



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE LAS
ANTOCIANINAS DE MAÍZ AZUL EN LINFOCITOS
HUMANOS AISLADOS Y SENSIBILIZADOS *IN
VITRO* CON EL AGENTE CLASTOGÉNICO
BLEOMICINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

PEDRO ANTONIO GAMA LÓPEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. JOSEFINA CÓRTEZ ESLAVA**

2017

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



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.

1. Datos del alumno

Gama
López
Pedro Antonio
55 42 24 72 08
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
413101325

2. Datos del tutor.

Dra.
Josefina
Cortés
Eslava

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Sandra Luz
Gómez
Arroyo

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Ana Rosa
Flores
Márquez

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Rosario
Ortiz
Hernández

7. Datos del trabajo escrito

Potencial antigenotóxico de las antocianinas de maíz azul en linfocitos humanos aislados y sensibilizados in vitro con el agente clastogénico bleomicina.
57p.
2017

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a la **Dra. Josefina Cortés Eslava**, por todo el apoyo incondicional que me ha brindado, por su entusiasmo, sus asesorías, consejos y por el aliento que me dio para la realización de este trabajo.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su comprensión que me permitió realizar todas las actividades que desempeñé durante el tiempo que estuve en el taller.

Agradezco enormemente a la M. en C. Ana Rosa Flores Márquez por su apoyo técnico, su tiempo y sus consejos.

Agradezco a mi madre **Felix López Honorato** por su infinito apoyo, amor y comprensión. A mis hermanas Edith, Araceli, Sandra y Ani porque siempre estuvieron conmigo en las buenas y en las malas, porque a pesar de todo siempre creyeron en mí y en mis locuras. Sin ustedes esto no sería posible.

Agradezco a todas las personas que me apoyaron en esta travesía, a mi abuelita Luisa Honorato, a la Señora Egai Hernández, a Leticia Manzano, que siempre estuvieron al pendiente de mí. Al Dr. Federico Aguilar que siempre me atendió. A Gustavo Palestina y la Dra. Clara Esquivel Huesca por motivarme y apoyarme en mis proyectos, y, a toda la gente que incondicionalmente me brindó apoyo de muchas formas, a la Comunidad Joyas del Derramadero, por recordarme muchas cosas importantes de la vida y por su cálido hospedaje, así mismo a la familia Novelo Pech.

Agradezco al Dr. Francisco Arenas Huertero, a la Dra. María del Pilar Eguía Aguilar por brindarme apoyo técnico en el cultivo de mis experimentos, y, a Carmen por sus buenas preguntas y tiempo. A la Dra. Ma. Carmen Calderón Ezquerro y al Dr. Cesar Guerrero Guerra por su apoyo para obtener las fotografías al fotomicroscopio.

A todas las personas del laboratorio que me apoyaron incondicionalmente, en especial a Victoria Carrillo, a Lizbeth Rivera, Yulia Hernández, Janet Renteria, Ximena Huerta, Denisse Badillo, Miguel Zavala y Jorge Luis Suárez.

Dedicatorias.

Dedico este trabajo en especial a mi madre, a mis hermanas y a mis sobrinos, quienes son, mi principal motor para seguir adelante superarme y luchar día a día por mis metas, objetivos y mi familia.

Dedico también este trabajo a la Dra. Josefina Cortés Eslava, porque gracias a su apoyo y a su sabiduría logre alcanzar esta importante meta.

A la Maestra Ana Rosa Flores Márquez.

Índice.

Resumen.....	5
I. Introducción.....	6
1. El Maíz azul y las antocianinas.....	6
Antocianinas.....	7
Estructura de las antocianinas.....	7
Las antocianinas como colorantes naturales.....	8
Extracción, identificación y cuantificación de antocianinas.....	9
Propiedades bioactivas de las antocianinas.....	10
2. Genotoxicidad.....	12
Evaluación de daño genotóxico.....	13
Ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis (MNBC).....	14
Criterios a considerar en el ensayo de MNBC.....	16
Selección de células binucleadas en el ensayo de MNBC.....	16
Registro de MN.....	16
Registro de PN.....	17
Conteo de células apoptóticas.....	17
Conteo de células necróticas.....	17
3. Muerte celular.....	18
Apoptosis.....	19
Necrosis.....	21
II. Justificación.....	23
III. Hipótesis.....	25
IV. Objetivos.....	25
V. Material y métodos.....	26
1. Extracción del pigmento de maíz azul.....	26
Cuantificación e identificación de antocianinas.....	26
2. Aislamiento de linfocitos.....	26
Viabilidad y conteo celular.....	27
Cultivo y tratamiento.....	27
3. Bloqueo de la citocinesis y cosecha de linfocitos.....	28
4. Tinción de preparaciones y observación al microscopio.....	28
5. Análisis estadístico.....	29
VI. Resultados.....	30
VII. Discusión.....	44
VIII. Conclusiones y recomendaciones.....	48
IX. Referencias.....	49

Resumen.

La gran cantidad y la enorme variedad de sustancias de uso cotidiano dispersas en el planeta como consecuencia de la actividad del ser humano y que se depositan en el agua, suelo y aire afectan seriamente al ambiente, la mezcla de estos contaminantes perjudican también el material genético de los seres humanos y en general de los organismos. La implementación de productos de origen vegetal que forman parte de la dieta humana como recurso de protección contra la agresión que implica la exposición a contaminantes ambientales ha tenido éxito recientemente, diferentes compuestos fitoquímicos se han aislado y utilizado como agentes antitumorales. El objetivo de este trabajo fue probar el papel de las antocianinas de maíz azul ante el daño genético inducido por el agente clastogénico bleomicina en linfocitos humanos aislados de sangre periférica. Se realizó una extracción etanólica-ácido cítrico 85:15 v:v a partir de una fina harina obtenida de maíz azul adquirido en la región sur del Estado de México, el extracto fue concentrado, liofilizado, disuelto en agua estéril y finalmente almacenado a 4 °C hasta su empleo. La caracterización de antocianinas fue realizada por espectrofotometría en la banda del ultravioleta al visible y la cuantificación de polifenoles mediante el método de Follin-Ciocalteu. Se efectuaron las pruebas citogenéticas en cultivos celulares de tres donadores. Mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, se observó, que el pigmento del maíz azul redujo la frecuencia de micronúcleos y puentes nucleoplasmáticos presentes en los linfocitos en comparación con el testigo negativo. En el caso de los tratamientos en los cuales se aplicó solo bleomicina se registró un incremento significativo de micronúcleos y puentes nucleoplasmáticos. En los linfocitos sensibilizados con bleomicina, pre y pos tratados con las antocianinas de maíz azul, se encontró reducción casi a cero en la frecuencia de micronúcleos y puentes nucleoplasmáticos; así como, aumento significativo de muerte celular programada en su modalidad de apoptosis. Se puede concluir que las antocianinas de maíz azul poseen un gran potencial frente a la acumulación del daño genético inducido por la bleomicina y se sugiere la incorporación del maíz azul y en general, el consumo de polifenoles naturales en la dieta cotidiana.

I. Introducción

1. El Maíz azul y las antocianinas.

El maíz (*Zea mays*) es una de las especies más importantes desde el punto de vista económico de la familia de las Poaceae o gramíneas, ya que comprende una de las plantas cultivadas desde la antigüedad. La evidencia más lejana de la existencia del maíz, data de hace unos 7,000 años y fue encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (México). Este cereal fue esencial en las civilizaciones maya y azteca y tuvo un papel importante en las creencias religiosas, festividades y nutrición (Organización para la Alimentación y la Agricultura, 2010). En general; el maíz fue la principal fuente de alimento para las civilizaciones precolombinas del nuevo mundo. Hoy las tortillas de maíz y productos derivados son alimentos básicos de México y Centroamérica (Cortés-Gómez *et al.*, 2005). También ha sido empleado, para la elaboración de diversos platillos como: tamales, atole, pan y otros alimentos tradicionales de México (Alarcón *et al.*, 2011).

En América Latina se han descrito cerca de 220 razas de maíz (Goodman y McK. Bird, 1977), de las cuales 64 (29%) se han identificado, y descrito en su mayoría, para México (Anderson, 1946; Wellhausen *et al.*, 1951; Hernández y Alanís 1970; Sánchez *et al.*, 2000) (fragmento tomado de CONABIO, 2012).

Con distintas formas y colores, que van desde el blanco, amarillo, rojo, morado y azul, entre los diversos maíces utilizados para la elaboración de la tortilla y otros productos alimenticios, se encuentra el maíz azul, cuyo color se debe a la presencia de colorantes naturales llamados antocianinas (Gross, 1987), encontradas principalmente en el pericarpio y/o la capa de la aleurona (Cortés-Gómez *et al.*, 2005).

El maíz azul y rojo son utilizados por pequeñas comunidades donde se cultivan para preparar alimentos tradicionales tales como tortillas, tlacoyos, gorditas, tostadas, atoles, entre otros. Estos productos son demandados por muchos consumidores debido a sus texturas suaves y buen sabor (Cortés-Gómez *et al.*, 2005). En EUA y en México la preferencia de los consumidores de tortillas de maíz azul está aumentando, debido a su sabor más dulce y suavidad en comparación con las tortillas de maíz blanco o amarillo (Cortés *et al.*, 2006).

Antocianinas.

Las antocianinas (del griego *Anthos*=flor y *Kianos*=azul) son pigmentos de las plantas vasculares (Pazmiño-Durán *et al.*, 2001) y son probablemente el grupo más importante de pigmentos visibles además de la clorofila (Cortés *et al.*, 2006). Son compuestos flavonoides hidrosolubles, responsables de los colores rojo, púrpura y azul que se aprecian en flores, frutos y otras partes de las plantas y que no son tóxicas al consumo humano (Alarcón *et al.*, 2011). Poseen diferentes funciones en la planta como la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y la protección de las plantas contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana (Strack y Wray, 1994).

Los estudios realizados por Salinas *et al.* (2003) indican que las antocianinas encontradas en el maíz azul proceden de la cianidina y la malvidina, principalmente, mientras que en el grano rojo provienen de la pelargonidina, la cianidina, la malvidina y otras antocianinas aún no descritas. Jackman y Smith (1996) encontraron la cianidina libre y acilada, 3-glucósidos de pelargonidina y peonidina, en el maíz azul.

Estructura de las antocianinas.

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, que pertenecen a la familia de los flavonoides (Garzón, 2008); están formadas por polifenoles, los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo (Gutiérrez *et al.*, 2008). Existe una enorme variedad de antocianinas en la naturaleza. Las principales diferencias entre ellas son el número de grupos hidroxilados, la naturaleza de los azúcares unidos a su estructura, los carboxilatos alifáticos o aromáticos unidos al azúcar en la molécula y la posición de los enlaces (Kong *et al.*, 2003). En su estado natural, las antocianinas simples se esterifican a uno o varios azúcares (Cortés *et al.*, 2006), siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad (Garzón, 2008). Hasta ahora hay informes de más de 500 diferentes antocianinas (Andersen y Jordheim, 2006); la más común es la cianidina-3-glucósido (Kong *et al.*, 2003). La gran variedad de antocianinas encontradas en la

naturaleza las convierte en un grupo muy complejo e interesante (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Las antocianinas aisladas son altamente inestables y muy susceptibles a la degradación (Giusti y Wrolstad, 2003). Factores como su misma estructura química, el pH, la concentración, la temperatura, la presencia de oxígeno y de ácido ascórbico, y la actividad de agua de la matriz, determinan la estabilidad del pigmento (Garzón, 2008), así también, la luz, el disolvente, la presencia de enzimas, de flavonoides, de proteínas y de iones metálicos (Rein, 2005). La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH^+) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbonilo o hemiacetal, y la forma chalcona, o de cadena abierta. Tanto el hemiacetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables (Garzón, 2008). A valores de pH superiores a siete se presentan las formas quinoidales de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Hutchings, 1999).

Brouillard (1982) encontró que las antocianinas son estables a un pH ácido, pero la estabilidad disminuye a pH neutro y se destruye completamente a pH alcalino (Cortés *et al.*, 2006). Sin embargo, algunas antocianinas de tipo acilo (tales como pentanina) son estables a un pH de más de 7, la cianidina-3-glucósido pierde estabilidad cuando el pH es superior a 5 (Fossen *et al.*, 1998).

Las antocianinas como colorantes naturales.

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos, en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules, mientras que, en las metilaciones coloraciones rojas (Garzón, 2008). El color que exhiben estas moléculas fue explicado por primera vez por Paulling en 1939 (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

El estudio de colorantes naturales es una extensa área de investigación debido al creciente interés por sustituir los colorantes sintéticos con efectos tóxicos en seres

humanos (Chou *et al.*, 2007), como es el caso del rojo 40, debido a su toxicidad en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos (Garzón, 2008).

Los carotenoides y las antocianinas están entre los colorantes vegetales más utilizados en la industria alimentaria (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Las antocianinas se utilizan como sustitutos de los pigmentos sintéticos debido a su atractivo color y funcionalidad fisiológica (Mazza y Miniati, 1993).

Además de su papel funcional como colorantes, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano (Garzón, 2008) por seguros y eficaces (Strack y Wray, 1994).

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias, productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento (Wrolstad, 2000; Cevallos-Casals y Cisneros Zeballos, 2004) y esto ha limitado su uso (Cortés *et al.*, 2006).

Extracción, identificación y cuantificación de antocianinas.

La extracción con disolventes ha sido la más común para obtener diversos compuestos presentes en frutas, incluyendo flavonoides (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Las antocianinas son moléculas polares, por lo tanto, los disolventes más usados en la extracción son soluciones acuosas con etanol, metanol y acetona (Kahkonen *et al.*, 2001). Entre los métodos más comunes se encuentran aquellos que usan metanol acidificado o etanol como extractantes (Amr y Al-Tamimi, 2007; Awika *et al.*, 2005; Cacace y Mazza, 2003; Donner *et al.*, 1997; Fossen y Andersen 2003; Phippen y Simon, 1998; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Sin embargo, en la industria alimentaria se prefiere el etanol debido a la toxicidad del metanol (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). En la extracción con disolventes acidificados, se debe tener especial cuidado en evitar medios ácidos fuertes porque las antocianinas aciladas pueden degradarse (hidrólisis) y en el caso de las antocianinas 3-monosídicas los enlaces glucósidos podrían ser destruidos (Kapasakali-dis *et al.*, 2006). Yang y Zhai (2010) para optimizar la extracción del pigmento del maíz azul, realizaron el procesamiento asistido por irradiación de microondas.

Se puede obtener información cuantitativa y cualitativa sustancial a partir de las características espectrales de las antocianinas (Giusti y Wrolstad, 2001). En realidad, la espectroscopia es la principal técnica utilizada debido a su simplicidad y bajo costo. Pero la dificultad para obtener compuestos de referencia y las similitudes espectrales de las antocianinas representan un inconveniente importante. Por lo tanto, la espectroscopia de masas y la resonancia magnética nuclear de H y C se han convertido en las técnicas preferidas para las identificaciones de antocianinas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Yang y Zhai (2010) realizaron la identificación de antocianinas extraídas de maíz azul utilizando la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento. Existen otros métodos que han sido empleados para la identificación de antocianinas como el de electroforesis capilar que fue reportado por primera vez por Bridle y colaboradores en 1996. Cabe destacar que también se han realizado estudios *ab initio* donde se desarrollan cálculos teóricos en equipos de supercómputo para conocer las características estructurales y electrónicas de las moléculas, el trabajo realizado por Sakata *et al.* (2006) reporta la descripción de cuatro antocianidinas.

Los métodos más comúnmente usados para determinar y cuantificar fenoles en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainilla y el de Folin-Ciocalteu. El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes (Gutiérrez *et al.*, 2008). El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Propiedades bioactivas de las antocianinas.

El interés por las antocianinas se ha intensificado debido a sus efectos benéficos para la salud humana cuando se incluyen en la dieta (Cortés *et al.*, 2006), dentro de los cuales se encuentran la reducción de la enfermedad coronaria, los efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos, además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo (Garzón, 2008) y, como agente protector contra la radiación (Akhmadieva *et al.*, 1993). También tienen la capacidad de proteger contra una

gran cantidad de enfermedades humanas, tales como disfunción hepática, hipertensión, trastornos de la visión, infecciones microbianas y diarrea (Mazza y kay, 2008; Smith *et al.*, 2000), en el tratamiento de las enfermedades microcirculatorias (Wang *et al.*, 1997) e inflamatorias crónicas (Rossi *et al.*, 2003). Es importante señalar que en los mamíferos; las antocianinas permanecen intactas durante su paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo (Miyazawa *et al.*, 1999).

Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante (Garzón, 2008). Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidante y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidante causado por los radicales libres (Rossi *et al.*, 2003; Scalbert *et al.*, 2005). Wang y Jiao (2000) y Wang y Lin (2000) han demostrado que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y contra radicales peróxidos (ROO), superóxido (O_2), hidroxilo (OH) y oxígeno singulete (O_2). Trabajos realizados por Yang y Zhai (2010) reportaron mediante los ensayos: 2,2-difenil-1-picrilhidracil, capacidad antioxidante equivalente al trolox y capacidad de reducción férrica del plasma; la actividad antioxidante de semillas y mazorcas de maíz azul cultivadas en localidades de China; estos resultados proporcionan información sobre la actividad farmacológica asociada con los radicales libres de estos cultivos, siendo útil para su aplicación como colorantes o antioxidantes en los alimentos (Yang y Zhai, 2010). Estudios con fracciones de antocianinas provenientes de vino han demostrado que éstas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir lipoproteínas y la agregación de plaquetas (Ghiselli *et al.*, 1998).

Hay varios informes centrados en los efectos de las antocianinas en los tratamientos contra el cáncer (Lule y Xia, 2005; Nichenametla *et al.*, 2006), como agentes antineoplásicos y quimioprotectores (Kamei *et al.*, 1995). Tristan *et al.* (2005) realizaron bioensayos que demuestran que los arándanos inhiben las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis. Hagiwara *et al.* (2002) demostraron que el suministro de papas púrpura dulces y repollo morado a ratas de laboratorio, causan supresión de tumores. Kamei *et al.* (1998) reportaron la supresión de células cancerígenas HCT-15 provenientes de colon humano y de células cancerígenas gástricas (AGS) al suministrar fracciones de antocianinas del vino tinto.

De acuerdo con Tristian *et al.* (2008) las antocianinas provenientes de cuatro especies de arándanos silvestres muestran propiedades hipoglucémicas. Otro tipo de actividad anti diabética de las antocianinas fue reportado por Perossini *et al.* (1987). Vuorela *et al.* (2005) encontraron un resultado supresor de prostaglandina EG2, sinónimo de actividad antiinflamatoria con extractos de antocianinas de frambuesa.

Las propiedades bioactivas de las antocianinas abren una perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano (Garzón, 2008). Considerando los efectos favorables de estas moléculas para la salud, su incorporación en la industria de alimentos y bebidas representará un provecho importante (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Sin embargo, hay mucho que aprender en cuanto a su estabilidad en matrices específicas y a la relación entre su estructura, actividad biológica de los metabolitos bioactivos, los efectos sinérgicos y las dosis efectivas (Garzón, 2008).

2. Genotoxicidad.

Existen razones importantes para justificar la preocupación por la exposición del hombre a los agentes genotóxicos. El uso del término genotóxico se refiere a aquellos agentes que tienen afinidad para interactuar con el DNA, produciendo alteraciones estructurales o funcionales tanto en células germinales como somáticas. El incremento de alteraciones en el material hereditario de las células germinales (óvulos y espermatozoides) y las células que las originan, puede provocar aumento en la ocurrencia de las enfermedades genéticas, monogénicas, cromosómicas y multifuncionales, en generaciones futuras. Además, existe una estrecha relación entre las alteraciones del DNA de las células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas (Stoneham *et al.*, 2000; Mortelmans *et al.*, 2004; Aiassa *et al.*, 2012).

Aunque la comprensión de la estructura cromosómica es incompleta, la evidencia sugiere que las anomalías cromosómicas son una consecuencia directa y la manifestación de daño en el nivel de DNA por ejemplo, los rompimientos cromosómicos pueden resultar de rupturas no reparadas de doble cadena y los arreglos de los cromosomas pueden resultar de un mal arreglo de las hebras rotas (Savage, 1993; Fenech, 2000).

Dentro de los factores capaces de influir en la integridad del material genético se pueden mencionar el estilo de vida, exposición a rayos UV (debido al progresivo debilitamiento de la capa de ozono), los tratamientos médicos, algunos polimorfismos genéticos individuales, entre otros (Aiassa *et al.*, 2012). La observación de que la exposición a radiaciones ionizantes o sustancias químicas carcinógenas causan daño cromosómico, fue una de las primeras pruebas confiables de que los agentes físicos y químicos pueden causar alteraciones importantes en el material genético de las células eucariotas (Evans, 1977; Fenech, 2000).

Existen suficientes evidencias experimentales y epidemiológicas que demuestran que el daño genético produce mutaciones y que el proceso cancerígeno se inicia y se favorece por la presencia de mutaciones en los oncogenes, en genes supresores de tumores y en los que codifican para los sistemas de reparación del DNA (Au *et al.*, 2001; Bonassi y Au, 2002, Aiassa *et al.*, 2012).

Evaluación de daño genotóxico.

En el monitoreo biológico de individuos expuestos a factores tóxicos se ha propuesto el uso de biomarcadores que son indicadores de eventos ocurridos en el organismo o en las células y pueden ser de exposición, de efecto o de susceptibilidad. (Ostrosky y Gonsebatt, 2006). Los marcadores biológicos o biomarcadores son los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o marcador de la exposición a un agente tóxico (Garte y Bonassi 2005; Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

Los estudios que pueden realizarse a partir de sangre de personas expuestas a agentes genotóxicos y que permiten detectar efectos tempranos pueden agruparse en estudios citogenéticos, moleculares y bioquímicos (Aiassa *et al.*, 2012). Los biomarcadores a nivel citogenético, son aberraciones cromosómicas (AC), micronúcleos (MN), intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y recientemente el ensayo cometa (CO); considerados como una medida útil de apreciación de daño. Tanto las AC como los MN se han reconocido como marcadores de estados-tempranos de enfermedades crónicas como cáncer, su presencia también indica que una frecuencia elevada de ellos permite predecir el riesgo

de cáncer en seres humanos (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007; Gómez-Arroyo *et al.*, 2013).

Las AC detectan cambios citológicamente identificables que afectan al número o a la estructura de los cromosomas que constituyen el cariotipo de la especie y pueden ser observados al microscopio óptico. Estas modificaciones corresponden a rompimientos y rearreglos en el mismo o entre diferentes cromosomas. Las aberraciones estructurales han sido consideradas como marcadores de riesgo (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

Los ICH son eventos que se producen durante la fase de síntesis. Representan el intercambio simétrico, entre loci homólogos, de productos de replicación (Norppa, 2004; Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007). Ocurren sin pérdida de DNA ni cambios en la morfología cromosómica y es posible detectarlos en metafases obtenidas de cultivos adicionados con bromodesoxiuridina que es un análogo de la base nitrogenada timina del DNA (Latt, 1979; Latt *et al.*, 1981; Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

El ensayo cometa es una herramienta rápida y sensible para la detección de daño a nivel del DNA en células individuales. Se basa en la migración del DNA en un campo eléctrico, el DNA que ha sido roto migra al ánodo (dando la apariencia de un cometa) y dicho desplazamiento puede ser usado como un indicador de daño (Östling y Johanson 1984; Gómez-Arroyo *et al.* 2013).

Los MN son uno de los biomarcadores de genotoxicidad más frecuentemente empleados en mamíferos y en la actualidad se utiliza para la evaluación de exposiciones ocupacionales a mutágenos (Vaglenov *et al.*, 2001, Norppa y Falck 2003; Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

Ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis (MNBC).

Los MN son la expresión en interfase de los fragmentos acéntricos de cromosomas, que al no tener centrómero no se incluirán en los núcleos principales durante la división celular, ya que no interactúan con las fibras del huso mitótico en anafase; estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen como pequeños núcleos (de ahí

el término micronúcleo) en interfase. Por otro lado, cuando el daño se da en el centrómero, alterando el cinetocoro o bien las fibras del huso acromático, se produce un desequilibrio en la distribución de los cromosomas, provocando que queden fuera de la cinética normal de la anafase y se rodeen de envoltura nuclear, como ocurre con los fragmentos acéntricos, originando también micronúcleos aunque de mayor tamaño (Fenech, 2000; Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

Ocasionalmente, se observan puentes nucleoplasmáticos (PN) entre núcleos en una célula binucleada. Éstos son probablemente cromosomas dicéntricos en los que los dos centrómeros migraron a polos opuestos de la célula y el DNA en el puente resultante cubierto por la membrana nuclear. Por lo tanto, los PN en las células binucleadas proporcionan una medida complementaria del reordenamiento cromosómico, que se puede registrar con los MN (Fenech, 2000).

Los ensayos de MN han surgido como uno de los métodos preferidos para evaluar el daño cromosómico porque permiten que tanto la pérdida como la ruptura de cromosomas se evalúen confiablemente. Debido a que los MN sólo pueden expresarse en células que completen la división nuclear, se desarrolló un método especial que identifica dichas células por su apariencia binucleada cuando se bloquea la realización de citocinesis por la citocalasina-B, un inhibidor del ensamblaje de microfilamentos (Fenech, 2000).

La citocalasina-B es un inhibidor de la polimerización de la actina requerida para la formación de los microfilamentos que constituyen el anillo constrictor del citoplasma entre las células hijas. Al evitar que se lleve a cabo la citocinesis se producen células binucleadas en las cuales se realiza el análisis de MN. Mediante esta técnica es posible considerar los PN, yemas nucleares, muerte celular (necrosis y apoptosis) y determinar el índice de división nuclear (Fenech, 2000, 2006; Gómez-Arroyo *et al.*, 2013).

El ensayo de MN con bloqueo de citocinesis (MNBC) permite una mejor precisión porque los datos obtenidos no se confunden por la cinética de división celular alterada causada por la citotoxicidad de los agentes sometidos a ensayo o condiciones de cultivo celular subóptimas (Fenech, 2000).

En su forma básica actual, el ensayo MNBC puede proporcionar, utilizando criterios morfológicos simples, las siguientes medidas de genotoxicidad y citotoxicidad: ruptura, pérdida y reordenamiento cromosómico, inhibición de la división celular, necrosis y apoptosis (Fenech, 2000). Los MN se registran sólo en las células binucleadas, lo que permite comparaciones fiables de daño cromosómico entre las poblaciones de células que pueden diferir en su cinética de división celular. El método se desarrolló inicialmente para su uso con linfocitos humanos cultivados (Fenech y Morley, 1985; Fenech, 2000).

Criterios a considerar en el ensayo de MNBC.

De acuerdo con lo propuesto por Fenech y colaboradores (2003) en "HUMN project", los criterios a considerar en el ensayo de MNBC se enuncian en detalle a continuación.

Selección de células binucleadas en el ensayo de MNBC.

Las células deben ser binucleadas (BI), los dos núcleos en éstas, deben tener membranas nucleares intactas, y, estar situados dentro del mismo límite citoplasmático; los dos núcleos deben ser aproximadamente iguales en tamaño, patrón e intensidad de tinción, pueden estar unidos por un puente fino nucleoplasmático que no sea más ancho que la cuarta parte del diámetro nuclear más grande. Los dos núcleos principales de una célula BI pueden tocarse, pero no superponerse entre sí. Una célula con dos núcleos solapados se puede contar sólo si los límites nucleares de cada núcleo son distinguibles. El límite citoplasmático de una célula BI debe estar intacto y claramente distinguible de las células adyacentes.

Registro de MN.

Los MN son morfológicamente idénticos, pero más pequeños que los núcleos principales. También tienen las siguientes características en linfocitos humanos: el diámetro de los MN varía generalmente entre $1/16$ y $1/3$ del diámetro promedio del núcleo principal que corresponde a $1/256$ y $1/9$ del área de uno de los núcleos principales en una célula BN, respectivamente. Los MN son redondos o de forma oval, no son refractivos y por lo tanto

pueden distinguirse fácilmente de artefactos, tales como, partículas de tinción. Los MN no están vinculados o conectados a los núcleos principales, puede tocar, pero no superponerse en los núcleos principales y el límite micronuclear debe ser distinguible del límite nuclear; los MN normalmente tienen la misma intensidad de tinción que los núcleos principales, pero ocasionalmente la tinción puede ser más intensa.

Registro de PN.

Los PN se observan a veces en células BI después de la exposición a clastógenos, y se piensa que se originan a partir de cromosomas reordenados con más de un centrómero, por ejemplo, cromosomas dicéntricos.

Tienen las siguientes características: son un enlace nucleoplasmático continuo entre los núcleos en una célula BI. La anchura de un puente PN puede variar considerablemente, pero usualmente no excede de un cuarto del diámetro de los núcleos dentro de la célula. Los PN deben tener las mismas características de tinción de los núcleos principales. En raras ocasiones se puede observar más de un PN dentro de una célula BI. Una célula BI con un PN puede o no contener uno o más MN.

Conteo de células apoptóticas.

Las células apoptóticas tempranas pueden ser identificadas por la condensación de la cromatina dentro del núcleo y límites citoplásmicos y nucleares intactos. Las células apoptóticas tardías exhiben fragmentación nuclear en cuerpos nucleares más pequeños (cuerpos apoptóticos) dentro de una membrana citoplasmática intacta. La intensidad de tinción en el núcleo, los fragmentos nucleares y el citoplasma suelen ser mayores que en las células viables.

Conteo de células necróticas.

Las células necróticas tempranas pueden ser identificadas por la presencia de un citoplasma pálido con numerosas vacuolas (principalmente en el citoplasma y algunas en el núcleo) y la membrana citoplasmática dañada, con un núcleo intacto. Las células

necróticas tardías muestran pérdida de citoplasma y membrana nuclear dañada con sólo una estructura nuclear parcialmente intacta y a menudo con material nuclear que se escapa del límite nuclear. La intensidad de tinción del núcleo y citoplasma suele ser menor que la observada en las células viables.

Finalmente, para comparar la respuesta mitogénica de los linfocitos y los efectos citostáticos de los agentes examinados en el ensayo de MNBC, se puede calcular el Índice de división nuclear (IDN) y la proporción de células BI. De acuerdo con el método descrito por Eastmond y Tucker en 1989; se realiza de la siguiente manera, se cuentan quinientas células viables para determinar la frecuencia de las células con 1, 2, 3 ó 4 núcleos y calcular el IDN usando la fórmula:

$$IDN = \frac{n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4}{N}$$

Donde n_1-n_4 representan el número de células con uno a cuatro núcleos y N es el número total de células viables contadas (Fenech, 2000).

3. Muerte celular.

El crecimiento, desarrollo y mantenimiento de los organismos no solo dependen de la producción de células sino también de los mecanismos para destruirlas. El mantenimiento del tamaño de los tejidos, por ejemplo, requiere que las células se mueran al mismo ritmo que se producen. Durante el desarrollo, patrones cuidadosamente orquestados de muerte celular contribuyen a determinar el tamaño y la forma de las extremidades y de otros tejidos. Las células también mueren cuando se dañan o se infectan asegurando que se eliminen antes de que supongan una amenaza para la salud del organismo (Alberts *et al.*, 2016).

La reproducibilidad en tiempo y en espacio con la que se lleva a cabo el proceso de muerte celular durante el desarrollo, ha dado lugar a la denominación de “muerte celular programada” (Castro y Covarrubias, 2003). La muerte celular programada puede definirse más exactamente como muerte celular que depende de señales o actividades genéticamente codificadas dentro de la célula senescente (Jaattela, 2002; Lockshin y

Zakeri, 2001; Fink y Cookson, 2005). La designación "programada" se refiere a la vía fija seguida de células senescentes, independientemente del mecanismo (Fink y Cookson, 2005). En la mayoría de los casos la muerte celular programada se produce mediante un proceso denominado apoptosis (Alberts *et al.*, 2016). No obstante; la apoptosis y la muerte celular programada se usan a menudo como sinónimos. Sin embargo, una variedad de otras vías moleculares de muerte celular se han caracterizado (Fink y Cookson, 2005). La apoptosis y los otros casos, no es un proceso aleatorio, sino que se produce mediante una secuencia ordenada de procesos moleculares, en los que la célula se destruye así misma desde dentro de forma sistemática siendo ingerida luego por otras células, sin dejar rastro (Alberts *et al.*, 2016), la eliminación de los restos celulares se realiza por fagocitosis (Castro y Covarrubias, 2003).

Apoptosis.

La palabra apoptosis se utilizó en griego para denotar una "caída" como hojas de un árbol (Kerr *et al.*, 1972; Fink y Cookson, 2005). El término fue utilizado por primera vez en un artículo ahora clásico por Kerr, Wyllie, y Currie en 1972 (Elmore, 2007). Connota un proceso fisiológico controlado de la eliminación de componentes individuales de un organismo sin su destrucción (Fink y Cookson, 2005). En muchos sistemas vivos se produce alguna forma de muerte celular, pero ésta se encuentra principalmente en los animales (Alberts *et al.*, 2016). Ocurre normalmente durante el desarrollo, y, de nuevo, como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones celulares en los tejidos (Elmore, 2007); actúa como un sistema de control de calidad, eliminando las células que son anormales, inapropiadas, no funcionales o potencialmente peligrosas para el organismo. Las células disponen de diversos mecanismos para detectar el daño en el DNA y si no lo pueden reparar mueren por apoptosis (Alberts *et al.*, 2016).

La apoptosis también ocurre como un mecanismo de defensa tal como en las reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por enfermedades o agentes nocivos (Norbury y Hickson, 2001; Elmore, 2007) como productos químicos (Elmore, 2007). Se describe como un proceso activo, programado, de desmantelamiento celular autónomo que evita los procesos de inflamación (Fink y Cookson, 2005).

Las células que mueren por apoptosis experimentan cambios morfológicos característicos. Se encogen y se condensan, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura nuclear se desensambla y la cromatina nuclear se condensa y se fragmenta (Alberts *et al.*, 2016). Como consecuencia, las células son más pequeñas en tamaño, el citoplasma es denso y los organelos están más apretados. La picnosis es el resultado de la condensación de la cromatina y este es el rasgo más característico de la apoptosis (Elmore, 2007). Durante el proceso temprano, la contracción de las células y la picnosis son visibles por microscopía óptica (Kerr *et al.*, 1972). La superficie celular a menudo emite protrusiones y, si la célula es grande, con frecuencia se rompe en fragmentos rodeados de membrana denominados cuerpos apoptóticos. La superficie de la célula o de los “cuerpos apoptóticos” se altera químicamente de modo que una célula adyacente o un macrófago los fagocita con rapidez, antes de que puedan liberar su contenido. De esta manera, la célula muere limpiamente y es eliminada sin provocar una respuesta inflamatoria perjudicial. Como las células son fagocitadas y digeridas tan brevemente que es habitual que se observan pocas células muertas, incluso aunque un gran número de células haya muerto por esta vía (Alberts *et al.*, 2016).

La apoptosis es activada por miembros de una familia de proteasas especializadas. Éstas reciben el nombre de caspasas, contienen una cisteína en su sitio activo y escinden sus proteínas diana sobre residuos específicos de ácido aspártico. Diversas aproximaciones experimentales han permitido identificar a más de un millar de proteínas que son escindidas por las caspasas. Entre las cuales se encuentran las láminas nucleares, cuya escisión provoca la ruptura irreversible de la lámina nuclear. Otra diana es una proteína que habitualmente mantiene inhibida a una endonucleasa que degrada el DNA del núcleo de la célula; por su proteólisis libera la endonucleasa que lo fragmenta. Otras proteínas diana incluyen componentes del citoesqueleto y proteínas de adhesión celular que unen a la célula a sus vecinas (Alberts *et al.*, 2016).

Las caspasas se sintetizan en la célula como precursores y sólo se activan durante la apoptosis. Existen dos tipos de caspasas: las iniciadoras y las ejecutoras. La cascada de caspasas no solo es destructiva y autoamplificante sino que también es irreversible, de modo que una vez que una célula ha alcanzado un punto crítico de la vía de destrucción ya no puede volver atrás. En la apoptosis; los dos mecanismos de activación mejor

comprendidos en células de mamífero se denominan: la vía extrínseca y la vía intrínseca o mitocondrial (Alberts *et al.*, 2016).

Una alternativa a la muerte celular apoptótica es la necrosis, que se considera un proceso tóxico donde la célula es una víctima pasiva y sigue un modo de muerte independiente de energía. Pero como la necrosis se refiere a los procesos de degradación que ocurren después de la muerte de la célula, algunos consideran que es un término inapropiado para describir un mecanismo de muerte celular (Elmore, 2007).

Aunque hay una amplia variedad de estímulos y condiciones, tanto fisiológicas como patológicas, que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células necesariamente morirán en respuesta a los mismos estímulos (Elmore, 2007).

Necrosis.

A diferencia de la apoptosis, las células animales que mueren en respuesta a una lesión aguda, como el trauma, la falta de riego sanguíneo o hipoxia, normalmente lo hacen por un proceso denominado necrosis. Las células necróticas se hinchan y se lisan, liberando todo su contenido sobre las células adyacentes y provocando una respuesta inflamatoria. En la mayoría de las ocasiones, la necrosis es probable que sea consecuencia del agotamiento de las reservas energéticas, lo que provoca alteraciones metabólicas y la pérdida de los gradientes iónicos que por lo general suceden a través de la membrana plasmática (Alberts *et al.*, 2016).

Algunos de los principales cambios morfológicos que ocurren en la necrosis incluyen el hinchamiento celular; formación de vacuolas citoplasmáticas; retículo endoplásmico distendido; formación de ampollas citoplasmáticas; condensación, hinchamiento o ruptura mitocondrial; desprendimiento de ribosomas; membranas de organelos alteradas; lisosomas hinchados y rotos; eventualmente la destrucción de la membrana celular. (Kerr *et al.*, 1972; Manjo y Joris, 1995; Trump *et al.*, 1997; Elmore, 2007).

La necrosis se ha caracterizado como muerte celular pasiva y accidental resultante de la perturbación ambiental, con la liberación de los contenidos celulares inflamatorios (Fink y

Cookson, 2005). Es un proceso incontrolado y pasivo que normalmente afecta a grandes campos de células, mientras que la apoptosis es controlada y depende de la energía (Elmore, 2007).

Existe la cuestión de distinguir la apoptosis de la necrosis, dos procesos que pueden ocurrir de forma independiente, secuencial y simultánea (Hirsh, 1997; Zeiss, 2003; Elmore, 2007). A dosis bajas, una variedad de estímulos perjudiciales tales como: radiaciones, hipoxia y fármacos anticancerosos citotóxicos pueden inducir apoptosis, pero estos mismos estímulos pueden dar como resultado necrosis a dosis más altas (Elmore, 2007).

Aunque los mecanismos y morfologías de la apoptosis y necrosis difieren, hay superposición entre estos dos procesos (Elmore, 2007). Las pruebas indican que la necrosis y la apoptosis representan expresiones morfológicas de una red bioquímica compartida descrita como el continuo "apoptosis-necrosis" (Zeiss, 2003).

La apoptosis inapropiada es un factor en muchas condiciones humanas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, daño isquémico, trastornos autoinmunitarios y muchos tipos de cáncer. La capacidad de modular la vida o la muerte de una célula se reconoce por su inmenso potencial terapéutico (Elmore, 2007).

II. Justificación

Anualmente son liberados al aire millones de toneladas de productos derivados de la actividad humana que comprende tanto fuentes móviles como fijas, a esto se le suman las naturales. Se ha considerado a la mezcla de contaminantes ambientales como una de las principales causantes de daño al material genético de las especies vivas (Ceratti *et al.*, 2015).

El uso de productos de origen vegetal incluidos en la dieta humana para proteger frente a la agresión de diversos contaminantes ambientales ha incrementado en tiempos recientes. El aislamiento y empleo de fitoquímicos como agentes antitumorales ha ganado una creciente popularidad en los últimos años debido a que algunas de las primeras quimioterapias utilizaron fármacos aislados de plantas por ejemplo la vincristina y la vinblastina extraídos de *Vinca rosea*; en 2012 Alonso-Castro demostró que el extracto etanólico del muicle (*Justicia spicigera*) presenta actividad antitumoral e inmunomoduladora en ratones.

El interés por el estudio de las antocianinas se ha intensificado gracias a sus posibles efectos terapéuticos y benéficos (Garzón, 2008). En 2011 Alarcón y colaboradores registraron la actividad anticancerígena *in vitro* de extractos de maíz azul en líneas cancerosas de seres humanos: colon (HCT-15), mama (MCF-7), pulmón (SKUL-1) y leucemia (K562).

Diversos sistemas biológicos de prueba permiten evaluar el efecto genético de numerosos contaminantes ambientales. El cultivo de linfocitos humanos es un sistema que ofrece numerosas ventajas. Desde tiempo atrás se ha buscado mejores condiciones en las técnicas de cultivo celular con varios propósitos: obtener una alta frecuencia de divisiones celulares, lograr una mejor morfología de los cromosomas, estimular las células a dividirse o incrementar la velocidad de proliferación en células que *in vivo* no lo harían. los tejidos más utilizados para el cultivo son los linfocitos de sangre periférica, fibroblastos por biopsia de piel, células de médula ósea y células de tumores malignos; el más fácil de realizar y el más ampliamente usado es el cultivo de linfocitos de sangre periférica el cual tiene varias ventajas, las células se encuentran en suspensión, sólo debe usarse un mitógeno para inducir su división, la obtención de la muestra es sencilla y de fácil acceso.

Puesto que los linfocitos de sangre periférica normalmente no se dividen, es necesario agregar al medio de cultivo una sustancia que los estimule a proliferar. Las más utilizadas son las lectinas tales como la fitohemaglutinina y la concavalina A.

La bleomicina es un medicamento empleado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. En 1991 K. Miller la describe como inductora de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos B y T. No obstante, esta sustancia se encuentra registrada en la lista modelo de medicamentos esenciales publicada en 2017 por la Organización Mundial para la Salud en la versión 20, para el tratamiento del linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, tumor de células germinales de ovario y testículo. Molinari en 2010 la utiliza como testigo positivo para bioensayos de genotoxicidad.

En el Centro de Ciencias de la Atmósfera se estudian no solo la composición y dispersión de diversos componentes de la atmósfera y su caracterización, sino también sus posibles efectos a la salud humana. Se han realizado diversos trabajos sobre el efecto genético en linfocitos *in vitro* sometidos a diferentes agentes genotóxicos, como plaguicidas, material orgánico extraído de aeropartículas, metales pesados, disolventes, hidrocarburos aromáticos policíclicos, gases, entre otros contaminantes ambientales; así como agentes clastogénicos como la bleomicina. Por otro lado, se ha demostrado que las antocianinas extraídas de maíz azul disminuyen la proliferación celular induciendo a células cancerosas a muerte celular programada. Por lo tanto, este estudio pretende evaluar si las antocianinas del maíz azul tienen un efecto significativo en la respuesta de los linfocitos sensibilizados con bleomicina, con lo cual se contribuirá a la obtención de evidencias que apoyen el uso de este extracto de origen vegetal que puede formar parte de la dieta humana, como un elemento protector frente a la agresión de los productos de la contaminación ambiental que afectan la salud.

III. Hipótesis.

Dado que se ha demostrado que las antocianinas extraídas de maíz azul disminuyen la proliferación celular e inducen muerte en células cancerosas, entonces se espera que los extractos conteniéndolas serán capaces de ejercer el mismo efecto en linfocitos sensibilizados con el agente clastogénico bleomicina.

IV. Objetivos.

General.

Evaluar el papel de las antocianinas extraídas de maíz azul sobre linfocitos humanos *in vitro* sensibilizados con el agente genotóxico bleomicina.

Particulares.

Obtener el extracto del pigmento de maíz azul, identificar la presencia de las antocianinas y cuantificar los polifenoles totales.

Evaluar el potencial antigenotóxico del pigmento de maíz azul mediante la prueba de micronúcleos en linfocitos aislados de sangre periférica; así como también, su efecto citotóxico en linfocitos sensibilizados con bleomicina.

Determinar la viabilidad celular de los linfocitos tratados con el pigmento de maíz azul, con la bleomicina y en los linfocitos sensibilizados con la bleomicina y pre y postratados con el pigmento.

V. Material y métodos.

1. Extracción del pigmento de maíz azul.

Se adquirió maíz azul en el tianguis dominical del municipio de Ixtapan de la Sal, Estado de México. Se dejó secar y se desgranó, posteriormente se seleccionaron los mejores granos a los cuales se les retiró cuidadosamente el pedúnculo y el embrión o germen, éstos fueron congelados con nitrógeno líquido y procesados en un molino de mano para obtener una harina, la cual se molió en un mortero para alcanzar mayor fineza, de ésta, se pesaron 20 g los cuales se disolvieron en 80 mL de una solución de etanol-ácido cítrico 1N en una relación de volumen 85:15. La suspensión fue sometida a baño ultrasónico con frecuencia de 60 Hz durante 30 min, al finalizar este periodo se dejó reposar por 24 h a 4 °C en oscuridad; posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 20 min a 5 °C; se tomó el sobrenadante y se llevó a un volumen final de 80 mL, la solución del extracto fue concentrada en un rotavapor a 28 °C y finalmente liofilizada. El polvo obtenido se diluyó en 6 mL de agua estéril.

Cuantificación e identificación de antocianinas.

La identificación de las antocianinas en el extracto, fue realizada mediante espectrofotometría en la banda del ultravioleta al visible. La cuantificación de polifenoles totales fue evaluada utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu (1927).

2. Aislamiento de linfocitos.

Debido al hecho de que existe la variabilidad biológica, lo que implica diferente sensibilidad entre individuos, es necesario utilizar la sangre de más de un individuo. Diversos autores utilizan entre 3 a 5 donadores para darle confiabilidad a los resultados (Bayarm, et al. 2016; Şekeroğlu, 2017). En este trabajo, se utilizó la sangre de tres donadores, dos de ellos, A y B, fueron del sexo masculino y el donador C femenino. Se tomó una muestra de 10 mL de sangre periférica de donadores voluntarios sanos, en un rango de 20 a 25 años, a quienes se les aplicó un cuestionario previo para conocer su historial clínico y firmaron voluntariamente una carta de consentimiento informado.

Se realizó el aislamiento de linfocitos con base en el método empleado por Boyum (1958) para obtener un gradiente de densidad. Las muestras de sangre fueron diluidas 1:1 en solución Hank's Gibco™; de ésta mezcla se depositaron cuidadosamente 6 mL en tubos Falcon que contenían 3 mL de "Lymphoprep™", éstos fueron centrifugados a 2500 rpm por 35 min. Se tomó la fase blanca (linfocitos), la cual fue lavada en solución Hank's dos veces, finalmente los linfocitos fueron resuspendidos en medio de cultivo Advanced RPMI 1640 Gibco™ (Adv), la suspensión de linfocitos fue incubada hasta su uso a 37 °C.

Viabilidad y conteo celular.

Se tomó una alícuota de 80 µL de la suspensión de linfocitos para evaluar la viabilidad y realizar el conteo celular, la viabilidad fue evaluada con la técnica de tinción dual (bromuro de etidio-5, BrEt y 6 carboxiacetato de fluoresceína, CFDA) descrita por Strauss (1991), el colorante tiñe de color verde las células vivas y de rojo las muertas. El conteo celular se efectuó utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer.

Cultivo y tratamiento.

Partiendo de una suspensión de linfocitos se sembraron en promedio 1.5 millones de células con una viabilidad superior a 95% en tubos Falcon con 4.8 mL de medio Adv enriquecido al 15% vol de suero bovino fetal (FBS) GIBCO™ y 200 µL de fitohemaglutinina Microlabs, se incubó a 37 °C en atmósfera de 5% de bióxido de carbono.

Los tratamientos con antocianinas y bleomicina fueron realizados de acuerdo a los siguientes protocolos.

A) Bleomicina o antocianinas de manera independiente: transcurridas 24 h a partir del inicio del cultivo, se aplicó: 10 µL/mL del extracto de antocianinas (Anto) o 10 µg/mL de bleomicina (Bleo), respectivamente; a las siguientes 24 h fueron lavados con medio Adv dos veces, e incubados nuevamente con medio enriquecido al 15% vol de FBS hasta completar el período de cultivo.

B) Pre-incubación de Anto con respecto a la Bleo (Anto + Bleo). A las 24 h a partir del inicio del cultivo, se aplicó: 10 μ L/mL de Anto y a las siguientes 24 h, los linfocitos fueron lavados con medio Adv dos veces y se agregaron 10 μ g/mL de Bleo; se incubaron nuevamente con medio enriquecido al 15% vol de FBS hasta completar el período de cultivo.

C) Post-incubación de Anto con respecto a la Bleo (Bleo + Anto). A las 24 h a partir del inicio, se aplicó 10 μ g/mL de Bleo y a las siguientes 24 h, los linfocitos fueron lavados con medio Adv dos veces y se agregaron 10 μ L/mL de Anto; se incubaron nuevamente con medio enriquecido al 15% vol de FBS hasta completar el período de cultivo.

3. Bloqueo de la citocinesis y cosecha de linfocitos.

A las 48 h de iniciados los cultivos, se agregaron a cada tratamiento 6 μ g/mL de citocalasina B para inhibir la polimerización de los filamentos de actina y evitar la citocinesis. A las 72 h de cultivo se procedió a la cosecha de linfocitos, para ello se realizó una prefijación agregando a los tubos de cultivo 1 mL de fijador frío metanol-ácido acético 3:1 % vol respectivamente, se resuspendió y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla de linfocitos fue resuspendida en 8 mL de fijador, las muestras fueron almacenadas a 4 °C.

4. Tinción de preparaciones y observación al microscopio.

El material de la cosecha de linfocitos fue resuspendido y centrifugado a 1500 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante y a la pastilla se le añadió 1 mL de fijador, de esta suspensión se prepararon laminillas las cuales fueron teñidas con colorante Giemsa al 3% en solución de fosfatos Sorensen. Las preparaciones fueron observadas bajo un microscopio de campo claro a 500X. Se contaron 500 células viables entre las cuales se contaron: mononucleadas (MONO), binucleadas (BI), trinucleadas (TRI) y tetranucleadas (TETRA), para calcular el índice de división nuclear (IDN) de cada uno de los tratamientos, así como, de sus respectivos duplicados. Por otra parte, se contaron 1000 células BI para calcular la frecuencia de micronúcleos (MN) y puentes nucleoplasmáticos (PN) de cada tratamiento; asimismo, se contaron 1000 células entre MONO, BI,

multinucleadas (MULTI) que incluye a las TRI y TETRA, apoptoticas y necróticas para calcular el porcentaje de apoptosis. Las preparaciones fueron recodificadas para su lectura.

5. Análisis estadístico.

Para el analizar la viabilidad de los tratamientos de cada donador se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Dunnet a fin de conocer si los resultados eran significativamente diferentes; así mismo, para la frecuencia de células apoptóticas y el IDN. En el caso de la frecuencia de MN y PN, de los tratamientos de cada donador, se realizó un ANOVA de dos vías y una prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak.

VI. Resultados.

Por 20 gramos de harina de maíz azul, se obtuvieron 0.459 g de material liofilizado del extracto, este fue disuelto en 6 mL de agua estéril. La cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu mostró, que el extracto contenía 13.24 ± 0.05 mg equivalentes de ácido tánico por gramo del extracto seco. Con el análisis de espectrofotometría en la región UV-Vis para el extracto del maíz azul se realizó la siguiente curva (**Fig. 1.**)

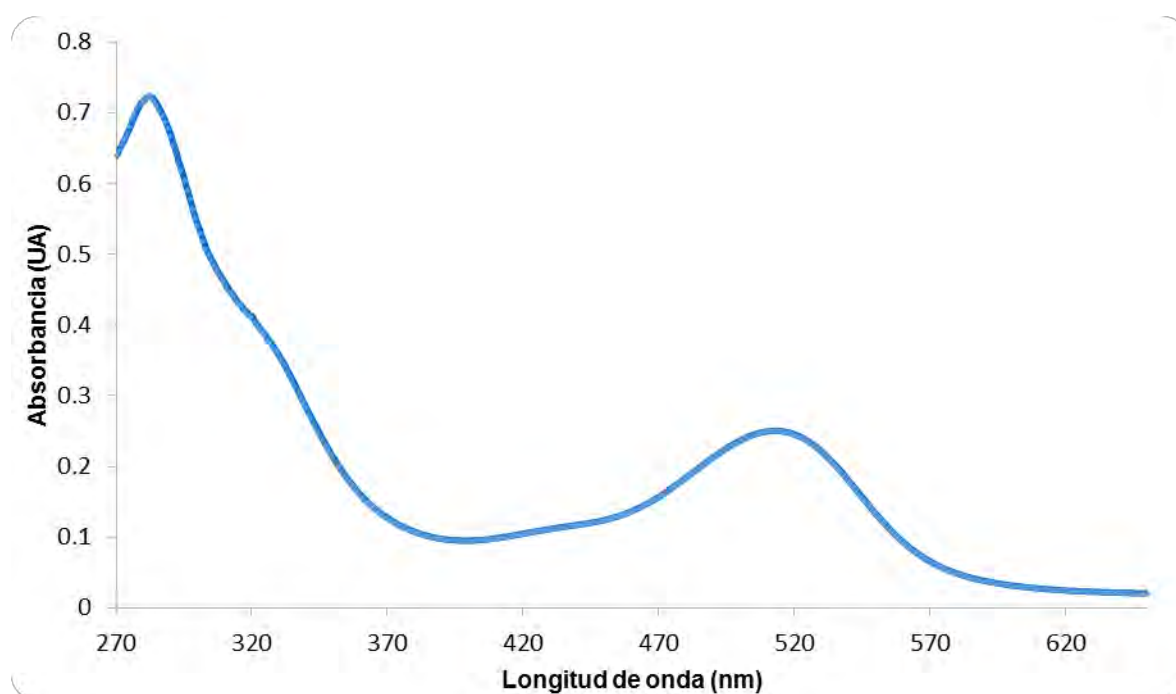


Figura 1. Espectro de absorción en la banda UV-Vis del pigmento extraído de maíz azul con un factor de dilución 1:6. Los picos de la curva corresponden a 283 ± 5 nm en la banda del ultravioleta y 513 ± 5 nm en la banda del visible.

La viabilidad inicial de todos los cultivos celulares fue mayor al 95%; en las Figuras 2, 3 y 4 se muestran los valores finales, para cada donador, respectivamente. En el cultivo de linfocitos de los tres donadores en todos los tratamientos la viabilidad celular disminuyó al final de las horas de incubación, incluyendo los testigos negativos. En el donador A (Fig. 2) se registró, en comparación con el testigo negativo, una viabilidad superior en el tratamiento con Anto, pero valores más bajos en los tratamientos Bleo, Bleo + Anto y Anto + Bleo, en este ultimo la diferencia fue significativa.

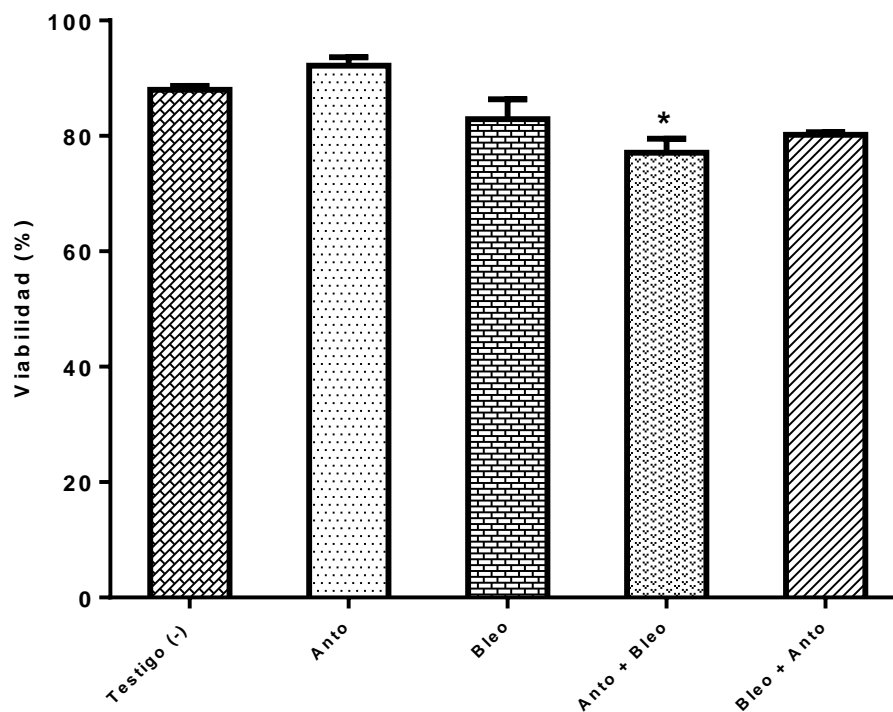


Figura 2. Viabilidad celular del donador "A" con los diferentes tratamientos transcurridas 72 h (prueba Dunnet de comparación múltiple, * $p < 0.05$, significativo).

Para el donador B (Fig. 3), la viabilidad, en el caso de todos los tratamientos, en comparación con el testigo negativo, fue baja, pero solo significativamente en los tratamientos Bleo, Anto + Bleo y Bleo + Anto.

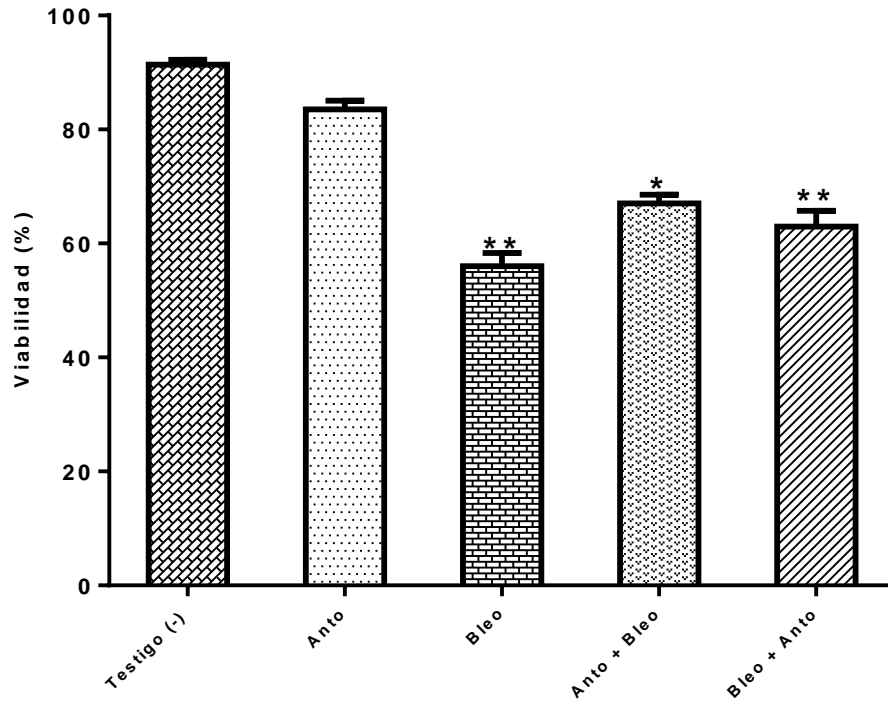


Figura 3. Viabilidad celular del donador "B" con los diferentes tratamientos transcurridas 72 h (prueba Dunnet de comparación múltiple, * $p < 0.05$, significativo).

En los cultivos del donador C, en comparación con el testigo negativo, los valores de la viabilidad (Fig. 4), en los diferentes tratamientos, también fueron bajos, pero solo significativamente en Anto + Bleo y Bleo + Anto.

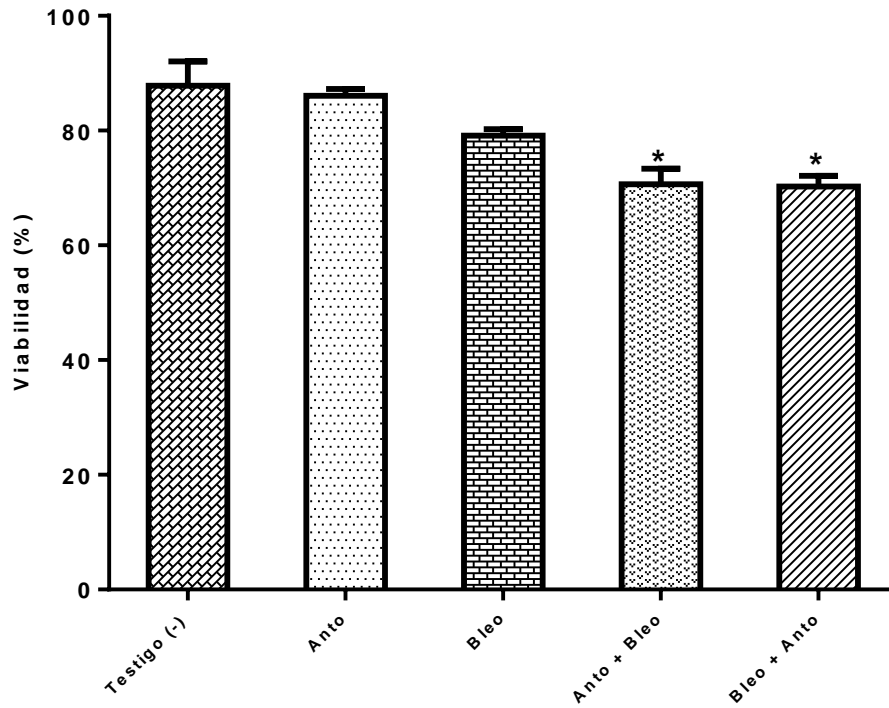


Figura 4. Viabilidad celular del donador "C" con los diferentes tratamientos transcurridas 72 h (prueba Dunnet de comparación múltiple, *p<0.05, significativo).

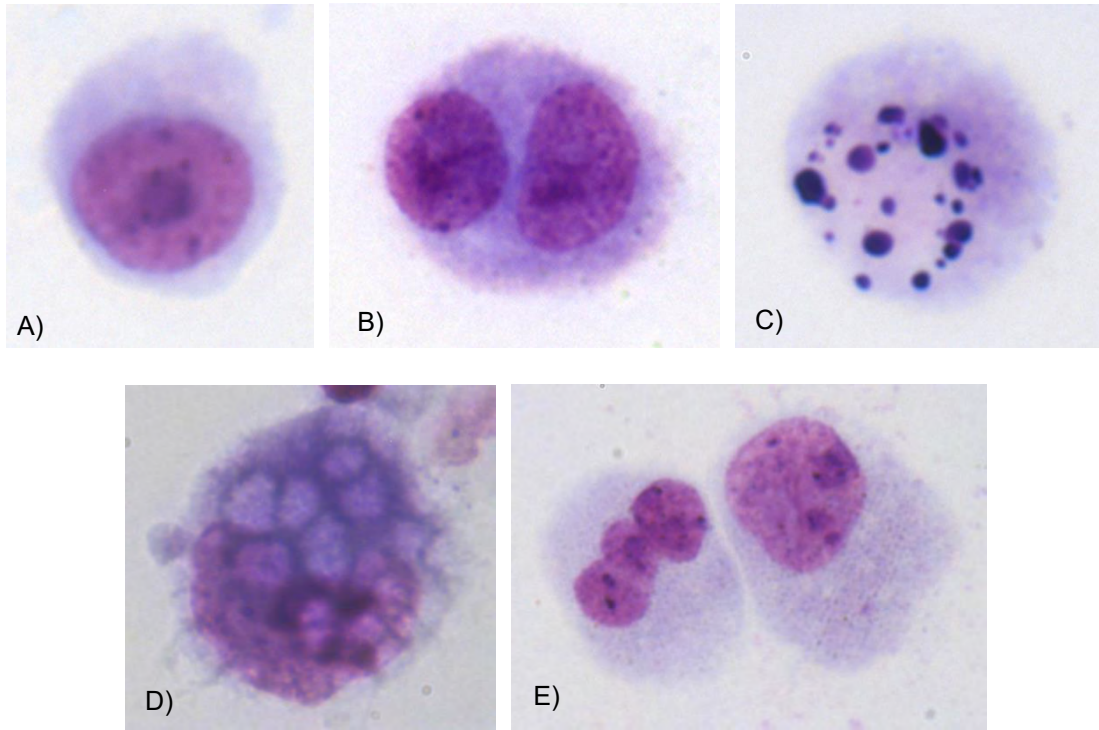


Figura 5. Fotomicrografías de células analizadas en los diferentes tratamientos, A) célula MONO, B) célula BI, C) célula apoptótica y D) células necróticas, E) célula TRI y célula MONO, (500X).

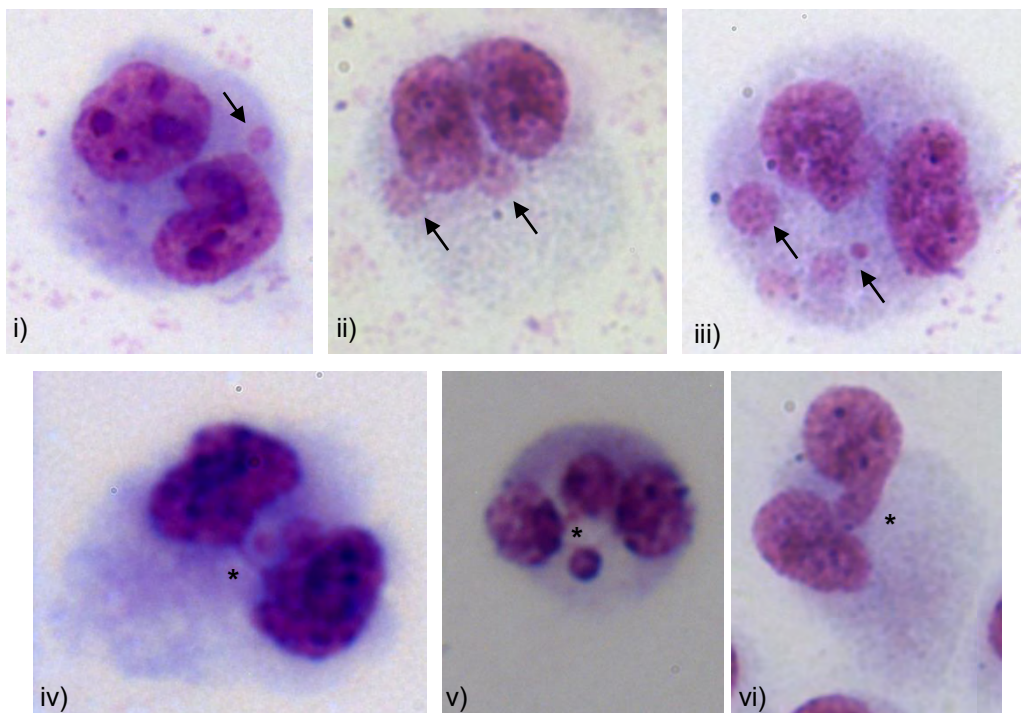


Figura 6. Fotomicrografías de células binucleadas de los cultivos expuestos a bleomicina, las flechas negras (↑) indican la presencia de MN, i), ii) y iii) y los asteriscos (*) PN iv) y v), (500X).

Los IDN para cada tratamiento de los tres donadores se muestran en la Tabla 1. En los tres donadores, el valor del IDN de los tratamientos: Bleo, Bleo + Anto y Anto + Bleo, fue bajo significativamente con respecto al testigo negativo. En cuanto al tratamiento solo con Anto, el valor del IDN es menor al testigo negativo, pero mayor que en los tratamientos Bleo, Anto + Bleo y Bleo + Anto. No obstante, solo en el caso de los donadores B y C las diferencias son significativas. Los valores del IDN del testigo negativo de los donadores A y B son similares, pero no con respecto al donador C, que es más bajo.

Tabla 1. Índices de división de los cultivos celulares bajo el efecto de las antocianinas del maíz azul y la bleomicina en diferentes tratamientos.

	Testigo (-)	Anto	Bleo	Anto + Bleo	Bleo + Anto
Donador A	1.57 ± 0.02	1.46 ± 0.07	1.15 ± 0.02 **	1.12 ± 0.01 **	1.13 ± 0.00 **
Donador B	1.52 ± 0.01	1.18 ± 0.10*	1.06 ± 0.05 **	1.02 ± 0.01 **	1.02 ± 0.00 **
Donador C	1.33 ± 0.02	1.17 ± 0.01 ***	1.01 ± 0.00 ****	1.01 ± 0.00 ****	1.03 ± 0.05 ****

Prueba Dunnet de comparación múltiple (*p<0.05, significativo), con respecto a los testigos (-) de cada donador.

Se contaron al menos 1000 células BI para las pruebas de genotoxicidad y antigenotoxicidad en el ensayo de MNBC de los tratamientos con Anto o Bleo de cada donador. En las figuras 7, 8 y 9 se muestran los resultados encontrados en la frecuencia de MN y PN. En el caso de los donadores A y B, en comparación con el testigo negativo, las Anto redujeron la frecuencia de MN y PN y la Bleo incrementó significativamente estas frecuencias (Fig. 7 y 8). Para el donador C (Fig. 9), en el tratamiento con Anto la frecuencia de MN y PN fue de cero, pero no fue posible evaluar los efectos genotóxicos de la Bleo en éste, ya que no se hallaron suficientes células BI para el análisis.

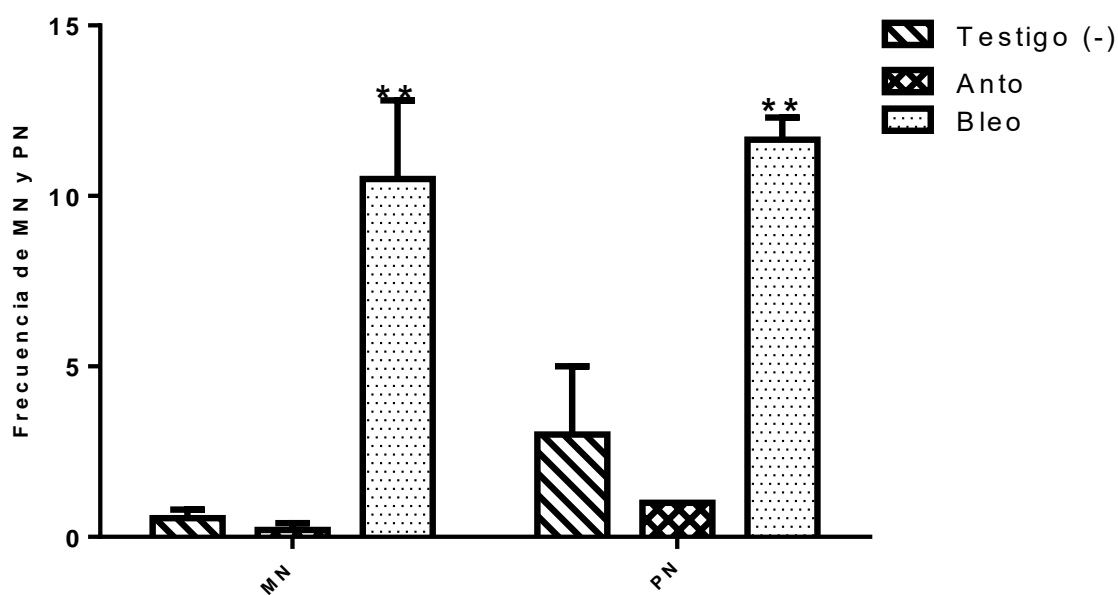


Figura 7. Frecuencia de MN y PN de los cultivos del donador “A” tratados con las antocianinas del maíz azul y de la bleomicina. Prueba Holm-Sidak de comparación múltiple (* $p < 0.05$, significativo).

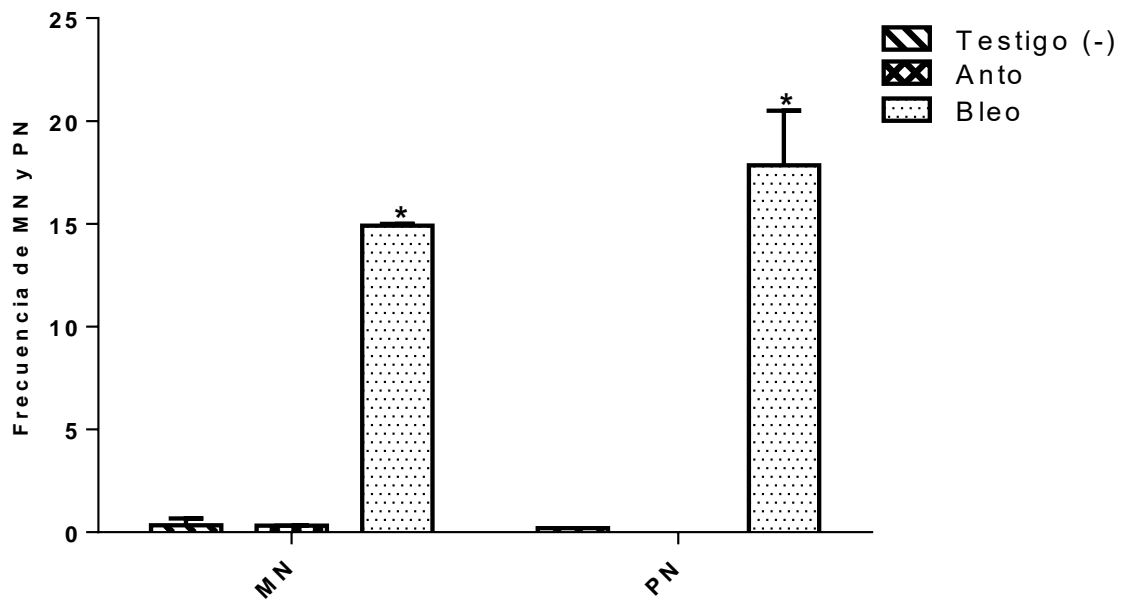


Figura 8. Frecuencia de MN y PN de los cultivos del donador “B” tratados con las antocianinas del maíz azul y de la bleomicina. Prueba Holm-Sidak de comparación múltiple (* $p < 0.05$, significativo).

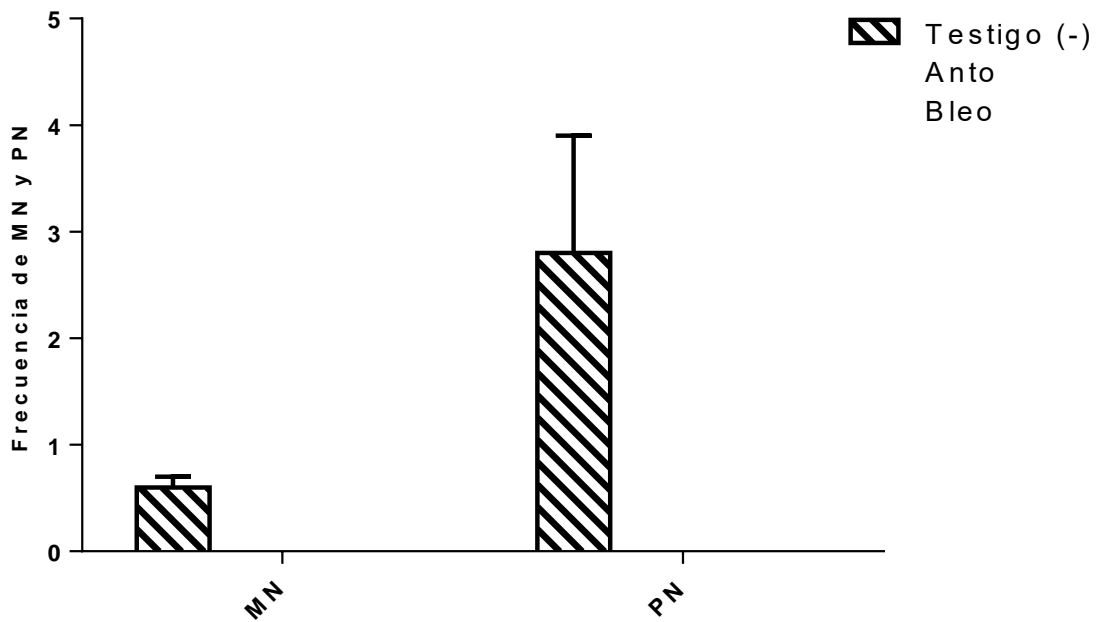


Figura 9. Frecuencia de MN y PN de los cultivos del donador “C” tratados con las antocianinas del maíz azul y de la bleomicina. Prueba Holm-Sidak de comparación múltiple (* $p < 0.05$, significativo).

De las 1000 células analizadas entre MONO, BI, MULTI, apoptóticas y necróticas (Figuras 10, 11 y 12). Para el donador A (Fig. 10), en el testigo negativo se registró un mayor número de células BI seguida de MONO y menor proporción de MULTI, necróticas y apoptóticas. En los cultivos tratados con Anto el mayor número de células registradas corresponde a células MONO y BI y un porcentaje bajo de células MULTI, necróticas y apoptóticas. En los cultivos expuestos a la Bleo, el número de células BI se redujo drásticamente, predominando las células MONO. En los tratamientos Anto + Bleo y Bleo + Anto los mayores porcentajes de células fueron las MONO, en éstos cultivos se observa como las células apoptóticas aumentan en porcentaje.

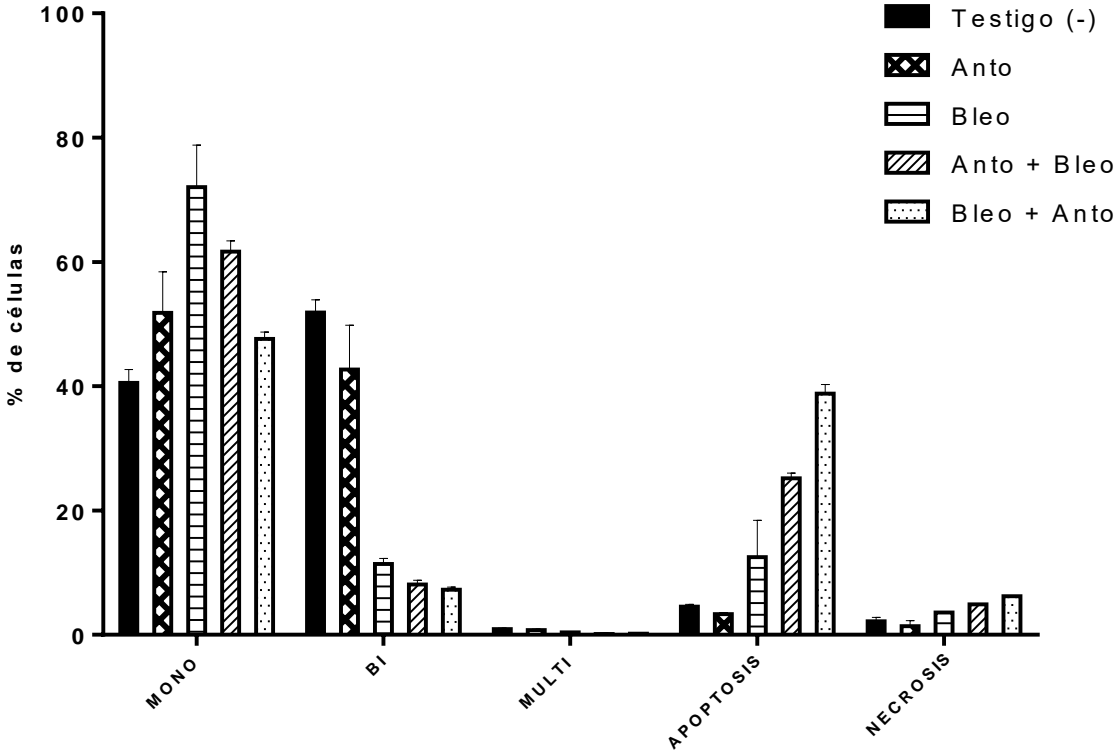


Figura 10. Porcentaje de células en los cultivos de linfocitos del donador "A", expuestos a las antocianinas del maíz azul y a la bleomicina en diferentes tratamientos.

Para el donador B (Fig. 11), en el testigo negativo se registró un porcentaje de células MONO y BI muy próximos, que fueron los más altos en comparación con las células MULTI, necróticas y apoptóticas. En los cultivos tratados con Anto, el mayor porcentaje corresponde a células MONO, y un porcentaje bajo de células BI, MULTI, necróticas y apoptóticas. En los cultivos expuestos a la Bleo, el mayor porcentaje corresponde a células MONO; las apoptóticas y necróticas registraron porcentajes bajos, y próximos entre sí, pero el menor porcentaje fue de las células BI y MULTI. En los tratamientos Anto + Bleo y Bleo + Anto las células predominantes fueron las MONO, en el tratamiento Bleo + Anto se registró un porcentaje de células apoptóticas mayor en comparación con Anto + Bleo. Para este donador, el mayor porcentaje de células necróticas, ocurrió en el tratamiento con Bleo.

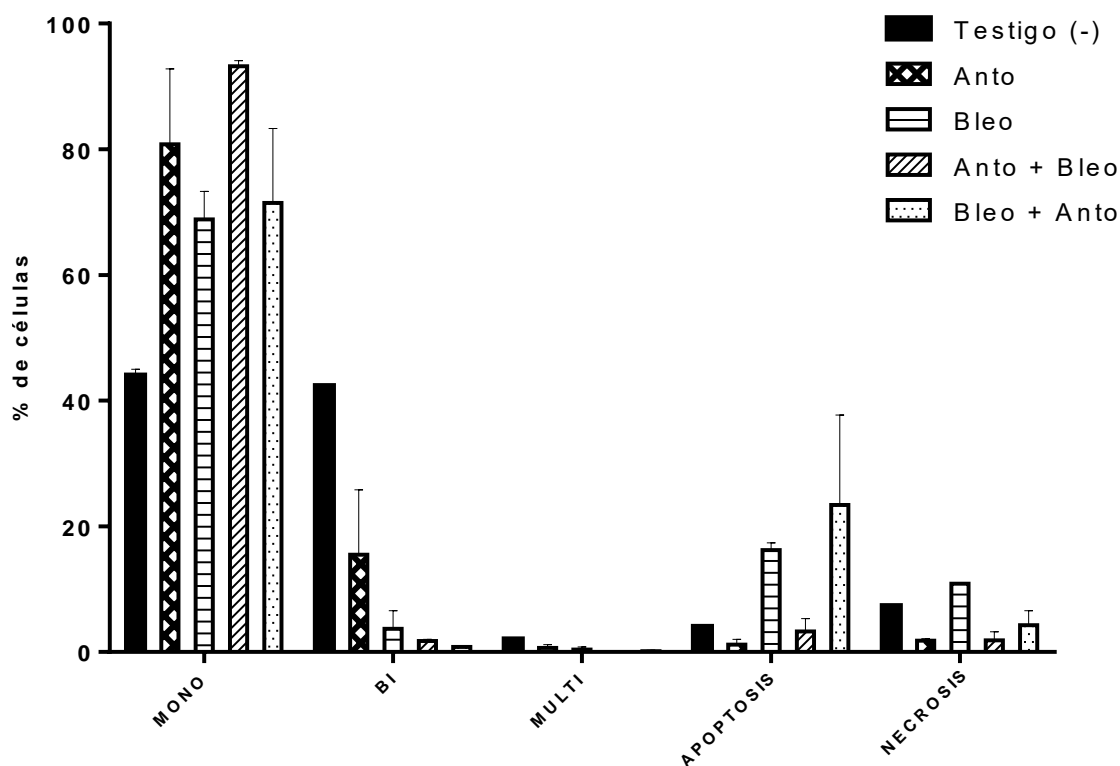


Figura 11. Porcentaje de células en los cultivos de linfocitos del donador “B”, expuestos a las antocianinas del maíz azul y a la bleomicina en diferentes tratamientos.

En los cultivos del donador C (Fig. 10), en el testigo negativo se registró un mayor número de células MONO, menor porcentaje de células BI, y muy pocas células apoptóticas, MULTI y necróticas. En los cultivos tratados con Anto el mayor número de células registradas corresponde a células MONO, un porcentaje bajo de células BI y escasas células MULTI, necróticas y apoptóticas. En los cultivos expuestos a la Bleo, el número de células BI se redujo drásticamente, predominando las células MONO, incluso el porcentaje de células apoptóticas fue mayor que el de BI. En los tratamientos Anto + Bleo y Bleo + Anto el mayor porcentaje fue de células MONO, en éstos, se observa un porcentaje mayor de células apoptóticas, en comparación con las BI, el cual es muy bajo, y sin registro de células MULTI.

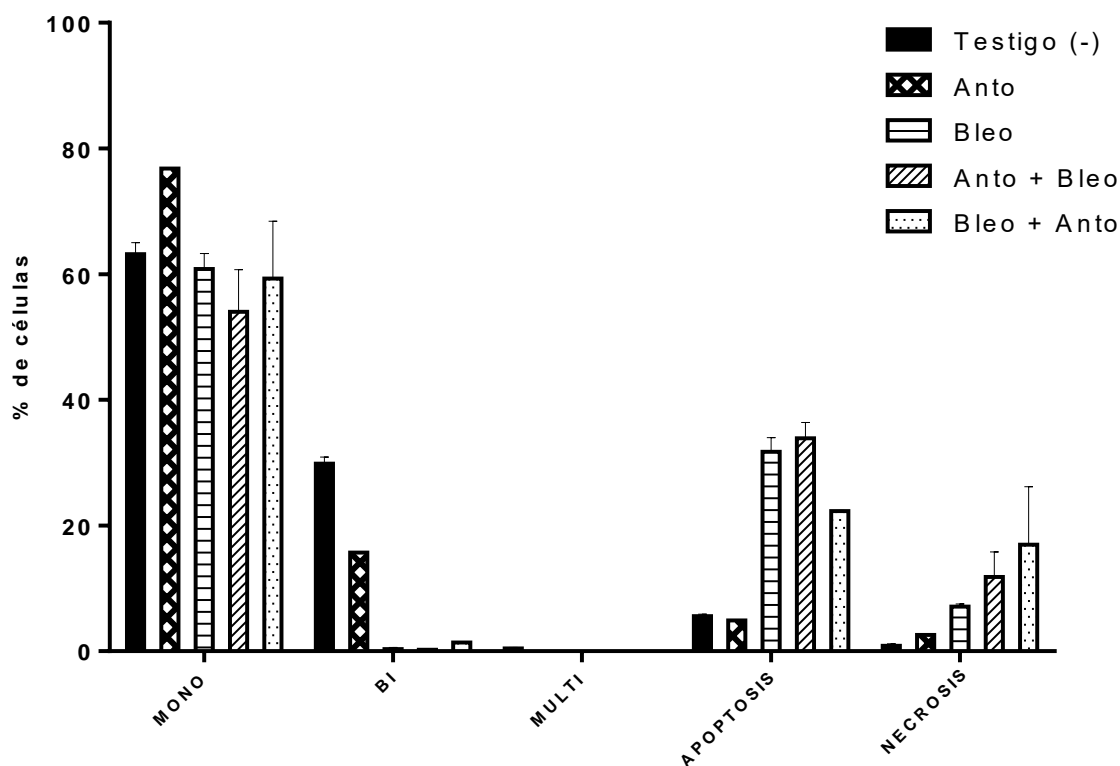


Figura 12. Porcentaje de células en los cultivos de linfocitos del donador “C”, expuestos a las antocianinas del maíz azul y a la bleomicina en diferentes tratamientos.

Los porcentajes de células apoptóticas en los tratamientos de cada donador, se muestran en las Figuras 13, 14 y 15. El donador A, en el tratamiento con Anto registró un porcentaje de apoptosis menor en comparación con el testigo negativo y un incremento de este porcentaje en el tratamiento con Bleo. Al evaluar el papel de las Anto pre y postratamiento con respecto a la Bleo (Anto + Bleo y Bleo + Anto, respectivamente), el porcentaje de células apoptóticas, fue significativamente alto (Fig. 13).

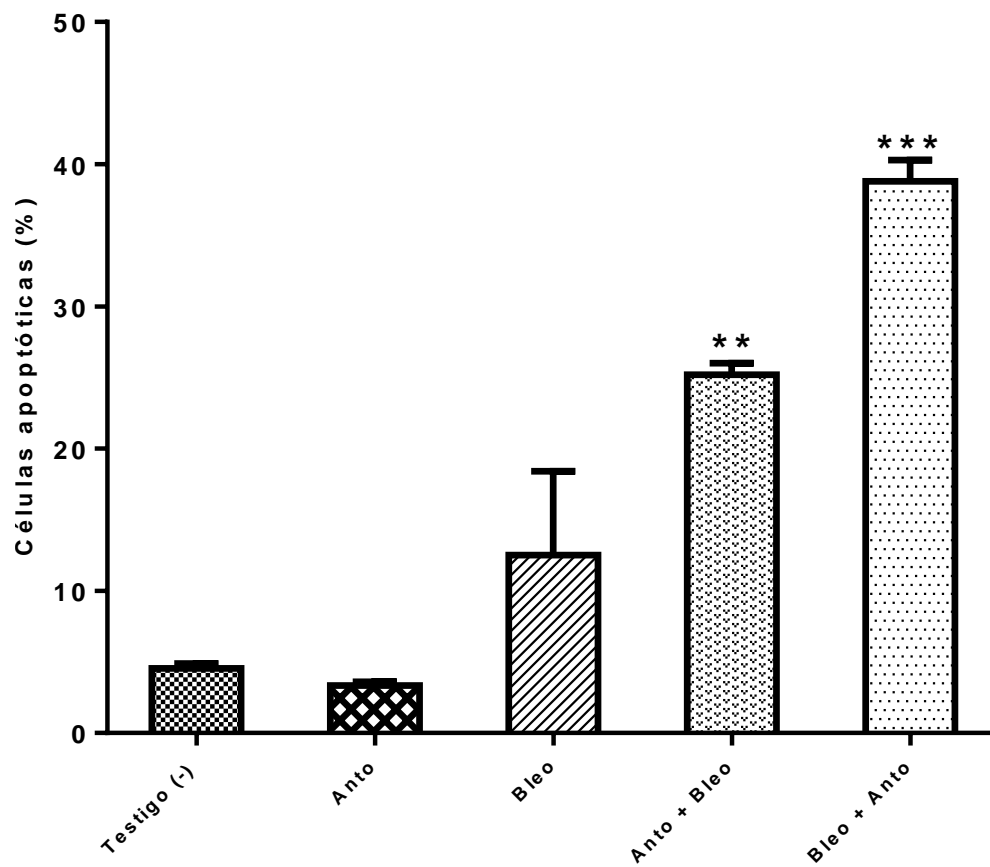


Figura 13. Porcentaje de células apoptóticas en los cultivos del donador “A” transcurridas 72 h, expuestos a las antocianinas del maíz azul y a la bleomicina en diferentes tratamientos (Prueba Dunnet de comparación múltiple, * $p < 0.05$, significativo).

En el donador B, con el tratamiento de Anto se registró un porcentaje de apoptosis menor en comparación con el testigo negativo, y un incremento significativo de este porcentaje en el tratamiento con Bleo. Al evaluar el papel de las Anto pretratamiento con respecto a la Bleo (Anto + Bleo) se observó una disminución de la apoptosis, en cambio en el postratamiento (Bleo + Anto) el porcentaje de células apoptóticas, fue significativamente alto (Fig. 14).

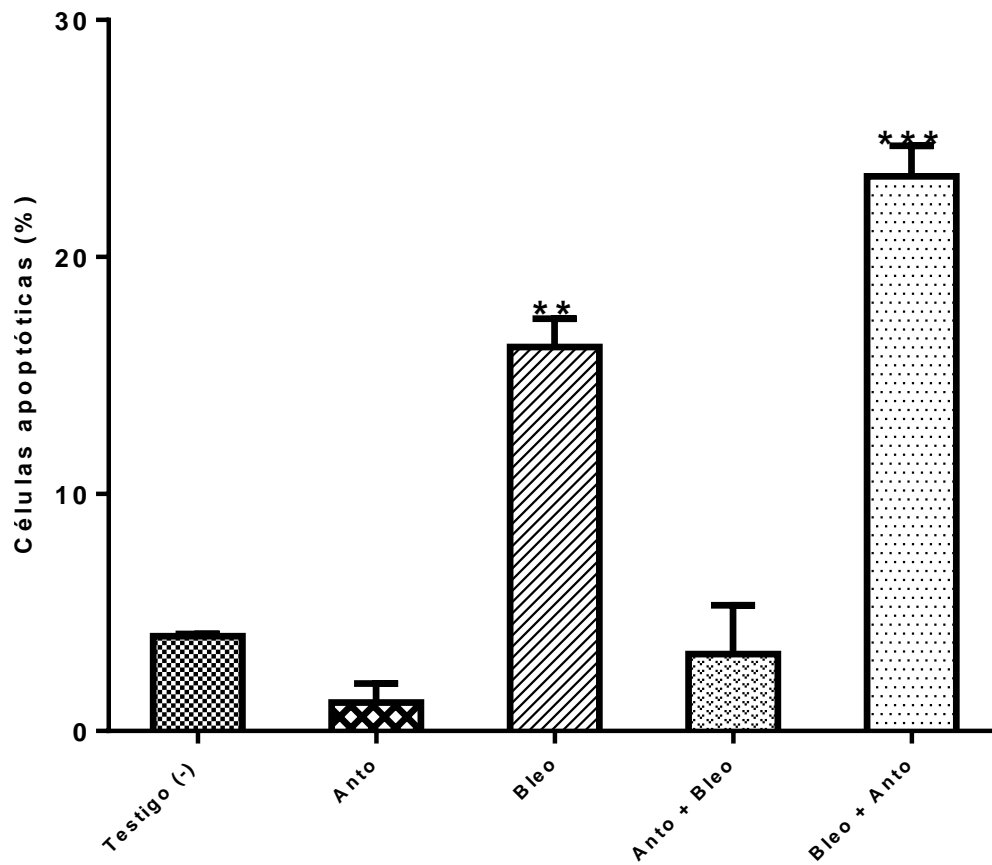


Figura 14. Porcentaje de células apoptóticas en los cultivos del donador "B" transcurridas 72 h, expuestos a las antocianinas del maíz azul y a la bleomicina en diferentes tratamientos (Prueba Dunnet de comparación múltiple, * $p < 0.05$, significativo).

Para el donador C, en el tratamiento con Anto se registró un porcentaje de apoptosis muy próximo con el testigo negativo, y un incremento significativamente alto en el tratamiento con Bleo. Al evaluar el papel de las Anto pre y postratamiento con respecto a la Bleo, el porcentaje de células apoptóticas, fue significativamente alto (Fig. 15).

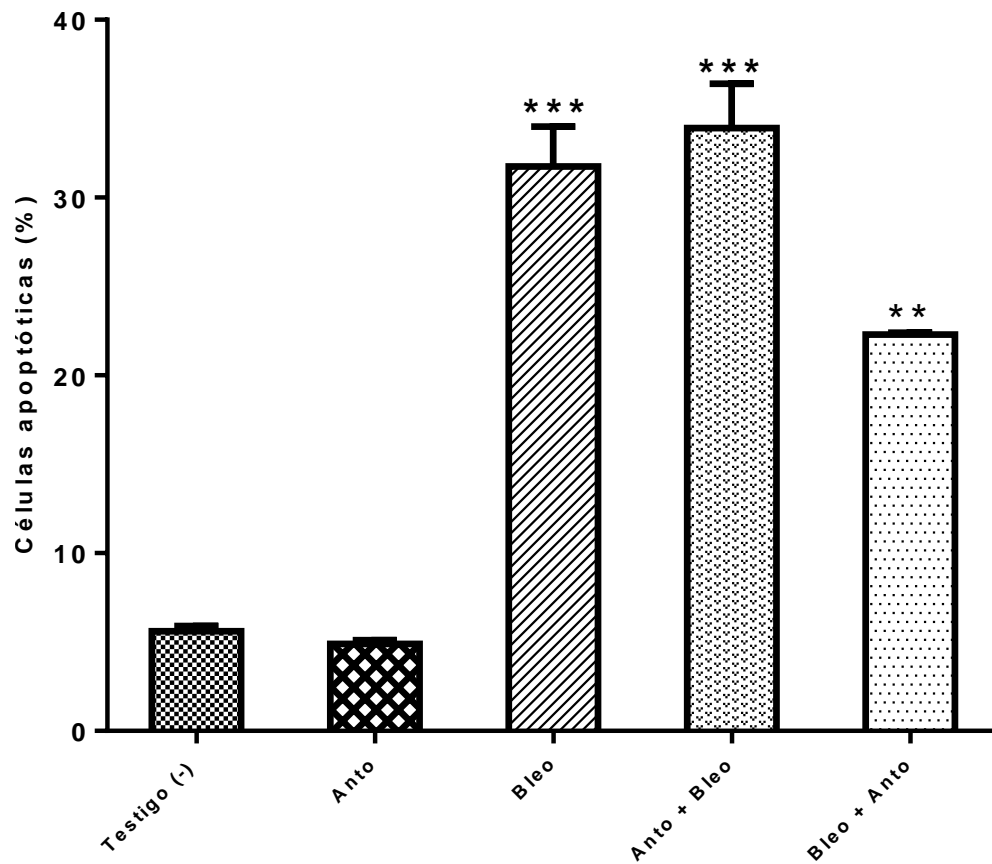


Figura 15. Porcentaje de células apoptóticas en los cultivos del donador "C" transcurridas 72 h, expuestos a las antocianinas del maíz azul y a la bleomicina en diferentes tratamientos (Prueba Dunnet de comparación múltiple, * $p < 0.05$, significativo).

VII. Discusión.

El rendimiento en peso del extracto liofilizado que se obtuvo fue de 2.3%, del total de harina utilizada, la apariencia de este extracto era rojiza, según lo reportado por Garzón (2008), este color corresponde a las antocianinas en un pH en la región de los ácidos; esta condición se debe a que la extracción se llevó a cabo con un disolvente acidificado con ácido cítrico; por lo tanto, aunque el color de la harina era azul en un inicio, tal como los granos del maíz, al entrar en contacto con la solución acidificada el color de ésta tornó a rojo intenso, de acuerdo con lo reportado por Garzón (2008), las antocianinas son más estables a valores bajos de pH, esto fue un factor para mantener las moléculas extraídas estables. Cuando las antocianinas fueron disueltas en agua estéril la apariencia se mantuvo de color rojizo. Fue importante que el extracto seco se disolviera en agua, ya que éste, se utilizó para realizar pruebas en los linfocitos humanos aislados, por lo tanto, mantenerlas en etanol, podría haber causado citotoxicidad.

En la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, a diferencia de Gutiérrez *et al.* (2008) y de Alarcón *et al.* (2011), la curva de calibración se realizó empleando ácido tánico en lugar de ácido gálico; los resultados mostraron que el extracto contenía 1.32 % de peso equivalente a ácido tánico de polifenoles por cada gramo de extracto seco, con respecto a lo reportado por los autores mencionados, esta cantidad podría aparentar un rendimiento bajo de fenoles, no obstante, la masa molar del ácido tánico es aproximadamente diez veces mayor a la del ácido gálico.

En el análisis por espectrofotometría en la banda del ultravioleta al visible; dentro de la región del ultravioleta, el extracto, alcanza el pico máximo a 283 ± 5 nm, que corresponde a lo reportado por Polyphenols Laboratories para la cianidina-3-glucósido; Jackman y Smith (1996) y Salinas *et al.* (2003) describen la presencia de esta antocianina en el maíz azul; según Kong *et al.* (2003) es la más común de las antocianinas. En la región del visible se encontró un pico máximo a 513 ± 5 nm que se aproxima a lo reportado por Jurd y Asen (1996) y Giusti y Wrolstand (2001) y Polyphenols Laboratories para la misma molécula en solución acuosa.

En el análisis de viabilidad celular, el hecho de que en los tratamientos Anto + Bleo y Bleo + Anto, en los tres donadores, reporte valores bajos, da un primer índice del papel citotóxico de las Anto en linfocitos sensibilizados con el agente clastogénico Bleo. No obstante, es importante, verificar estos valores con el análisis de la muerte celular ocurrida, necrosis o apoptosis.

En los valores del IDN de los linfocitos tratados con Bleo, Bleo + Anto y Anto + Bleo de los tres donadores, de acuerdo con Eastmond y Tucker (1989), se evidencia efecto citostático; la respuesta mitogénica y por ende, la proporción de células BI es baja, este efecto puede deberse a la cantidad de Bleo empleada, pues, Promchainant (1975) y Au y colaboradores (1980), han mostrado que altas dosis de Bleo reducen el índice mitótico de los linfocitos *in vitro*; sin embargo, Aghamohammadi y colaboradores (1984) utilizan la misma cantidad de Bleo en el ensayo de MN encontrando resultados significativos en la frecuencia de MN. En menor grado con respecto a la Bleo, las antocianinas de maíz azul ejercen un efecto citostático, lo que se asemeja a lo encontrado por Fimognari *et al.* (2004) que reportaron que la cianidina 3-O- β -glucopiranosido redujo el índice de replicación en cultivos de linfocitos humanos en aproximadamente el 50%. Por otra parte, en el testigo negativo, el donador C obtuvo un IDN bajo en comparación con los otros donadores, esto puede deberse al grado de sensibilidad de cada individuo o también, atribuirse a que se trataba de un individuo del sexo femenino.

En el ensayo de MNBC para las pruebas de genotoxicidad y antigenotoxicidad; se encontró que las antocianinas de maíz azul juegan un papel importante en la reducción de daño genotóxico, ya que, en el tratamiento con Anto, en todos los donadores, en comparación con el testigo negativo, la frecuencia de MN y PN fue baja. Los resultados hallados son comparables con los obtenidos por Ribeiro *et al.* (2010), quienes encontraron que la pulpa de acai, fruto que contiene antocinainas, administrada en ratones tratados con doxorubicin (un agente que induce daño al DNA); reduce la frecuencia de MN en eritrocitos de sangre periférica y de medula ósea; también reportaron que la pulpa ejerce una alta eficacia en la protección contra el daño del DNA en células hepáticas y renales. Estos resultados muestran que el extracto de maíz azul ejercen un fuerte potencial antigentóxico en los cultivos de linfocitos, fungiendo como protectoras, reduciendo la frecuencia de células con MN y PN, esto, concuerdan con lo descrito por Fimognari *et al.* (2004) para la cianidina 3-O- β -glucopiranosido, quienes encontraron, que ésta efectúa un

papel en la protección de los linfocitos humanos, ya que, fue capaz de reducir la frecuencia de MN inducidos por los mutágenos: etil metanosulfonato, colchicina y peróxido de hidrogeno. Es importante señalar que, en comparación con las antocianinas, otros autores han reportado el papel protector de otros pigmentos de origen vegetal, por ejemplo, Serpeloni *et al.* (2011) evaluó el efecto de clorofila b, encontrando la reducción en la frecuencia de la ruptura cromosómica y la formación de MN en células de médula ósea y de sangre periférica de ratones sensibilizados con cisplatino mostrando que el pretratamiento con clorofila b atenúa la inestabilidad cromosómica.

En los cultivos expuestos a la Bleo, se observó, una evidente alteración del material genético de los linfocitos, ya que, la frecuencia de MN y PN incremento significativamente en los donadores A y B, esto corresponde a lo hallado por Aghamohammadi (1984) en linfocitos humanos *in vitro*; en células de sangre periférica de ratones por Anderson y colaboradores (1995) y Molinari (2010) en células CHO-K1, quienes describen un incremento de MN en los respectivos sistemas biológicos expuestos a la Bleo. En el donador C, no se logró analizar la frecuencia de MN y PN dado que no se encontraron suficientes células BI; el IDN fue bajo y el porcentaje de células apoptóticas alto, esto sugiere que la Bleo ejerció un fuerte efecto tóxico en los linfocitos de este donador, lo cual puede deberse al grado de sensibilidad de éste. Estos resultados evidencian el efecto gentóxico de la bleomicina.

Al analizar los porcentajes de células apoptóticas en los diferentes tratamientos, muestran que las Anto, ejercen también, un papel en la citotoxicidad, ya que en los cultivos de los tres donadores tratados solo con Anto, se registró un porcentaje bajo de la apoptosis, en comparación con el testigo negativo, lo mismo, en el porcentaje de células necróticas en el caso de los donadores A y B.

Los linfocitos expuestos a la Bleo, como se muestra en las Figuras 13, 14 y 15, registraron un porcentaje alto en la apoptosis y en la necrosis, en comparación con el testigo; este porcentaje fue significativamente mayor en el donador C, lo que puede deberse a la sensibilidad de este individuo, quizá relacionada al sexo, de hecho, como se mencionó anteriormente, en este tratamiento, para este individuo se encontró un IDN muy bajo.

En los linfocitos sensibilizados con Bleo y tratados previamente con las Anto (Anto + Bleo), se observó, que el porcentaje en la apoptosis fue alto significativamente. Sin embargo, en el donador B, este porcentaje fue menor al testigo negativo, esto puede sugerir, una respuesta más eficiente de este individuo bajo la protección de las Anto frente a los agentes genotóxicos. En los linfocitos sensibilizados con Bleo y posteriormente tratados con Anto (Bleo + Anto), en todos los donadores, se registró un incremento de citotoxicidad; el porcentaje en la apoptosis con respecto al testigo negativo fue significativamente alto, según la prueba de comparación múltiple de Dunnet; también la viabilidad celular muestra porcentajes bajos para este tratamiento. Este evento resulta ser muy interesante, dado que, como se ha visto en trabajos previos, en diferentes sistemas biológicos, las antocianinas muestran un efecto citotóxico muy importante en células con daño genético induciéndolas a muerte celular, tal como, lo describe Fimognari *et al.* (2004) para la cianidina 3-O- β -glucopiranosido, la cual produjo apoptosis en linfocitos humanos *in vitro* sensibilizados por el etil metanosulfonato, colchicina y peróxido de hidrogeno. Esto refuerza que las antocianina es capaz de eliminar células altamente dañadas. Por otra parte, Alarcón y colaboradores (2011) describieron los efectos citotóxicos de extractos de maíz azul en las líneas celulares humanas cancerosas: PC3-próstata, K562-Leucemia, MCF-7-Mama, SKLU-1-Pulmón; fracciones de antocianinas de vino tinto causan la supresión de células cancerígenas HCT de colon humano, y AGS gástricas (Kamei, *et al.*, 1995); así como, en ratas, el suministro de papas púrpura y repollo morado que contiene antocianinas causan la supresión de tumores (Hagiwara, *et al.*, 2002).

VIII. Conclusiones y recomendaciones.

Con los resultados encontrados en este trabajo, se puede concluir el excelente potencial de las antocianinas de maíz azul, en la reducción de la frecuencia de MN y PN, así como, para eliminar las células dañadas genéticamente por la bleomicina en el sistema de linfocitos humanos *in vitro*. Este estudio pone de manifiesto el papel relevante de los compuestos de origen vegetal como son las antocianinas, entre otros fotoquímicos, en la búsqueda de alternativas que ayuden a combatir eficazmente la agresión ocasionada por los productos tóxicos dispersos en el ambiente, derivados de la actividad humana. Finalmente, se sugiere la incorporación del maíz azul y en general, el consumo de polifenoles naturales en la dieta cotidiana.

IX. Referencias.

- Aghamohammadi, S. Z., Henderson, L., Cole R. J. (1984). The human lymphocytes micronucleus assay: responses of cord blood lymphocytes to γ -irradiation and bleomycin. *Mutation Research* 130: 395-401.
- Aiassa, D., Mañas, F., Bosh, B., Gentile, N., Bernadi, N., Gorla, N. (2012). Biomarcadores de daño genético en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas. *Acta Biológica Colombiana* 17 (3): 485-510.
- Akhmadieva, A. Kh., Zaichkina, S. I., Ruzieva, R. K., Ganassi, E. E. (1993). The protective action of a natural preparation of anthocyan (pelargonidin-3,5-diglucoside). *Radiobiologia* 33: 433-435.
- Alarcón, E., Guzmán, R. I., Aquino, E. N., Chávez-Servia, J. L. (2011). Actividad anticancerígena “*in vitro*” de extractos de maíz y tortilla azul. Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2016). *Biología molecular de la célula*. Sexta edición traducida al español. Editorial OMEGA. pp. 1027-1030.
- Alonso-Castro, A. J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez, M. C., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., García-Carrancá, A. (2012). Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltld (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 141: 888-946.
- Amr, A., Al-Tamimi, E. (2007). Stability of the crude extracts of ranunculus asiaticus anthocyanins and their use as food colourants. *International Journal of Food Science and Technology* 42: 985-991.
- Anderson, E. (1946). Maize in Mexico. A preliminary survey. *Annals of Missouri Botanical Garden* 33: 147-247.
- Anderson, D., Basaran, N., Blowers, S. D., Edwards, A. J. (1995). The effect of antioxidants on bleomycin treatment in in vitro and in vivo genotoxicity assays. *Mutation Research* 329: 37-47.
- Andersen, O. M., Jordheim, M. (2006). The anthocyanins. En O. M. Andersen y K. R. Markham (Editores), *Flavonoids*, 2da edición, Chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 452-471.
- Au, W. W., Badary, O. A., Heo, M. Y. (2001). Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens. *Occupational Medicine* 16(2): 345-357.
- Au, W. W., Johnston, D. A., Collie-Bruyere, C., Hsu, T. C. (1980). Short-term cytogenetic assays of nine cancer chemotherapeutic drugs with metabolic activation. *Environmental Mutagenesis* 4: 455-464.

- Awika, J. M., Rooney, L. W., Waniska, R. D. (2005). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 90(1–2): 293–301.
- Bayram, S., Genc, A., Buyukleyla, M., Rencuzogullari, E. (2016). Genotoxicity and cytotoxicity of copper oxychloride in cultured human lymphocytes using cytogenetic and molecular tests. *Cytotechnology* 68:2027–2036.
- Bonassi, S., Au W. W. (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutation Research* 511: 73-86.
- Boyum, A. (1976). Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology* 5: 9-15.
- Bridle, P., García-Viguera, C., Tomas-Barberan, F. A. (1996). Analysis of anthocyanins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 19(4): 537–545.
- Cacace, J. E., Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59(4): 379–389.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry* 113: 859–871.
- Castro, S., Covarrubias, L. F. (2003). Muerte celular programada. En: Jiménez L. F. y Merchant H. (Editores), *Biología celular y molecular.*, Capítulo 20. Primera edición. Pearson Educación, México.
- Ceretti, E., Zani, C., Zerbini, I., Viola, G., Moretti, M., Villarini, M., Dominici, L., Monarca, S., Feretti, D. (2015). Monitoring of volatile and non-volatile urban air genotoxins using bacteria, human cells and plants. *Chemosphere* 1120: 221-229.
- Cevallos-Casals B. A., Cisneros Zeballos L. (2004). Stability of anthocyanin based aqueous extract of andean purple corn and red fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry* 86: 69-77.
- Chou, P. H., Matsui, S., Misaki, K., Matsuda, T. (2007). Isolation and identification of xenobiotic aryl hydrocarbon receptor ligands in dyeing wastewater. *Environmental Science and Technology* 41(2): 652–657.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/maices/razas2012.html>. Recuperado el 07 de agosto de 2017.
- Cortés-Gómez, A., San Martín-Martínez, E., Martínez-Bustos, F., Vázquez-Carrillo, G. M. (2005). Tortillas of blue maize (*Zea mays* L.) prepared by fractionated process of nixtamalization: analysis using response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 66: 273-281.

- Cortés, G. A., Salinas, M. Y., San Martín-Martínez, E., Martínez-Bustos, F. (2006). Stability of anthocyanins of blue maize (*Zea mays* L.) after nixtamalization of separated pericarp-germ tip cap and endosperm fractions. *Journal of Cereal Science* 43: 57-62.
- Donner, H., Gao, L., Mazza, G. (1997). Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. *Food Research International* 30(8): 637-643.
- Eastmond, D. A., Tucker, J. D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 13 (1): 34-43.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495-516.
- Evans, H. J. (1977). Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations, En: Scott, D., Bridges, B. A., Sobels, F. H. (Editores), *Progress in Genetic Toxicology*. Elsevier North Holland Biomedical Press. pp. 57-74.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455: 81-95.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research* 600: 58-66.
- Fenech, M., Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Research* 147: 29-36.
- Fenech, M., Morley, A. A. (1985) Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios* 43: 233-246.
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534: 65-75.
- Fimognari, C., Berti, F., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. (2004). Effect of cyanidin 3-O- β -glucopyranoside on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by four different mutagens. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 43:45-52.
- Fink, S. L., Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity* 73(4): 1907-1916.
- Folin, C., Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *The Journal of Biology Chemistry* 73: 627-650.
- Fossen, T., Andersen, O. M. (2003). Anthocyanins from red onion, *Allium cepa*, with novel aglycone. *Phytochemistry* 62(8): 1217-1220.
- Fossen, T., Cabrita, L., Andersen, O. M. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH include the alkaline region. *Food Chemistry* 63: 435-440.

- Garte, S., Bonassi, S. (2005). Linking toxicology to epidemiology: biomarkers and new technologies-special issue overview. *Mutation Research* 592: 3-5.
- Garzón, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana* 13(3): 27-36.
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., Scaccini, C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 46 (2): 361-367.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* 14(3): 217-225.
- Goodman, M. M., McK. Bird, R. (1977). The races of maize IV: Tentative grouping of 219 Latin American races. *Economic Botany* 31:204-221.
- Gómez-Arroyo, S., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Martínez-Arroyo, A., Calderón-Segura, M. E., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S. M. (2013). Riesgo Genotóxico por exposición ocupacional a plaguicidas en América Latina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29: 159-180.
- Gross, J. (1987). *Pigments in fruits*. Academic Press. N. Y. pp: 59-63.
- Gutiérrez Avella, D. M., Ortiz García, C. A., Mendoza Cisneros, A. (2008). Medición de fenoles y actividad Antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Centro Nacional de Metrología. México.
- Hagiwara, A., Yoshino, H., Ichihara, T., Kawabe, M., Tamano, S., Aoki, H., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T. (2002). Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-B]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats. *The Journal of Toxicological Science* 27:57-68.
- Hernández, E., Flores, A. (1970). Estudio morfológico de cinco razas de maíz de la Sierra Madre Occidental de México: implicaciones filogenéticas y fitogeográficas. *Agrociencia* 5(1): 3-30
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., Kroemer, G. (1997) The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15:1573-81.
- Hutchings, J. B. (1999). *Food Color and Appearance*. 2da. edición, Gaithersburg. Aspen Publishers, Inc. pp 1-29.
- Jaattela, M. (2002). Programmed cell death: many ways for cells to die decently. *Annals of Medicine* 34:480-488.

- Jackman, R. L., Smith, J. L. (1996). Anthocyanins and betalains, En: Hendry, G. A. F., Houghton, J. D. (Editores), Natural Food Colorants. Chapman & Hall, N. Y. pp. 244–310.
- Jurd, L., Asen, S. (1996). The formation of metal and “co-pigment” complexes of cyanidin 3-glucoside. *Phytochemistry* 5: 1263-1271.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8): 4076–4082.
- Kamei, H., Hashimoto, Y., Koide, T., Kojima, T., Hasegawa, M. (1998). Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 13(6): 447-52.
- Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Koide, T., Umeda, T., Yukawa, T., Terabe, K. (1995). Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Investigation* 13(6): 590–594.
- Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., Gordon, M. H. (2006). Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(11): 4016–4021.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239–257.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64(5): 923–933.
- Latt, S. (1979). Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(12): 3395-3399.
- Latt, S., Allen, J., Blom, S., Carrano, A., Falke, E., Kram, D., Schneider, E., Schreck, R., Tice, R., Whitfield, B., Wolff, S. (1981). Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. *Science* 205: 1273-1275.
- Lockshin, R. A., Zakeri, Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Molecular Cell Biology* 2(7): 545–550.
- Lule, S. U., Xia, W. (2005). Food phenolics, pros and cons: A review. *Food Reviews International* 21(4): 367–388.
- Majno, G., Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology* 146: 3–15.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 17(6): 271-278.
- Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S. (2007). Riesgo Genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23 (4): 185-200.

- Mazza, G., Kay, C. D. (2008). Bioactivity, absorption, and metabolism of anthocyanins. En Daayf, F., Lattanzio, V. (editores), *Recent advances in polyphenols research*, vol. I. Capítulo 10. pp. 228–262.
- Mazza, G., Miniati, E. (1993). Introduction. En Mazza, G., Miniati, E. (editores), *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 144.
- Miller, K. (1991). Clastogenic effects of bleomycin, cyclophosphamide, and ethyl methanesulfonate on resting and proliferating human B- and T-lymphocytes. *Mutation Research* 251: 241-251
- Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., Someya, K. (1999). Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 147: 1083-109.
- Molinari, G. B. (2010). Ivermectinas: evaluación de su efecto deletéreo mediante ensayos de genotoxicidad. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. pp 48.
- Mortelmans, K., Rupa, D. S. (2004). Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. *Advances in Applied Microbiology* 56: 379-401.
- Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L., Exon, J. H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46(2): 161–183.
- Norbury, C. J., Hickson, I. D., (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41: 367–401.
- Norppa, H. (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology letters* 149: 309-334.
- Norppa, H., Falck, G. (2003). What do human micronuclei contain?. *Mutagenesis*. 18: 221-233.
- Organización para la Alimentación y la Agricultura. (2010). <http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S02.htm>. Recuperado el 07 de agosto de 2017.
- Östling, O., Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123: 291-298.
- Ostrosky, P., Gonsebatt, M. E. (2006). El tejido linfocitario en la evaluación de biomarcadores de efecto. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pazmiño-Duran A., Gusti, M., Wrolstdad, R. E., Gloria, B. A. (2001). Anthocyanins from oxails triangularis as potential food colorants. *Food Chemistry* 75: 211-216.
- Perossini, M., Guidi, G., Chiellini, S., Siravo, D. (1987). Clinical study of bilberry anthocyanosides in the treatment of diabetic and hypertensive microangiopathy of the retina. *Ann. Ottalm. e Clin. Ocul.* 12:1173.

- Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* 100: 201-220.
- Phippen, W. B., Simon, J. E. (1998). Anthocyanins in Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(5): 1734–1738.
- Polyphenols Laboratories. <http://polyphenols.com/cyanidin-products/cyanidin-3-glucoside-article132-186.html>, revisado el 05 de agosto de 2017.
- Promchainant, C. (1975). Cytogenetic effect of bleomycin on human leukocytes *in vitro*, *Mutation Research* 28: 107-112.
- Rein, M. J. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins (dissertation). EKT series 1331. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. pp. 10–14.
- Ribeiro, J. C., Antunes, L. M., Aissa, A. F., Darin, J. D., De Rosso, V. V., Mercadante, A. Z., Bianchi, M. L. (2010). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research* 695: 22-28.
- Rossi, A., Serraino, I., Dugo, P., Di Paola, R., Mondelo, L., Genovese, T., Morabito, D., Dugo, G., Santebin, L., Caputi, A., Cuzzocrea, S. (2003). Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. *Free Radical Research* 37: 891–900.
- Sakata, K., Saito, N., Honda, T. (2006). *Ab initio* study of molecular structures and excited states in anthocyanidins. *Tetrahedron* 62(15): 3721–3731.
- Salinas, M. Y., Soto, M. H., Martínez-Bustos, F., Ortega, R. P., Arellano, J. L. (2003). Effect of alkaline cooking process on anthocyanins in pigmented maize grain. *Agrociencia* 37: 617–628.
- Sanchez, J. J., Goodman, M. M., Stuber, C. W. (2000). Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany* 54(1): 43–59.
- Savage, J. R. (1993). Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Environmental and molecular mutagenesis* 22: 198–207.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the preservation of disease. *Critical Reviews in Food Science Nutrition* 45: 297-306.
- Şekeroğlu, V., Aksoy, M., Şekeroğlu, Z. A. (2017). Cytogenetic alterations in human lymphocytes cultures following exposure to ofloxacin. *Drug and Chemical Toxicology* 40(2): 140-145.
- Serpeloni, J. M., Grotto, D., Aissa, A. F., Mercadante, A. Z., Bianchi, M. L., Antunes, L. M. (2011). An evaluation, using the comet assay and the micronucleus test, of the antigenotoxic effects of chlorophyll b in mice. *Mutation Research* 725: 50– 56.

- Smith, M., Marley, K., Seigler, D., Singletary, K., Meline, B. (2000). Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of Food Science* 65: 352–356.
- Stoneham, M., Goldacre, M., Seagroatt, V., Grill, L. (2000). Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *Journal of Epidemiology and Community Health* 54: 756–760.
- Strack, D. Wray, V. (1994). The anthocyanins. En Harborne, J. B. (Editor), *The Flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London. pp. 1-22.
- Strauss, G. H. (1991). Non-random cell killing in cryopreservation: Implication for performance of the battery of leukocyte test (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation research* 252: 1-15.
- Tristan, F., Kraft, B., Schmidt, B. M., Yousef G. G., Knight, C. T. G., Cuendet, M., Kang, Y. H., Pezzuto, J. M., Seigler, D. S., Lila, M. A. (2005). Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis. *The Journal of Food Science* 70(3): 159-166.
- Tristan, F., Kraft, B., Dey, M., Rogers, R. B., Ribnicky, D. M., Gipp, D. M., Cefalu, W. T., Raskin, I., Lila, M. A. (2008). Phytochemical composition and metabolic performance-enhancing activity of dietary berries traditionally used by native north americans. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 56(3): 654–660.
- Trump, B. F., Berezsky, I. K., Chang, S. H., Phelps, P. C. (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic pathology* 25 (1): 82–8.
- Vaglenov, A., Laltchev, S., Petkova, V., Pavlova, S., Marcos, R. (2001). Occupational exposure to lead and induction of genetic damage. *Environmental Health Perspectives* 109: 295-298.
- Vuorela, S., Kreander, K., Karonen, M., Nieminen, R., Hämäläinen, M., Galkin, A., Laitinen, L., Salminen, J. P., Moilanen, E., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., Heinonen, M. (2005). Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53(15): 5922-5931.
- Wang, S. Y., Jiao, H. (2000). Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48: 5677-5684.
- Wang, S. Y., Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruit and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry is affected by cultivar and maturity. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48: 140-146.
- Wang, H., Cao, G., Prior, R. L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 304–309.
- Wellhausen, E. J., Roberts, L. M., Hernández, E., Mangelsdorf, P. C. (1951). Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. Oficina de Estudios Especiales Secretaría de Agricultura y Ganadería. Ciudad de México. Folleto técnico núm. 55.

- Organización Mundial de la Salud (WHO). (2017). Model list of essential Medicines, list 20th.
- Wrolstad, R. E. (2000). Anthocyanins. En: Lauro, G. J., Francis, F. J., (editores), Natural Food Colorants. New York, Marcel Dekker. pp. 237-252.
- Yang, Z., Zhai, W. (2010). Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). Innovative Food and Emerging Technologies 11: 169-176.
- Yang, Z., Zhai, W. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. Innovative Food and Emerging Technologies 11: 470-476.
- Zeiss, C. J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. Veterinary Pathology 40:481–95.