

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“EFECTO GENOPROTECTOR DEL JUGO DE  
TORONJA MEDIANTE LA REPARACIÓN Y  
APOPTOSIS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUIMICOBIOLOGICAS**

**P R E S E N T A:**

**GUADALUPE RAZO AGUILERA**

**DIRECTORES:**

**DRA. ROSA ISELA ÁLVAREZ GONZÁLEZ  
DR. EDUARDO MADRIGAL BUJAIAR**



**MEXICO, D.F.**

**JUNIO 2011**



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F., siendo las 14:00 horas del día 20 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

**Efecto genoprotector del jugo de toronja mediante la reparación y apoptosis**

Presentada por el alumno:

<u>Razo</u> Apellido paterno	<u>Aguilera</u> Apellido materno	<u>Guadalupe</u> Nombre(s)							
		Con registro: <table border="1"> <tr> <td>B</td> <td>0</td> <td>7</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>3</td> <td>6</td> </tr> </table>	B	0	7	1	0	3	6
B	0	7	1	0	3	6			

aspirante de:

Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Rosa Isela Álvarez González

Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar

Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos

Dr. Juan Carlos Cancino Díaz

Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán

Dra. María Lilia Domínguez López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Manuel Jesús Piñón López





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F., el día 20 del mes junio del año 2011, el (la) que suscribe Guadalupe Razo Aguilera alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B071036, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Rosa Isela Álvarez González y el Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar y ceden los derechos del trabajo intitulado “Efecto genoprotector del jugo de toronja mediante la reparación y apoptosis”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: isela.alvarez@gmail.com y eduardo.madrigal@lycos.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Guadalupe Razo Aguilera

Dra. Rosa Isela Álvarez González  
Directora de tesis

Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar  
Director de tesis

A Edith y Alma Rosa

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Rosa Isela Álvarez González y al Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar, directores de este trabajo, por su valioso conocimiento y la confianza que depositaron en mí para la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial y jurado: Dra. María Lilia Domínguez López, Dr. Juan Carlos Cacino Díaz, Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán y Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos por sus aportaciones para mejorar este trabajo.

Al M. en C. Iván J. Galván Mendoza, Jefe de la Unidad de Microscopía Confocal y Multifotónica de los Laboratorios Centrales del CINVESTAV, por su apoyo para la captura de imágenes en el microscopio confocal.

A la Dra. Ma.del Rocío Báez, por su amistad y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros: Lolita, Víctor y Fernando por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A mis donadoras, porque sin su apoyo, no hubiera sido posible realizar este trabajo.

**El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Genética del Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rosa Isela Álvarez González y del Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar.**

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<i>i</i>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<i>ii</i>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<i>iii</i>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<i>iv</i>
<b>RESUMEN</b> .....	<i>v</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>vi</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Genotoxicidad.....	2
1.2 Antimutagénesis.....	7
1.3 Antioxidantes.....	9
1.4 Mecanismos de antimutagénesis.....	12
A. Reparación del DNA.....	13
B. Apoptosis.....	15
1.5 Propiedades de la toronja.....	19
1.6 Ensayo Cometa.....	21
1.7 Hibridación in situ con fluorescencia.....	23
1.9 Justificación.....	25
1.10 Hipótesis.....	26
1.11 Objetivos.....	26
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	27
2.1. Obtención de la muestra.....	28
2.2 Aislamiento de linfocitos.....	28

2.3 Densidad celular.....	29
2.4 Viabilidad celular.....	29
2.5 Tratamiento de linfocitos.....	30
A. Genotoxicidad.....	30
B. Antigenotoxicidad.....	31
2.6 Ensayo cometa simple.....	32
2.7 Ensayo cometa modificado (FPG).....	34
2.8 Técnica cometa-FISH.....	36
2.9 Técnica Anexina-V.....	38
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>66</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Daño al DNA inducido por peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) y jugo de toronja (JT) en los linfocitos humanos. Ensayo cometa.....	45
Figura 2. Daño al DNA inducido por peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) en los linfocitos humanos y su prevención con jugo de toronja (JT). Ensayo cometa.....	46
Figura 3. Daño al DNA inducido por peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) y su prevención con jugo de toronja (JT). Ensayo cometa con FPG....	47
Figura 4. Imágenes de cometas teñidos con bromuro de etidio.....	48
Figura 5. Esquema del cromosoma 17 y ubicación del gen p53 (17p13)....	50
Figura 6. Imágenes de células teñidas con DAPI (cometa-FISH).....	51
Figura 7. Efecto del jugo de toronja (JT) en el porcentaje de células apoptóticas y necróticas inducidas por peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). Anexina-V.....	52
Figura 8. Células teñidas con Anexina-V.....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Distribución de los grupos experimentales en el ensayo genotóxico.. .....	30
Tabla 2. Distribución de los grupos experimentales en el ensayo antígenotóxico.....	31
Tabla 3. Efecto del jugo de toronja (JT) sobre la migración de las señales del gen p53 en el cometa (cabeza o cauda).....	49

## ABREVIATURAS

AB	Aberraciones cromosómicas
DAPI	4'-6-Diamidino-2 phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ES	Estrés oxidativo
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FPG	Formamidopyrimidine-DNA-glycosylase
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HEPES	N-2[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
JT	Jugo de Toronja
KCl	Cloruro de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
LC	Longitud del cometa
MN	Micronúcleo
min	Minuto
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
PBS	Phosphate buffered saline
RL	Radicales libres
SSC	Solución salina de citratos
UV	Ultravioleta

## **RESUMEN**

Por medio del ensayo cometa demostramos el efecto genotóxico del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el efecto antígenotóxico del jugo de toronja (JT) en los linfocitos humanos. Las células que fueron expuestas al  $H_2O_2$  y tratadas con tres concentraciones de JT (10 a 90 min), presentaron un incremento significativo del daño en el DNA por  $H_2O_2$  en comparación con el testigo negativo y una disminución significativa del daño en el DNA con el JT con respecto al testigo positivo. Con el ensayo cometa modificado con FPG encontramos un incremento aun mayor del daño en el DNA por efecto del  $H_2O_2$  en comparación con el testigo negativo, y con el JT se observó también una disminución significativa del daño producido por el  $H_2O_2$ , en comparación con el testigo positivo. Con la aplicación de la técnica cometa-FISH, se determinó un 98% de las señales del gen p53 en la cabeza del cometa de las células sin tratamiento a lo largo del experimento (10-90 min), en contraste con aproximadamente el 90% de las señales en la cola del cometa de las células expuestas al  $H_2O_2$ . Las células tratadas con ambos agentes mostraron un comportamiento dependiente de la concentración y tiempo de exposición en el regreso de las señales del gen p53, a la cabeza del cometa, lo que sugiere la reparación del gen. Finalmente, con el ensayo de anexina-V, encontramos un incremento en la apoptosis y necrosis por  $H_2O_2$  pero no con el JT; cuando el JT fue adicionado a las células tratadas con  $H_2O_2$  no se observó modificación en la apoptosis, pero si se presentó una disminución significativa de la necrosis.

## **ABSTRACT**

By means of the comet assay we demonstrated a strong effect by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and no damage by grapefruit juice (GJ) in human lymphocytes. Cells exposed to  $H_2O_2$  and treated with three concentrations of GJ (10 to 90 min) showed an increase of DNA damage by  $H_2O_2$  over the control level, and a decrease of such damage by GJ. With the comet assay plus FPG we found the strongest increase of DNA damage by  $H_2O_2$  over the control level, and the strongest reduction of such damage by GJ. By applying the comet/FISH method we determined 98 % of the p53 gene signals in the comet head of control cells along the experiment (10-90 min), in contrast with about 90% signals in the comet tail of cells exposed to  $H_2O_2$ . Cells treated with both agents showed a significant, concentration/time dependent return of p53 signals to the head, suggesting enhancement of the gene repair. Finally, with the annexin V assay we found an increase in apoptosis and necrosis by  $H_2O_2$ , and no effect by GJ; when GJ was added to  $H_2O_2$  treated cells no modification was observed in regard to apoptosis, although a decrease of necrosis was observed.

# **INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 GENOTOXICIDAD

El término genotóxico fue utilizado para identificar la acción carcinogénica sobre el DNA de diversos agentes tóxicos, en contraste con los carcinógenos que tienen este efecto a través de otros mecanismos (1).

En los últimos años se han identificado numerosos agentes genotóxicos en prácticamente todas las actividades relacionadas con el hombre: laboral, farmacéutica, alimenticia o estilo de vida (1).

El daño que se produce en el DNA puede ser de varios tipos como:

1. Oxidación de bases, por ejemplo 7,8-dihidroxi-guanina (8-oxo-G).
2. Alquilación de bases por ejemplo la formación de 7-metilguanina.
3. Hidrólisis de bases, como la depurinación y depirimidinación.
4. Errores en el apareamiento de bases, como la incorporación de una base errónea en la cadena de nueva formación (2).

Los agentes que dañan al DNA son numerosos y muchos de ellos son generadores de radicales libres (RL) (3).

Los RL son moléculas de oxígeno inestable, parcialmente reducidas y altamente reactivas. Una vez inducidas causan una mayor formación de RL en una reacción en cadena autocatalítica (denominada *propagación*) (3).

La producción excesiva de RL o estrés oxidativo (EO) puede provocar daño irreversible en las biomoléculas como: lípidos (peroxidación de enlaces dobles con ruptura de cadenas), proteínas (oxidación y fragmentación) y ácidos nucleicos (oxidación de bases y ruptura de la cadena) (3).

Los RL, se producen por:

1. Absorción de energía radiante (ejemplo: luz UV, rayos X). La radiación ionizante puede hidrolizar el agua en RL de hidróxido (OH) y de hidrógeno (O).
2. Metabolismo enzimático de agentes químicos exógenos o de fármacos (ejemplo: tetracloruro de carbono).
3. Reacciones de oxidación-reducción que se producen durante los procesos metabólicos normales. En la respiración normal, la reducción secuencial de oxígeno a agua al añadir cuatro electrones genera pequeñas cantidades de intermediarios tóxicos: anión radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e iones hidróxilo (OH).
4. Los metales de transición por ejemplo: el hierro y cobre pueden catalizar la formación de RL.
5. El óxido nítrico (NO) importante mediador químico puede actuar directamente como RL o ser convertido a otras formas muy reactivas (3).

Afortunadamente RL son inestables y generalmente se degradan espontáneamente. Además varios sistemas contribuyen a la inactivación de los RL como:

1. Los antioxidantes como vitaminas E y A, el ácido ascórbico y el glutatión, bloquean la iniciación de la formación de RL o eliminan los RL.
2. Las formas reactivas generadas por los metales de transición son minimizadas por la unión de proteínas de almacenamiento de transporte (ejemplo: transferrina, ferritina, lactoferrina y ceruloplasmina).

3. Sistema de enzimas eliminadoras de radicales libres catabolizan el peróxido de hidrógeno (catalasa, glutatión peroxidasa y el anion superóxido (superóxido dismutasa) (3).

Es importante mencionar que no solamente se han tratado de identificar a los agentes genotóxicos, sino también se han buscado las estrategias para evitar o reducir los efectos negativos de estos agentes. Es así como se ha llegado al conocimiento de que en la naturaleza también se encuentran compuestos químicos con capacidad antimutagénica o antígenotóxica (1, 2)

#### **Métodos para valoración del daño genotóxico:**

Actualmente se conocen más de 200 métodos para medir genotoxicidad, entre los cuales se encuentran:

1. **Ensayo de Ames:** Este método consiste en utilizar cepas de *Salmonella typhimurium*, las cuales presentan una mutación en el *locus* de histidina por lo que la bacteria no sintetiza dicho aminoácido. La técnica consiste en cultivar las cepas, sobre una placa de agar con una pequeña cantidad de histidina y el genotóxico en estudio. Cuando la histidina se agota, sólo las bacterias que hayan mutado para obtener la capacidad de producir su propia histidina van a sobrevivir y multiplicarse. La reversión a la situación normal constituye el efecto genotóxico (4).
2. **Micronúcleos (MN):** Los micronúcleos son lesiones genotóxicas que se originan de fragmentos acéntricos de cromosomas o cromosomas completos, los cuales pueden migrar hacia los polos durante la anafase de la división celular. Este método puede ser diseñado para detectar el efecto clastogénico

y aneugénico del agente en estudio, tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro* de animales y plantas. La valoración de micronúcleos puede realizarse al microscopio, previa elaboración de laminillas con las células de estudio y la tinción de las mismas con colorante de Giemsa o naranja de acridina (1,4).

3. **Intercambio de cromátidas hermanas (ICH):** Este método está representado por el intercambio de productos de replicación del DNA, aparentemente entre cromosomas homólogos. La valoración de ICH puede hacerse en estudios *in vivo* o *in vitro*. Esta técnica se basa en la tinción diferencial de los cromosomas y la cuantificación de la frecuencia de intercambios. Es una técnica laboriosa, ya que se requiere de la obtención de cromosomas después de la exposición al agente tóxico y la realización de la tinción diferencial de las cromátidas para su análisis al microscopio (4,5).
4. **Aberraciones cromosómicas (AB):** Este método se basa en la valoración de alteraciones numéricas y estructurales. La más utilizada para medir daño genotóxico, es la cuantificación de las aberraciones estructurales ya que permite conocer la presencia de lesiones cromosómicas, cromatídicas, y los rearrreglos estructurales entre cromosomas. La frecuencia de aberraciones cromosómicas es indicador del efecto genotóxico. Es una técnica laboriosa ya que se requiere hacer cultivos celulares, exponerlo al agente tóxico, detener la división celular en metafase por medio de un mitógeno y elaborar laminillas para su análisis al microscopio, previa tinción con Giemsa (4,6).
5. **Ensayo cometa:** Es un método sensible para detectar y analizar rupturas en la cadena del DNA en una gran variedad de células tanto de plantas como de animales. Se basa en la migración del DNA en una matriz de agarosa bajo condiciones electroforéticas, la cual depende del nivel de daño. Cuando se

analizan las células al microscopio, se observa una figura en forma de cometa, con una cabeza (la región nuclear) y una cauda conteniendo los fragmentos del DNA que migran en dirección del ánodo. La longitud y frecuencia de cometas, depende del potencial genotóxico del agente probado. Es una técnica sencilla, económica y se pueden obtener resultados en relativamente poco tiempo.(4,7)

Es importante mencionar, que conforme avanzó el conocimiento sobre el daño producido por los agentes genotóxicos, también se buscaron las estrategias para evitar o reducir los efectos negativos de estos agentes. En esta búsqueda surgió el conocimiento de que también se encuentran compuestos químicos con capacidad antimutagénica o antígenotóxica (1). Por lo que un método que sirve para cuantificar genotoxicidad también es útil para medir antígenotoxicidad (4).

## 1.2 ANTIMUTAGENESIS

La antimutagenesis es el proceso mediante el cual se inhibe o elimina el daño provocado al DNA ya sea espontáneo o inducido por agentes tóxicos (1).

Actualmente, existe una gran cantidad de agentes tóxicos o factores de riesgo, ya sean físicos, químicos o biológicos que tienen un efecto mutagénico, y está bien establecido que las mutaciones en las células somáticas, tienen un papel importante en la iniciación y promoción de la carcinogénesis (8).

Algunos estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de frutas y verduras previenen enfermedades crónicas degenerativas, entre ellas el cáncer, por lo que varios grupos de investigadores del área de la salud, se han dado a la tarea de identificar agentes quimiopreventivos y quimioterapéuticos, los cuales comprenden compuestos farmacológicos (ejemplo: tamoxifen, reloxifen) y los obtenidos a través de la dieta, como los antioxidantes (ejemplo: vitamina A, C, D, E,  $\beta$ -carotenos), flavonoides (ejemplo: genistein, quercetin), polifenoles (ejemplo: curcumina, epigallocatequina-3-galata) (8,9).

En las dos últimas décadas, se han tratado de identificar y agrupar los diferentes tipos de antimutágenos. Es así como han propuesto las siguientes clasificaciones:

- A. Clasificación de Wattenberg (1981): **Agentes bloqueadores** son los que previenen la reacción de los carcinógenos en el sitio blanco y **agentes supresores** los que previenen la evolución del proceso neoplásico (8).
- B. Clasificación de Kada y col. (1982): **Desmutágenos** o inhibidores de mutagénesis, los que inactivan a los mutágenos antes de que puedan atacar al DNA y **bioantimutágenos** los que interfieren con la fijación del daño al DNA (8).

- C. Clasificación de Morse y col. (1993): **Agentes bloqueadores** los que inhiben la iniciación tumoral y **agentes supresores** los que inhiben la promoción y progresión tumoral (8).
- D. El grupo experto en antimutágenos y desmutágenos (ICPEMC) agrupan en **inhibidores del período 1** que son los que actúan extracelularmente y **inhibidores del período 2** los que actúan intracelularmente (8).
- E. En 1988 De Flora y Ramel proponen una clasificación detallada de los inhibidores de mutagénesis y carcinogénesis, los cuales han sido periódicamente revisados. Este esquema tiene tres niveles generales de prevención y conexión con el posible mecanismo de agentes quimiopreventivos del cáncer.
- 1).**Prevención primaria:** Tiene el objetivo de prevenir la ocurrencia de la enfermedad maligna, incluye inhibición de la mutación y de la iniciación del cáncer, sea en el medio extracelular o en el intracelular. 2).**Prevención secundaria:** Explora una variedad de mecanismos que ayudan a inhibir la progresión de un tumor benigno hacia la malignidad. 3).**Prevención terciaria:** Previene la recaída local de la enfermedad e inhibe la invasión y metástasis. Los mecanismos que se siguen en los diferentes niveles pueden ser compartidos o traslapados (8).

### 1.3 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias que retrasan o previenen significativamente la oxidación de las biomoléculas. Su acción se lleva a cabo tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos, actúan como capturadores (scavengers) de radicales libres, con el objetivo de mantener un equilibrio entre prooxidante/antioxidante (10).

Hay diferentes tipos de antioxidantes, los cuales se clasifican de acuerdo a su origen y a su sitio de acción (10):

#### **Clasificación de acuerdo a su origen:**

##### **A. Antioxidantes exógenos:**

###### a). Vitamina E

Captura radicales libres hidróxilo (OH) y oxígeno singlete ( $O_2$ ).

Neutraliza peróxidos.

###### b). Vitamina C

Captura radicales libres hidróxilo (OH) y oxígeno singlete ( $O_2$ )

Regenera la forma oxidada de la vitamina E.

###### c). $\beta$ -carotenos

Neutraliza el oxígeno singlete ( $O_2$ ).

###### d). Flavonoides, Licopenos

##### **B. Antioxidantes endógenos:**

###### a). Enzimáticos

Actúa como cofactor

###### b). Superóxido dismutasa (SOD)

Actúa sobre cobre, sodio, manganeso.

###### c). Catalasa (CAT)

Actúa sobre el hierro

d). Glutación peroxidasa (GPx)

Tiene acción sobre el selenio

**C. Antioxidantes no enzimáticos:**

a). Glutación

Barrera fisiológica que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células.

b). Coenzima Q

c). Ácido Tioctico

Transportador de metales (transferrina y ceruloplastina)

**Clasificación de acuerdo su sitio de acción (10):**

A. Intracelular: SOD, CAT, peroxidasa, DT-deafarasa, GSH, proteínas que ligan metales, sistemas proteolíticos, vitamina C.

B. Membrana: Vitamina E,  $\beta$ -carotenos, ubiquinol-10.

C. Extracelular: Ceruloplasmina, transferrinas, lactoferrinas, albúminas, haptoglobinas, vitamina C, ácido úrico, vitamina E.

Los antioxidantes son parte del mecanismo de defensa de la célula, muchos de los cuales son tomados a través de la dieta y están presentes en las frutas, verduras y otras plantas comestibles (11).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para conocer el efecto antioxidante y/o antimutágeno de diversas frutas (naranja, manzana, kiwi, etc.), verduras (berros, cebolla, tomate, etc.) y otras plantas (té verde, te negro, etc) así como de algunos de sus componentes (vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -carotenos, flavonoides, polifenoles, etc.) (11).

Estudios epidemiológicos han demostrado que una dieta rica en frutas y verduras reduce el riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas relacionadas con mutaciones, como el cáncer (11).

## **1.4 MECANISMOS DE ANTIMUTAGÉNESIS**

Los mecanismos para evitar la mutagénesis y carcinogénesis son numerosos entre los cuales se pueden mencionar (8):

- La inhibición de penetración o remoción del agente tóxico del organismo.
- La inactivación del mutágeno por reacción química o enzimática.
- La modificación del transporte de membrana.
- La actividad antioxidante y captura de radicales libres.
- La reparación del daño al DNA
- La modulación de apoptosis.
- La inhibición de la proliferación celular.

Los mecanismos de los agentes antimutagénicos y anticarcinogénicos pueden depender de algunas variables como: dosis, ruta de penetración al organismo, secuencia de administración, interacciones químicas, biotransformación, etc (1,8).

## A. REPARACIÓN DEL DNA

La célula tiene varios sistemas de reparación del DNA, dependiendo del tipo de daño causado a la doble hélice, entre los cuales se encuentran:

- 1. Reparación de mal apareamiento de bases (REMA).** Esta reparación de “mal apareamiento” (mismatch repair) se basa en el reconocimiento de la región del DNA con bases incorrectamente apareadas. En la especie humana, las principales proteínas de este sistema son cinco, y de ellas la más importante es la “hMSH2” (de humana, Mutante S, Homóloga, tipo 2). La acción de esta proteína es reconocer y unirse específicamente al DNA con bases mal apareadas. Una vez que se da este proceso, una nucleasa corta la cadena con la base errónea y la elimina y una DNA polimerasa sintetiza la secuencia correcta (9).
- 2. Reparación por escisión de bases (REBA).** Este tipo de reparación opera a través de varios pasos. 1) Reconocimiento de bases anormales (alquiladas, etc.). 2) Intervención de una glucosilasa específica (para cada tipo de base anormal) que corta la unión glucosídica de la base con la desoxirribosa. 3) Una endonucleasa reconoce el lugar sin una base púrica (endonucleasa apurínica, APE) o, menos frecuente, sin una base pirimídica, y corta la cadena que contiene el lugar vacío. 4). Una DNA polimerasa de reparación, usando la cadena indemne de molde, restaura la cadena cortada y, mediante la ligasa, se termina de unir la cadena reparada (9).
- 3. Reparación por escisión de nucleótidos (REN).** Es posiblemente el más extenso sistema de reparación del DNA. Reemplaza lesiones que abarcan de dos a más bases del DNA, en especial lesiones que distorsionan mucho la doble

hélice, como lesiones por luz ultravioleta (UV). Este daño ocurre generalmente en las secuencias donde hay dos Timinas lado a lado, formando dímeros de Timina, con 2 uniones entre las bases adyacentes que dan una estructura de ciclobutano y que distorsionan la estructura de la doble hélice. La reparación de este tipo de cambio está a cargo de endonucleasas especiales, que cortan un segmento de cadena simple que contiene al dímero, y luego el hueco es llenado por una DNA polimerasa y una ligasa (9).

- 4. Reparación de rupturas de doble cadena.** Este tipo de reparación es el menos desarrollado y se asocia con los mecanismos de recombinación meiótica. Estos sistemas proveen la reparación del DNA para cambios inducidos por agentes ambientales, como luz UV, agentes desaminantes, agentes alquilantes (que introducen un grupo alquilo a una base) y otros, que no están relacionados con los errores durante la replicación, pero que si no fueran corregidos, en el momento de replicarse introducirían cambios permanentes (por ello éstos son llamados cambios premutacionales) (9).

### **Métodos para valoración de la reparación del DNA:**

#### **Ensayo de síntesis no programada:**

Mide la síntesis de reparación del DNA cuando se produce escisión y eliminación del fragmento que contiene la región lesionada por agentes químicos o físicos. Este método se basa en la incorporación de Timidina tritiada al DNA (7).

#### **Ensayo cometa:**

Este método es sensible para medir daño y reparación en el DNA considerando el índice de daño de las células embebidas en un gel de agarosa (7).

## **B. APOPTOSIS**

La apoptosis es un proceso genéticamente controlado y fisiológicamente regulado, el cual tiene un papel importante durante el desarrollo embrionario y posteriormente en la homeostasis celular y la defensa inmunitaria (12,13).

El estudio de la apoptosis ha revelado un mecanismo muy complejo en el que están involucrados fenómenos morfológicos y bioquímicos que llevan a la muerte celular (12,13).

Los cambios que se producen en las células durante la apoptosis han sido descritos por diversos investigadores de la siguiente forma:

1. La cromatina se compacta y se desarma el citoesqueleto, la célula pierde entonces contacto con las células vecinas y con el sustrato o matriz extracelular por la pérdida de estructuras especializadas para la adhesión celular, como las microvellosidades o desmosomas. También pierde su forma original y se vuelve esférica (12).
2. El DNA se fragmenta por la acción de endonucleasas; las rupturas que se producen son de bajo peso molecular y entre nucleosomas (12).
3. El citoplasma y los organelos se condensan, aunque estos últimos permanecen intactos (12).
4. Las rupturas que se producen en el DNA llevan a la fragmentación del núcleo, el cual se distribuye en el citoplasma bajo la forma de numerosos fragmentos de cromatina compactada (12).
5. En la superficie de la célula aparecen prolongaciones membranosas (emisión de protusiones o protuberancias citoplasmáticas) a manera de pseudopodos,

los cuales contienen una fracción de citoplasma, organelos y fragmentos nucleares (12).

6. Estas prolongaciones membranosas se van desprendiendo de la superficie celular y se convierten en los llamados cuerpos apoptóticos o vesículas apoptóticas con derivados nucleares y componentes citoplásmicos bien conservados en su interior y finalmente, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por células cercanas y digeridas dentro de lisosomas. Las células que participan en este proceso son los macrófagos y células cercanas como las epiteliales, endoteliales y tumorales. Además se ha observado que la apoptosis no produce inflamación (14,15).

La apoptosis no solamente puede ser producida como parte de algún proceso fisiológico (morfogénesis del embrión; recambio celular en adultos, etc.) o patológico (cáncer, SIDA, enfermedades neurodegenerativas, etc.) sino también puede ser producida por algunos agentes tóxicos tanto físicos como químicos (16).

Dentro de los agentes físicos que dañan a la célula y que pueden inducir apoptosis están la radiación ionizante, la luz UV y el calor. Entre los agentes químicos que pueden producir apoptosis se encuentran los agentes alquilantes como los antineoplásicos, el peróxido de hidrógeno y los radicales libres. Tanto los agentes físicos como químicos pueden actuar de manera directa o indirecta sobre el DNA o bien a nivel de la membrana celular, dañando a la célula de tal forma que se activa la apoptosis (16).

Durante la apoptosis, se produce la externalización de fosfatidilserina (PS) en la superficie celular. La Anexina-V es una proteína anticoagulante que preferentemente se une a la PS cargada negativamente en la superficie de las células, posibilitando la detección de esta PS. El conjugado de anexina-V-biotina tiene un fluoróforo por lo que

se hace posible el uso de microscopía de fluorescencia en el proceso de detección. La combinación de Anexina-V y yoduro de propidio conjugados hace posible que se diferencie entre las células apoptóticas (anexina-V positiva, verde ), células necróticas (yoduro de propidio positivo, rojo), células necróticas células normales (sin tinción). Esto se debe a la capacidad de la anexina-V de unirse a la PS de un modo dependiente del calcio. Esta propiedad de la anexina-V la ha transformado en una herramienta muy útil para la detección de la apoptosis en las etapas tempranas del proceso, particularmente en conjunción con el yoduro de propidio (17).

### **Métodos para la valoración de la apoptosis.**

Los métodos que han sido utilizados para cuantificar la apoptosis son los siguientes:

#### **Microscopía:**

El parámetro que mide es la fragmentación nuclear, se basa en los aspectos morfológicos de la apoptosis, sus limitaciones son el tiempo, el trabajo que representa y el juicio personal del observador (18).

#### **Electroforesis en gel:**

El parámetro que mide es la degradación del material genético, en el período final de la apoptosis, esta técnica presenta una sensibilidad limitada y puede dar datos confusos (18).

#### **Citometría de flujo:**

Mide la degradación del DNA, en la fase terminal de la apoptosis, su limitante es que puede darnos valores falsos positivos (18).

**TUNEL:**

Se basa en las rupturas del DNA, es un método con alta especificidad pero su desventaja es que es muy laborioso y se pierden los cuerpos apoptóticos (18).

**Microscopía confocal:**

El parámetro que mide es mitocondrial, se tienen resultados en la fase inicial de la apoptosis, la desventaja de este método es que es indirecto. Es rápido y da resultados en un gran número de células, sin embargo pueden obtenerse datos falsos positivos (18).

**Ensayo cometa:**

Algunos investigadores, sugieren que este método puede utilizarse para medir células apoptóticas, en base a las rupturas en la cadena del DNA que se generan como parte del proceso de muerte celular (19).

**Anexina-V:**

Este método consiste en hacer evidente la fosfatidilserina, de las células en apoptosis a través de la proteína Anexina-V, que es marcada con un colorante fluorescente (18).

## 1.5 PROPIEDADES DE LA TORONJA

La toronja (*Citrus paradisi*) es un híbrido natural que se originó en las Islas Barbados hacia el siglo XVII, obtenido a través de un naranjo dulce y un pomelo (*Citrus grandis*) (20,21).

Existen dos variedades de toronja: 1) Las blancas o comunes (*Duncan* y *Marsh*) y 2) Las pigmentadas (*Burgundy*, *Ruby*, *Star Ruby*, *Thompson* o *Pink* y *Marsh*) (20).

El jugo de toronja (JT) es una bebida baja en lípidos (la mayoría mono o poliinsaturados) que contiene varios aminoácidos esenciales (triptófano, fenilalanina, tirosina, treonina, metionina, cisteína, isoleucina, leucina, lisina, ácido glutámico y aspártico) y algunos oligoelementos (potasio, calcio, cobre, magnesio, fósforo, manganeso, potasio, hierro y zinc); también es una fuente importante de vitaminas (C, A, B6, ácido pantoténico, folato y tiamina, D, E, riboflavina y niacina) (20).

A la toronja se le han realizado diversas investigaciones y los resultados han mostrado las siguientes propiedades biológicas (20):

- 1) Antimicrobiana (en compuestos extraídos de la cáscara).
- 2) Insecticida (en el aceite esencial)
- 3) Antioxidante (en el jugo)
- 4) Antigenotóxica (en el jugo)

La actividad antioxidante del JT es atribuída a su rico contenido en vitaminas y oligoelementos cuyo efecto ha sido probado por separado en varios sistemas biológicos (20,22).

El JT ha mostrado propiedades antígenotóxicas en estudios *in vivo*, ya que se ha observado una disminución en la frecuencia de micronúcleos (MN) e intercambios de cromátides hermanas (ICH) inducidos por daunorrubicina, ifosfamida y benzo[a]pireno, en estudios *in vivo* (22,23,24).

## 1.6 ENSAYO COMETA

El “Ensayo Cometa”, también conocido como electroforesis unicelular o “Single Cell Gel Electrophoresis” (SCGE), fue propuesto por varios grupos de investigadores como un método para valorar daño y reparación en el DNA (25).

Östling y Johanson en 1984, fueron los primeros en desarrollar esta técnica con el objeto de detectar el daño en el DNA en células individuales. Posteriormente, Singh y colaboradores (1988) modificaron la técnica, agregando las condiciones alcalina (pH 13) durante el proceso electroforético.

Desde su introducción, el ensayo cometa ha sido de gran aplicación en numerosos trabajos de investigación sobre daño y reparación del DNA, para medir genotoxicidad por diversos agentes; en estudios ecológicos para probar agentes contaminantes; en estudios humanos para conocer el daño de agentes físicos o químicos en personas ocupacionalmente expuestas; y también en estudios sobre nutrición y cáncer (7,25).

El ensayo cometa, es una técnica sencilla que ofrece varias ventajas como: 1) requiere un número pequeño de células por muestra; 2) es muy sensible para detectar bajos niveles de daño al DNA; 3) es muy flexible; 4) es de bajo costo; 5) se puede hacer una valoración intercelular en cualquier población de células eucarióticas; y 6) se pueden obtener resultados en un período de tiempo relativamente corto (7).

El fundamento del ensayo cometa consiste básicamente, en embeber las células bajo estudio en un minigel de agarosa que se coloca en una solución de lisis (detergentes y altas concentraciones de sales), con el objeto de romper a las células y dejar libre el DNA, el cual se desnaturaliza bajo condiciones alcalinas y posteriormente se coloca en un campo electroforético en el cual se produce una migración del DNA de

las células (desde el cátodo hacia el ánodo) que al ser neutralizadas, teñidas con bromuro de etidio y observadas bajo el microscopio de fluorescencia, se hace visible una imagen en forma de “cometa” con una cabeza (núcleo) y cauda (DNA desplazado fuera del núcleo) fluorescente, cuya longitud e intensidad de fluorescencia de la cauda del cometa están relacionados con el número de rupturas en la cadena del DNA inducidas por el agente probado (7,26,27).

Recientemente, el ensayo cometa ha sufrido otras modificaciones que consisten en hacer evidente la oxidación del DNA, por acción de algunos genotóxicos, como la radiación ionizante y el peróxido de hidrógeno, para lo cual las células embebidas en el gel de agarosa, sin lisadas e incubadas con la enzima FPG (formamidopyrimidine-DNA-glycosylase), la cual tiene la capacidad de reconocer y cortar las regiones dañada del DNA (bases oxidadas), como la 8-hidroxi guanina (8-oxo-G). Por consecuencia se forman cometas con caudas más largas, debido a la presencia de una mayor cantidad de rupturas en el DNA (28).

## **1.7 HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA**

La hibridación in situ con fluorescencia es conocida por sus siglas en inglés como FISH, Fluorescence In Situ Hybridization.

Es una técnica citogenética molecular que permite la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos (DNA ó RNA) por medio de una señal fluorescente (29).

Fue desarrollada a finales de los años 1980s como un procedimiento de hibridación radiactivo para el mapeo de genes humanos. Más tarde, esta tecnología fue ampliamente utilizada en laboratorios de citogenética clínica para la identificación de aberraciones cromosómicas, detección de microdeleciones y para el diagnóstico prenatal de las aneuploidias más comunes (30).

Se fundamenta en la desnaturalización e hibridación del DNA en estudio, con pequeñas secuencias de DNA complementarias y marcadas con fluorocromos, a los cuales se les denomina “sondas” (30).

Las sondas han sido comercializadas y clasificadas de acuerdo a la región del cromosoma que marcan, como: Centroméricas, Teloméricas, Específicas o de secuencia única y de Cromosoma completo (30).

Son obtenidas a través de los métodos de amplificación por PCR, microdissección de pequeños fragmentos de los cromosomas de interés y por clonación en levaduras y bacterias (30).

El marcaje puede ser directo o indirecto con biotina o digoxigenina, las cuales son detectadas con tinciones inmunofluorescentes (30).

El FISH es aplicado en varias ramas de la medicina y en la investigación biomédica y toxicológica ya que con esta tecnología se puede hacer evidente los

rearrreglos cromosómicos complejos; las aneuploidias presentes en los diferentes tipos celulares y tejidos, tanto en células en metafase como en interfase. También permite conocer la expresión o regulación de un gen específico, así como conocer la presencia o ausencia de un gen determinado, como por ejemplo el gen p53 el cual se encuentra involucrado en los procesos de reparación y apoptosis. El gen p53, mapea en la región 13, del brazo corto del cromosoma 17 (17p13) (31).

## 1.8 JUSTIFICACIÓN

Se sabe que el JT al igual que otras frutas y verduras, es rica en vitaminas y oligoelementos, a los cuales se les atribuyen algunas propiedades como su efecto antioxidante y antígenotóxico por su participación en los diversos mecanismos que previenen el daño al DNA.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que el JT tiene un efecto antígenotóxico en estudios *in vivo*, sin embargo no se ha comprobado este efecto en estudios *in vitro*.

Los biomarcadores de daño utilizados para ver el efecto antimutagénico, han sido aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas, pero no se ha evaluado con el ensayo cometa.

Los mecanismos de acción del JT se atribuye a su capacidad para capturar radicales libres y a su efecto inhibitorio de mutágenos como la daunorrubicina, ifosfamida y benzo(a)pireno, sin embargo es importante conocer otros mecanismos en los cuales participa el JT como genoprotector, por lo que en este trabajo se consideró importante estudiar el efecto del JT sobre la reparación y apoptosis.

Para lo cual, en este proyecto se propuso utilizar el ensayo cometa, como un método para valorar el daño y reparación del DNA debido a las ventajas que presenta y en combinación con la técnica de FISH para evidenciar el gen p53 como indicador de reparación y apoptosis.

## **1.9 HIPÓTESIS**

Si el jugo de toronja tiene un efecto genoprotector, entonces será valorado a través de la reparación y apoptosis en los linfocitos humanos tratados con  $H_2O_2$ .

## **1.10 OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales:**

1. Determinar el efecto genoprotector del jugo de toronja en linfocitos humanos tratados con  $H_2O_2$ .
2. Evaluar si el efecto antigenotóxico del jugo de toronja está relacionado con la reparación y apoptosis

### **Objetivos específicos:**

1. Realizar la cinética de inducción genotóxica del jugo de toronja y  $H_2O_2$  utilizando el ensayo cometa.
2. Determinar la antigenotoxicidad del jugo de toronja sobre el daño producido por  $H_2O_2$  por medio del ensayo cometa simple y modificado.
3. Evaluar el tiempo de migración de p53 como indicador de reparación mediante el ensayo cometa.
4. Determinar la cantidad de células en apoptosis y necrosis.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1 Obtención de la muestra:**

El estudio fue hecho en los linfocitos de una muestra de sangre periférica de tres mujeres voluntarias, clínicamente sanas, de edad promedio de 25 años, no fumadoras y que no ingirieron bebidas alcohólicas, medicamentos o suplementos alimenticios, al menos por tres semanas previas al experimento.

### **2.2 Aislamiento de linfocitos:**

Para la obtención de las células de estudio, se tomó una muestra de 10 ml de sangre periférica, de cada voluntario, con jeringa estéril y heparinizada.

La muestra de sangre fue diluída 1:10 con medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal de bovino y conservada a 4°C por 30 min. Posteriormente, se procedió a la separación de los linfocitos por gradiente de densidad, para lo cual la suspensión celular fue distribuida en 4 tubos para centrifuga de polipropileno con capacidad de 50 ml conteniendo 25 ml de Lymphoprep. Se centrifugaron a 2,500 rpm durante 30 min. La capa de linfocitos se separó y lavó 2 veces con PBS (32).

### **2.3 Densidad celular:**

Para conocer la densidad celular de cada muestra, se procedió a resuspender las células de estudio en 1 ml de PBS, se tomó una alícuota de 50µl de esta suspensión celular y se colocó en el hemocitómetro. Se contó el número de células presentes en los cuatro cuadrantes grandes y se calculó el número de células totales mediante la relación (32):

Densidad de células = # de células totales / # de cuadrantes (10,000)(Factor de dilución)

### **2.4 Viabilidad celular:**

Para conocer la viabilidad celular se preparó una solución con la suspensión celular y el colorante azul de tripano al 0.4 % en una proporción 1:1.

Se colocó una alícuota de 20 µl de la suspensión celular en el hemocitómetro y se procedió a contar las células con color (muertas) y sin color (vivas).

Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de viabilidad celular, de acuerdo a la relación siguiente (32):

% Viabilidad = Células sin color / Células totales (100)

## 2.5 Tratamiento de linfocitos:

### A). Genotoxicidad:

Para determinar el efecto genotóxico del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y del jugo de toronja (JT), los linfocitos de cada individuo, fueron distribuidos en 5 grupos, con aproximadamente  $1 \times 10^4$  células/ml. Fueron enumerados y tratados como sigue: Testigo negativo, al cual se adicionó 1ml de PBS; testigo positivo tratado con 1ml de solución  $10\mu M$  de  $H_2O_2$  y tres grupos tratados con solución de jugo de toronja (JT) al 0.1, 0.5, 1.0 %, respectivamente (Tabla 1). Las células fueron mantenidas a  $4^\circ C$  durante 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min. Antes y después de cada tratamiento se midió la viabilidad celular con solución de azul de tripano al 0.4% y se hicieron geles para ser procesados por medio del ensayo cometa simple.

El jugo de toronja (*Citrus paradisi* Macfad. var. ruby red) fue obtenido inmediatamente antes de efectuar el experimento.

**Tabla 1. Distribución de los grupos experimentales en el ensayo genotóxico. Cada grupo estuvo formado por 3 individuos**

<u>Grupo</u>	<u>Tratamiento</u>
1	PBS
2	$H_2O_2(10\mu M)$
3	JT (0.1 %)
4	JT (0.5 %)
5	JT (1.0 %)

### **B). Antigenotoxicidad:**

Para determinar el efecto antigenotóxico del JT, los linfocitos de cada individuo tratados con 10 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 min, fueron lavados con PBS y distribuidos en 4 grupos con una densidad celular de 1 X 10<sup>4</sup> células/ml e incubados a 37°C. Uno solamente en PBS y a los otros tres se les adicionó JT, 0.1, 0.5 ó 1% respectivamente (Tabla 2). Después de cada 10, 30, 60 y 90 min, las células se lavaron con PBS y se procedió con el ensayo cometa. Se prepararon geles por triplicado, para ser procesados por medio del ensayo cometa simple y modificado con FPG, cometa-FISH. También se cuantificó el número de células en apoptosis y necrosis por medio de la técnica de anexina-V.

**Tabla 2. Distribución de los grupos experimentales en el ensayo antigenotóxico. Cada grupo estuvo formado por 3 individuos**

<u>Grupo</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Condiciones experimentales</u>
A	PBS	
B	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 $\mu$ M)	5 min / 4°C
<b>(Lavado de las células con PBS)</b>		
C	PBS	10, 30, 60 y 90 min / 37°C
D	JT (0.1%)	10, 30, 60 y 90 min / 37°C
E	JT (0.5%)	10, 30, 60 y 90 min / 37°C
F	JT (1%)	10, 30, 60 y 90 min / 37°C

## **2.6 Ensayo Cometa Simple:**

### **a). Preparación de geles:**

Para la preparación de geles, se procedió a hacer lo siguiente: sobre portaobjetos completamente esmerilados y prelavados, se colocaron 120  $\mu$ l de agarosa regular (1 % en PBS, a 50°C) e inmediatamente se colocó un cubreobjetos para que se extendiera la agarosa y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 3 ó 4 min. Posteriormente, se retiró el cubreobjetos y se agregó una segunda capa con 75  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión (1 % en PBS, a 37°C) mezclada con 20  $\mu$ l de muestra ( $1 \times 10^4$  cél), se colocó un cubreobjetos y se dejó solidificar a temperatura ambiente por 3 min. Después de este tiempo, se retiró el cubreobjetos y se agregó una tercer capa con 75  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión (1% en PBS, a 37°C), de igual manera, se dejó solidificar a temperatura ambiente por 3min y se retiro el cubreobjetos con cuidado para no romper el gel formado (7,28).

Todos los geles se colocaron en un recipiente con solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % Na-Sarcosinato, Triton X-100 / DMSO 10%, pH 10), se protegieron de la luz y se mantuvieron a 4°C al menos por una hora, antes de realizar la electroforesis (7,28).

### **b). Electroforesis:**

Los geles se retiraron de la solución se lisis y se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal a la que se adicionó buffer de electroforesis (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH 13) hasta que quedaron completamente cubiertos. Se mantuvieron a temperatura ambiente y bajo oscuridad durante 20 min con el fin de desnaturalizar el DNA. Inmediatamente se realizó la electroforesis con 25 V y 300 mA durante 20 min (7,28).

**c). Tinción:**

Después de la electroforesis, los geles se lavaron durante 5min con buffer de neutralización (0.4M Tris, pH 7.5), y tiñeron con 50 µl de Bromuro de Etidio (25µg/ml) (7,28).

**d). Análisis al microscopio:**

Se analizaron 100 nucleoides por muestra al microscopio de fluorescencia, equipado con filtros de excitación y emisión de 450-500 nm (Axiostart 50, Zeiss) y software Image-Pro Plus, versión 5.0 (MediaCybernetics). Se midió la longitud del cometa en micrómetros con objetivo 40X.

**e). Análisis estadístico:**

Para el análisis estadístico se utilizaron las pruebas de ANOVA y Tukey por medio del programa SigmaStat versión 3.5.

### **2.7 Ensayo Cometa Modificado (con FPG):**

Los geles para el ensayo cometa modificado, se realizaron de la misma forma que con el ensayo cometa simple, sin embargo, antes del paso electroforético, se sometieron a la acción de la enzima FPG (Formamidopirimidina-DNA-glicosilasa) de la siguiente forma:

#### **Incubación con FPG:**

Los geles se retiraron de la solución de lisis y se colocaron en el buffer de la enzima (40mM HEPES, 0.1M KCl, 0.5mM EDTA, 0.2 mg/ml suero de albumina de bovino, pH 8) durante 5 min (3 veces). Posteriormente, a cada uno de los geles, se les agregó 50µl de la enzima FPG ( $1 \times 10^{-3}$  µg/µl), se les colocó un cubreobjetos y se incubaron por 45 min a 37°C, en una cámara húmeda (33,34) .

#### **Electroforesis:**

Transcurrido el tiempo de acción de la FPG, los geles fueron colocados en una plancha fría por 5 min, se les retiró el cubreobjetos y se colocaron en la cámara de electroforesis para desnaturalizar el DNA en el buffer de electroforesis durante 40 min. La electroforesis se realizó por 20 min a 25V y 300 mA (34).

#### **Tinción:**

Al igual que en el ensayo cometa simple, después de la electroforesis, se siguió con el procedimiento de lavado con buffer pH 7.4 y tinción con 50µl de bromuro de etidio (34).

#### **Análisis al microscopio:**

Se analizaron 100 nucleoides por muestra al microscopio de fluorescencia, equipado con filtros de excitación y emisión de 450-500 nm (Axiostart 50, Zeiss) y software Image-Pro Plus, 5.0 (MediaCybernetics). Se midió la longitud del cometa en micrómetros con objetivo 40X.

**Análisis estadístico:**

Los datos fueron analizados con las pruebas estadísticas ANOVA y Tukey, utilizando el programa SigmaStat versión 3.5.

## **2.8 Técnica cometa- FISH**

### **a). Preparación de los geles para FISH:**

Después de la electroforesis y neutralización de los geles realizados en laminillas prelavadas, se deshidrataron con Etanol absoluto durante 30 min, se dejaron secar perfectamente a temperatura ambiente y se procedió a hacer lo siguiente:

### **b). Desnaturalización:**

Los geles fueron colocados en solución de desnaturalización (0.5M NaOH) por 30 min y posteriormente se lavaron por 10 min con PBS (pH 7.4) (31,35,36,37,38).

### **c). Deshidratación:**

Inmediatamente después de la desnaturalización, los geles fueron deshidratados con Etanol al 70, 80 y 100 % durante 5 min en cada uno (31,35,36,37,38).

### **d). Hibridación:**

Para la hibridación del DNA, se agregó 50µl de la sonda p53 (17p13), previamente desnaturalizada a 90°C por 10 min y diluída con buffer de hibridación (10µl de sonda + 40µl de buffer de hibridación). El buffer de hibridación se preparó con Formamida al 50% con 2X SSC (solución salina de citratos). Se colocó un cubreobjetos y se incubó a 37°C en cámara húmeda, durante 72 h (31,35,36,37,38).

### **e). Posthibridación:**

Los geles se lavaron con solución 0.4X SSC a 37°C por 5 min (3 veces), con solución 2X SSC / 0.05% tween 20 por 5 min (31, 35,36,37,38).

### **f). Contratinción:**

Las laminillas fueron colocadas por 10 min en PBS, se escurrieron perfectamente y se agregó 50 µl de solución de DAPI (31,35,36,37,38).

**Análisis al microscopio:**

Se analizaron 100 células por caso, tratamiento y tiempo de exposición al microscopio de fluorescencia (63X), equipado con filtros TRICT, FITC, DAPI y UV-2<sup>a</sup> (Microscopio Nikon, Eclipse E-800, software ACT-1) y las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal (Microscopio Leyca TCS-SPE, software LAS-AF) .

**g). Análisis estadístico:**

Se analizaron 100 células por caso, tratamiento y tiempo de exposición. Se valoró el número de células con señales rojas en la cabeza (p53 sin daño) y en la cauda (p53 con daño) del cometa. Se aplicó la prueba estadística de Student-Newman-Keuls, por medio del programa SigmaStat versión 3.5.

## **2.9 Técnica Anexina-V**

### **a). Tinción de las células:**

Siguiendo el protocolo de Roche, las células de estudio, se lavaron con PBS a temperatura ambiente y centrifugaron a 5000 rpm durante 3 min, se retiró el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido con 100µl de solución de tinción (20µl Anexina-V-Fluoresceina, 1000µl Buffer HEPES, 20µl Yoduro de Propidio por cada 10 pruebas) para su incubación durante 25 min a temperatura ambiente (39).

### **b). Elaboración de preparaciones:**

Inmediatamente después de la tinción, las células se lavaron con PBS y se fijaron con solución de formaldehído al 1%, se centrifugaron a 5000 rpm por 3 min, se desechó el sobrenadante hasta dejar solamente 20µl, se resuspendió el paquete celular y se colocó el volumen total sobre un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para su observación al microscopio de fluorescencia (39,17).

### **c). Análisis al microscopio:**

Se analizaron 200 células por caso, tratamiento y tiempo de exposición al microscopio de fluorescencia (Axiostart 50, Zeiss), equipado con filtros TRICT y FITC, y software Image-Pro Plus, versión 5.0 (MediaCybernetics). Las células en apoptosis, se observaron verdes y las células en necrosis, se observaron rojas, con objetivo 100X.

### **d). Análisis estadístico:**

Los datos obtenidos se analizaron con la prueba estadística Student-Newman-Keuls, por medio del programa SigmaStat, versión 3.5.

## **RESULTADOS**

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Viabilidad celular:**

En este trabajo fue necesario medir la viabilidad celular para seleccionar las concentraciones del JT y del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para realizar los experimentos sobre genotoxicidad y antigenotoxicidad.

Nuestros resultados mostraron una viabilidad promedio del 98% para las células expuestas a las tres concentraciones de JT (0.1, 0.5 ó 1%) y del 96 % (93 - 98%) para la concentración 10 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a lo largo de 60 min de tratamiento. Estos valores de viabilidad celular no mostraron significancia estadística en comparación con las células sin tratamiento (99%).

#### **3.2 Genotoxicidad**

Los resultados que se describen a continuación corresponden a los linfocitos aislados de una muestra de sangre periférica de 3 voluntarios sanos, los cuales fueron expuestos al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10µM) y JT (0.1, 0.5 ó 1%) durante 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min a 4°C.

En la Figura 1, se representa el valor promedio de las observaciones realizadas en 100 células por individuo/tiempo. El parámetro de genotoxicidad que se cuantificó, fue la longitud del cometa (LC) expresada en micrómetros (Figura 4).

Las células tratadas con PBS presentaron un valor promedio de la LC de 10.13±0.27 µm, a lo largo de 60 min de tratamineto. Estos resultados sugieren que las

condiciones experimentales fueron las óptimas debido a que las células no sufrieron daño en el DNA. Por el contrario, en el grupo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10μM) se observó un incremento estadísticamente significativo (p<0.05, ANOVA y Tukey) de aproximadamente 6 veces la LC (valor promedio de 63.46 ± 0.55 μm), al compararlo con el testigo negativo; dicho incremento se presentó desde los 5 min de exposición al mutágeno y a lo largo de todas las observaciones realizadas (5, 10, 15, 30, 45 y 60 min) en el experimento. Estos resultados confirman la capacidad genotóxica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sugieren que la concentración y tiempos analizados son apropiados para utilizarlo como testigo positivo.

Con relación a los grupos tratados con JT en las concentraciones de 0.1, 0.5 y 1%, los resultados mostraron que la LC promedio fue de 10.1 ± 0.2, 10.08 ± 0.27 y 10.09 ± 0.2 μm, respectivamente. Estos valores se mantuvieron constantes después de incubar las células durante 60 min de tratamiento con el JT, lo cual sugiere que el JT no ejerce daño sobre el DNA.

### **3.3 Antigenotoxicidad:**

En este experimento los linfocitos fueron tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10μM) durante 5 min a 4°C, se lavaron con PBS y se prepararon cuatro grupos de células, a uno de ellos, se le adicionó PBS y a los tres restantes se les adicionó JT, a una concentración de 0.1, 0.5 ó 1%. Después de 10, 30, 60 y 90 min de incubación a 37°C, se procedió a realizar el ensayo cometa simple, modificado con FPG y cometa-FISH, asimismo se realizó el ensayo de anexina-V.

En la Figura 2, se representa el valor promedio de las observaciones realizadas en 100 células por individuo/tiempo. Al igual que en el experimento sobre genotoxicidad, se utilizó como parámetro de valoración de daño en el DNA, la LC expresada en micrómetros (Figura 4).

Las células tratadas con PBS (testigo negativo), mostraron un valor promedio de la LC de  $11.53 \pm 0.31$  a lo largo de 90 min de tratamiento; estos resultados sugieren que no se presentó daño en el DNA. Por el contrario, las células que fueron tratadas con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 min, lavadas e incubadas con PBS y con las tres concentraciones de JT (0.1, 0.5 ó 1%) mostraron un incremento significativo ( $p < 0.05$ , ANOVA y Tukey) con un valor promedio de la LC de  $53.83 \pm 0.45$ ,  $51.53 \pm 0.82$ ,  $42.41 \pm 0.73$  y  $41.59 \pm 0.63 \mu\text{m}$  respectivamente, durante 90 min de tratamiento, con respecto al testigo negativo. Sin embargo, también se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ , ANOVA y Tukey) de aproximadamente un 20% de la LC en las células que fueron incubadas con las concentraciones más altas del JT (0.5 y 1%) con respecto al testigo positivo. Lo que sugiere que el JT a las concentraciones más altas promueve la reparación del DNA.

Con respecto al ensayo cometa modificado con FPG, en la Figura 3, se representa el valor promedio de las observaciones realizadas en 100 células por individuo/tiempo. Al igual que en el ensayo cometa simple, se utilizó como parámetro de valoración de daño en el DNA, la LC expresada en micrómetros (Figura 4).

Las células que fueron incubadas sólo con PBS (testigo negativo), mostraron un valor promedio de la LC de  $12.79 \pm 0.63$  a lo largo de 90 min (10, 30, 60 y 90 min) de tratamiento; lo que sugiere que no se presentó daño en el DNA. Por el contrario, las células que fueron tratadas con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 min, lavadas e incubadas con PBS y con las tres concentraciones de JT (0.1, 0.5 ó 1%) mostraron un incremento significativo

( $p < 0.05$ , ANOVA y Tukey) del valor promedio de la LC que fue de  $83.47 \pm 0.71$ ,  $78.19 \pm 0.68$ ,  $71.65 \pm 1.06$  y  $53.63 \pm 0.74 \mu\text{m}$  respectivamente, durante los 90 min de tratamiento, con respecto al testigo negativo. Estos valores de la LC observados, con el ensayo cometa modificado por FPG, resultaron en aproximadamente un 30% más grande que el observado con el ensayo cometa sin FPG, lo que sugiere que la presencia de daño oxidativo en el DNA fue provocado por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, también se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ , ANOVA y Tukey) de aproximadamente un 40% de la LC en las células que fueron incubadas con las concentraciones más altas del JT (0.5 y 1%) con respecto al testigo positivo. Lo que sugiere que el JT a las concentraciones más altas (0.5 y 1%) previene el daño oxidativo.

En relación al ensayo cometa-FISH, se consideró como parámetro de valoración la posición de las señales del gen p53 (marcadas de color rojo) en el cometa (cabeza ó cauda). La posición de las dos señales rojas (gen p53), en la cabeza del cometa se consideró como un indicador de reparación y la posición de las dos señales rojas en la cauda del cometa se consideró como indicador de daño del gen p53 (Figura 5 y 6).

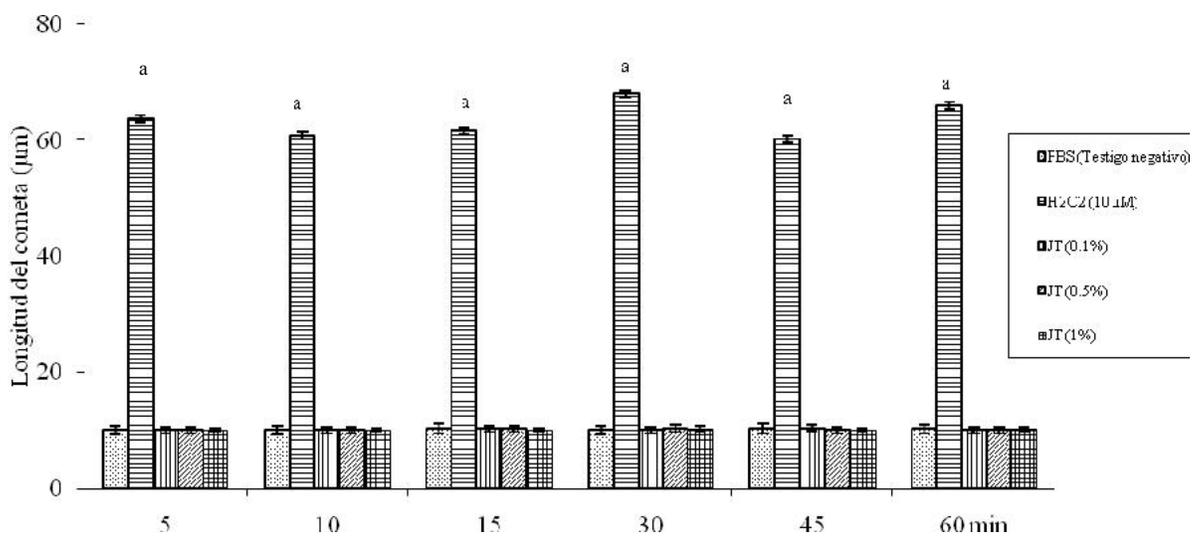
En la Tabla 3, se muestran las observaciones realizadas en 100 células por individuo/tiempo. El 98% de las células incubadas sólo con PBS (testigo negativo), mostraron las señales del gen p53 en la cabeza del cometa, a lo largo de todas las observaciones realizadas (10, 30, 60 y 90 min). Por el contrario, las células que fueron tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$  e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  con PBS (testigo positivo), mostraron un 90% de células con daño, por la presencia de las señales del gen p53 en la cauda del cometa. En lo que respecta a las células que fueron incubadas con 0.1, 0.5 ó 1% de JT, se observó un valor promedio del 24, 42 y 48% respectivamente, de células con las señales del gen p53 en la cabeza del cometa, a lo largo de 90 min de tratamiento (10, 30, 60 y 90 min). La incubación de las células con las concentraciones más altas de

JT (0.5 y 1%) resultaron con significancia estadística (Student-Newman-Keuls). Estos resultados sugieren que el gen p53, a las concentraciones más altas de JT (0.5 y 1%) participan en el proceso de reparación del gen p53.

En la Figura 7 se muestran los datos obtenidos sobre el ensayo de anexina-V. En este ensayo se consideró como parámetro de valoración el porcentaje de células apoptóticas (anexina-V positiva, en verde) y necróticas (yoduro de propidio positivo, en rojo) (Figura 8). Las células que fueron tratadas con PBS (testigo negativo), mostraron un valor del 2% de apoptosis y 5% de necrosis (Figura 7A). Por el contrario, las células que fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 5 min, mostraron un incremento significativo en el porcentaje de células apoptóticas (39%) con respecto al testigo negativo, pero no de necróticas, lo que sugiere que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la concentración de 10 μM es un agente inductor de apoptosis en los linfocitos humanos.

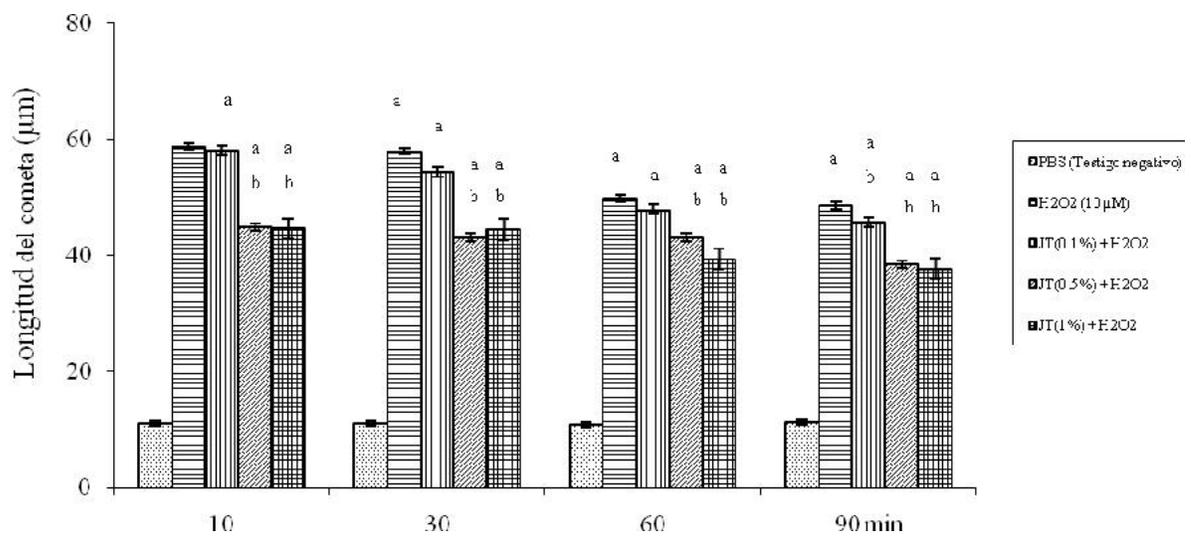
Las células que fueron tratadas con las tres concentraciones de JT (0.1, 0.5 y 1%) mostraron valores similares al del testigo negativo, lo que sugiere que el JT a las concentraciones de 0.1, 0.5 y 1%, no produce muerte celular.

En la Figura 7B-E, se representan los resultados obtenidos de las observaciones a lo largo de 90 min de tratamiento de las células incubadas a 37°C con PBS y las tres concentraciones de JT (0.1, 0.5 y 1%), después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 min. En las células incubadas con PBS (testigo positivo), se observó un incremento significativo del porcentaje de las células necróticas (34%) con respecto al testigo negativo, mientras que las células apoptóticas no mostraron cambio. En las células incubadas con JT se observó una tendencia hacia la disminución de muerte celular, tanto por necrosis como por apoptosis. Lo que sugiere que el JT a las concentraciones más altas (0.5 y 1%) previene la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis.



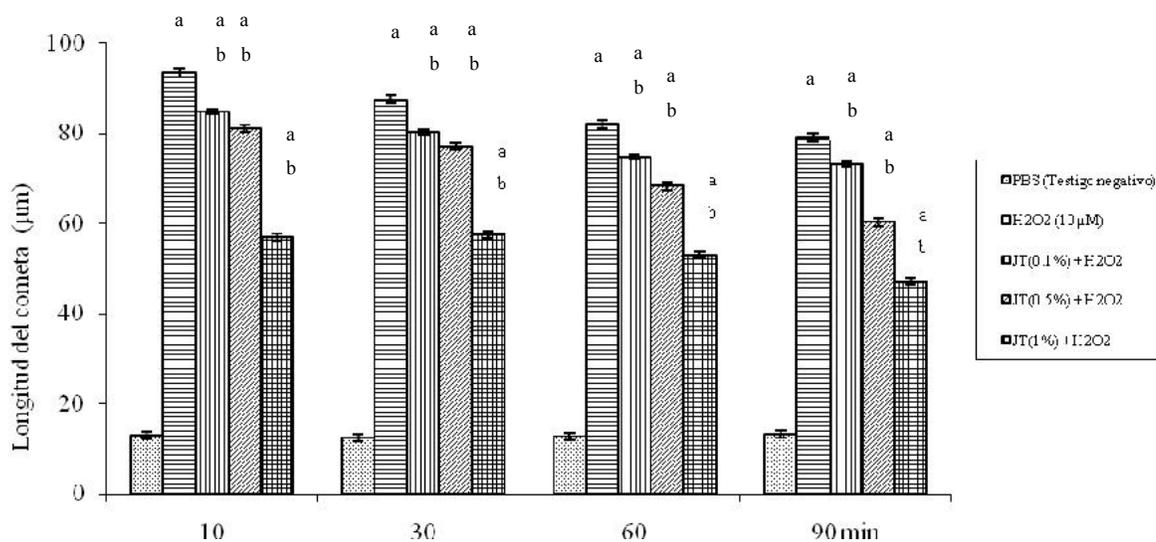
**Figura 1. Daño al DNA inducido por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y jugo de toronja (JT) en los linfocitos humanos. Ensayo cometa.**

Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES de la longitud del cometa obtenida en 100 células por muestra/tiempo de exposición. <sup>a</sup> Diferencia estadística significativa con respecto al valor del testigo negativo (ANOVA y Tukey,  $p < 0.05$ ).



**Figura 2. Daño al DNA inducido por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en los linfocitos humanos y su prevención con jugo de toronja (JT). Ensayo cometa.**

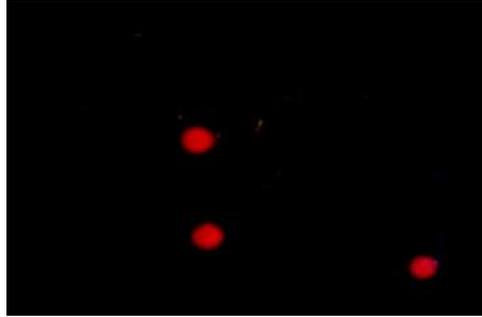
La figura muestra los resultados obtenidos después del lavado de las células con PBS y la observación de la longitud del cometa en cuatro tiempos diferentes. Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES de 100 células por muestra/tiempo. <sup>a</sup> Diferencia estadística significativa con respecto al valor del testigo negativo y <sup>b</sup> con respecto al valor de las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ANOVA y Tukey,  $p < 0.05$ ).



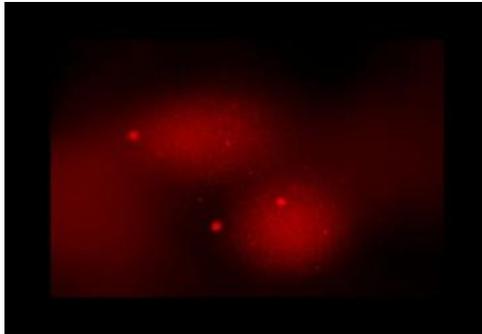
**Figura 3. Daño al DNA inducido por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y su prevención con jugo de toronja (JT). Ensayo cometa con FPG.**

La figura muestra los resultados obtenidos después del lavado de las células con PBS y la observación de la longitud del cometa en cuatro tiempos diferentes. Cada barra representa el valor promedio  $\pm$  ES de 100 células por muestra/tiempo. <sup>a</sup> Diferencia estadística significativa con respecto al testigo negativo y <sup>b</sup> con respecto al valor de las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ANOVA y Tukey,  $p < 0.05$ ).

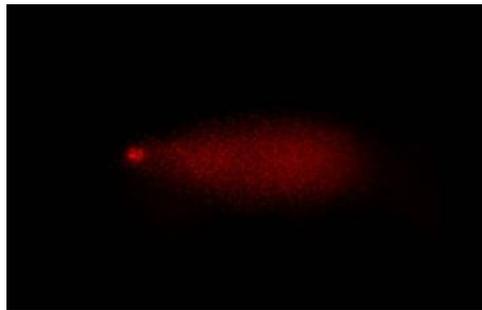
(a)



(b)



(c)

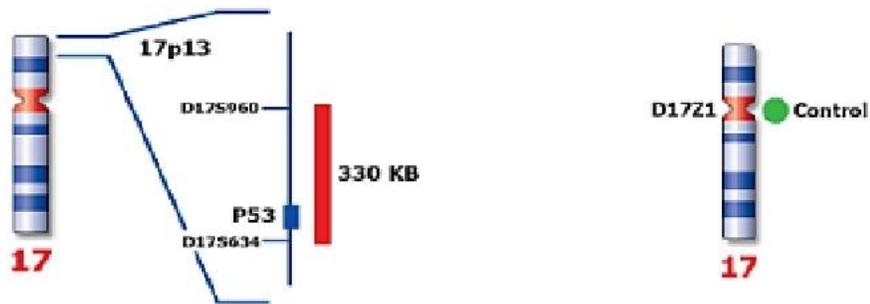


**Figura 4. Imágenes de cometas teñidos con bromuro de etidio.** Células observadas al microscopio de fluorescencia (40X): a).Células sin daño (testigo negativo); b-c).Células con daño al DNA inducido con  $H_2O_2$ , formando el aspecto de un “cometa” por la presencia de cabeza (núcleo) y cauda (DNA desplazado fuera del núcleo); b).Cometa simple; c) Cometa modificado por FPG (Formamidopirimidina-DNA-glicosilasa).

**Tabla 3. Efecto del jugo de toronja (JT) sobre la migración de las señales del gen p53 en el cometa (cabeza o cauda).**  
 Las células fueron expuestas por 5 min al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y lavadas con PBS antes de la adición del jugo de toronja (JT). La cuantificación de las señales del gen p53 (rojas) fueron hechas por medio del ensayo Cometa-FISH. Cada valor representa el promedio de 300 células analizadas (100 células por individuo).

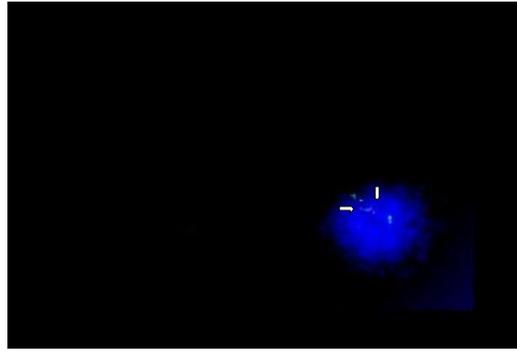
Localización de las señales del gen p53 en el cometa (%)											
Sustancia	Concentración	5		10		30		60		90 min	
		Cabeza	Cauda								
PBS		98	2	98	0	98	0	98	0	98	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10µM	25	75	10	90	12	88	13	87	14	96
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + JT	10µM + 0.1%			19	81	22	78	25	75	30*	70*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + JT	10µM + 0.5%			32*	68*	45*	55*	44*	56*	47*	53*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + JT	10µM + 1.0%			40*	60*	40*	60	52*	48*	59*	41*

\*p<0.05 Student-Newman-Keuls

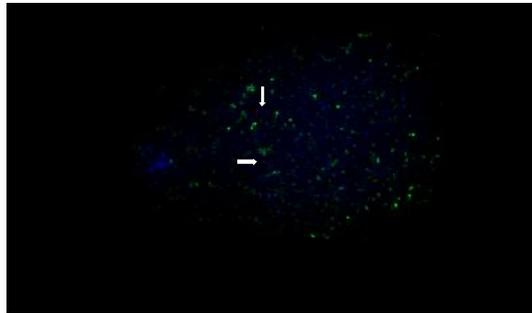


**Figura 5. Esquema del cromosoma 17 y ubicación del gen p53 (17p13).** La sonda esta marcada con *PlatinumBright550* (gen p53, que se observa de color rojo) y *PlatinumBright495* (región centromérica que funciona como control y se observa de color verde).

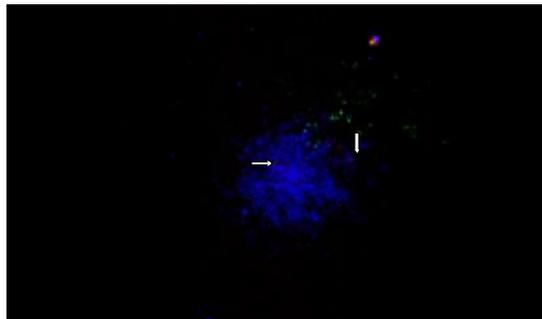
(a)



(b)

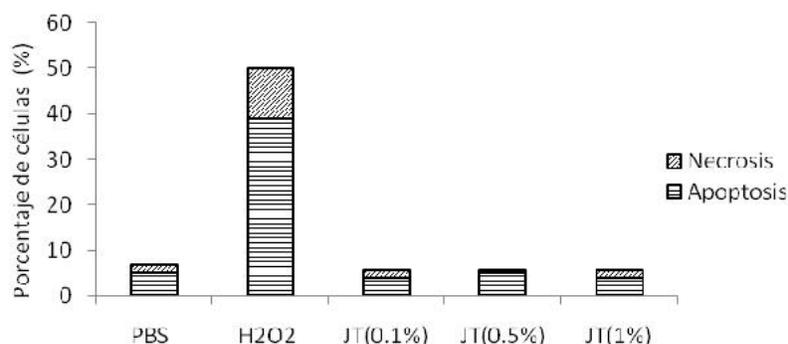


(c)

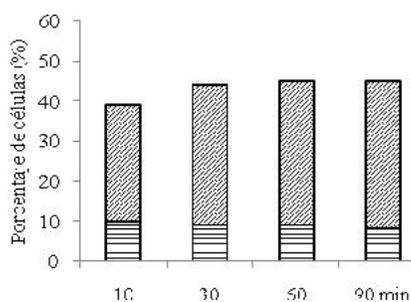


**Figura 6. Imágenes de células teñidas con DAPI (cometa-FISH).** Células observadas al microscopio confocal, las señales rojas representan al gen p53 (flechas) y las verdes a la región control (63X): a) célula con el gen p53 sin daño; b) célula con p53 dañado, en cauda del cometa; c) célula con el gen p53 reparado.

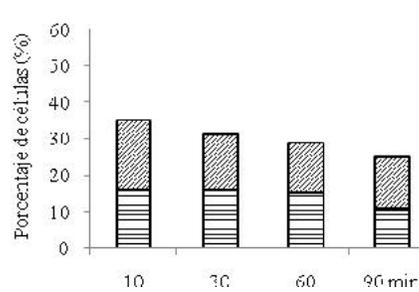
(A)



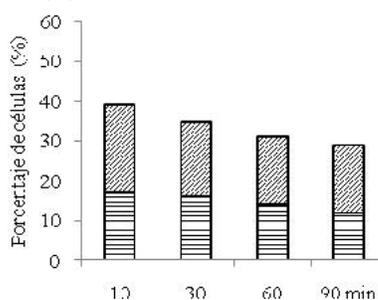
(B)



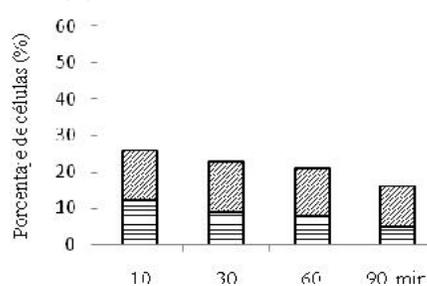
(D)



(C)



(E)



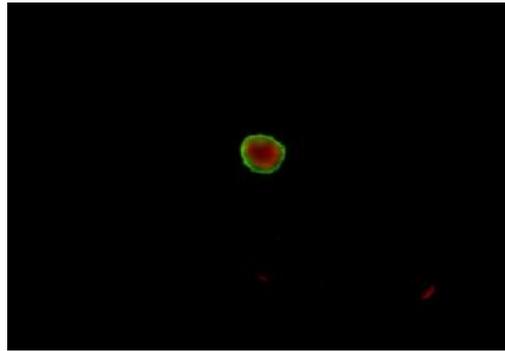
**Figura 7. Efecto del jugo de toronja (JT) en el porcentaje de células apoptóticas y necróticas inducidas por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Anexina-V.**

A. Muestra el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y JT por 5 min de exposición. Las células fueron lavadas en PBS. B. Daño inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM). C, D y E. Muestran el efecto del JT (0.1, 0.5 y 1%, respectivamente) sobre la genotoxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cada barra representa el promedio obtenido de 3 individuos (200 células por individuo).

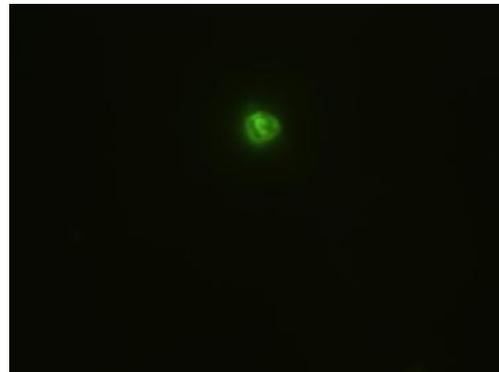
(a)



(b)



(c)



**Figura 8. Células teñidas con Anexina-V-Fluorescente.** Células observadas al microscopio de fluorescencia (100X). a).Células vivas (sin tinción fluorescente); b).células necróticas (rojas por el Ioduro de Propidio); c) células apoptóticas (verdes fluorescentes).

## **DISCUSIÓN**

#### 4.DISCUSIÓN

La oxidación en el DNA es el daño que se produce con mayor frecuencia en la células somáticas, el cual es provocado por los RL y otras especies reactivas del oxígeno (ERO) como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) superóxido ( $O_2$ ), radicales hidróxilo (OH), óxido nítrico (NO) y peroxinitrato (OONO), entre otras (40, 41, 42).

Las ERO son el resultado de los procesos metabólicos de la propia célula, como la respiración, biosíntesis y biodegradación de moléculas, así como la biotransformación de xenobióticos y la actividad fagocítica (42).

El daño oxidativo se ve incrementado por la exposición a factores de riesgo que pueden ser ambientales (radiaciones, contaminantes del aire), ocupacionales (industria, agricultura), estilo de vida (tabaquismo, alcohol, nutrición) y las condiciones de salud (infecciones virales, obesidad, edad) de cada individuo (43).

Los estudios epidemiológicos al respecto, muestran que el daño oxidativo puede dar origen a mutaciones (42), las cuales tienen un papel importante en el desarrollo de enfermedades degenerativas como alteraciones cardiovasculares, neurológicas, inmunológicas, diabetes y cancer (8,42).

Las mutaciones producidas por las ERO se debe a que las bases púricas y pirimidicas son modificadas. Es así como se forma la 8-hidroxi guanina, 8-hidroxi adenina y glicol de timina que resultan de la oxidación de la guanina, adenina y timina, respectivamente. La presencia de estas lesiones en el DNA produce errores durante la replicación ya que la DNA-polimerasa incorpora bases equivocadas al leer la base oxidada, por ejemplo, en el caso de la 8-hidroxi guanina, que es una de las modificaciones que se encuentran con mayor frecuencia en las células humanas, se

genera una mutación por transversión de bases, es decir, en lugar de unirse una citocina, se une una adenina (G:C → T:C) (44).

Ante este problema, todos los organismos han desarrollado mecanismos de defensa entre los cuales se encuentran los procesos de reparación y los antioxidantes presentes en la célula y los que adquieren a través de la dieta.

Por medio de señalizaciones proteicas, las células tienen la capacidad de identificar el tipo de daño presente en el DNA y de utilizar el sistema de reparación requerido para tal efecto, por lo que la remoción de las bases erróneas lo hace por medio de la reparación por escisión de bases (REBA) que consiste en reconocer y cortar las bases equivocadas con apoyo de las DNA-glicosilasas, con lo cual deja sitios abásicos o apurínicos (44,45,46).

Sin embargo, cuando la oxidación del DNA supera la capacidad de reparación celular y se tiene una dieta baja en antioxidantes, la célula puede sufrir un daño irreversible (47,46), de ahí la importancia del consumo de frutas y verduras para prevenir mutación, enfermedad y muerte celular (48).

Algunos investigadores aportan evidencia de que las personas que tienen un alto consumo de calorías derivadas de proteína animal en combinación con otros factores de riesgo como la obesidad y dieta baja en antioxidantes, se relaciona con el desarrollo de algunos procesos carcinogénicos como el cáncer de colon, prostata, endometrio, mama y linfoma no-Hodgkin (43).

Por el contrario, con las dietas ricas en antioxidantes presentes en las frutas y verduras y otras plantas comestibles, se disminuye el riesgo de muerte prematura, producida por enfermedades relacionadas con la oxidación (47,49).

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios para identificar el potencial antioxidante y/o antimutagénico de diversas frutas (kiwi, cereza, naranja, arándano, manzana) y verduras (cebolla, berros, tomate), así como de algunos de sus componentes (vitaminas, carotenos, polifenoles y flavonoides) (11).

A este respecto, en nuestro laboratorio, se ha demostrado el efecto antioxidante y antimutagénico del jugo de toroja (*Citrus paradisi*) en estudios “*in vivo*” por la disminución de la lipoperoxidación, disminución de micronucleos e ICH, después de la exposición a agentes tóxicos como la ifosfamida, daunorrubicina y benzo(a)pireno. (22,23,24). Para probar dicho efecto en estudios *in vitro*, en este trabajo se utilizó el ensayo cometa.

Actualmente el ensayo cometa es aceptado como uno de los métodos estándar para medir el daño y reparación en el DNA (27). Este método ha sido ampliamente usado por diversos grupos de investigadores en una gran cantidad de estudios en diferentes áreas de la ciencia, debido a que es una técnica sencilla, económica y muy sensible para medir daño y reparación del DNA, además de que requiere una pequeña cantidad de células, se puede hacer un estudio interindividual en poblaciones de células eucarióticas y se obtienen resultados en poco tiempo (27, 50, 51).

En años recientes, el ensayo cometa fue modificado por la adición de la enzima Formamidopirimidina-DNA-glicosilasa (FPG) previamente al proceso electroforético, con el objeto de medir el daño oxidativo en el DNA. La FPG como su nombre lo dice es una DNA-glicosilasa de origen bacteriano que participa en el proceso de reparación por escisión de bases, tiene la capacidad de reconocer y cortar las purinas oxidadas como la 8-hidroxi guanina (8-oxo-G), dejando sitios abásicos o apúrinicos, lo que se traduce en rupturas en la cadena de la doble hélice y por consiguiente la formación de una cauda más larga, en el cometa (28, 34, 44, 46, 52).

En este trabajo los resultados obtenidos por medio del ensayo cometa en el experimento sobre genotoxicidad, se observó que el jugo de toronja (JT) no es genotóxico a las tres concentraciones probadas (0.1, 0.5 y 1%) en los linfocitos humanos *in vitro* a lo largo de 1h de tratamiento.

Por el contrario, el peróxido de hidrógeno mostró un efecto genotóxico en los linfocitos humanos *in vitro* debido a que se incrementó de manera significativa la longitud del cometa (5-6 veces el daño basal) a lo largo de una hora de tratamiento, en comparación con el testigo negativo.

El efecto tóxico del peróxido de hidrógeno se hizo aun más evidente con el ensayo cometa modificado por la adición de la enzima FPG. En este caso, el incremento de la longitud del cometa fue superior al 30% (9-10 veces el daño basal) que el observado en las células sin FPG. Nuestros resultados sugieren que el daño en el DNA detectado por el ensayo cometa simple, no solamente es el resultado del estrés oxidativo provocado por el peróxido de hidrógeno, sino también por otros mecanismos de genotoxicidad.

Algunos investigadores sugieren que las lesiones del DNA también puede deberse a otros mecanismos como: rupturas en la cadena del DNA, aberraciones cromosómicas (AB), formación de micronúcleos (MN) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) (46) o bien puede deberse a procesos de envejecimiento, estilo de vida o muerte celular por apoptosis o necrosis (47).

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Weng, y col. (2008), quienes realizaron un estudio diferencial del daño inducido por peróxido de hidrógeno en las diferentes subpoblaciones de leucocitos y demostraron que a la concentración usada en este trabajo (10 $\mu$ M), las células-T (CD<sup>4</sup> y CD<sup>8</sup>), mostraron un incremento significativo

de la cauda del cometa, después de 10 min de exposición al agente tóxico. Y por los experimentos de Reeves y col. (2008), quienes probaron diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y observaron un incremento significativo con el ensayo cometa modificado por FPG a concentraciones mayores de 5 $\mu$ M, aunque sus parámetros de valoración y sistema biológicos fueron diferentes al de este trabajo. Sin embargo, este efecto, no fue observado por Holt y col. (2007) en las células Nalm-6 (línea celular, obtenida de una paciente con leucemia linfocítica aguda), posiblemente por las condiciones experimentales neutras del ensayo cometa y por tratarse de células enfermas.

Como se mencino en párrafos anteriores, algunos estudios epidemiológicos han demostrado que las frutas, verduras, así como otras plantas comestibles y algunos de sus componentes tienen propiedades antioxidantes y antimutagénicas (11,55). Este hecho, cada vez toma mayor importancia porque se tiene el conocimiento de que las mutaciones en las células somáticas están relacionadas con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas tales como afecciones cardiovasculares y procesos carcinogénicos, entre otras (8,56).

A este respecto, dentro de los mecanismos que se conocen por los cuales puede tener acción genoprotectora el JT, se encuentran su capacidad para capturar radicales libres y su efecto inhibitorio de mutágenos como la daunorrubicina, ifosfamida y benzo(a)pireno (22,23,24),

Para conocer el efecto antígenotóxico del JT en otros mecanismos de acción, se valoró el daño al DNA por medio del ensayo cometa simple y modificado con la enzima FPG en los linfocitos humanos *in vitro*. Las células de estudio fueron lavadas e incubadas en presencia del jugo de toronja, inmediatamente después de la exposición al agente tóxico (peróxido de hidrógeno) por 5 min. Los resultados obtenidos con el

ensayo cometa simple, mostraron una disminución de la longitud del cometa del 20%; mientras que con el ensayo cometa modificado por FPG, se observó una disminución de la longitud del cometa del 40%, en comparación con el testigo positivo, a lo largo de 90 min de incubación y con las concentraciones más altas del jugo de toronja (0.5 y 1%).

Nuestros resultados sugieren que el JT promueve la reparación celular y previene las lesiones oxidativas.

Este mismo efecto ha sido reportado para otras frutas como: jugo de kiwi, jugo de naranja, jugo de arándano, jugo de manzana y para algunas verduras como pure de tomate, cebolla y berros, entre otras (11). Y en biomonitoreos con individuos vegetarianos, también se ha observado un daño oxidativo en el DNA menor, en comparación con los que tienen una dieta habitual (58).

Dado que se ha reportado que los agentes antígenotóxicos pueden presentar varios mecanismos de inhibición del daño inducido por mutágenos (8), en este trabajo, también se estudio la influencia del JT sobre la reparación del gen p53, el cual fue marcado sobre los cometas por medio de la técnica cometa-FISH.

Esta técnica, ha sido utilizada por varios investigadores en estudios sobre toxicidad, mutación y reparación del DNA relacionadas con la terapia del cáncer (59).

Uno de los genes que ha despertado mayor interés para hacerlo evidente es el gen p53, porque es el que mantiene la integridad del genoma por dos mecanismos de respuesta celular frente al daño o mutación, primero produce una parada del ciclo celular (en la fase G1) para dar tiempo a su reparación y si el daño no se repara, p53 desencadena la muerte celular por apoptosis (60,3).

Las ventajas que representa utilizar este método, son que permite estudiar de manera simultánea el daño al DNA y el daño producido a algunos genes de importancia como p53, por la exposición a factores de riesgo, como el estrés oxidativo (61).

Para realizar este estudio se utilizó una sonda comercial que marcó con un fluoroforo rojo el gen p53 (17p13) y de verde la región control (centrómero del cromosoma 17), visibles al microscopio de fluorescencia, por contraincubación con DAPI.

Los resultados obtenidos con este método demostraron que el gen p53 fue dañado significativamente después de la exposición al peróxido de hidrógeno, debido a que el porcentaje de señales correspondientes al gen p53 en la cauda del cometa se incrementó de manera significativa (75%), en comparación con las células sin tratamiento y cuando las células se incubaron sólo con PBS, después de la exposición al agente tóxico, el incremento del daño fue aun mayor (90%). Sin embargo, las células que fueron incubadas en presencia del JT mostraron una disminución significativa del daño del gen p53, a las concentraciones más altas del JT (0.5 y 1%).

Estos resultados demuestran que el JT participa en el proceso de reparación del gen p53, ya que se observó una disminución del daño del gen en aproximadamente un 50% a las concentraciones de 0.5 y 1% del JT.

No se encontraron reportes en los que se pueda comparar la capacidad de reparación del gen p53, por efecto de agentes antioxidantes como el JT. Sin embargo, otros autores han reportado con otros métodos, una reparación del daño al DNA, similar al de este trabajo, por efecto de otras frutas y verduras (62).

Los parámetros que se tomaron en cuenta para valorar el gen p53 en el cometa fueron similares a los reportados por otros autores (31, 59,63).

Nuestros resultados también demuestran que el gen p53 se repara más rápido que el genoma completo a las concentraciones más altas del JT (0.5 y 1%), esto porque las señales correspondientes al gen p53, regresaron a la cabeza del cometa antes que el resto del DNA presente en la cauda del cometa.

Esta observación también ha sido reportada por otros investigadores, quienes compararon la velocidad de reparación del gen p53 con otros genes como Her 2/neu (17q11.2-q12), ZNF217 (20q13.2); APC (5p13-q31), KRAS (12pter-p11.2), MGMT y DHFR (59,61,64).

Aunque no está claro porque sucede este comportamiento del gen p53, Spivak y col. (2009), suponen que puede ser porque es requerido en los procesos de transcripción, mecanismo al que le denominan “transcripción acoplada a la reparación” (Transcription-coupled repair o TCR) (64).

Por otra parte, para conocer el efecto del JT sobre los mecanismos de apoptosis y necrosis, estos parámetros fueron estudiados considerando que cuando las células sufren apoptosis por la exposición a factores de riesgo, se produce pérdida de asimetría de los fosfolípidos de la membrana celular.

La anexina-V es una proteína coagulante que preferentemente se une a la fosfatidilserina cargada negativamente en la superficie de las células, posibilitando la detección de esta externalización en las células apoptóticas. El conjugado de anexina-V tiene un fluoróforo por lo que se hace visible por microscopia de fluorescencia. Al combinar la anexina-V-fluorescente con el yoduro de propidio es posible diferenciar las células apoptóticas (anexina-V positiva, verde) y necróticas (positiva a yoduro de propidio, rojo) de manera simultánea (17).

Los resultados obtenidos muestran que después de la exposición al peróxido de hidrógeno, se incrementó de manera significativa el porcentaje de células apoptóticas, en comparación con las células sin tratamiento. Por el contrario las células expuestas a las diferentes concentraciones del JT no mostraron muerte celular.

Cuando las células de estudio, fueron lavadas e incubadas en PBS, después de la exposición al agente tóxico, se observó un incremento significativo de las células necróticas a lo largo de 90 min de incubación. Este comportamiento también fue reportado por Holt y col. (2007) quienes observaron que por exposición de las células a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno hay muerte celular por necrosis.

Los experimentos de Saito y col. (2006), también demostraron que a una concentración moderada de peróxido de hidrógeno se produce muerte celular por apoptosis y a una concentración elevada se produce muerte celular por necrosis, en las células Jurak.

Por otra parte, las células que fueron incubadas en presencia de las tres concentraciones de JT mostraron una tendencia hacia la disminución de muerte celular, tanto por apoptosis como por necrosis, ya que a las concentraciones más altas del JT el porcentaje de muerte celular fue similar a la observada en las células sin tratamiento.

A este respecto algunos investigadores han demostrado que los agentes antimutagénicos tienden a modular el proceso apoptótico, es decir, que en las células cancerosas, se induce de apoptosis como un mecanismo de supresión del daño celular, mientras que en las células normales se produce la inhibición de la apoptosis. (3,66,67).

Nuestros resultados demuestran que el JT a las concentraciones más altas del 0.5 y 1%, previenen la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis.

## **CONCLUSIONES**

## **5. CONCLUSIONES:**

1. El peróxido de hidrógeno tiene un efecto genotóxico sobre los linfocitos humanos.
2. El peróxido de hidrógeno tiene un efecto oxidante sobre el DNA de los linfocitos humanos.
3. El Jugo de Toronja tiene un efecto antioxidante en los linfocitos humanos, expuestos al peróxido de hidrógeno.
4. El Jugo de Toronja promueve la reparación del DNA, en los linfocitos humanos expuestos al peróxido de hidrógeno.
5. El Jugo de Toronja previene el daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.
6. El Jugo de Toronja participa en la de reparación del gen p53.
7. El Jugo de Toronja previene la muerte celular por apoptosis y necrosis.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Álvarez GRI. (2004). Efecto inhibitorio del jugo de toronja sobre la genotoxicidad producida por la ifosfamida y la daunorrubicina. Tesis de doctorado en Ciencias Quimicobiológicas. IPN. ENCB. México.
2. Klaassen CD, Watkins JB. (2001). Manual de toxicología. McGraw Hill-Interamericana Editores. México.
3. Mitchell, R. N., Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., 2007. Adaptaciones celulares, lesión celular y muerte celular. Compendio de Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. Elsevier Saunders. Madrid, España.
4. Madrigal-Bujaidar E, Madrigal-Santillán E, Álvarez-González I, Morales-Álvarez JA. Aflatoxin B1: Prevention of its genetic damage by means of chemical agents. In press.
5. Molina JL. (2010). Evaluación de la capacidad genotóxica del beta-cariofileno en ratón. Tesis de doctorado en Ciencias Quimicobiológicas. IPN. ENCB. México.
6. Kasahara S. (2009). Introdução a pesquisa em citogenética de vertebrados. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto. SP.
7. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis. 35:206-221.
8. De Flora S. (2005). Overview of mechanisms of cáncer quimiopreventive agents. Mutation Research. 591:8-15.
9. Solari AJ. (1999). Genética Humana. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
10. Venereo GJR. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cub. Med. Mil. 31(2):126-133.
11. Wasson GR, McKelvey-Martin VJ, Downes CS. (2008). The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. Mutagenesis. 23(2):153-162.

12. Gómez CMA. (2000). Tesis de maestría en ciencias. Area morfología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México.
13. De Robertis EDP. (2000). Biología celular y molecular. El Ateneo. Argentina.
14. Cingolani HE.(2000). Houssay AB. Fisiología Humana de Houssay. El Ateneo. Argentina.
15. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.(2002). Biología Molecular de la Célula. GS Garland Science.US.
16. Kam PCA and Ferch NI.(2000).Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*.55:1081-1093.
17. Matta JL, Ramos JM, Armstrong RA, D'Antoni H. (2006). Niveles de luz ultravioleta ambiental asociados con apoptosis y necrosis en fibroblastos humanos. *Acta bioquímica. clínica. latinoamerica*. 40 (4).
18. Davis MA. (2002).Apoptosis. Methods in pharmacology and toxicology.Human press.Totowa,NJ.
19. Olive PL, Frazer G, Banáth JP. (1993). Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cell using the comet assay. *Radiation Research*. 136, 130-136.
20. Mójica ER.(2006). Efecto inhibitorio del jugo de toronja sobre la genotoxicidad producida por el benzo[a]pireno y la actividad de la CYP1A1. Tesis de Maestría en Ciencias Químico-biológicas. IPN. ENCB. México.
21. Bianchini, F., Cabetta, F., 1976. The complete book of fruits and vegetables. Crown Publishers Inc. New York.
22. Álvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E, Martino-Roaro L, Espinosa-Aguirre JJ. (2004) Antigenotoxic and antioxidant effect of grapefruit juice in mice treated with daunorubicin. *Toxicology Letters*. 152,203-211.
23. Álvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E, Sánchez-García VY. (2010). Inhibitory effect of grapefruit juice on the genotoxic damage induced by ifosfamide in mouse. *Plant Foods for Human Nutrition*. 65(4):369-373.
24. Álvarez-González I, Mojica R, Madrigal-Bujaidar E, Camacho-Carranza R, Escobar-García D, Espinosa-Aguirre JJ. (2010). The antigenotoxic effects of grapefruit juice on the damage induced by benzo(a)pyrene and evaluation of its interactions with hepatic and intestinal cytochrome P450 (Cyp)1a1. *Food and Chemical Toxicology*.in press.

25. Piperakis SM.(2008). Comet assay: A brief history. *Cell Biol. Toxicol. Abr.*
26. Collins AR.(2002).The comet assay.Methods in molecular biology.In situ detection of DNA damage:Methods and protocols. Human press.203:169-177.
27. McKenna DJ, McKeown SR,Mckelvey-Martin V. (2008). Potetial use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis* 23(3): 183-190.
28. Forchhammer L, Vaclavik BE, Kjaersgaard FJ, Høgh DP, Nielsen C, Jensen A, Loft S, Friis G, Møller P. (2008). Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring. *Mutagenesis* 23: 223-231.
29. Stedum SV, King W. (2002) *Basic FISH Techniques and Troubleshooting. Methods in Molecular Biology. Protocols and applications.* Yhao-han Fan. Humana Press. New Jersey.
30. Yan YS. (2002). *Molecular cytogenetics in medicine. Methods in Molecular Biology. Protocols and applications.* Yhao-Shan Fan. Humana Press.New Jersey.
31. Horváthová E, Dusinka M, Shaposhnikov S, Collins AR. (2004).DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent in situ hybridization. *Mutagenesis.*19(4):269-276.
32. González-Moran MG.(1996).*Técnicas en Biología Celular. Teoría y Práctica.* AGT Editor. México.
33. Sigma-aldrich.Fpg-protein.Formamidiprimidine-DNA-glycosylase.USA.
34. Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Orešćanin. (2008). Cytogenetics status and oxidative DNA-damage induced by atorvastatin in human peripheral blood lymphocytes: sandard and fpg-modified comet assay. *Toxicology and Applied Pharmacology.*YTAAP. 11162.
35. Santos SJ, Singh NP, Natarajan AT. (1997). Fluorescence in situ hybridization with comets. *Experimental cell research.* 232,407-411.
36. Arutyunyan R, Gebhart E, Hovhannisyan G, Greulich KO, Rapp A. (2004). Comet-FISH using peptide nucleic acid probes detects telomeric repeats in DNA damaged by bleomycin and mitomycin C proportional to general DNA damage. *Mutagenesis.* 19(5):403-408.

37. Poseidon <sup>TM</sup> DNA probes. Instruction Manual. Kreantech diagnostics. Amsterdam, The Netherlands.
38. McKelvey-Martin VJ, Ho ETS, McKeown SR, Johnston SR, McCarthy PJ, Rajab NF, Downes CS. (1998). Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis*. 13(1):1-8.
39. Roche. (2005). Annexin-V-Fluos Staining Kit Kit for detection and quantification of apoptosis and differentiation from necrosis at single cell level based on Annexin-V-labeled. Roche. Germany.
40. Girard-Lalancette, K., Pichette, A., Legault, J. (2009). Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro-and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry*. 115, 720-726.
41. Pérez GPL, Pérez de Alejo JL. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Medico Militar*. 29(3):192-8.
42. Azqueda A, Shaposhnikov S, Collins AR. (2009). DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research*. 674, 101-108.
43. Mena, S., Ortega, A., Estrela, J.M., (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research*. 674, 36-44.
44. Trapp C, McCullough AK, Epe B. The basal levels of 8-oxoG and other oxidative modifications in intact mitochondrial DNA are low even in repair-deficient (*Ogg1*<sup>-1</sup>*Csb*<sup>-1</sup>) mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 625(2007):155-163.
45. Zhang H, Mizumachi T, Carcel-Trullols J, Li L, Naito A, Spencer HJ, Spring PM, Smoller BR, Watson AJ, Margison GP, Higuchi M, Fan CY. (2007). Targeting human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1) to mitochondria enhances cisplatin cytotoxicity in hepatoma cells. *Carcinogenesis*. 28(8):1629-1637.
46. Weng H, Lu Y, Weng Z, Morimoto K. (2008). Differential DNA damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and bleomycin in subpopulations of human white blood cells. *Mutation Research*. 652,46-53.

47. Samak G, Shenoy RP, Manjunatha SM, Vinayak KS. (2009). Superoxide and hydroxyl radical scavenging actions of botanical extracts of *Wagatea spicata*. *Food Chemistry* 115,631-634.
48. Brambilla, D., Mancuso, C., Scuderi, M.R., Bosco, P., Cantarella, G., Lempereur, L., Di Benedetto, G., Pezzino, S., Bernardini, R. (2008). The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. *Nutrition journal*.7,1-29
49. Andrade FM, Caetano FL, Andrade FR, Roberto CW, Crispin TD. (2008). Antimutagenicity of rosmarinic acid in swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research*. 657, 150-157.
50. Johansson C, Møller P, Forchhammer L, Loft S, Godschalk RWL, Langie SAS, Lumeij S, Jones GDD, Kwok RWL, Azqueda A, Phillips DH, Sozeri O, Routledge MN, Charlton AJ, Riso P, Porrini M, Allione A, Matullo G, Palus J, Stepnik M, Collins AR, Möller L. (2010). An ECVAG trial on assessment of oxidative damage to DNA measured by the comet assay. *Mutagenesis*. 25(2):125-132.
51. Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN. (2007). Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol*.9043-9.
52. Collins AR, Azqueta Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Štělina R. (2008). The comet assay: topic issues. *Mutagenesis*. 23(3): 143-151.
53. Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*. 674,137-147.
54. Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJF, Jha AN. (2007). Hydroxyl radicals ( $\bullet\text{OH}$ ) are associated with titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research*. 640,113-122.
55. Holt SM, Georgakilas AG. (2007). Detection of complex DNA damage in  $\gamma$ -irradiated acute lymphoblastic leukemia Pre-B NALM-6 Cells. *Radiation Research*. 168,527-534.
56. Lohman PHM, Gentile JM, Gentile G, Ferguson LR. (2001). Antimutagenesis/Anticarcinogenesis 2001 screening, methods and biomarkers. *Mutation Research*. 496, 1-4.

57. Ferrer M, Sanchez-Lamar A, Fuentes JL, Barbé J, Llagostera M. (2001). Studies on the antimutagenesis of *phyllanthus orbicularis*: mechanisms involved against aromatic amines. *Mutation Research*. 498,99-105.
58. Dusinska M, Collins AR. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis* 23(3):191–205.
59. Kumaravel TS, Bristow R.G. (2005). Detection of genetic instability at HER-2/neu and p53 loci in breast cancer cells using comet-FISH. *Breast Cancer Research and Treatment*. 91, 89-93.
60. Fernández-Gómez, F.J., Gómez-Lazaro, M., Jordán, J., 2004. P53, nuestro Guardián, celebra sus bodas de plata. *I+D+i De Fármacos*. 2,195-203.
61. Gleib M, Hovhannisyan G, Pool-Zobel BL. (2009). Use of comet-FISH in the study of DNA damage and repair: Review. *Mutation Research*. 681,33-43.
62. Collins AR. (2009). Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research*. 681, 24-32.
63. Gleib M, Schaeferhenrich A, Claussen U, Kuechler A, Liehr T, Weise A, Marian B, Sendt W, Pool-Zobel BL.(2007). Comet fluorescence in situ hybridization analysis for oxidative stress-induced DNA damage in colon cancer relevant genes. *Toxicological Sciences*. 96(2):279-284.
64. Spivak G, Cox RA, Hanawalt PC. (2009). New applications of the comet assay: comet-FISH and transcription-coupled DNA repair. *Mutation Research*. 681(1):44-50.
65. Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, Noguchi N, Niki E. (2006). Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radical Research*. 40(6):619-630.
66. Shamma MA, Neri P, Koley H, Batchu RB, Bertheau RC, Munshi V, Prabhala R, Fulciniti M, Tai Y, Treon SP, Goyal RK, Anderson KC, Munshi NC. (2006). *Blood*. 108(8):2804-2810.
67. D'Agostini F, Izzoti A, Balansky M, Bennicelli C, De Flora S. (2005). Modulation of apoptosis by cancer chemopreventive agents. *Mutation Research* 591,173-186.