



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**GENOTOXICIDAD INDUCIDA POR BENZO[A]ANTRACENO Y
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIGENOTÓXICA DE
LIOFILIZADO DE FRESA (*Fragaria x ananassa*) EN
LINFOCITOS HUMANOS AISLADOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

**SUSANA PATRICIA ZACARÍAS GARCÍA
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 la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, por todo el apoyo y confianza dados desde el inicio, durante mi estancia en el laboratorio y en la revisión de este trabajo, mi más sincero agradecimiento.

A la M en C. Ana Rosa Flores Márquez, por su excelente asesoría técnica para la realización de esta tesis, por todo su tiempo, entusiasmo y paciencia dedicados, por los ánimos en los momentos de frustración, le agradeceré siempre.

A la Dra. Eva Aguirre Hernández, por la ayuda y tiempo brindados en la elaboración de los extractos, muchas gracias.

Al Dr. Omar Amador Muñoz y a su equipo por el apoyo brindado en la realización de este trabajo, muchas gracias.

A la Dra. Josefina Cortés Eslava, por la enseñanza y guía en la introducción al trabajo en el laboratorio, muchas gracias.

A la M en C. Denisse Badillo Velázquez, por su tiempo y la enseñanza dada en el laboratorio, por sus consejos y amistad, gracias.

A Victoria Carrillo por todo el apoyo dado durante mi estancia en el laboratorio, por darme su amistad y confianza, gracias Vicky.

Gracias también a mis compañeras (os) del CCA por su ayuda, consejos y por hacer del laboratorio un lugar más agradable.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres, gracias por sus enseñanzas, esfuerzo y por apoyarme en todo momento, sin ustedes no hubiera sido posible. A mis hermanos T y M. Los quiero mucho a todos.

A mi abuela Teresa, gracias por sus oraciones y siempre darme ánimos. A mi abuelo Abdón en donde quiera que estés, gracias por todo, te extrañaré siempre.

A mis amigos y amigas. Sandra, Daniela y Pablo por su amistad, ayuda, paros, pláticas, risas, y por todos los buenos momentos que pasamos. A Bere por escucharme siempre y reírse de mis malos chistes. A Dany y Diana por las pijamadas, chisme y las risas en el museo, sin ustedes no hubiera sido tan divertido. A todas mis amigas que me acompañaron durante este proceso, con algún consejo o meme. Gracias por su amistad y compañía.

A mi gran amiga Mayra, gracias por estar siempre para mí a pesar de la distancia, por tu amistad, cariño y por las largas horas al teléfono durante todos estos años. T.Q.M.

A César, gracias por toda tu ayuda y apoyo incondicional a lo largo de todo este tiempo, por darme ánimos, confortarme y motivarme en los momentos más difíciles.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1. Contaminación ambiental	3
2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	4
3. Consecuencias de la contaminación atmosférica en la salud humana	6
4. Importancia de la alimentación para la salud humana	7
5. Frutas. La fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	8
6. Ensayo cometa	9
II. ANTECEDENTES	13
III. OBJETIVOS	16
IV. HIPÓTESIS	16
V. JUSTIFICACIÓN	17
VI. MATERIAL Y MÉTODO	18
1. Aislamiento de linfocitos	18
2. Viabilidad celular	18
3. Conteo celular	19
4. Extracto de fresa	19
5. Preparación y selección de concentración de extracto de fresa	20
6. Preparación de disoluciones de Benzo[a]antraceno	21
7. Exposición de linfocitos humanos a Benzo[a]antraceno	22
7.1 Viabilidad celular y genotoxicidad	22
7.2 Antigenotoxicidad	22
VII. RESULTADOS	23
1. Liofilizado de fresa	23
2. Exposición de linfocitos humanos a Benzo[a]antraceno	24
3. Exposición de linfocitos humanos a Benzo[a]antraceno con extracto de fresa	27
VIII. DISCUSIÓN	33
1. Genotoxicidad de Benzo[a]antraceno	33
2. Efecto del liofilizado de fresa en células expuestas a Benzo[a]antraceno	35
IX. CONCLUSIONES	39
X. REFERENCIAS	40
XI. ANEXO	47

RESUMEN

La contaminación ambiental va en aumento cada día, los efectos dañinos a la salud humana y a los ecosistemas son graves consecuencias producidas por este hecho. Entre las sustancias nocivas para la salud presentes en la atmósfera, están los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Su origen puede deberse a fuentes naturales como la actividad volcánica y los incendios forestales, sin embargo la mayor cantidad de ellos proviene de fuentes antropogénicas como la quema de combustibles fósiles. Las personas que viven en grandes urbes están expuestas a una mayor cantidad de sustancias contaminantes, entre las que se encuentran los HAP que representan un potencial peligro a la salud.

Desde hace tiempo y gracias a diversos estudios se ha vinculado la salud con el consumo de vegetales como frutas y verduras, la presencia de fitoquímicos en estos alimentos se relaciona con la prevención de enfermedades como Alzheimer, padecimientos cardiacos y relacionados con la edad. Los frutos rojos, las fresas y bayas son una gran fuente de polifenoles como las antocianinas que han sido vinculadas con la disminución de diversos padecimientos.

En el presente trabajo se evaluó el efecto genotóxico en linfocitos humanos aislados de sangre periférica del Benzo[a]antraceno (HAP clasificado como probable carcinógeno) así como también el efecto protector o inhibidor del liofilizado de fresa en el daño al ADN ocasionado por el compuesto. Inicialmente se realizaron varios experimentos para determinar la concentración de liofilizado de fresa que no tuviera efecto citotóxico ni genotóxico en linfocitos humanos. La viabilidad se obtuvo con el método de tinción dual y el daño genético se evaluó mediante la técnica de electroforesis unicelular también conocida como ensayo cometa. Para verificar el efecto genotóxico del HAP las concentraciones utilizadas fueron 21, 44, 88 y 175 μM aplicadas durante cuatro horas. Mediante el programa Comet Assay IV se determinaron tres parámetros de daño: longitud de la cauda, % de ADN en la cauda y momento de la cauda; se encontraron diferencias significativas en todas las concentraciones del HAP respecto al testigo negativo, indicando

efecto genotóxico. Se realizó una prueba de Kruskal Wallis con significancia de 0.05 y una prueba de Dunn.

Al añadir el liofilizado de fresa a los tratamientos con Benzo[a]antraceno se obtuvo una disminución del daño al ADN producido en las células por el HAP. Se concluyó que el Benzo[a]antraceno produjo daño genotóxico en linfocitos humanos en ausencia y en presencia de liofilizado de fresa. Sin embargo, al añadir el extracto a los tratamientos, hubo reducción del daño.

I. INTRODUCCIÓN

1. Contaminación ambiental

La contaminación ambiental es un problema presente en el mundo, que implica graves consecuencias en todos los ámbitos. Las grandes ciudades del planeta tienen una alta concentración de gente, esta situación hace que la demanda de muchos servicios y productos aumente cada vez más. El uso de vehículos, la construcción de edificios, casas, centros de esparcimiento, así como la fabricación de productos alimenticios y de la vida cotidiana involucran la explotación de los recursos naturales.

Muchas actividades de producción requieren la explotación de recursos naturales mediante procedimientos que causan un gran impacto ambiental, como la minería a cielo abierto y la extracción de petróleo. Como consecuencia se tienen afectaciones al ambiente, aumentos en la contaminación y en padecimientos que alteran la salud humana.

El término contaminación atmosférica se define como la presencia en el aire de diversas sustancias nocivas para la salud, que dependiendo de la concentración en la que se encuentren pueden ocasionar daños a los ecosistemas y a la salud humana (Ubilla y Yohannessen, 2017). Los contaminantes atmosféricos se clasifican en primarios (emitidos directamente a la atmósfera) y secundarios (se forman en la atmósfera por medio de reacciones químicas). También pueden clasificarse según su origen, en biogénicos cuando provienen de fuentes naturales como las erupciones volcánicas o antropogénicos cuya generación es la actividad humana, como las emisiones de vehículos e industrias (Ubilla y Yohannessen, 2017).

2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son compuestos orgánicos no polares, formados por átomos de carbono e hidrógeno y por anillos aromáticos con diferentes arreglos estructurales. Generalmente su apariencia es de sólidos incoloros, blancos, amarillos o verdosos y pueden desprender un leve olor (Ghosal *et al.*, 2016).

Proviene de la combustión incompleta de materia orgánica como el petróleo, gas, alquitrán, carbón, humo de cigarro, alimentos ahumados y emisiones vehiculares. También pueden formarse durante erupciones volcánicas o incendios forestales (Ghosal *et al.*, 2016); sin embargo la mayor cantidad de ellos es producida por fuentes antropogénicas. La principal causa de emisión de los HAP es la quema de combustibles fósiles (Mastandrea *et al.*, 2005).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos que son liberados a la atmósfera pueden depositarse en los suelos, sistemas acuáticos o permanecer en el aire. La exposición a estas sustancias puede ocurrir por ingestión de agua o alimentos, por inhalación y por absorción dérmica (Bolden *et al.*, 2017).

Existen personas que por su condición laboral en las industrias están en contacto frecuente con los HAP. La exposición a estos compuestos pueden ocasionar daños adversos a la salud, los individuos que trabajan en fábricas de gas y coque están en contacto con las emisiones provenientes de estas actividades (Mastandrea *et al.*, 2005).

Por otro lado, para inducir efectos mutagénicos o carcinogénicos, los HAP necesitan ser activados metabólicamente. Por lo regular su oxidación por enzimas P450 (CYP450) es el primer paso del proceso de activación metabólica (Xue y Warshawsky, 2005). La familia de P450 se compone de una gran variedad de enzimas presentes en tejidos cerebrales, intestinales, pulmonares y otros. Existen enzimas que metabolizan sustancias que ingresan al organismo de forma exógena (xenobióticos) para posibilitar su eliminación (Galli y Feijoó, 2002). Las enzimas P450 oxidan los HAP produciendo al final metabolitos derivados con alta potencia carcinógena; debido a que son capaces de interactuar con macromoléculas como ácidos nucleicos y proteínas (Xue y Warshawsky, 2005).

Para formar metabolitos activos, los HAP necesitan activación por medio de reacciones catalizadas enzimáticamente (Jarvis *et al.*, 2014). Un ejemplo es la activación del Benzo[a]pireno (B[a]P), cuyo mecanismo de activación consiste en una serie de pasos. A grandes rasgos, primero con la participación de las enzimas CYP1A1 que transforman el B[a]P en BP-7,8-epóxido, con la epóxido hidrolasa éste se transforma en BP-7,8-dihidrodiol; finalmente con CYP1A1 resulta el metabolito reactivo carcinógeno final BP-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido (BPDE) (Moorthy *et al.*, 2015). Las enzimas CYP1A1 y 1B1 están involucradas en la activación de varios HAP cancerígenos, además los polimorfismos genéticos de estas enzimas están relacionados con la susceptibilidad individual en seres humanos a carcinogénesis causadas por los HAP (Shimada y Fujii-Kuriyama, 2004).

Se han descrito tres principales vías para la biotransformación de los HAP: de CYP1A1/1B1 y epóxido hidrolasa, de CYP peroxidasa y de aldo-ceto reductasas. A grandes rasgos, las enzimas CYP en conjunto con otras enzimas, metabolizan los HAP produciendo fenoles y quinonas que resultan en la formación de diolepóxidos o quinonas reactivas capaces de interactuar con el ADN; las consecuencias de este proceso son la inducción de aductos, tumores, cáncer, entre otras (Moorthy *et al.*, 2015).

La actividad mutagénica de los HAP se relaciona con la capacidad que tienen sus metabolitos diol epóxidos (DE) para formar aductos con el ADN. Asimismo, el estrés oxidante es una evidencia de toxicidad asociada con los HAP y puede desencadenar respuestas inflamatorias y muerte celular (Jarvis *et al.*, 2014).

a) Benzo[a]antraceno

Es un HAP que está clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) en el grupo 2A como probable carcinógeno humano. Puede producir cáncer en hígado y pulmón, al metabolizarse forma compuestos con actividad carcinogénica como los dioles epóxido capaces de interaccionar con moléculas como el ADN (Gray y Hall, 2014). Se produce por la combustión incompleta de materia orgánica y por la quema de combustibles fósiles (National Cancer Institute USA, 2020). Durante el proceso de cocción de alimentos como carne a la parrilla o ahumada, se puede inducir la formación de éste y otros HAP en los mismos (Ince e Ince, 2019). También se ha detectado su presencia en el humo del cigarro (Gray y Hall, 2014).

3. Consecuencias de la contaminación atmosférica en la salud humana

Los HAP han sido catalogados como contaminantes tóxicos del aire debido a los efectos adversos que ocasionan en la salud humana y al ambiente. La Ciudad de México y el área metropolitana cuentan con una gran densidad poblacional y enorme actividad industrial, esto las convierte en una de las urbes más contaminadas del mundo y los compuestos presentes en el aire pueden representar un peligro para la salud de sus habitantes (Múgica *et al.*, 2010).

El cáncer de pulmón está relacionado con el consumo de tabaco y la contaminación del aire, los HAP forman parte de los contaminantes presentes en el humo de tabaco y el aire. La exposición por inhalación a sustancias que contienen HAP aumenta el riesgo de padecer cáncer de pulmón (Moorthy *et al.*, 2015). El Benzo[a]antraceno es un HAP que ha sido hallado en pulmones de pacientes enfermos por cáncer de pulmón habitantes de Iasi Rumania, el cual se presentó en mayor cantidad en pacientes provenientes de áreas urbanas que de zonas rurales (Cioroiu *et al.*, 2013).

Las personas que trabajan en industrias de la zona conurbada a la Ciudad de México se encuentran expuestas constantemente a diversas sustancias contaminantes. Diariamente la mayor parte de la población se desplaza por la ciudad y el área metropolitana para

poder realizar sus actividades laborales o estudios, esta situación también provoca repercusiones en la salud, la calidad de vida y aumenta la exposición a diversos productos presentes en el aire.

4. Importancia de la alimentación para la salud humana

En la actualidad el tema de la alimentación es muy amplio y abarca muchos aspectos; se puede abordar desde el punto de vista científico, cultural, social, etc. Hay diversas discusiones sobre la importancia que la alimentación ha tenido y tiene en la salud humana. Con la gran riqueza cultural del mundo, viene también una enorme variedad culinaria; ésta depende en gran parte de los alimentos que se encuentran en las distintas regiones del mundo y actualmente también la accesibilidad que tiene la población a ellos es un factor relevante a considerar.

Una de las recomendaciones más importantes que se ha difundido a través de las generaciones y que también en la actualidad se escucha en medios de comunicación, como sugerencia de médicos y personal de salud en general, es el consumo frecuente de vegetales como frutas y verduras.

Existe información que relaciona el consumo de alimentos de origen vegetal con la prevención de enfermedades tales como el cáncer, diabetes, Alzheimer, enfermedades cardíacas y vinculadas con la edad (Liu, 2013).

Las frutas y verduras contienen gran cantidad de fitoquímicos, que están relacionados con la reducción del riesgo de algunas enfermedades. Para su estudio, los fitoquímicos se pueden clasificar en compuestos que tienen nitrógeno, organosulfurados, fenólicos, alcaloides, fitoesteroles y carotenoides. Los compuestos fenólicos y los carotenoides son los que han mostrado mayor relación con la salud humana (Liu, 2013).

5. Frutas. La fresa (*Fragaria x ananassa*)

La fresa (*Fragaria x ananassa*) es una fruta que tiene gran aceptación debido a sus llamativas características sensoriales como su color rojo brillante y su sabor (Morales *et al.*, 2014). El cultivo de fresa se realiza en la mayor parte del mundo. En México el 52.21% de la producción nacional se destina para el comercio exterior internacional. México se posiciona como tercer proveedor de fresa en el mercado internacional (SAGARPA, 2017).

Esta fruta es una gran fuente de antioxidantes, y su atractivo color se debe a la presencia de antocianinas, otros flavonoides y ácido ascórbico (Morales *et al.*, 2014). Las fresas, bayas y frutos rojos son una gran fuente de polifenoles, como las antocianinas. Se han realizado estudios de intervención en la dieta humana con fresas, arándanos y otras bayas que se han asociado con disminución del riesgo cardiovascular (Basu *et al.*, 2010).

Las fresas contienen muchos nutrientes y vitaminas además de fitoquímicos como los compuestos fenólicos. Los principales compuestos fenólicos presentes son los flavonoides, entre ellos se encuentran a las antocianinas; también contienen taninos hidrolizables y ácidos fenólicos (Giampieri *et al.*, 2012).

Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno son generadas por el metabolismo normal o irregular de procesos que utilizan oxígeno molecular (Heo y Lee, 2005). La producción en exceso de especies reactivas de oxígeno ocasiona diversos padecimientos en seres humanos afectando los procesos celulares; como el metabolismo, las respuestas antioxidantes y antiinflamatorias. Las especies reactivas de oxígeno pueden afectar principalmente a los lípidos de la membrana celular causando peroxidación lipídica, también perjudican a proteínas y ADN, en este último pueden ocasionar la pérdida de purinas, roturas y daños en los mecanismos de reparación del ADN (Gasparrini *et al.*, 2017). Los radicales libres son especies químicas que tienen uno o más electrones desapareados y por tanto son más inestables químicamente (Aruoma, 1994).

Se ha observado la actividad anti proliferativa del extracto de fresa sobre células de cáncer de colon HT29 y cáncer de mama MCF-7 disminuyendo la proliferación de forma dosis dependiente (Olsson *et al.*, 2006). También se ha estudiado la reducción del estrés oxidante inducido por peróxido de hidrógeno en células neuronales PC12, los efectos

parecen atribuirse al gran contenido de compuestos fenólicos que poseen (Heo y Lee, 2005).

La capacidad antioxidante de las fresas está muy relacionada con la presencia de la vitamina C y compuestos fenólicos, estos componentes tienen la posibilidad de eliminar radicales de oxígeno (Giampieri *et al.*, 2012). Las fresas han mostrado una acción antioxidante mayor que otras frutas como la manzana, durazno, pera, uva, jitomate, naranja o kiwi (Giampieri *et al.*, 2012).

Entre los potenciales beneficios asociados al consumo de fresas para la salud humana, están los efectos benéficos contra el estrés oxidante, inflamación, enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad e infecciones microbianas (Afrin *et al.*, 2016).

6. Ensayo cometa

En 1984, Östling y Johanson desarrollaron una técnica de electroforesis en gel para detectar daño al DNA a nivel de una célula. El método que presentaron consistió en embeber células en agarosa y mediante el uso de sales y detergentes para realizar lisis celular. Una vez liberado el ADN se lleva a cabo una electroforesis en condiciones de pH neutro (Tice *et al.*, 2000). Las células de mamífero utilizadas en el ensayo fueron irradiadas con rayos gamma, las que resultaron con altas frecuencias de rupturas de cadena doble también mostraron una mayor migración del ADN hacia el ánodo. Estos resultados fueron proporcionales a la dosis de la radiación; de esta manera les fue posible cuantificar la relación dosis/respuesta midiendo la intensidad de la fluorescencia emitida por los cometas en cabeza y cauda (Rodríguez-Rey *et al.*, 2016).

La electroforesis unicelular llamada comúnmente ensayo cometa, es una prueba que se utiliza para evaluar la respuesta en células individuales a diferentes agentes o factores que producen daño al ADN; es un ensayo sencillo, rápido, de bajo costo y puede ser aplicado en diversos tipos celulares y organismos tanto *in vivo* como *in vitro*. Además de que ofrece grandes ventajas para la evaluación genotóxica de productos de la industria química, fármacos, principios activos, agroquímicos y en el biomonitorio ambiental y humano (Ansoar *et al.*, 2015).

Es uno de los ensayos más populares para medir el daño al ADN en células humanas. Con el cual se busca relajar el superenrollamiento del ADN y con la aplicación de una electroforesis alcalina obtener imágenes parecidas a un cometa (Azqueta *et al.*, 2020).

La técnica llevada a cabo en pH neutro muestra algunas limitaciones ya que sólo es posible detectar rupturas de cadena doble en el ADN (Tice *et al.*, 2000).

Años después en 1988, Singh y colaboradores realizan la técnica utilizando la electroforesis en condiciones alcalinas (Rodríguez-Rey *et al.*, 2016), midiendo la longitud de la cauda para cuantificar el daño al ADN (Kumaravel *et al.*, 2009).

En 1990 Olive realiza otra versión alcalina del ensayo, además calcula el momento de la cauda (que se llegó a conocer como momento de la cauda de olive OTM) para describir la migración del ADN (Kumaravel *et al.*, 2009). Con la variación de las condiciones de pH se establecen dos versiones del bioensayo, la de Singh llamada electroforesis alcalina (pH>13) y la de Olive, llamada electroforesis neutra (pH 8.3), el método alcalino es el más utilizado ya que detecta rupturas de cadena doble y sencilla además de sitios álcali lábiles (Rodríguez-Rey *et al.*, 2016).

Aunque la técnica para realizar el ensayo cometa puede variar en los diferentes centros de investigación, existe una serie de pasos básicos. La preparación de portaobjetos para microscopio, lisis, electroforesis, neutralización, tinción y visualización de los cometas (Tice *et al.*, 2000).

Preparación de portaobjetos. La finalidad es obtener geles uniformes que faciliten la visualización de los cometas, disminuyendo al mínimo el ruido de fondo (Tice *et al.*, 2000). Por lo general se utilizan tres capas de agarosa, en la primera que cubre el portaobjetos se utiliza agarosa de punto de fusión normal y se deja solidificar, esto ayudará a que la capa de células tenga una buena adhesión. La segunda capa consiste en células embebidas en agarosa de bajo punto de fusión, una vez solidificada se pone la tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión para dar uniformidad al gel y también protección (Zúñiga, 2009).

Lisis celular. Cuando la tercera capa de agarosa ha solidificado, los portaobjetos se colocan en solución de lisis que contiene sales y detergentes; debe ser enfriada antes de

usar para mantener la estabilidad del gel de agarosa. El tiempo que debe durar la lisis es de al menos una hora (Tice *et al.*, 2000). Con la solución de lisis se busca liberar el ADN de la célula, las sales y detergentes interaccionan con las membranas celular y nuclear, de tal forma que las sales puedan interaccionar con las histonas que dan estabilidad al ADN (Rodríguez-Rey *et al.*, 2016).

Electroforesis. La electroforesis es un proceso fisicoquímico en el que los fragmentos del ADN libres y con carga eléctrica se extraen del nucleóide por un campo eléctrico (Koppen *et al.*, 2017). Los fragmentos de ADN cargados negativamente migran hacia el ánodo.

Antes de la electroforesis, los portaobjetos se colocan en amortiguador de electroforesis alcalino ($\text{pH} > 13$) durante veinte minutos para permitir el desenrollamiento del ADN (Tice *et al.*, 2000). En estas condiciones de alcalinidad es posible romper los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases del ADN para producir el desenrollamiento (Rodríguez-Rey *et al.*, 2016).

Una vez realizado el desenrollamiento del ADN, los portaobjetos se ponen en electroforesis, el amortiguador alcalino ($\text{pH} > 13$) utilizado para este paso es el mismo que el usado en el desenrollamiento. La electroforesis puede llevarse a cabo entre 5 °C y temperatura ambiente, pero se cree que a temperatura más baja, proporciona mayor reproducibilidad. En 1988 Singh y colaboradores desarrollaron las condiciones de electroforesis en 25 V y 300 mA (Tice *et al.*, 2000).

Neutralización. Para neutralizar se utiliza una solución amortiguadora como el tris (hidroximetil) aminometano, a un pH de 7.5, realizando tres lavados de 5 minutos cada uno (Tice *et al.*, 2000).

Tinción y visualización de cometas. Para teñir se utilizan compuestos que se conocen como fluorocromos, estos producen fluorescencia en otras sustancias y por ello se utilizan como marcadores de otros compuestos (National Center for Biotechnology Information, 2020). Los colorantes más empleados son el bromuro de etidio, yoduro de propidio y 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), éstos interactúan con los pares de bases del ADN y gracias a eso permiten visualizar ácidos nucleicos (Zúñiga, 2009).

Una vez que se han teñido las preparaciones, la observación es el paso siguiente; para visualizar las laminillas se utiliza un microscopio de fluorescencia y existen diversas maneras de evaluar las observaciones.

Puede usarse un sistema de análisis de imágenes, éstos son de gran utilidad para cuantificar el daño al ADN. Los parámetros más comúnmente reportados son porcentaje de ADN en la cauda, momento de la cauda y longitud de la cauda; debido a la variación que puede existir entre los diversos sistemas de análisis de imágenes, el porcentaje de ADN en la cauda es muy utilizado para realizar comparaciones entre laboratorios (Speit y Rothfuss, 2012). Los tres parámetros mencionados anteriormente suelen adoptarse al utilizar un sistema de análisis de imágenes, sin embargo el porcentaje de ADN y momento de la cauda son los que se emplean con mayor frecuencia (Sunjog *et al.*, 2013).

La longitud de la cauda es un parámetro que informa sobre el daño al ADN en niveles bajos, ya que éste no tiende a cambiar cuando el daño aumenta (Lu *et al.*, 2017). La cauda puede aumentar en intensidad, pero no en longitud a medida que la magnitud del daño crece, de esta manera el % de intensidad y el momento de la cauda son los parámetros que se reportan con mayor frecuencia (Sunjog *et al.*, 2013).

La intensidad de la cauda (% de ADN en la cauda) está relacionado con la frecuencia de rompimientos del ADN y es útil para imaginar el tipo de cometa que se describe, es por eso que se considera de los parámetros más adecuados (Azqueta y Collins, 2013).

El momento de la cauda resulta del producto de la longitud por la intensidad de la cauda, en cuanto a sensibilidad es similar a la que otorga la intensidad de la cauda aunque no proporciona información sobre el tipo de cometa (Azqueta y Collins, 2013).

Los sistemas de análisis de imágenes pueden ser semiautomatizados o automatizados, estos últimos aunque son más costosos ofrecen mayores ventajas como la rapidez en el análisis; pudiendo completar el proceso en unas cuantas horas (Koppen *et al.*, 2017).

Existen otros métodos de evaluación alternativos a los sistemas de análisis de imágenes, tales como realizar una escala visual clasificando los tamaños de la cauda en diferentes grupos, determinar el porcentaje de células con y sin cauda o utilizar la lente ocular calibrada del microscopio para examinar las células. Para el análisis estadístico existen

una gran variedad de métodos paramétricos y no paramétricos dependiendo del tipo de estudio (Speit y Rothfuss, 2012).

Entre las desventajas que presenta el ensayo, es presentar niveles altos de variabilidad en especial cuando se comparan resultados entre laboratorios, algunas formas de daño no pueden detectarse con el ensayo cometa (aductos voluminosos) y aunque en células humanas es un marcador de exposición a agentes dañinos, no es un indicador predictivo de riesgo de cáncer (Azqueta *et al.*, 2020).

Sin embargo, esta técnica también provee de grandes ventajas entre las que se encuentran: su gran sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN, no requiere un gran número de células para efectuarse, la cantidad de sustancia de prueba que se requiere es mínima, es de bajo costo, fácil aplicación y el procedimiento experimental puede completarse en unos pocos días (Tice *et al.*, 2000).

II. ANTECEDENTES

Desde hace varios años en el Centro de Ciencias de la Atmósfera (CCA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) ubicado en la Ciudad de México, se han realizado diversos estudios para evaluar la mutagenicidad de las aeropartículas. Durante algunos años, en la estación del Pedregal de San Ángel se realizaron muestreos del aire, las muestras obtenidas revelaron la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) relacionados con partículas suspendidas totales (PST) (Amador-Muñoz *et al.*, 2001). Se realizó el ensayo de AMES con la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* para evaluar la mutagenicidad de la materia orgánica asociada a PST en la atmósfera del suroeste de la Ciudad de México, durante las temporadas de lluvias y secas. Los resultados mostraron efecto mutagénico de los extractos de materia orgánica obtenida de las partículas suspendidas totales (Amador-Muñoz *et al.*, 2001).

En el CCA también se han realizado pruebas para evaluar los efectos de las partículas suspendidas totales (PST) y las partículas menores o iguales a 10 μm (PM10) con diversas técnicas. Entre los trabajos desarrollados en la institución se han incluido diversos métodos, como la técnica de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), con el objetivo

de evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad en cultivo de linfocitos humanos expuestos a materia orgánica extraída (MOE) en los meses de abril, agosto y noviembre de 1997, periodo donde fueron realizados varios muestreos en el CCA de contaminantes y partículas suspendidas, cada mes corresponde a una de las tres estaciones presentes a lo largo del año en la Ciudad de México. Entre las sustancias contaminantes fueron encontrados al menos quince hidrocarburos aromáticos policíclicos, cuya presencia varió durante las temporadas de lluvia y secas y éstos revelaron que existen efectos adversos causados por este tipo de contaminantes. Se encontró también que el índice de replicación y el índice mitótico decreció con el aumento de MOE, además al utilizar concentraciones muy altas se produjo muerte celular (Calderón-Segura *et al.*, 2004).

Utilizando el ensayo de AMES para evaluar la mutagenicidad de los contaminantes del aire, se empleó la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* con la fracción S9 para evaluar la mutagenicidad de acción indirecta, así como la cepa TA98 y la cepa YG1021 sin S9 para evaluar la mutagenicidad de acción directa. El muestreo del aire se llevó a cabo durante 1998 en el suroeste de la Ciudad de México, se analizaron las partículas suspendidas iguales o menores a 10 µm (PM10) y la MOE asociada a ellas. De este estudio se concluyó que la PM10 y la MOE están correlacionadas positivamente con la acción mutagénica de TA98-S9 y con YG1021, aunque no con TA98+S9 (Villalobos-Pietrini *et al.*, 2006). Los HAP más abundantes encontrados en este muestreo fueron el Benzo[ghi]perileno, coroneno e indeno [1,2,3-cd] pireno, todos provenientes de la quema de combustibles fósiles.

Otro estudio se realizó utilizando mezclas complejas orgánicas (MCO) obtenidas a partir de PST y PM10 (Villalobos-Pietrini *et al.*, 2007). Se aplicó el ensayo de AMES para evaluar el efecto mutagénico de estas mezclas complejas. Los compuestos orgánicos que forman parte de la MCO son separados selectivamente para su análisis en varios grupos de acuerdo a su polaridad, estos grupos pueden presentar respuestas mutagénicas diferentes a las de la MCO general. Los resultados mostraron correlación entre la fracción más polar y las PM10, además la presencia de NO₂, SO₂ y CO, indica que los compuestos orgánicos polares obtenidos de la MCO tienen su origen en la combustión incompleta producida por los vehículos y también por los incendios. La mayor actividad mutagénica

directa e indirecta fue más elevada en las mezclas que presentaron mayor polaridad (Villalobos-Pietrini *et al.*, 2007).

Existen otros bioensayos para evaluar los efectos de mutagenicidad y genotoxicidad. A diferencia del ensayo de AMES; el de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis y el ensayo cometa en sangre periférica utilizan células eucariontes como los linfocitos, esto permite tener un panorama más amplio ya que el sistema de prueba es distinto.

Utilizando el ensayo cometa Rodríguez-Romero *et al.* (2012) estudiaron los efectos genotóxicos y citotóxicos en linfocitos aislados de sangre periférica producidos por la exposición a distintos HAP. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos empleados fueron dibenzo[a,h]antraceno, benzo[ghi]perileno, benzo[b]fluoranteno y benzo[a]pireno, a diferentes concentraciones. Los resultados obtenidos mostraron daño al material genético determinado por la detección de aductos de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OhdG). Se observó que la media de la frecuencia de los cometas así como la longitud de la cola de los mismos, aumentó según se incrementó la concentración de cada uno de los hidrocarburos probados.

III. OBJETIVOS

1. Seleccionar una concentración de extracto de fresa que no muestre citotoxicidad ni genotoxicidad en linfocitos humanos aislados de sangre periférica.
2. Evaluar el daño genotóxico del hidrocarburo aromático policíclico categorizado como posible cancerígeno, utilizando la técnica de ensayo cometa en linfocitos humanos aislados.
3. Estimar el efecto protector o inhibidor de liofilizado de fresa en la actividad genotóxica de Benzo[a]antraceno sobre linfocitos humanos.

IV. HIPÓTESIS

Se ha reportado que el Benzo[a]antraceno forma parte de los contaminantes del aire y está clasificado por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer como probable carcinógeno para los seres humanos; por lo cual será evaluado el daño producido por este hidrocarburo en linfocitos humanos aislados de sangre periférica. Por otra parte, será evidente el efecto protector o inhibidor del liofilizado de fresa ante el daño producido por el Benzo[a]antraceno en las células.

V. JUSTIFICACIÓN

La calidad del aire en los grandes asentamientos humanos como la Ciudad de México, se ha visto afectada por la siempre creciente urbanización e industrialización. Los contaminantes del aire pueden ser partículas o gases que se encuentran formando mezclas complejas, se han identificado diferentes tamaños de partícula entre los que se encuentran partículas $\leq 2.5 \mu\text{m}$ (PM2.5) y $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM10), las cuales por su diámetro pueden ingresar al organismo y ocasionar gran variedad de enfermedades y padecimientos (Villalobos-Pietrini *et al.*, 2008).

El Benzo[a]antraceno es un hidrocarburo aromático policíclico que forma parte de los contaminantes del aire de la Ciudad de México (Ledezma *et al.*, 2015). Se produce por la combustión incompleta de materia orgánica y por la quema de combustibles como el diesel y la gasolina; está presente en el alquitrán de hulla utilizado como recubrimiento de pinturas y superficies y también se encuentra en algunos productos de consumo como los cigarrillos (National Cancer Institute USA, 2020). El Benzo[a]antraceno ha sido clasificado por la IARC en el grupo 2A como probable carcinógeno para los seres humanos.

Existen varias fuentes de Benzo[a]antraceno, al estar presente en los contaminantes del aire es importante su estudio en diferentes modelos biológicos, *in vivo* o *in vitro*. Por otra parte, se ha asociado el consumo de frutas y vegetales con la disminución del riesgo para enfermedades tales como el cáncer, diabetes, Alzheimer, enfermedades cardíacas y relacionadas con la edad (Liu, 2013).

Las fresas también son una buena fuente de nutrientes y tienen gran capacidad antioxidante debido a los compuestos fenólicos presentes, estos componentes pueden eliminar radicales libres (Giampieri *et al.*, 2012). Esta fruta ofrece grandes ventajas debido a que se cultiva en todo el mundo y en México se consume con regularidad. Por lo que es necesario llevar a cabo estudios, que demuestren la genotoxicidad de este HAP, así como la posibilidad de contrarrestar sus efectos mediante el liofilizado de fresa.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

1. Aislamiento de linfocitos

Para realizar los experimentos se obtuvo la colaboración de dos donadores sanos de sexo masculino. Los cuales fueron notificados acerca del estudio y firmaron una hoja de consentimiento informado que se presenta en el anexo.

Se tomó una muestra de 7 mL de sangre periférica que fue heparinizada para evitar la coagulación. La sangre se mezcló con 7 mL de solución de Hanks en un tubo cónico para centrífuga de 15 mL y posteriormente se traspasó en partes iguales a otros dos tubos para centrífuga que contenían 3.5 mL de Ficol cada uno. Los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 2010 rpm.

Después se separó la capa de linfocitos con pipetas Pasteur de vidrio y se colocaron en un tubo para centrífuga con 7 mL de solución de Hanks. Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. Una vez obtenido el botón de células se desechó el sobrenadante y se reemplazó con 7 mL de solución de Hanks. Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, el botón de células se resuspendió en 2 mL de medio RPMI 1640.

2. Viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad se tomaron 10 μ L de suspensión celular y se tiñeron con 10 μ L de colorante dual (bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína) durante 6 minutos a 37 °C. Después se hizo una preparación que se observó en el microscopio de fluorescencia con filtro dual realizando un conteo de 100 células, las cuales se clasificaron en vivas (color verde) y muertas (rojo brillante).

3. Conteo celular

Se tomaron 10 µL de suspensión celular y se colocaron en una cámara de Neubauer para observar en el microscopio óptico. Se realizó un conteo celular de los cuatro cuadrantes de la cámara y para contabilizar el número de células por mL se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Número de células de los 4 cuadrantes} \times 10000}{4}$$

4. Extracto de fresa

Para la elaboración del extracto acuoso de fresa, se utilizaron 500 gramos de la fruta que fueron compradas en un mercado local del Estado de México. Las fresas se lavaron con agua corriente y se enjuagaron con agua destilada, también se les retiró la hoja.

Las fresas fueron maceradas en un mortero, se pusieron al fuego añadiendo 200 mL de agua destilada y se dejó hervir el preparado. La mezcla se mantuvo en ebullición durante 10 minutos, moviéndola siempre con una espátula.

Después se procedió a colar la mezcla con un embudo y papel filtro. También se añadieron 100 mL de agua destilada para ayudar a filtrar. Se obtuvieron 450 mL de extracto filtrado.

El filtrado se repartió en 3 matraces bola y se congeló con nitrógeno líquido para su posterior liofilizado (HETO FD3, Heto-Holten A/S, Denmark). Al finalizar el proceso de liofilización, el extracto se almacenó dentro de un frasco de vidrio y en oscuridad. Se obtuvieron 19.3 gramos finales de material liofilizado de fresa.

5. Preparación y selección de concentración de extracto de fresa

Con la finalidad de obtener una concentración de liofilizado de fresa en los linfocitos, se realizaron pruebas de citotoxicidad y de genotoxicidad.

Se hicieron algunos experimentos preliminares utilizando diferentes tiempos y concentraciones del extracto, a partir de los cuales se seleccionaron las concentraciones 5.0, 0.5 y 0.05 mg/mL para exponer a las células por 4 horas.

Para la preparación de la disolución inicial se utilizó un frasco pequeño de vidrio con tapa y se pesaron 0.14 g de liofilizado de fresa, se añadieron 2.5 mL de agua destilada para disolverlo. Se agitó en un vortex y después se filtró con un millipore de 0.45 μ m.

Una vez preparada esta disolución inicial de 50 mg/mL, con una micropipeta se tomó una alícuota de 100 μ L que se añadió a un microtubo con 900 μ L de agua destilada estéril. De esta forma se obtuvo una dilución 1 con una concentración de 5 mg/mL. Posteriormente, de esta dilución 1 se tomó una alícuota de 100 μ L y se llevó a un microtubo con 900 μ L de agua destilada, así se obtuvo la dilución 2 de 0.5 mg/mL. Finalmente de la dilución 2 se tomó una alícuota de 100 μ L que se añadió a un microtubo con 900 μ L de agua destilada, así se logró la dilución 3 de 0.05 mg/mL.

Se realizó el aislamiento de linfocitos humanos, conteo celular y la determinación de su viabilidad. Se prepararon los microtubos para el tratamiento de las células de la siguiente manera: 50 μ L de extracto de fresa, el volumen de suspensión celular conteniendo 250,000 linfocitos y el medio RPMI 1640 necesario para llegar a un volumen final de 500 μ L. Se dejaron en la incubadora a 37 °C. Transcurrido el tiempo de tratamiento los microtubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Se determinó la viabilidad de las células y se hicieron las laminillas para evaluar la genotoxicidad mediante el ensayo cometa. Para ello se removió el sobrenadante y se tomaron 10 μ L del sedimento, que se pusieron en otro microtubo con 75 μ L de agarosa de punto de fusión bajo, se resuspendió el botón, se tomaron 75 μ L de esta suspensión y se colocaron en un portaobjetos previamente cubierto con agarosa de punto de fusión normal y se les empalmó un cubreobjetos. Para solidificar la agarosa los portaobjetos se pusieron sobre una placa metálica en contacto con hielo, una vez sólida la capa de agarosa, se retiró el cubreobjetos

y se colocó otro con 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión. Cuando se solidificó la tercera capa de agarosa, las laminillas se colocaron en una caja oscura con solución de lisis a pH 10 (NaCl [2.5 M], EDTA [0.1 M], Tris [10 mM], NaOH, DMSO [10%], Triton x-100 [1%]) y se mantuvieron en refrigeración durante al menos 1 hora. Después las laminillas se acomodaron en la cámara de electroforesis, con amortiguador de electroforesis con pH>13 (NaOH y EDTA) y se dejaron en pre electroforesis durante 20 minutos. Posteriormente, se realizó la electroforesis a 300 miliamperios y 25 voltios por 20 minutos. Al finalizar, las laminillas se neutralizaron realizando tres lavados con solución de Tris a pH 7.5 durante 5 minutos cada uno. Para la fijación, las preparaciones se pusieron en cajas coplin con etanol al 100% y se dejaron durante 5 minutos. Las laminillas se tiñeron con 50 microlitros de bromuro de etidio [2 μ g/mL] y se colocaron dentro de una caja de plástico oscura para evitar la interacción de la luz con el colorante. La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus, Carl Zeiss) con filtro de excitación de 515-560 nm y filtro barrera de 590 nm. Para registrar los datos se utilizó el programa computarizado para análisis de imágenes Comet Assay IV (Perceptive Instruments). Los parámetros de daño al ADN empleados fueron la longitud, la intensidad y momento de la cauda.

Se realizó una prueba de Kruskal Wallis con 95 % de confianza y una prueba de Dunn para evaluar las diferencias entre los distintos grupos. Se utilizó el programa Graphpad Prism 6.0 para el análisis estadístico y en la elaboración de las gráficas.

6. Preparación de disoluciones de Benzo[a]antraceno

Las concentraciones de Benzo[a]antraceno utilizadas fueron de 21, 44, 88 y 175 μ M.

Se preparó una disolución madre de Benzo[a]antraceno con 1 mg del HAP que se disolvió en 1 mL de diclorometano, se utilizaron viales ámbar de 2 mL con tapa para evitar la exposición a la luz. Para llegar a las cuatro concentraciones distintas se tomaron alícuotas de la disolución inicial y se colocaron en viales transparentes. Después se realizó una reducción del diclorometano con nitrógeno para cambiar el disolvente. Inmediatamente se añadieron alícuotas de DMSO para cada concentración y se agitaron los viales en un

vortex para disolver el hidrocarburo. Con la finalidad de obtener el volumen final se añadió agua estéril con una microjeringa a los viales y de nuevo se agitaron en vortex.

Las diferentes concentraciones de Benzo[a]antraceno se prepararon el mismo día de su uso.

7. Exposición de linfocitos humanos a Benzo[a]antraceno

7.1 Viabilidad celular y genotoxicidad

Para los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad con Benzo[a]antraceno los microtubos se prepararon como sigue: 50 µL de Benzo[a]antraceno de la concentración correspondiente, 50 µL de mezcla S9 con 4% de fracción microsómica de hígado de rata (Moltox), suspensión celular correspondiente a 250 000 células y el volumen se ajustó a 500 µL con medio RPMI 1640. Los testigos negativos fueron: uno solo con medio y el otro con DMSO al 1 % (disolvente del HAP) y el testigo positivo Benzo [a] pireno 80 µM. Los microtubos se mantuvieron en una incubadora durante 4 horas a 37 °C.

7.2 Antigenotoxicidad

Para este aspecto, el tratamiento se realizó de la misma manera que en el caso anterior solo que aquí los microtubos también contenían 50 µL del extracto de fresa a la concentración seleccionada anteriormente con base en los resultados de viabilidad y genotoxicidad en los linfocitos.

Una vez transcurrido el tiempo de exposición de los linfocitos al tratamiento correspondiente en los incisos a y b, la metodología que se siguió fue la misma que en el punto 5.

VII. RESULTADOS

1. Liofilizado de fresa

Después de realizar el tratamiento de linfocitos humanos con diferentes concentraciones de liofilizado de fresa se obtuvieron los resultados de viabilidad que aparecen en la tabla 1 y de genotoxicidad de la figura 1. Considerando lo obtenido en ambas pruebas se seleccionó la concentración de 0.05 mg/mL para los experimentos de antigenotoxicidad en presencia del benzo(a)antraceno, ya que no fue citotóxica pues la viabilidad tuvo un valor igual al del testigo y tampoco fue genotóxica dado que el promedio de momento de la cauda no fue significativamente diferente del testigo.

Tabla 1. Viabilidad de linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de extracto de fresa por 4 h.

Liofilizado de fresa (mg/mL)	Viabilidad (%)
Testigo	96
0.05	96
0.5	78
5.0	68

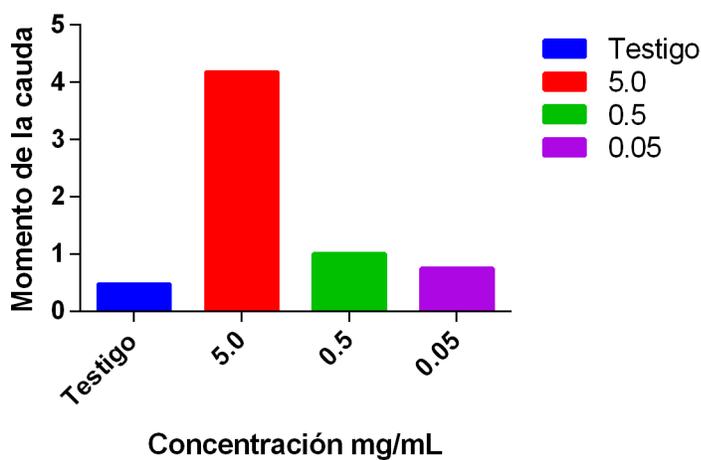


Figura 1. Genotoxicidad en linfocitos humanos de diferentes concentraciones de liofilizado de fresa.

2. Exposición de linfocitos humanos a Benzo[a]antraceno

Para el análisis de resultados se tomaron en cuenta tres parámetros obtenidos con el programa Comet Assay IV: longitud, intensidad (% de ADN) y momento de la cauda. Los promedios de los tratamientos con Benzo[a]antraceno y de Benzo[a]antraceno con liofilizado y sus respectivos errores estándar se muestran en las tablas 2 y 3.

En el caso de la viabilidad celular de los tratamientos con y sin extracto liofilizado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo negativo.

Tabla 2. Citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Benzo[a]antraceno.

Concentración μM	Longitud de la cauda (μm) Promedio \pm E.E	Intensidad de la cauda (%) Promedio \pm E.E	Momento de la cauda Promedio \pm E.E	Viabilidad (%)
Testigo -	30.14 \pm 0.69	3.44 \pm 0.23	0.43 \pm 0.03	95
21	* 98.74 \pm 1.74	* 51.18 \pm 1.47	* 22.17 \pm 0.85	75
44	* 96.71 \pm 1.62	* 47.81 \pm 1.27	* 19.25 \pm 0.69	81
87	* 101.08 \pm 1.71	* 52.70 \pm 1.53	* 23.47 \pm 0.90	74
175	* 104.31 \pm 1.50	* 54.25 \pm 1.32	* 24.56 \pm 0.84	66
Testigo +	* 98.87 \pm 1.64	* 44.65 \pm 1.28	* 15.95 \pm 0.70	92

*Indica las diferencias significativas respecto al testigo negativo ($p < 0.05$). Promedio de 400 datos, obtenidos en dos ensayos.

Tabla 3. Citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Benzo[a]antraceno con liofilizado de fresa. Promedios de longitud, intensidad y momento de la cauda \pm error estándar y % de disminución del daño.

Concentración μM	Longitud de la cauda (μm) Promedio \pm E.E	Disminución de daño (%)	Intensidad de la cauda (%) Promedio \pm E.E	Disminución de daño (%)	Momento de la cauda Promedio \pm E.E	Disminución de daño (%)	Viabilidad (%)
Testigo -	25.62 \pm 0.81		3.39 \pm 0.32		0.43 \pm 0.05		96
Liofilizado	26.84 \pm 0.57		3.14 \pm 0.26		0.28 \pm 0.02		97
Liofilizado + S9	23.64 \pm 0.44		3.43 \pm 0.27		0.33 \pm 0.03		97
21	* 84.78 \pm 1.86	14.14	* 33.98 \pm 1.33	33.59	* 13.88 \pm 0.78	37.37	90
44	* 115.53 \pm 2.90	0	* 37.06 \pm 1.21	22.49	* 17.04 \pm 0.73	11.5	88
87	* 87.62 \pm 1.62	13.31	* 43.28 \pm 1.41	17.88	* 16.98 \pm 0.76	27.64	73
175	* 90.11 \pm 1.60	13.61	* 39.93 \pm 1.36	26.39	* 15.82 \pm 0.76	35.56	75
Testigo +	* 76.59 \pm 1.21	22.53	* 22.70 \pm 0.73	49.15	* 5.12 \pm 0.21	67.9	94

*Indica diferencias significativas contra el testigo negativo con liofilizado ($p < 0.05$).

Promedio de 400 datos, obtenidos en dos ensayos.

Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se detectaron diferencias con un 95 % de confianza en los tratamientos con Benzo[a]antraceno. Las concentraciones de 21, 44, 87 y 175 μM de Benzo[a]antraceno, mostraron diferencias significativas con una $p < 0.05$ respecto al testigo negativo (Tabla 2). Después se analizaron los datos utilizando la prueba de Dunn para identificar las concentraciones diferentes entre sí; siendo 44 μM la que resultó ser significativamente distinta de las otras concentraciones en la longitud, intensidad y momento de la cauda (Figura 2).

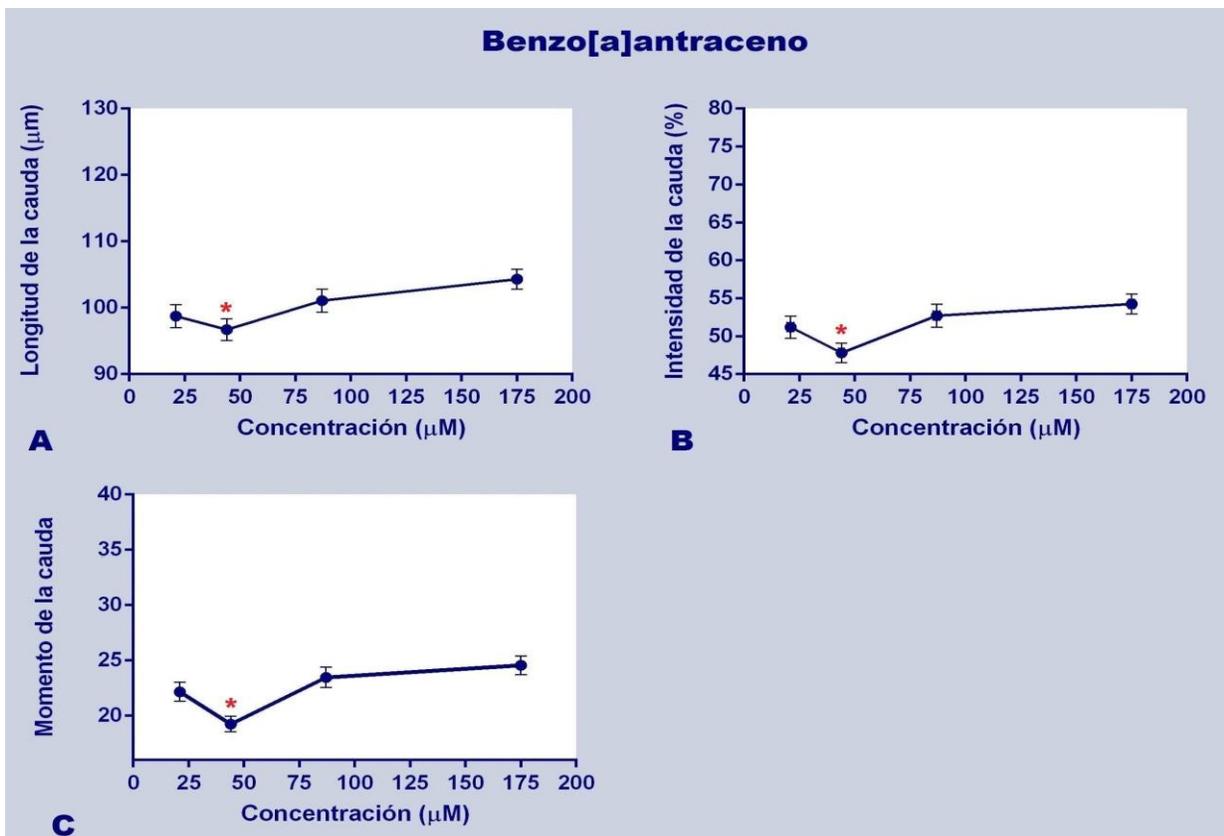


Figura 2. Las gráficas A, B y C muestran la respuesta genotóxica de linfocitos humanos a diferentes concentraciones del Benzo[a]antraceno. *Indica la concentración de 44 μM que presentó $p < 0.05$. Cada punto en la gráfica representa el promedio de 400 datos, obtenidos en dos ensayos. Las barras indican el error estándar.

En los 3 parámetros de daño genético evaluados (la longitud, intensidad y momento de la cauda), el testigo positivo (BaP 80 μM) resultó significativo al compararse con el testigo negativo (Tabla 2). En la figura 2 se observa la respuesta concentración-efecto del Benzo[a]antraceno, en las gráficas B y C se muestra que la concentración de 44 μM presentó diferencias significativas con 87 y 175 μM ; sin embargo 21, 87 y 175 μM no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, por lo que no se observa un incremento del efecto de este HAP al aumentar la concentración.

3. Exposición de linfocitos humanos a Benzo[a]antraceno con extracto de fresa

En este caso, también se evaluaron tres parámetros; longitud, % de intensidad y momento de la cauda. Primero se realizó una prueba de Kruskal-Wallis con 95 % de confianza y se obtuvieron diferencias significativas para los tres parámetros.

Mediante la prueba de Dunn se encontró que los tratamientos de Benzo[a]antraceno con liofilizado de fresa presentaron diferencias significativas en la longitud, intensidad y momento de la cauda contra el testigo negativo (Tabla 3). En cuanto a la concentración-efecto del Benzo[a]antraceno en presencia del extracto no se observó incremento del efecto al aumentar la concentración (Fig. 4). En la gráfica A únicamente 44 μM presentó $p < 0.05$; en B entre 21 y 87 μM se notó un cambio significativo y en C, se observó un ligero aumento de 21 a 44 μM .

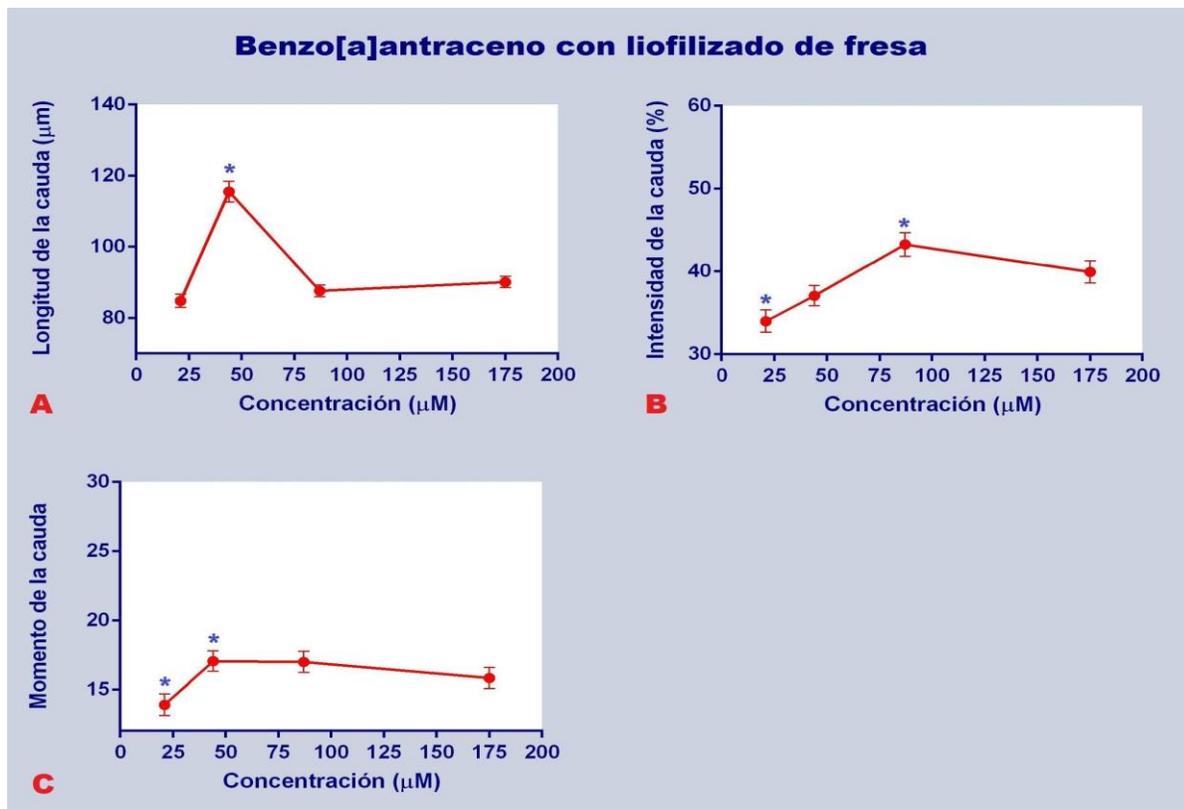


Figura 3. Las gráficas A, B y C muestran la respuesta del Benzo[a]antraceno con liofilizado de fresa en longitud, intensidad y momento de la cauda en linfocitos humanos

al aumentar la concentración. Cada punto en la gráfica representa el promedio de 400 datos, obtenidos en dos ensayos. Las barras indican el error estándar. * Indica las diferencias significativas.

Se compararon también los tratamientos de Benzo[a]antraceno con y sin extracto de fresa. Para la longitud de la cauda, se presentaron los siguientes resultados:

- A 21 μM de Benzo[a]antraceno con liofilizado se obtuvo una $p < 0.05$ contra 21 μM sin liofilizado (Fig. 4).
- A 87 μM de Benzo[a]antraceno con liofilizado se encontró una diferencia significativa con $p < 0.05$ contra 87 μM sin liofilizado (Fig. 4).
- A 175 μM de Benzo[a]antraceno con liofilizado se presentó una diferencia significativa con $p < 0.05$ contra 175 μM sin liofilizado (Figura 4).

Para el % de intensidad de la cauda, se encontró lo siguiente:

- A 21, 44, 87 y 175 μM de Benzo[a]antraceno con el extracto obtuvieron diferencias significativas con $p < 0.05$ contra 21, 44, 87 y 175 μM sin liofilizado, respectivamente (Fig. 5).

En la evaluación del momento de la cauda, se obtuvo lo siguiente:

- A 21 μM de Benzo[a]antraceno con liofilizado de fresa se obtuvo una diferencia significativa con $p < 0.05$ contra 21 μM de Benzo[a]antraceno sin liofilizado (Fig. 6).
- A 87 μM de Benzo[a]antraceno con liofilizado se obtuvo una $p < 0.05$ contra 87 μM sin liofilizado (Fig. 6).
- A 175 μM Benzo[a]antraceno con liofilizado se presentaron diferencias significativas $p < 0.05$ contra 175 μM sin liofilizado (Fig. 6).

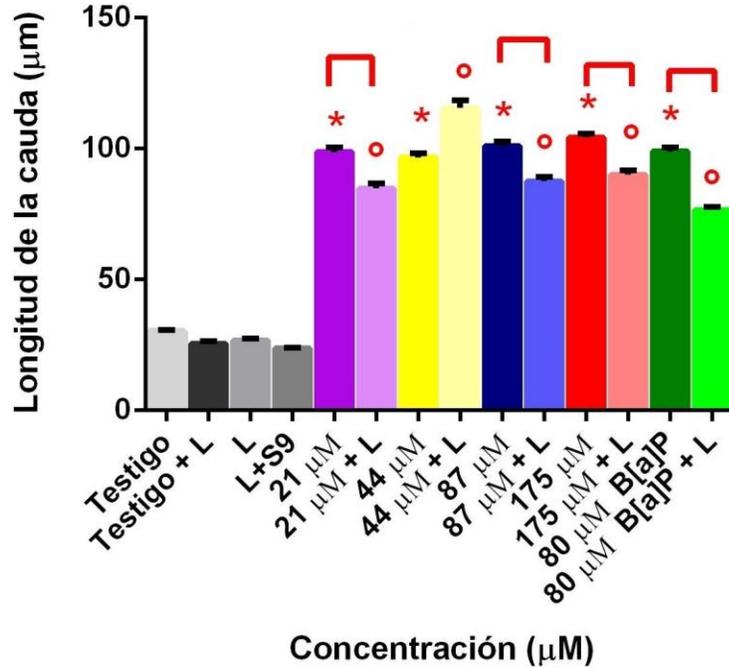


Figura 4. Respuesta genotóxica (longitud de la cauda) de linfocitos humanos a Benzo[a]antraceno en ausencia y presencia de liofilizado de fresa (L). Se incluye el testigo positivo (B[a]P). * Indica las diferencias significativas encontradas entre el testigo negativo y los tratamientos con Benzo[a]antraceno y B[a]P en ausencia de liofilizado de fresa $p < 0.05$. ° Indica las diferencias significativas encontradas entre el testigo negativo (Testigo + L) y los tratamientos con Benzo[a]antraceno y B[a]P en presencia de liofilizado de fresa. ⌈ Indica las diferencias significativas entre los tratamientos con y sin liofilizado.

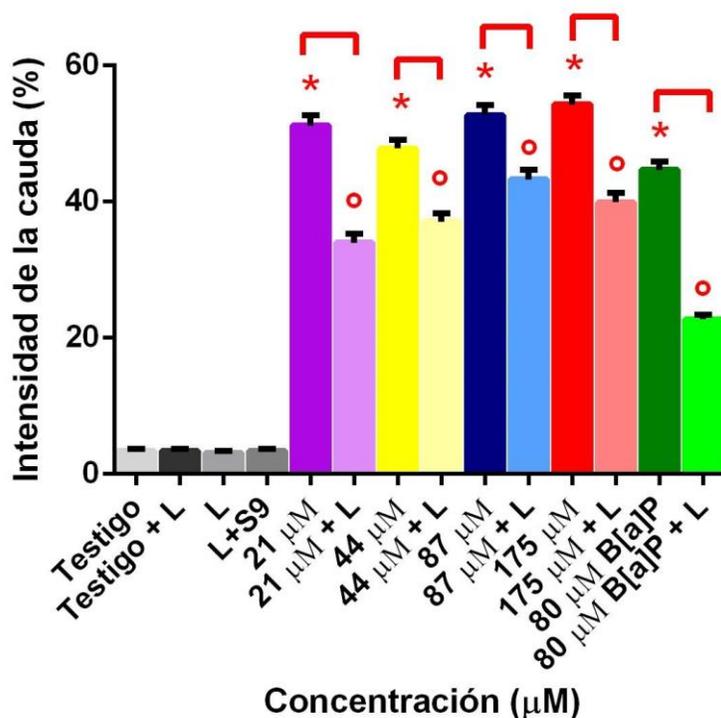


Figura 5. Respuesta genotóxica (Intensidad de la cauda) de linfocitos humanos a Benzo[a]antraceno en ausencia y presencia de liofilizado de fresa (L). Se incluye el testigo positivo (B[a]P). * Indica las diferencias significativas encontradas entre el testigo negativo y los tratamientos con Benzo[a]antraceno y B[a]P en ausencia de liofilizado de fresa $p < 0.05$. ° Indica las diferencias significativas encontradas entre el testigo negativo (Testigo + L) y los tratamientos con Benzo[a]antraceno y B[a]P en presencia de liofilizado de fresa. ∩ Indica las diferencias significativas entre los tratamientos con y sin liofilizado.

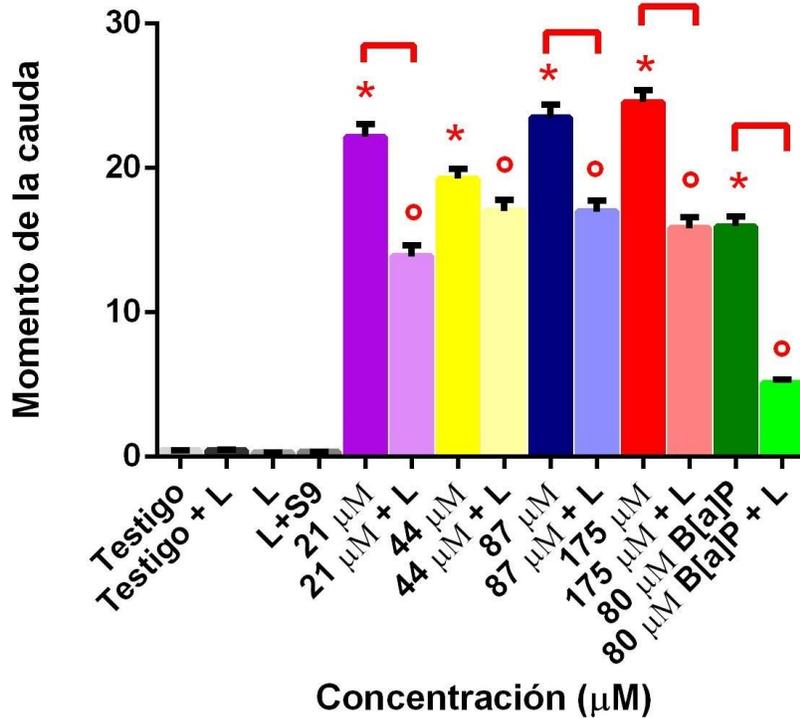


Figura 6. Respuesta genotóxica (Momento de la cauda) de linfocitos humanos a Benzo[a]antraceno en ausencia y presencia de liofilizado de fresa (L). Se incluye el testigo positivo (B[a]P). * Indica las diferencias significativas encontradas entre el testigo negativo y los tratamientos con Benzo[a]antraceno y B[a]P en ausencia de liofilizado de fresa $p < 0.05$. ° Indica las diferencias significativas encontradas entre el testigo negativo (Testigo + L) y los tratamientos con Benzo[a]antraceno y B[a]P en presencia de liofilizado de fresa. □ Indica las diferencias significativas entre los tratamientos con y sin liofilizado.

Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones de Benzo[a]antraceno y los tratamientos del HAP con liofilizado indican que se produjo una ligera disminución del efecto del hidrocarburo en presencia del liofilizado.

Al añadir el liofilizado a los tratamientos se obtuvo una disminución de los promedios para los tres parámetros evaluados. En la tabla 3 se muestra el porcentaje de disminución de daño, en la longitud de la cauda se observan reducciones entre 13.31 y 14.14 %, para el % de intensidad de la cauda, 17.88 y 33.59 % y para el momento de la cauda 11.5 y 37.37%. El porcentaje de disminución de daño más alto fue de 67.9 % mostrado por el testigo positivo con Benzo[a]pireno para el momento de la cauda.

VIII. DISCUSIÓN

1. Genotoxicidad de Benzo[a]antraceno

En el análisis estadístico, los datos de las concentraciones de 21, 44, 88, y 175 μM de Benzo[a]antraceno mostraron una $p < 0.05$, esto puede ser indicador del efecto dañino de este compuesto sobre los linfocitos. Para inducir actividad genotóxica o carcinogénica los HAP requieren activación metabólica, la familia de enzimas P450 entre las que se encuentran CYP1A1, 1A2 y 1B1 están involucradas en la activación de varios HAP como el Benzo[a]pireno (Shimada y Fujii- Kuriyama, 2004). Las enzimas CYP1A1 transforman el B[a]P en BP-7,8-epóxido, con la epóxido hidrolasa éste se transforma en BP-7,8-dihidrodiol y finalmente con CYP1A1 resulta el metabolito reactivo carcinógeno final BP-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido (BPDE). Este mecanismo de activación también ocurre en otros HAP (Moorthy *et al.*, 2015; Jarvis *et al.*, 2014).

Al metabolizarse, el Benzo[a]antraceno forma compuestos con actividad carcinogénica como los dioles epóxido capaces de interaccionar con moléculas como el ADN (Gray y Hall, 2014); debido a este potencial está clasificado por la IARC como probable carcinógeno humano. Song y colaboradores (2012) reportan la formación de Benzo[a]antraceno-3,4-diol-1,2-epóxido en células HepG2 expuestas a Benzo[a]antraceno, el metabolito exhibió citotoxicidad y genotoxicidad mayores que el compuesto original.

El aumento significativo en la longitud, % de intensidad y momento de la cauda respecto al testigo negativo podrían revelar la actividad metabólica del Benzo[a]antraceno, la cual puede atribuirse al sistema de activación metabólica S9, pues de acuerdo con los resultados obtenidos por Rodríguez-Romero *et al.* (2012), la fracción S9 de hígado de mamífero fue capaz de inducir la actividad metabólica de otros HAP (Benzo[a]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno, entre otros) en linfocitos humanos, produciendo la fragmentación del ADN y aumentando significativamente la longitud de la cauda.

La transformación de los HAP por enzimas metabólicas produce la formación de diol-epóxidos y quinonas capaces de interaccionar con el ADN y producir aductos que pueden ocasionar desajustes en la replicación del ADN teniendo como consecuencia la formación

de tumores. Los metabolitos producidos por los HAP también son capaces de aumentar las especies reactivas de oxígeno que pueden afectar al ADN y proteínas e iniciar un proceso de carcinogénesis (Moorthy *et al.*, 2015).

En la longitud, % de intensidad y momento de la cauda, no se observó un aumento significativo de la respuesta del Benzo[a]antraceno al incrementar la concentración. Esto coincide con lo reportado por Frölich y Würigler (1990) al evaluar el efecto genotóxico del Benzo[a]antraceno y otros HAP en cepas de *Drosophila melanogaster*. A bajas concentraciones el HAP (0-10 mM) mostró una respuesta dosis dependiente, sin embargo en concentraciones entre 10 y 25 mM el efecto se mantuvo constante y a concentraciones más elevadas como 100 mM no se produjeron efectos mayores. Los autores lo interpretaron como una saturación de los sistemas de activación del citocromo P450 (Frölich y Würigler, 1990).

Sin embargo, estudios realizados con Benzo[a]pireno en la línea celular HepG2 han mostrado efecto dosis-dependiente aumentando el % de intensidad y el momento de la cauda a concentraciones de 25 a 100 μ M (Delgado *et al.*, 2008); en el caso de linfocitos humanos *in vitro* Rodríguez-Romero *et al.* (2012) han reportado que el hidrocarburo aromático policíclico Benzo[b]fluoranteno muestra un efecto dependiente de la dosis aumentando la longitud de la cauda a concentraciones de 20 a 80 μ M. Los autores mencionan que el efecto genotóxico causado por los HAP en linfocitos humanos depende de su estructura química, concentración y activación metabólica para producir compuestos intermedios que son capaces de dañar el ADN. Para el Benzo[a]antraceno, Seo y Lee (2011) reportan un incremento dependiente de la dosis para el momento de la cauda a concentraciones de 1 a 50 μ M en linfocitos humanos, por lo que la diferencia con los resultados concentración-efecto obtenidos en el presente trabajo puede deberse a las concentraciones utilizadas. No obstante, la citotoxicidad se vio incrementada a medida que aumentó la concentración de Benzo[a]antraceno.

El aumento en la longitud, % de intensidad y momento de la cauda producidos por la exposición a Benzo[a]pireno indican daño al ADN de los linfocitos, coincidiendo con lo reportado por Rodríguez-Romero *et al.* (2012) que observaron un aumento en la longitud

de la cauda de los cometas en linfocitos humanos expuestos a Benzo[a]pireno. Entre los efectos ocasionados por este HAP está la inducción de daños al ADN en linfocitos de sangre periférica, macrófagos alveolares y células de pulmón en ratas expuestas a Benzo[a]pireno (Garry *et al.*, 2003).

Respecto a la viabilidad, las células tratadas con Benzo[a]antraceno no mostraron diferencias significativas respecto al testigo negativo. Rodríguez-Romero *et al.* (2012) reportan que la viabilidad de linfocitos humanos expuestos a distintos HAP(dibenzo[a,h]antraceno, benzo[ghi]perileno, benzo[b]fluoranteno y benzo[a]pireno), no se modificó significativamente respecto a los testigos negativos. Para el Benzo[a]pireno la viabilidad fue mayor al 90%, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

2. Efecto del liofilizado de fresa en células expuestas a Benzo[a]antraceno

Se llevó a cabo la exposición de los linfocitos al liofilizado de fresa para observar el efecto producido sin hidrocarburo. De las tres concentraciones utilizadas la de 0.05 mg/mL mostró ser más adecuada debido a que no tuvo efecto citotóxico ni genotóxico en los linfocitos. En la figura 1 se observa el promedio del momento de la cauda producido por las diferentes concentraciones de liofilizado. El consumo regular de fresas se ha asociado a la reducción de los niveles de colesterol total, en un estudio realizado en 23 voluntarios sanos donde se incluyeron fresas en su dieta se observó un mejoramiento en el estado antioxidante del plasma sanguíneo y en la función plaquetaria (Álvarez *et al.*, 2014).

En la tabla 3, se muestra una disminución del % de intensidad de la cauda en los linfocitos tratados con Benzo[a]antraceno y el extracto de fresa, al estar este parámetro relacionado con la frecuencia de rompimiento del ADN (Azqueta y Collins, 2013) se sugiere que esta última pudo haber disminuido con el liofilizado. También puede observarse la reducción del momento de la cauda (Tabla 3) según Azqueta y Collins (2013) este parámetro resultante del producto de la longitud por la intensidad de la cauda proporciona una sensibilidad similar a la otorgada por el % de intensidad de la cauda, por lo que estos parámetros presentan porcentajes de disminución de daño mayores y similares entre ellos en comparación con la longitud de la cauda.

El Benzo[a]pireno está clasificado por la IARC en el Grupo 1 como cancerígeno para los seres humanos. Debido a sus conocidos efectos cancerígenos, ha sido utilizado como referencia para la carcinogenicidad de otros HAP en diversos estudios (Moorthy *et al.*, 2015; Liamin *et al.*, 2017). Se sugiere que el extracto de fresa tuvo un efecto en el descenso del daño producido por Benzo[a]pireno en linfocitos humanos *in vitro*, al disminuir de forma significativa la longitud, % de intensidad y momento de la cauda en porcentajes de 22.53, 49.15 y 67.9 %, respectivamente. Estos datos muestran que el efecto del liofilizado fue mayor con el Benzo[a]pireno que con el Benzo[a]antraceno.

El liofilizado tuvo un ligero efecto en la disminución del daño al ADN ocasionado por el Benzo[a]antraceno. Esto coincide con un trabajo realizado por Giampieri *et al.* (2012a) donde se evaluó la actividad de un extracto de fresa sobre cultivo de fibroblastos humanos con daño provocado por luz ultravioleta A. La intensidad de la cauda disminuyó significativamente cuando se agregó el extracto de fresa a concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/mL.

En diversas investigaciones realizadas con fresas, se han identificado fitoquímicos, entre los que destacan compuestos fenólicos y los carotenoides mostrando una relación con el bienestar en la salud humana (Liu, 2013). Existen varios estudios llevados a cabo *in vivo* entre los que se encuentra uno realizado en ratas Fischer cuya dieta incluyó fresas liofilizadas, se observó la inhibición de tumores en el esófago de las ratas causados por exposición al carcinógeno n-nitroso-metilbencilamina (NMBA). Las ratas fueron alimentadas antes, durante y después de la exposición con una dieta dónde se incluyó el liofilizado de fresa (Stoner *et al.*, 2006). En otro estudio realizado se evaluó el efecto protector ocasionado por el consumo de fresa sobre el estrés oxidante inducido por doxorubicina (fármaco utilizado en quimioterapia) en ratas. Se concluyó que la ingesta de fresas tuvo efecto protector contra la toxicidad de este compuesto en plasma, hígado y mitocondrias (Giampieri *et al.*, 2016). Estos resultados son similares a los reportados por Diamanti *et al.* (2014) dónde se realizó una intervención dietética en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) con liofilizado de fresa; las ratas presentaron una disminución significativa del daño al ADN causado por doxorubicina.

La fresa es una gran fuente de compuestos fenólicos como los flavonoides (antocianinas) taninos hidrolizables y ácidos fenólicos (Giampieri *et al.*, 2012). Se ha investigado el papel individual de estos compuestos presentes en fresas y otras frutas, por ejemplo; el ácido tánico se encuentra en frutas como uvas y fresas y se ha reportado que este compuesto es capaz de reducir la formación de aductos causados por BPDE en epidermis de ratón, además de modular la actividad de enzimas metabolizadoras de xenobióticos en hígado y riñón de estos organismos (Szaefer *et al.*, 2004). Los compuestos fenólicos han demostrado tener capacidad para inhibir la actividad de las enzimas del citocromo P450, involucradas en la activación de procarcinógenos como los HAP y en la activación de sistemas enzimáticos relacionados con la desintoxicación de xenobióticos (Vattem y Shetty, 2005).

Las interacciones entre el Benzo[a]antraceno y el liofilizado no están claras, sin embargo se observa una respuesta en la disminución del porcentaje de daño al añadir el liofilizado en los tratamientos. Probablemente la acción de los diversos fitoquímicos presentes en la fresa tengan un papel importante en el efecto observado con el Benzo[a]antraceno, autores como Bassu *et al.* (2010) han realizado trabajos en los cuales se utilizan extractos de fresa y arándanos liofilizados observando que tienen efectos benéficos en perfiles de glucosa y lípidos en plasma de personas con padecimientos como diabetes tipo 1 y 2. Giampieri *et al.* (2012b) han realizado estudios *in vitro* en cultivo de fibroblastos humanos expuestos a radiación ultravioleta A, el extracto de fresa mostró tener actividad fotoprotectora en los fibroblastos expuestos aumentando la viabilidad celular y disminuyendo el daño al ADN. Los resultados en los diversos estudios muestran beneficios potenciales de la fresa. Es importante considerar que la gran variedad de compuestos y micronutrientes que contienen los alimentos de origen vegetal como las frutas pueden actuar en conjunto, en contraste con la mayoría de éstos se investigan individualmente (Azqueta y Collins, 2016).

El ensayo cometa ha resultado ser una técnica eficiente y sensible en estudios sobre el daño en ADN de distintas poblaciones celulares y en investigaciones de biomonitorio humano (Garry *et al.*, 2003; Rodríguez-Romero *et al.*, 2012). Es un procedimiento sencillo, rápido, de bajo costo y puede ser aplicada en diversos organismos *in vivo* e *in vitro*. Además de que ofrece grandes ventajas para la evaluación genotóxica de productos de la industria química, fármacos, principios activos, agroquímicos y en el biomonitorio ambiental y humano (Ansoar *et al.*, 2015).

IX. CONCLUSIONES

Mediante el ensayo cometa se observó que el hidrocarburo aromático policíclico Benzo[a]antraceno produjo daño genotóxico en linfocitos humanos *in vitro*. La exposición al HAP provocó un aumento significativo en la longitud, intensidad y momento de la cauda en todas las concentraciones.

Se observó una disminución en la longitud, intensidad y momento de la cauda, en los linfocitos expuestos a Benzo[a]antraceno con liofilizado de fresa.

Cuando las células se expusieron al Benzo[a]pireno (testigo positivo) junto con el extracto de fresa la antigenotoxicidad fue considerable. Por lo tanto, el liofilizado exhibió un efecto sobre la actividad genotóxica de dos hidrocarburos aromáticos policíclicos.

X. REFERENCIAS

Afrin, S., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Reboredo-Rodriguez, P., Mezzetti, B., Varela-López, A., Giampieri, F., Battino, M. (2016). Promising health benefits of the strawberry: a focus on clinical studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), 4435-4449.

Álvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., Tulipani, S., Casoli, T., Di Stefano, G., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Busco, F., Quiles, J.L., Cordero, M.D., Bompadre, S., Mezzetti, B., Batino, M. (2014). One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(3), 289-294.

Amador-Muñoz, O., Rodríguez-Delgado, A., Villalobos-Pietrini, R., Munive-Colín, Z., Ortiz-Marttelo, R., Bravo-Cabrera, J.L. Gómez-Arroyo, S. (2001). Partículas suspendidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el suroeste de la Ciudad de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 17(4), 193-204.

Ansoar-Rodríguez, Y., Fontanetti, C.S., Christofolletti, C.A., del Carmen Díaz-Llera, S. (2015). Aplicaciones del ensayo cometa en genética ecotoxicológica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 51-62.

Aruoma, O. I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 32(7), 671-683.

Azqueta, A., Collins, A. (2016). Polyphenols and DNA damage: A mixed blessing. *Nutrients*, 8(12), 785.

Azqueta, A., Collins, A.R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87(6), 949-968.

Azqueta, A., Ladeira, C., Giovannelli, L., Boutet-Robinet, E., Bonassi, S., Neri, M., Gajski, G., Duthie, S., Del Bo, C., Riso, P., Koppen, G., Basaran, N., Collins, A., Møller, P. (2020). Application of the comet assay in human biomonitoring: An COMET perspective. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 783, 108288.

Basu, A., Rhone, M., Lyons, T.J. (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular Health *Nutrition Reviews*, 68(3), 168-177.

Bolden, A.L., Rochester, J.R., Schultz, K., Kwiatkowski, C.F. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and female reproductive health: A scoping review. *Reproductive Toxicology*, 73, 61-74.

Calderón-Segura, M.E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Butterworth, F.M., Amador-Muñoz, O. 2004. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 558(1), 7-17.

Cioroiu, B.I., Tarcau, D., Cucu-Man, S., Chisalita, I., Cioroiu, M. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in lung tissue of patients with pulmonary cancer from Romania. Influence according as demographic status and ABO phenotypes. *Chemosphere*, 92(5), 504-511.

Delgado, M. E., Haza, A. I., Arranz, N., García, A., Morales, P. (2008). Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo (a) pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *European Journal of Nutrition*, 47(8), 479.

Diamanti, J., Mezzetti, B., Giampieri, F., Álvarez-Suarez, J. M., Quiles, J.L., González-Alonso, A., Ramírez-Tortosa M.C., Granados-Principal, S., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Battino, M. (2014). Doxorubicin-induced oxidative stress in rats is efficiently counteracted by dietary anthocyanin differently enriched strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3935-3943.

Fresa Mexicana. (2017). 1st ed. [ebook] Ciudad de México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), p.2. Disponible en <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf> [Acceso 27 de marzo, 2020].

Frölich, A., Würgler, F.E. (1990). Drosophila wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 234(2), 71-80.

Galli, E., Feijoó, L. (2002). Citocromo P-450 y su importancia clínica: revisión actualizada. *Revista de Neuro-Psiquiatría*, 65(3-4), 187-201.

Garry, S., Nesslany, F., Aliouat, E., Haguenoer, J. M., Marzin, D. (2003). Assessment of genotoxic effect of benzo [a] pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2), 33-43.

Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T.Y., Giampieri, F., Afrin, S., Mezzetti, B., Quiles, J.L., Bompadre, S., Battino, M. (2017). Protective effect of strawberry extract against inflammatory stress induced in human dermal fibroblasts. *Molecules*, 22(1), 164.

Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T.K., Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1369.

Giampieri, F., Álvarez-Suárez, J. M., Tulipani, S., González-Paramàs, A. M., Santos-Buelga, C., Bompadre, S., Quiles, J. L., Mezzetti, B., Battino, M. (2012b). Photoprotective potential of strawberry (*Fragaria x ananassa*) extract against UV-A irradiation damage on human fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(9), 2322-2327.

Giampieri, F., Álvarez-Suárez, J.M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T.Y., Afrin, S., Bompadre, S., Rubini, C., Zizzi, A., Astolfi, P., Santos-Buelga, C., González-Paramàs, A.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M. (2016). Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 94, 128-137.

Giampieri, F., Tulipani, S., Álvarez-Suárez, J.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M. (2012a). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), 9-19.

Gray, J.P., Hall, G.J., (2014). Benz[a]anthracene en P. Wexler(Ed.), *Encyclopedia of Toxicology*, (3 ed., pp. 413-414) Elsevier Science Publishing Co Inc.

Disponible en

www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123864543002475?via%3Dihub

Heo, H.J., Lee, C.Y. (2005). Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1984-1989.

Ince, O.K., Ince, M. (2019). Using box-behnken design approach to investigate benzo[a]anthracene formation in smoked cattle meat samples and it's risk assessment. *Journal of Food Science and Technology*, 56(3), 1287-1294.

International Agency for Research on Cancer. (2020). IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Recuperado 6 marzo, 2020, de <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>

Jarvis, I.W., Dreij, K., Mattsson, Å., Jernström, B., Stenius, U. (2014). Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology*, 321, 27-39.

Koppen, G., Azqueta, A., Pourrut, B., Brunborg, G., Collins, A.R., Langie, S.A. (2017). The next three decades of the comet assay: A report of the 11th International Comet Assay Workshop.

Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A.N. (2009). Comet assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 53-64.

Ledezma, S.R., González, G.D., Velázquez, A.M., Contreras, A.L. (2015). Hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos respirables en aerosol atmosférico del sur de la Ciudad de México. *Revista de Zoología*, (26), 29-48.

Liamin, M., Boutet-Robinet, E., Jamin, E. L., Fernier, M., Khoury, L., Kopp, B., Le Ferrec, E., Vignard, J., Audebert, M., Sparfel, L. (2017). Benzo [a] pyrene-induced DNA damage associated with mutagenesis in primary human activated T lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, 137, 113-124.

Liu, R.H. (2013). Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in Nutrition*, 4(3), 384S-392S.

Lu, Y., Liu, Y., Yang, C. (2017). Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. *Journal of Visualized Experiments*, (128), e56450.

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(1), 27-36.

Moorthy, B., Chu, C., Carlin, D.J. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicological Sciences*, 145(1), 5-15.

Morales-Delgado, D.Y., Téllez-Medina, D.I., Rivero-Ramírez, N.L., Arellano-Cárdenas, S., López-Cortez, S., Hernández-Sánchez, H., Gutiérrez-López, G., Cornejo-Mazón, M. (2014). Effect of convective drying on total anthocyanin content, antioxidant activity and cell morphometric parameters of strawberry parenchymal tissue (*Fragaria x ananassa* Dutch). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 179-187.

Mugica, V., Hernández, S., Torres, M., García, R. (2010). Seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure levels in Mexico City. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 60(5), 548-555.

National Cancer Institute USA. (2020). Benz[a]anthracene. Acceso 10 marzo, 2020, de https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C44334

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Benz[a]anthracene, CID=5954, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benz_a_anthracene (acceso 6 de marzo, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 4',6-Diamidino-2-phenylindole, CID=2954, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4_6-Diamidino-2-phenylindole (acceso 19 mayo, 2020)

Olsson, M.E., Andersson, C.S., Oredsson, S., Berglund, R.H., Gustavsson, K.E. (2006). Antioxidant levels and inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* by extracts from organically and conventionally cultivated strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1248-1255.

Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E., Fundora Torres, M.T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(2), 184-194.

Rodríguez-Romero, M. I. (2011). Evaluación de los niveles del aducto 8-OHdG y fragmentación del ADN en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a hidrocarburos aromáticos policíclicos con y sin activación metabólica animal / Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

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.

Seo, Y. N., Lee, M. Y. (2011). Inhibitory effect of antioxidants on the benz [a] anthracene-induced oxidative DNA damage in lymphocyte. *Journal of Environmental Biology*, 32(1), 7-10.

Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Science*, 95(1), 1-6.

Song, M. K., Kim, Y. J., Song, M., Choi, H. S., Park, Y. K., Ryu, J. C. (2012). Formation of a 3, 4-diol-1, 2-epoxide metabolite of benz [a] anthracene with cytotoxicity and genotoxicity in a human in vitro hepatocyte culture system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 33(2), 212-225.

Speit, G., Rothfuss, A. (2012). The comet assay: A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. En: *DNA Repair Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 79-90

Stoner, G.D., Chen, T., Kresty, L.A., Aziz, R.M., Reinemann, T., Nines, R. (2006). Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries: potential mechanisms. *Nutrition and Cancer*, 54(1), 33-46.

Sunjog, K., Kolarević, S., Héberger, K., Gačić, Z., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., Lenhardt, M. (2013). Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking differences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(14), 4879-4885.

Szaefer, H., Cichocki, M., Brauze, D., Baer-Dubowska, W. (2004). Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. *Nutrition and Cancer*, 48(1), 70-77.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, 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(3), 206-221.

Ubilla, C., Yohannessen, K. (2017). Contaminación atmosférica efectos en la salud respiratoria en el niño. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(1), 111-118.

Vattem, D. A., Shetty, K. (2005). Biological functionality of ellagic acid: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 234-266.

Villalobos-Pietrini, R., Amador-Muñoz, O., Flores-Márquez, A.R., Guzmán-Rincón, J., Munive-Colín, Z., Hernández-Mena, L., Murillo-Tovar M., Gómez-Arroyo, S.,

Waliszewski, S.M. (2008). Materia orgánica extraída de las aeropartículas de la Ciudad de México y sus efectos genotóxicos. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-biológicas*, 11(2), 105-109.

Villalobos-Pietrini, R., Amador-Muñoz, O., Waliszewski, S. M., Hernández Mena, L., Munive-Colín, Z., Gómez-Arroyo, S., Bravo-Cabrera, 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.

Villalobos-Pietrini, R., Hernández-Mena, L., Amador-Muñoz, O., Munive-Colín, Z., Bravo-Cabrera, J.L., Gómez-Arroyo, S., Frías-Villegas, A., Waliszewski, S.M., Ramírez-Pulido, J., Ortiz-Muñiz, R. (2007). Biodirected mutagenic chemical assay of PM 10 extractable organic matter in southwest México City. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 634(1), 192-204.

Xue, W., Warshawsky, D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206(1), 73-93.

Zuñiga, L. (2009). Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana [Tesis Doctoral]. *Universidad Autónoma de Barcelona*.

XI. ANEXO

Por medio de la presente,

_____ de manera libre,
autorizo a ser sometido (a) la toma de muestra de sangre que será
practicada el día _____ del mes de _____ del año _____.

Para que se realice con ella el estudio de electroforesis unicelular alcalina o
ensayo cometa.

Previamente se me informó que no representa ningún riesgo para mi salud,
pues consiste en la toma de 7 mL de sangre del antebrazo que será
realizada con material nuevo, estéril y al término de su uso será desechado
en mi presencia.

Aplicando al principio de confidencialidad, autorizo a que se utilice la
información que he proporcionado para que se publique únicamente con
fines de investigación, respetando mi integridad y privacidad.

Nombre y firma