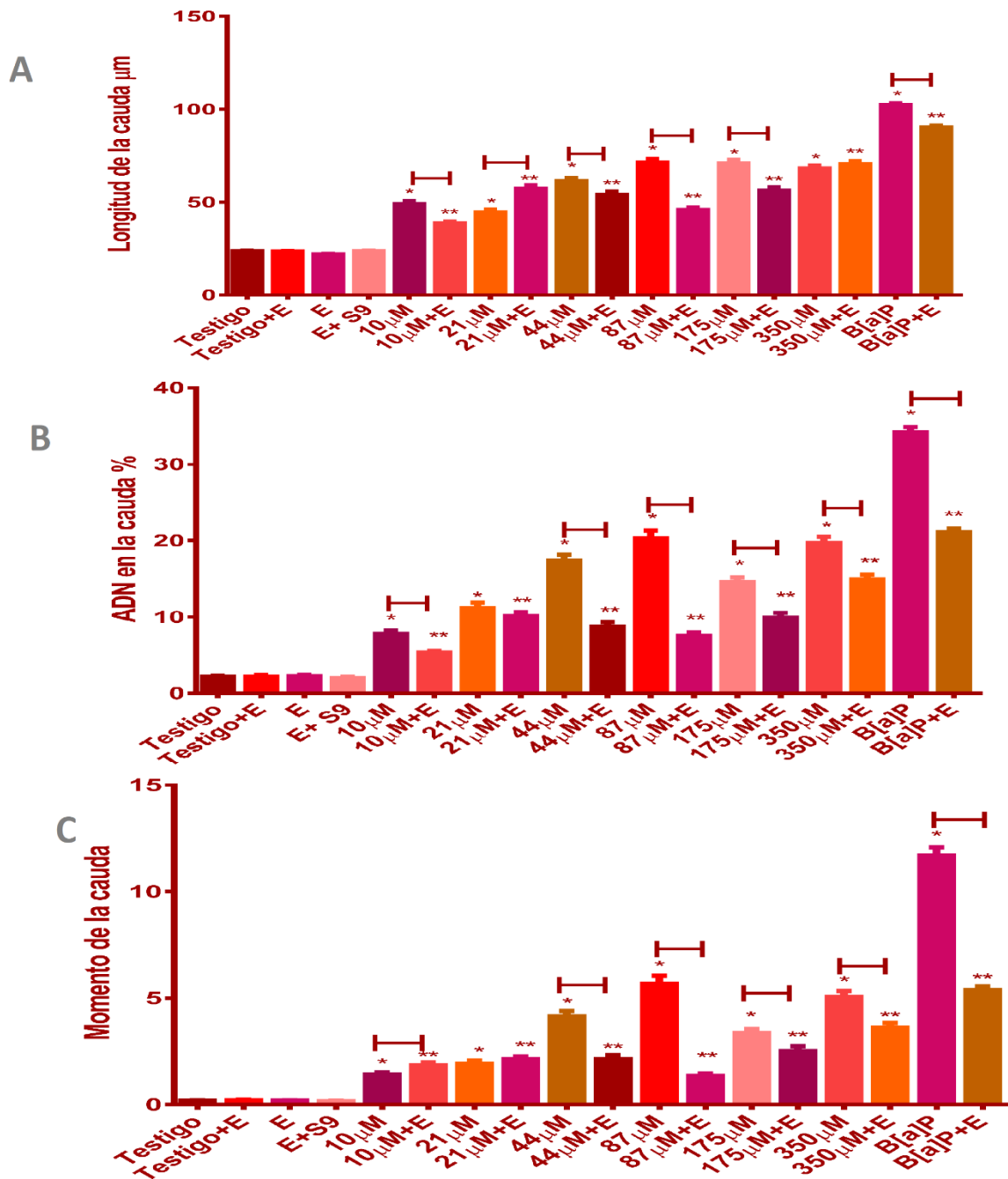


Figura 7. Evaluación de la genotoxicidad de B[k]F y antigenotoxicidad del extracto acuoso de fresa en presencia de B[k]F. Los linfocitos se expusieron a B[k]F y el extracto durante 4 h: (A) Longitud de la cauda, (B) ADN en la cauda, (C) Momento de la cauda. *indica diferencias significativas con grupo testigo, ** indica diferencias significativas con grupo testigo+E en prueba de Kruskal-Wallis y post-hoc Dunn $P \leq 0.05$. La barra indica si hubo diferencias entre las mismas concentraciones con y sin extracto en prueba de Mann-Whitney $P \leq 0.05$.

Tabla 8. Antigenotoxicidad de extracto acuoso de fresa en linfocitos humanos expuestos a B[k]F

Concentración (µM) B[k]F+ 0.000005 g/mL	% de disminución de daño en longitud de la cauda µm	% de disminución de daño en el porcentaje de ADN en cauda	% de disminución de daño en el momento de la cauda
10	21.48	32.20	+30.01
21	+28.88	9.16	+11.01
44	11.92	49.45	48.49
87	35.79	63.02	76.10
175	20.88	31.67	25.45
350	+3.32	24.29	28.62
B[a]P	10.31	35.1	49.29

Los

Signos positivos antes del porcentaje, indican que hubo un aumento del daño genotóxico.

9 Discusión

9.1 Extracto acuoso de fresa

Se han realizado múltiples estudios con diversos extractos de fresa, para probar *in vitro* e *in vivo* las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticarcinogénicas que se les han atribuido, además de que dichos extractos se han caracterizado para identificar cuales fitoquímicos son los que pueden estar presentando dichas propiedades. Sin embargo, ha sido menor la atención que han tenido estos compuestos en cuanto a sus propiedades antigenotóxicas.

En este trabajo se contemplaron un extracto etanólico y uno acuoso de fresa porque en estudios previos se mencionan las propiedades benéficas de algunos metabolitos presentes en extractos polares de dicha especie. De acuerdo con Mojzer *et al.* (2016), el extracto de etanol obtenido de *Fragaria x ananassa* presenta un gran contenido de compuestos fenólicos, destacando las antocianinas. Fitoquímicos similares se han encontrado en jugos y liofilizados de fresa (Miller *et al.* 2019). Si bien no se caracterizaron los compuestos del extracto de fresa, es posible afirmar que los componentes en los extractos se mantienen debido a las técnicas de extracción utilizadas como maceración y liofilización (Ramírez-Nava 2006, Mojzer *et al.* 2016).

Históricamente, como parámetro universal en el ensayo cometa, para cuantificar la genotoxicidad se utilizó el momento de la cauda, que se refiere al producto entre la cantidad de ADN en la cauda y la longitud de la misma, pero recientemente se estableció que los parámetros más adecuados son la longitud y el ADN de la cauda, que indican el tamaño desde el centro de la cabeza hasta la punta final, medido en μm y el porcentaje de ADN en la cauda, respectivamente (Koppen *et al* 2017; Afanasieva y Sivolob 2018). En este trabajo, se utilizaron los tres parámetros.

Se probó el efecto de diferentes concentraciones tanto del extracto etanólico como del extracto acuoso de fresa y dos modalidades para agregarlo: en pretratamiento o en contacto durante 4 horas con los linfocitos. Tomando como base el trabajo de Giampieri *et al.* (2014), en el que encontraron que 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto metanólico de fresa fue protector de fibroblastos humanos contra radiación UV y aumentó la viabilidad cuando se agregó en pretratamiento durante 15 minutos, se probó la misma concentración y dos diluciones de ésta para identificar la genotoxicidad y la citotoxicidad de los extractos.

Debido a que el extracto etanólico resultó ser tanto citotóxico como genotóxico, se optó por utilizar en las pruebas posteriores únicamente el extracto acuoso. La concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto acuoso en el modelo biológico aquí utilizado, resultó ser tanto citotóxica como genotóxica cuando los linfocitos fueron expuestos a dicho extracto durante 4 h. A esta misma concentración en un pretratamiento de 12 minutos, también resultó ser genotóxico pero no citotóxico, lo que corresponde con lo descrito por Giampieri *et al.* (2014).

Las dos concentraciones restantes, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 4 h, no resultaron ser citotóxicas ni genotóxicas, pero 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en pretratamiento de 12 minutos resultó genotóxica. De esta manera se reafirmó que la viabilidad celular depende tanto de la concentración del extracto de fresa, como del tiempo de exposición, como lo describió Giampieri *et al.* (2014).

Gracias al método de obtención del extracto acuoso, es posible mantener todo el contenido de la fresa, como vitaminas C, A, E, K, folato; minerales, entre los que se

encuentran calcio, fósforo, magnesio, zinc, etc. Además de los polifenoles (Giampieri *et al.*2014).

De manera natural, en el organismo se producen radicales libres y especies reactivas de oxígeno, resultado del metabolismo de oxígeno o se pueden formar por inducción de estímulos externos y son capaces de causar daño en proteínas, lípidos y el ADN. De la misma forma, se poseen mecanismos antioxidantes como las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y otros compuestos como glutatión o ácido ascórbico, que cumplen con la función de estabilizar a los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno. Cuando existe un desequilibrio entre la generación de radicales y los mecanismos antioxidantes, hay estrés oxidante (Nijveldt *et al.*2001, Wang *et al.* 2005, Konigsberg 2008).

Los polifenoles como los que se han reportados en extractos acuosos de fresa, tienen una gran actividad antioxidante, entre los mecanismos más conocidos por los que actúan, es por el barrido de radicales libres como anión superóxido o peroxinitratos, por regulación de enzimas mediadoras de estrés oxidante o por quelación de metales de transición involucrados en la formación de radicales (Nijveldt *et al.* 2001, Mojzer *et al.* 2016).

9.2 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Por otro lado, los hidrocarburos aromáticos policíclicos son promutágenos, por lo que requieren de ser metabolizados para producir daño genotóxico (Spink *et al.* 2008, World Health Organization 2010). El modelo biológico utilizado en este trabajo son linfocitos aislados de sangre periférica de seres humanos. Los linfocitos humanos son un tipo celular presente en la sangre, de los que a su vez, hay más divisiones con diferentes tareas pero todos dedicados a la respuesta inmune del organismo, a pesar de que se observa metabolismo en estas células, solo es significativo cuando son aislados y se les agrega una lectina mitogénica, como la fitohematoglutinina (Liamin *et al.* 2017).

Debido a que para este trabajo únicamente se aislaron pero no se estimularon para que entraran en división celular, el metabolismo de los linfocitos no es suficiente al estar en contacto con los HAPs por lo que se necesitó agregar una fracción enzimática S9 de hígado de rata, la cual contiene las enzimas y cofactores necesarios para poder llevar a cabo el metabolismo de xenobióticos. De esta manera, la fracción S9 activó a los HAPs.

Cuando los linfocitos fueron expuestos a las cuatro concentraciones de B[a]P se evidenció una respuesta dependiente de la concentración, pues la LC, el % de ADN y el MC aumentaron según se incrementó la concentración, a excepción de 60 μM , que mantuvo una respuesta baja en todos los parámetros. El alto daño causado al material genético coincide con lo reportado para B[a]P sobre su potencial como mutagénico y carcinogénico (Tarantini *et al.* 2009, Shah *et al.* 2016).

Es posible contrastar el caso de la viabilidad, puesto que para todas las concentraciones fue alta, incluso para 80 μM se mantuvo en 80% de células vivas, lo que corresponde con lo descrito por Liamin *et al.* (2017) en cuyo trabajo se indujo genotoxicidad con B[a]P y a pesar de la presencia de aductos, especies reactivas de oxígeno y un incremento en el % del ADN de la cauda, no encontró incremento de apoptosis, medida por la actividad de caspasas, lo que sugiere que el daño producido puede ser reparado pero llevando consigo mutaciones genéticas. En este caso, se pudo observar dicho comportamiento por el alto porcentaje de viabilidad pero los altos niveles de genotoxicidad.

El B[a]P es el hidrocarburo más estudiado y es bien conocido su metabolismo, que también es su forma de dañar el material genético de diversas células. Los metabolitos más mutagénicos y carcinogénicos son las formas epóxido: 2,3-, 4,5-, 7,8- y 9,10- epóxidos y 7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido. Éste último es el que se ha reportado que forma aductos de ADN en posición N 2 de la guanina debido a la presencia de un anillo epóxido en posición C-10 o región bahía. Además de que las o-quinonas causan mutaciones al producir especies reactivas de oxígeno, y que pueden inducir estrés oxidante en el ADN (Shen *et al.* 2006, Verna *et al.* 2012).

Los aductos originados por hidrodíol-epóxidos se unen de manera covalente a grupos amino exocíclicos de purinas del ADN para formar aductos estables, mayoritariamente se unen a las guaninas, porque poseen cinco sitios nucleofílicos y menos frecuentemente a adenina y citosina. Algunos de los aductos son removidos por los mecanismos de reparación, pero si se conservan pueden inducir mutaciones (Ewa y Danuta 2017).

Las formas epóxido son un radical constituido por un átomo de oxígeno unido de manera covalente a dos átomos de carbono y que es altamente reactivo. Puede causar peroxidación de lípidos de la membrana celular, dañando su fluidez y permeabilidad, además de generar aldehídos que reaccionen con otras proteínas o ácidos nucleicos o se unen de manera covalente al ADN o ARN, conduciendo a diversas mutaciones (Jaramillo-Juárez 2016). Es importante hacer mención de que en este trabajo, debido a la técnica utilizada, no es posible saber qué metabolitos del B[a]P son los que están causando daño al material genético, únicamente fue posible ver el resultado de exponer los linfocitos a dicho hidrocarburo.

Por otro lado, el B[k]F no presentó una respuesta dependiente de la concentración, pues hay muchas variaciones entre cada uno de los parámetros, además la respuesta genotóxica fue mucho más baja que la que presentó B[a]P. La baja potencia genotóxica que induce B[k]F en linfocitos humanos, también fue descrita en células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano A549 y de hepatocarcinoma HepG2, en donde se han encontrado bajos niveles de formación de aductos de ADN (Tarantini et al. 2010, Libalová *et al.* 2014)

Para este HAP y correspondiendo con la baja genotoxicidad que produce, la viabilidad celular también fue alta, es decir, que el daño genético producido por el B[k]F, no indujo citotoxicidad, evidenciado por la cantidad de células que fueron capaces de sobrevivir. Semejando el comportamiento del B[a]P, sugiriendo que el daño genotóxico producido no es suficiente para inducir algún tipo de muerte celular, acarreado consigo posibles mutaciones.

A pesar de que ambos HAPs mostraron respuestas diferentes, los dos dañaron en diferentes magnitudes el ADN de los linfocitos, evidenciado gracias a los parámetros

de genotoxicidad con el ensayo cometa. Es importante recalcar que a pesar del daño genotóxico, tanto B[a]P como B[k]F mantuvieron altos porcentajes de viabilidad de los linfocitos, lo que indica que el daño puede ser reparado pero llevando mutaciones en el material genético, que es peligroso porque si esas células con mutaciones se dividen, llevan los errores a las nuevas células.

9.3 Extractos en presencia de HAP

El extracto acuoso de fresa resultó ser antígenotóxico, pues disminuyó el daño al ADN inducido con las diferentes concentraciones de B[a]P, 80 μ M fue la concentración en donde más se evidenció dicho efecto, pues disminuyó 21.20% la LC, 46.55% el % ADN y 60.46% el MC, lo cual solo ha sido probado por Edenharder *et al.* (2003) donde utilizaron concentrados de fresa que disminuyeron en 31% la formación de micronúcleos de médula espinal de ratones inducidos con B[a]P.

No han sido muy numerosos los estudios realizados con extractos de fresa en presencia de HAPs para probar la antígenotoxicidad, en cambio, se han llevado a cabo para evidenciar otras propiedades de la fruta. Xue *et al.* (2001) probaron extractos metanólicos de fresa en compañía de ácido elágico y B[a]P en un modelo de transformación celular de embriones de criceto sirio, y disminuyeron la transformación celular, evidenciando así que los compuestos fenólicos contenidos en la fracción polar y el ácido elágico fueron cruciales para evitar la transformación.

La actividad antígenotóxica del extracto acuoso de fresa puede ser atribuida a la acción de los polifenoles, pues se sabe que son importantes “barredores” de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, que en este caso, fueron producidas durante el metabolismo de B[a]P. Ha sido reportado que los polifenoles previenen la generación de ERO, disminuyen la formación de superóxido mitocondrial así como la expresión de genes relacionados al estrés oxidante en ensayo carcinógeno celular Bhas42, una línea celular de fibroblastos de ratón, expuesta a un tratamiento de B[a]P (Omidian *et al.* 2017).

Asimismo, es importante el papel que juegan los polifenoles durante el metabolismo de B[a]P. Como se expuso anteriormente, el mecanismo por el cual los HAPs son activados, incluyen al receptor AhR para traslocar el xenobiótico al núcleo y pueda interactuar con CYP1. Se ha documentado que los polifenoles pueden funcionar como ligandos para AhR, compitiendo con el HAP por el receptor; bloqueando la translocación nuclear del complejo constituido por AhR y B[a]P e inhibiendo la formación del heterodímero AhR-Arnt, lo que impide que se inicien las reacciones de la fase 1 del metabolismo (Fakuda *et al.* 2007, Xue *et al.* 2017).

Este trabajo es pionero en utilizar un extracto acuoso de fresa en presencia de B[k]F como genotóxico, pues no se había estudiado el efecto de extractos de fresa o polifenoles de manera individual con este HAP. Los resultados aquí mostrados a pesar de presentar bajos niveles de daño genotóxico en los tres parámetros medidos, indican una disminución de daño en casi todos, a excepción de la longitud de la cauda para 21 y 350 μM , en los cuales el daño aumentó 28.88 y 3.32%, respectivamente. De igual forma el MC aumentó 30 y 11% en 10 y 21 μM , respectivamente.

De la misma forma que para el B[a]P, la actividad antígenotóxica observada del extracto acuoso cuando se utilizó con B[k]F, puede ser en gran parte a la acción de los polifenoles, tanto por sus propiedades antioxidantes, como por su afinidad con AhR, bloqueando la cascada de señalización, para continuar las reacciones metabólicas necesarias y producir metabolitos potencialmente más tóxicos, como ha sido sugerido por Fakuda *et al.* (2007) y Xue *et al.* (2017).

El uso del ensayo cometa como técnica para evaluar el efecto genotóxico, permite cuantificar el daño asociado a rompimientos de cadena doble, sitios álcali-lábiles, rompimientos de cadena sencilla y rompimientos asociados a sitios de escisión incompleta, en este caso como resultado de la interacción de los metabolitos producidos durante el metabolismo de los HAPs y/o con las especies reactivas de oxígeno, que pueden conducir a la formación de aductos. De la misma forma, se observa la actividad antígenotóxica del extracto de fresa gracias a la disminución en los parámetros cuantificados que evidencian los puntos anteriores.

Con los datos aquí obtenidos, solo se cuantificó el daño producido al material genético de los linfocitos con ambos HAPs, así como el efecto del extracto de fresa; no es posible atribuirle a un mecanismo el daño observado ni especificar un mecanismo de acción de los polifenoles durante el metabolismo de los hidrocarburos probados, porque el objetivo únicamente era observar el efecto antigenotóxico del extracto.

Durante las últimas dos décadas, muchos estudios han sido encaminados al descubrimiento de los efectos y los mecanismos de acción del B[a]P en diferentes modelos biológicos, no así con todos los HAPs, por lo que se requiere hacer más estudios con el B[k]F.

Asimismo, se reitera la importancia de probar fitoquímicos en compañía de diversos contaminantes, que puedan servir de parteaguas para después llevarlos a otros modelos biológicos y finalmente probar los efectos positivos que tendrían como parte de la dieta de los seres humanos para mejorar la salud en términos generales, pero que también sirvan de protección contra diferentes sustancias a las que se está expuesto de manera constante.

10 Conclusiones

- El benzo[a]pireno indujo daño genotóxico en linfocitos humanos de forma dependiente de la concentración en los tres parámetros utilizados: LC, % de ADN y MC.
- El benzo[k]flouranteno indujo menor daño que el producido por B[a]P, además no resultó comportarse de manera dependiente de la concentración, pues se observó mucha variación.
- El extracto de fresa, abundante en compuestos fenólicos, vitaminas y minerales, resultó ser antigenotóxico cuando se utilizó con B[a]P y B[k]F como agentes genotóxicos en linfocitos humanos.

- Este trabajo es pionero en utilizar extracto acuoso de fresa en presencia de B[k]F.
- Debido a que en el presente estudio quedó demostrada la antigenotoxicidad de las fresas y por todas las propiedades benéficas de la salud que se le atribuyen, se recomienda ampliamente el consumo de esta fruta.

11 Referencias

Aaby K., Ekeberg D., Skrede G. 2007. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4395-4406.

Afanasieva K., Sivolob A. 2018. Physical principles and new applications of comet assay. *Biophysical Chemistry* 238, 1-7.

Amador-Muñoz O., Villalobos-Pietrini R., Agapito-Nadales M.C., Munive-Colín Z., Hernández-Mena L., Sánchez-Sandoval M., Gómez-Arroyo S., Bravo-Cabrera J.L., Guzmán-Rincón J. 2009. Solvent extracted organic matter and polycyclic aromatic hydrocarbons distributed in size-segregated airborne particles in a zone of Mexico City: seasonal behavior and human exposure. *Atmospheric Environment* 44, 122-130.

Angulo-Carmona R. 2009. Fresa *Fragaria ananassa*. Bayer CropScience S.A. Colombia, 44p.

Ariza M.T., Forbes-Hernández T.Y., Reboredo-Rodríguez P., Afrín S., Gasparrianni M., Cervantes L., Soria C., Martínez-Ferri E., Battino M., Giampieri F. 2018. Strawberry and achenes hydroalcoholic extracts and their digested fractions efficiently counteract the AAPH-induced oxidative damage in HepG2 cells. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 2180.

ATSDR, Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Resúmenes de Salud Pública- Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)

[Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)], consultado en <<
https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html>> el 7 de agosto de 2019.

Basu A., Hguyen A., Betts N.M., Lyons T.J. 2014. Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54, 790-806.

Capó Martí, M.A. 2007. Principios de ecotoxicología: [diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente]. Tebar, Madrid, 73-90.

Chang W.C, Yu Y.M. Chiang S.Y. Tseng C.Y. 2008. Ellagic acid suppresses oxidized low-density lipoprotein—induced aortic smooth muscle cell proliferation: studies on the activation of extracellular signal-regulated kinasa ½ and proliferating cell nuclear antigen expression. *British Journal of Nutrition* 99, 709-714.

Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology Toxicology* 25, 5-32.

Edenharder R., Krieg H., Kotten V., Platt K.L. 2003. Inhibition of clastogenicity of benzo[a]pyrene and of its trans-7,8-dihydrodiol in mice *in vivo* by fruits, vegetables and flavonoids. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 537, 169-181.

Ewa B., Danuta M.S. 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *Journal of Applied Genetics* 58, 321-330.

Forbes-Hernández T., Gasparrini M., Afrin S., Cianciosi D., González-Paramás A.M., Santos-Buelga C., Mezzetti B., Quiles J.L., Battino M., Giampieri F., Bompadre S. 2017. Methanolic extract and anthocyanin-enriched fraction improve lipid profile and antioxidant status in HepG2 cells. *International Journal of Molecules Sciences* 18, 1149.

Gasparrini M., Giampieri F., Forbes-Hernández T.Y., Afrín S., Cianciosi D., Reboredo-Rodríguez P., Varela-López A., Zhang J., Quiles J.L., Mezzetti B., Bompadre S., Battino M. 2018. Strawberry extracts efficiently counteract

inflammatory stress induced by the endotoxin lipopolysaccharide in human dermal fibroblast. *Food and Chemical Toxicology* 114, 128-140.

Giampieri F., Tulipani S., Álvarez-Suárez J.M., Quiles J.L., Mezzeti B., Battino M. 2012. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact in human health. *Nutrition* 28, 9-19.

Giampieri F., Forbes-Hernández T.Y., Gasparri M., Álvarez-Suárez J.M., Afrin S., Bompadre S., Quiles J.L., Mezzeti B., Battino M. 2013. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food and Function* 1, 1-33.

Giampieri F., Álvarez-Suárez J.M., Mazzoni L., Forbes-Hernández T.Y., Gasparri M., González-Paamás A.M., Santos-Buelga C., Quiles J.L., Bompadre S., Mezzeti B., Battino M. 2014. An anthocyanin-rich strawberry extract protects against oxidative stress damage and improves mitochondrial functionality in human dermal fibroblasts exposed to an oxidizing agent. *Food and Function* 5, 1939-1948.

Giampieri F., Álvarez-Suárez J.M., Battino M. 2014. Strawberry and human health: effects beyond antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 3867-3876.

Hancock J., Sjulín T., Lobos G. 2008. Strawberries. In: Hancock J.F. (eds). *Temperature Fruit Crop Breeding*. Springer Dordrecht, 393-437.

Huang M.C., Chen F.Y., Chou M.T., J.Su J.G. 2011. Fluoranthene enhances p53 expression and decreases mutagenesis induced by benzo[a]pyrene. *Toxicology Letters* 208, 214-224.

Huang T., Xiao D., Burton-Freeman B.M., Edirisinghe I. 2016. Chemical changes of bioactive phytochemicals during thermal processing. *Reference Module in Food Sciences* 2, 1-9.

IARC. 2010. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, volume 92, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. Lyon, France. 868 p.

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 2011. Qué son y cómo se originan las partículas, en Guía Metodológica para la Estimación de PM_{2.5}. 1ra ed. INE-SEMARNAT, México, 13-25.

Izquierdo-Vega J.A., Morales-González J.A., Sánchez-Gutiérrez M., Betanzos-Cabrera G., Sosa-Delgado S.M., Sumaya-Martínez M.T., Morales-González A., Paniagua-Pérez R., Madrigal-Bujaidar E., Madrigal-Santillán E. 2017. Evidence of some natural products with antigenotoxic effects, part 1: fruits and polysaccharides. *Nutrients* 9, 102.

Jaramillo-Juárez F., Valdivia-Flores A.G. 2016. Fundamentos de estrés oxidativo celular. México. Universidad Autónoma de Aguascalientes, 142p.

Jiménez B.E. 2001. Capítulo 3: Contaminación del aire en La contaminación ambiental en México. Limusa, México, pp. 317-346.

Koningsberg F.M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. Editorial El Manual Moderno, México, 623 p.

Koppen G., Azqueta A., Pourrut B., Brunborg G., Collins A.R., Langie S.A.S. 2017. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 32, 397-408.

Liamin M., Boutet-Robinet E., Jasmin E.L., Fernier M., Khoury L., Kopp B., Le Ferrec E., Viganard J., Audebert M., Sparfel L. 2017. Benzo[a]pyrene-induced DNA damage associated with mutagenesis in primary human activated T lymphocytes. *Biochemical Pharmacology* 137, 93-106.

Laccasagne A., Buu-Hoy N.P., Zajdela F., Lavit-Larny D., Chalvet O. 1963. Carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons with fluoranthene group. *Union International Contra Cancrum Acta* 19, 490-496.

Libalová H., Krčková S., Uhlířová K., Milcova A., Schmuczervá J., Ciganek M., Klema J., Machala M., J Šram R., Topinka J. 2014. Genotoxicity but not the AhR-mediated activity pg PAH's is inhibited by other components of complex mixtures of ambient air pollutants. *Toxicology Letters* 225, 350-357.

LaVoie E.J., Braley J., Rice J.E., Rivenson A. 1987. Tumorigenic activity of nonalternant polinuclear aromatic hydrocarbons in newborn mice. *Cancer Letter* 34, 15-20.

Mastandrea C., Chichizola C., Ludueña B., Sánchez H., Álvarez H., Gutiérrez A. 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 39, 27-36.

Meyers K.J., Watkins C.B., Pritts M.P., Liu R.H. 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6887-6892.

Misaki K., Takamura-Enya T., Ogawa H., Takamori K. 2016. Tumor-promoting activity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated or nitrated derivatives. *Mutagenesis* 31, 205-213.

Omidian K., Raflei H., Bandy B. 2017. Polyphenol inhibition of benzo[a]pyrene-induced oxidative stress and neoplastic transformation in an *in vitro* model of carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology* 106, 165-174.

Ostling O., Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemistry, Biophysics Research Communications* 123, 291-298.

Ramírez-Nava J.S. 2006. Liofilización de alimentos. Universidad del Valle. Cali, Colombia, pp. 2-4.

Registre M., Proudlock R. 2016. The *in vitro* chromosome aberration test. *Genetic Toxicology Testing* 817, 207-267.

Rodríguez-Romero M.I., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Martínez-Valenzuela C., Cortés-Eslava J., Calderón-Ezquerro M.C., García-Martínez R., Arenas-Huertero F., Calderón-Segura M.E. 2012. Evaluation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to polycyclic aromatic hydrocarbons with or

without animal metabolic activation. *Toxicology Mechanisms and Methods* 22, 170-183.

SAGARPA. 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030: Fresa Mexicana. Consultado el 3 de agosto de 2020 en <<<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>>>

Shah U-K., Seager A.L., Fowler P., Doak S., Johnson G., Scott S.J., Scott A.D., Jenkins G.J. 2016. A comparison of genotoxicity of Benzo[a]pyrene in four cell lines with differing metabolite capacity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 808, 8-19.

Shen Y.M., Troxel A.B., Vedantam S., Penning T.M., Fiel J. 2006. Comparison of p53 mutations induced by PAH o-Quinones with those caused by anti-Benzo[a]pyrene diol epoxide *in vitro*: role of reactive oxygen selection. *Chemical Research in Toxicology* 19, 1441- 1450.

Solís Segura L.M., López Arriaga J.A. 2003. Principios básicos de contaminación ambiental. Universidad Autónoma del Estado de México, pp. 84-87.

Spink D.C., Wu S.J., Spink B.C., Hussain M.M., Vakhana D.P., Pentecost B.T., Kaminsky L.S. 2008. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-470 human breast cancer cells: roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* 226, 213-224.

Tarantini A., Maitre A., Lefévre E., Marques M., Rajhi A., Dsuki T. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology* 279, 36-44.

Tarantini A., Mitre A., Lefebvre E., Carques M., Marie C. Revanat J-C., Douki T. 2009. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a compound and in complex mixtures. *Mutation Research* 671, 67-75.

Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay:

guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis 35, 206-221.

Verma N., Pink M., Rettenmeier A.W., Schmitz-Spanke S. 2012. Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. Proteomics 12, 1731-1755.

Villalobos-Pietrini R., Amador-Muñoz O., Waliszewski S., Hernández-Mena L., Munive-Colín Z., Gómez-Arroyo S., Bravo-Cabrera J.L., Frías-Villegas A. 2006. Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles $\leq 10\mu\text{m}$ in southwest Mexico City. Atmospheric Environment 40, 5845-5857.

Wang S.Y., Feng R., Lu Y., Bowman L., Ding M. 2005. Inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor-kappaB and cell transformation by extracts of strawberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 4187-4193.

Weyand E.H., Geddie N, Rice J.E., Czech A., Amin S.J., LaVoie E. 1988. Metabolism and mutagenic activity of benzo[k]fluoranthene and 3-8- and 9-fluorobenzo[k]fluoranthene. Carcinogenesis 9, 1277-1281.

World Health Organization. 2010. WHO guidelines for indoor quality: selected pollutants. WHO Regional Officers for Europe. 454.

Xue H., Aziz R.M., Sun N., Cassady J.M., Komendulis L.M., Xu Y., Stoner G.D., Klaving J.E. 2001. Inhibition of cellular transformation by berry extracts. Carcinogenesis 22, 351-356.

Xue Z., Li D., Yu W., Zhang Q., Hou X., Hie Y., Kou X. 2017. Mechanisms and therapeutic prospects of polyphenols as modulators of the aryl hydrocarbon receptor. Food and Function 8, 1414-1437.

12 Anexo

Carta de Consentimiento Bajo Información para Investigación

Por medio de la presenta, el (la) que suscribe _____, de manera libre y sin coerción alguna, autorizo a ser sometido(a) a la toma de muestra de 7mL de sangre periférica el día ___ del mes _____ del año _____ a las _____ hrs para que se realice con ella el estudio de “Ensayo de electroforesis alcalina en linfocitos humanos”.

Asimismo, se me informó que no tiene riesgo para mi salud, ya que consiste en la toma de una muestra sanguínea del antebrazo, con materiales nuevos y estériles. Además se me ha dado la oportunidad de despejar mis dudas. Atendiendo al principio de confidencialidad, autorizo que se publique la información que proporcioné únicamente para los fines de investigación, respetándose en todo momento mi integridad y privacidad.

Nombre y firma