

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

**MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL  
CENTRO DE LA REPUBLICA (PROPAC)

**EFFECTO DE CAROTENOIDES SOBRE LA CITOTOXICIDAD  
Y GENOTOXICIDAD DE DIETILNITROSAMINA  
EN CULTIVO DE HEPATOCITOS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

**MARGARITA TERESA DE JESUS GARCIA GASCA**

QUERÉTARO, QRO. DICIEMBRE DE 1996

No Adq. H55828

No. Título \_\_\_\_\_

Clas. 574.1921

G 216e

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA**  
**DE ALIMENTOS**

**EFFECTO DE CAROTENOIDEOS SOBRE LA CITOTOXICIDAD**  
**Y GENOTOXICIDAD DE DIETILNITROSAMINA**  
**EN CULTIVO DE HEPATOCITOS**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA**  
**DE ALIMENTOS**

Presenta:

**MARGARITA TERESA DE JESUS GARCIA GASCA**

Dirigido por:

**DRA. ELVIRA GONZALEZ DE MEJIA**

**SINODALES**

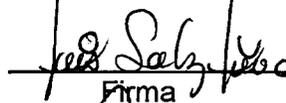
DRA. ELVIRA GONZALEZ DE MEJIA  
Presidente

  
Firma

DR. SAUL VILLA TREVIÑO  
Secretario

  
Firma

DR. LUIS SALAZAR OLIVO  
Vocal

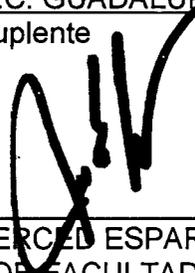
  
Firma

DRA. FLAVIA LOARCA PIÑA  
Suplente

  
Firma

M.C. GUADALUPE GARCIA ALCOCER  
Suplente

  
Firma

  
Q.M. J. MERCED ESPARZA GARCIA  
DIRECTOR FACULTAD QUÍMICA

  
M.C. CARLOS ISAAC SILVA BARRON  
DIRECTOR ESTUDIOS POSGRADO

**CENTRO UNIVERSITARIO**  
**QUERETARO, QRO. MEXICO**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL  
LABORATORIO DE TOXICOLOGIA DE ALIMENTOS  
DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y  
POSGRADO EN ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD  
AUTONOMA DE QUERETARO, BAJO LA DIRECCION  
DE LA DRA. ELVIRA GONZALEZ DE MEJIA.**

"Primero es soñar  
y después es ser.  
El sueño antecede a la creación.  
Si no podemos soñar,  
jamás podremos conseguir."

José Vasconcelos.

*Gracias a Dios por darme vida para alcanzar esta meta.*

Deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a la Dra. Elvira González de Mejía por la confianza depositada en mí, así como por su tiempo, dedicación, dirección y apoyo incondicional en la realización de este trabajo; pero sobre todo por su afecto. Gracias.

Al Dr. Saúl Villa Treviño por todas sus atenciones, tiempo e interés en mi persona, quisiera expresar mi admiración por usted, no sólo por su excelente labor como investigador y promotor de la investigación en México, sino por su calidad humana. Así mismo, le agradezco a usted y a su equipo de trabajo: Samia, Evelia, y Sergio por recibirme tan cálidamente en su laboratorio y hacerme sentir como en casa, por su apoyo en el estudio genotóxico y su amistad.

Al Dr. Luis Salazar Olivo por su oportuna intervención y comentarios que contribuyeron a enriquecer este trabajo, así como por su tiempo y apoyo.

A la Dra. Flavia Loarca Piña y a la M.C. Guadalupe García Alcocer por sus valiosos comentarios y observaciones en la revisión de la tesis.

A mis compañeros de la generación 93-95 del Doctorado y la Maestría en Ciencia y Tecnología en Alimentos y a mis compañeras del laboratorio de Toxicología de Alimentos, especialmente a Miriam y Chely con quienes compartí muchas horas de trabajo, por su apoyo y amistad. A Adriana de León por su apoyo en el estudio citotóxico.

A todo el personal académico y administrativo del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, especialmente al M.C. Jorge Alvarez Domínguez y a todo el personal de la oficina por su buena disposición.

Agradezco también el apoyo brindado por las siguientes instituciones:

Universidad Autónoma de Querétaro, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A mi esposo Luis Alberto:  
por tu paciencia, tu apoyo y comprensión, porque sé que siempre puedo  
contar contigo, pero sobre todo mil gracias por tu amor.

A mis padres:  
Leopoldo y Margarita por toda su confianza y amor, porque  
a ustedes les debo todo lo que soy

A mis hermanos:  
Alejandra, Claudia y Polo por todo su estímulo y palabras de aliento,  
por su cariño y apoyo incondicional.

A mi abuelita Margarita:  
porque cuento siempre con tu apoyo, por tu amor.

A mis suegros:  
Emilio y Melba por su apoyo en todo momento, su comprensión y su cariño.

**ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO A MIS HIJOS:**

**OMAR, OSCAR Y ANDREA**

**PORQUE SON EL MOTOR DE MI VIDA.**

**A LA MEMORIA DE MIS ABUELOS SALVADOR, LEOPOLDO Y ALICIA**

# INDICE GENERAL

|   |    |
|---|----|
| INDICE DE CUADROS                         | i  |
| INDICE DE FIGURAS                         | ii |
| I-RESUMEN                                 | 1  |
| II-INTRODUCCION                           | 3  |
| III-ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS           | 6  |
| A.CAROTENOIDES                            | 6  |
| 1.DEFINICION                              | 6  |
| 2.HISTORIA                                | 6  |
| 3.METABOLISMO                             | 8  |
| 4.CAPACIDAD BIOLOGICA DE LOS CAROTENOIDES | 11 |
| 5. CAROTENOIDES COMO ANTIOXIDANTES        | 13 |
| 6.PROMOCION DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA  | 17 |
| 7.OTRAS FUNCIONES                         | 18 |
| 8.TOXICIDAD DE CAROTENOIDES               | 20 |
| B.NITROSAMINAS                            | 21 |
| 1.HISTORIA                                | 21 |
| 2.FORMACION DE NITROSAMINAS               | 22 |
| 3.NITROSAMINAS EN ALIMENTOS               | 23 |
| 4.TOXICIDAD DE NITROSAMINAS               | 27 |
| 5.MECANISMOS DE CARCINOGENESIS            | 27 |
| 6.HEPATOTOXICIDAD DE NITROSAMINAS         | 30 |
| IV-JUSTIFICACION                          | 33 |
| V-HIPOTESIS                               | 35 |
| VI-OBJETIVOS                              | 36 |

|  |     |
|--|-----|
| VII-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL  | 37  |
| VIII-PROTOCOLO DE TRATAMIENTOS   | 39  |
| 1.ESTUDIO CITOTOXICO   | 39  |
| 2.ESTUDIO GENOTOXICO   | 40  |
| IX-MATERIALES Y METODOS  | 42  |
| A.MATERIALES   | 42  |
| 1.QUIMICOS   | 42  |
| 2.BIOLOGICOS   | 42  |
| B.METODOS  | 43  |
| 1.EXTRACTO DE CAROTENOIDES DE CHILE CHILACA ( <i>Capsicum spp.</i> )                             | 43  |
| 2.CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE LOS CAROTENOIDES DE CHILE CHILACA ( <i>Capsicum spp.</i> ) | 43  |
| 3.OBTENCION Y CULTIVO DE HEPATOCITOS   | 45  |
| 4.METODO DE SALES DE TETRAZOLIUM (MTT) PARA DETERMINAR VIABILIDAD CELULAR EN CELULAS EN CULTIVO  | 45  |
| 5.METODO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR CITOTOXICIDAD  | 49  |
| 6.DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA LACTATO DESHIDROGENASA                          | 49  |
| 7.CUANTIFICACION DE GLUTATION REDUCIDO TOTAL   | 52  |
| 8.DETERMINACION DE PROTEINA TOTAL  | 52  |
| 9.METODO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR GENOTOXICIDAD  | 56  |
| 10.METODO DE SINTESIS NO PROGRAMADA DE ADN   | 56  |
| 11.TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS  | 56  |
| X-RESULTADOS   | 59  |
| 1.CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE CAROTENOIDES   | 59  |
| 2.ESTUDIO CITOTOXICO   | 59  |
| 3.ESTUDIO GENOTOXICO   | 74  |
| XI-CONCLUSIONES  | 86  |
| XII-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS   | 88  |
| ANEXO 1: <i>Capsicum spp.</i>  | 97  |
| ANEXO 2: SOLUCIONES  | 101 |
| ANEXO 3: CURVAS PATRON   | 105 |

## INDICE DE CUADROS

### CUADRO

|   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | CONVERSION DE B-CAROTENO A RETINOL   | 10 |
| 2 | CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN ALIMENTOS   | 12 |
| 3 | CONTENIDO DE DIMETILNITROSAMINA O<br>DIETILNITROSAMINA EN ALIMENTOS              | 26 |
| 4 | PERFIL DE CAROTENOIDES DEL EXTRACTO DE CHILE                                     | 61 |
| 5 | EFECTO DE LOS VEHICULOS SOBRE LA VIABILIDAD<br>CELULAR EN HEPATOCITOS DE RATA    | 66 |
| 6 | DAÑO GENOTOXICO PROVOCADO POR<br>DIETILNITROSAMINA(DEN) EN 4 HORAS DE EXPOSICION | 78 |
| 7 | RESUMEN DEL TRATAMIENTO GENOTOXICO   | 82 |
| 8 | COMPOSICION QUIMICA DEL CHILE  | 98 |
| 9 | DISTRIBUCION DE CAROTENOIDES EN<br>CHILE ( <i>Capsicum spp.</i> )                | 99 |

## INDICE DE FIGURAS

### FIGURA

|    |  |    |
|----|--|----|
| 1  | ESTRUCTURA MOLECULAR DE CAROTENOIDES   | 7  |
| 2  | RUTA METABOLICA DEL $\beta$ -CAROTENO  | 9  |
| 3  | EFECTO DE LOS CAROTENOIDES<br>SOBRE LAS CELULAS                                  | 14 |
| 4  | SITIOS DE ACCION DE CAROTENOIDES EN EL<br>PROCESO NEOPLASICO                     | 19 |
| 5  | MECANISMO DE ACTIVACION DE<br>DIALQUILNITROSAMINAS                               | 28 |
| 6  | METODO DE EXTRACCION DE CAROTENOIDES   | 44 |
| 7  | METODO DE PERFUSION HEPATICA   | 46 |
| 8  | OBTENCION DE UNA SUSPENSION CELULAR Y CULTIVO DE<br>HEPATOCITOS                  | 47 |
| 9  | METODO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)   | 48 |
| 10 | METODO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR CITOTOXICIDAD                                   | 50 |
| 11 | DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA<br>DE LA LACTATO DESHIDROGENASA         | 51 |
| 12 | CUANTIFICACION DE GLUTATION REDUCIDO<br>TOTAL                                    | 53 |
| 13 | DETERMINACION DE LA CURVA PATRON DE PROTEINA                                     | 54 |
| 14 | DETERMINACION DE PROTEINA TOTAL  | 55 |
| 15 | METODO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR GENOTOXICIDAD                                   | 57 |
| 16 | METODO DE SINTESIS NO PROGRAMADA DE ADN  | 58 |
| 17 | PERFIL CROMATOGRAFICO DE LOS CAROTENOIDES<br>DE CHILE CHILACA                    | 60 |
| 18 | CROMATOGRAMA DE LA LUTEINA PURIFICADA<br>DEL PRODUCTO COMERCIAL                  | 62 |
| 19 | CURVA DOSIS-RESPUESTA DE DEN EN HEPATOCITOS<br>(6 HORAS). EFECTO CITOTOXICO      | 63 |
| 20 | EFECTO DE DEN 50 mM EN HEPATOCITOS DE RATA                                       | 65 |
| 21 | EFECTO DEL TRANS $\beta$ -CAROTENO SOBRE LA VIABILIDAD<br>CELULAR DE HEPATOCITOS | 67 |

## FIGURA

|    |  |    |
|----|--|----|
| 22 | EFFECTO DE TRANS LUTEINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE HEPATOCITOS  | 68 |
| 23 | EFFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO CITOTOXICO DE DEN 50 mM. CUANTIFICACION DE LDH. ADMINISTRACION SIMULTANEA        | 70 |
| 24 | EFFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO CITOTOXICO DE DEN 50 mM. CUANTIFICACION DE GSH. ADMINISTRACION SIMULTANEA        | 71 |
| 25 | EFFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO CITOTOXICO DE DEN 50 mM. CUANTIFICACION DE LDH. PREINCUBACION CON EL CAROTENOIDE | 72 |
| 26 | EFFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO CITOTOXICO DE DEN 50 mM. CUANTIFICACION DE GSH. PREINCUBACION CON EL CAROTENOIDE | 73 |
| 27 | EFFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE LA SINTESIS NO PROGRAMADA DE ADN   | 75 |
| 28 | CURVA DOSIS-RESPUESTA DE DEN EN HEPATOCITOS. EFFECTO GENOTOXICO  | 76 |
| 29 | EFFECTO GENOTOXICO DE DEN EN HEPATOCITOS (4 HORAS DE EXPOSICION)   | 79 |
| 30 | EFFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO GENOTOXICO CAUSADO POR DEN 2.5 $\mu$ M EN HEPATOCITOS                            | 80 |
| 31 | EFFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO GENOTOXICO CAUSADO POR DEN 5 $\mu$ M EN HEPATOCITOS                              | 81 |

## I-RESUMEN

Los carotenoides han sido considerados como nutrientes especiales dado que poseen diferentes capacidades a nivel biológico, principalmente actuando como antioxidantes naturales y de esta forma protegen al organismo contra el efecto de diversos tóxicos. La falta de conocimientos acerca de la utilización de los carotenoides en el cuerpo humano ha impedido su completo aprovechamiento. Por otro lado, también en la dieta se encuentran diferentes tóxicos, muchos de ellos provenientes del procesamiento de los alimentos. El objetivo de este estudio fue conocer las interacciones a nivel celular y molecular de dos tipos de compuestos provenientes de la dieta; el primero una nitrosamina (dietilnitrosamina), tóxico presente en algunos alimentos como los embutidos y los quesos madurados, la cual produce daños a nivel genético y es considerada como un potente iniciador de procesos carcinogénicos; y el segundo un extracto de carotenoides de Chile así como sus principales componentes puros ( $\beta$ -caroteno y luteína). Los carotenoides fueron extraídos mediante el método de la AOAC (1990) y analizados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. El sistema biológico utilizado fue el cultivo primario de hepatocitos de ratas Wistar macho (250 a 350 g) que fueron sometidos a una perfusión hepática *in situ* con colagenasa. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos para el estudio de viabilidad celular mediante el método de MTT, o en cajas de 35 mm para el estudio citotóxico y genotóxico. El estudio citotóxico se determinó mediante la cuantificación de lactato deshidrogenasa libre y el total de glutatión reducido. El estudio genotóxico se llevó a cabo mediante el método de síntesis no programada de ADN. El perfil cromatográfico del extracto de Chile reveló que contiene principalmente luteína en 50%, trans  $\beta$ -caroteno en 12% y un tercer carotenoide probablemente neoxantina o violaxantina en 38%. Del estudio de viabilidad celular se obtuvo la curva dosis respuesta de la dietilnitrosamina (DEN). Se requirió una concentración de 50 mM de DEN para causar 50% de muerte celular ( $CL_{50}$ ) en 10 horas ( $p < 0.05$ ). Se determinaron las concentraciones de los carotenoides las cuales no dañaron a las células y fueron de 50  $\mu$ M para  $\beta$ -caroteno, 1  $\mu$ M para luteína y el extracto de 1  $\mu$ M equivalente de luteína. Los resultados del estudio citotóxico demostraron que la toxicidad de la

nitrosamina (50 mM) no se ve afectada por la presencia previa o simultánea de  $\beta$ -caroteno, luteína o el extracto ( $p \geq 0.05$ ). Al realizar el estudio genotóxico se observó que la DEN a concentraciones de 10, 5 y 2.5  $\mu\text{M}$  causó 2.5, 2.0 y 1.3 veces más daño genotóxico respectivamente al compararla con el control ( $p < 0.05$ ). Los carotenoides fueron capaces de evitar el daño causado por DEN 2.5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) y disminuir la genotoxicidad de la DEN 5  $\mu\text{M}$  en 30-40% (excepto la luteína) ( $p < 0.05$ ). Estos resultados demuestran que, bajo las condiciones experimentales del estudio citotóxico, la dietilnitrosamina no se comportó como un agente hepatotóxico ya que no se observó disminución de la viabilidad celular sino hasta que se utilizó una concentración alta (50 mM) la cual provocó el 50% de muerte. Sin embargo si es un agente genotóxico potente como se observó en el estudio a nivel genético, ya que se requirieron concentraciones micromolares para dañar de manera significativa al ADN con respecto al control ( $p < 0.05$ ). El  $\beta$ -caroteno, la luteína y el extracto de carotenoides no ejercieron efecto sobre el daño citotóxico causado por la dietilnitrosamina pero si mostraron tener la capacidad de disminuir el daño al material genético causado por dicho tóxico, lo cual indica que de cierta forma inhiben la etapa de iniciación carcinogénica provocada por la nitrosamina. Los datos obtenidos sugieren que los carotenoides son capaces de proteger a las células hepáticas contra el daño de las nitrosaminas comunmente presentes en alimentos, mediante un comportamiento dependiente de la dosis.

## II-INTRODUCCION

El ser humano está expuesto irremediablemente a un gran número de compuestos tóxicos, de diferente procedencia y naturaleza, que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Los alimentos no son la excepción ya que contienen un sinnúmero de compuestos tóxicos, algunos potencialmente carcinogénicos, que llegan al alimento por diversas causas ya sean accidentales o incidentales, y de diversas fuentes como son los aditivos, los plaguicidas, los contaminantes entre otros. El origen de estos compuestos tóxicos puede ser natural, como el caso de las micotoxinas; o sintéticos, como algunos aditivos y colorantes, entre otros.

Los alimentos procesados como los embutidos y los productos cárnicos contienen diferentes clases de aditivos que son indispensables para que el producto se mantenga en óptimas condiciones fisicoquímicas, sensoriales y con la calidad microbiológica que se requiere. Esto se logra mediante la adición de sales de nitrito; sin embargo, bajo las condiciones de procesado (cocción, secado, etc.) y a pH ácidos, reaccionan con aminas para dar lugar a la formación de nitrosaminas. Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza: **a.** en el agua, debido al uso de fertilizantes químicos los cuales quedan como residuos contaminantes en el agua; **b.** en los alimentos procesados, como son los embutidos, los quesos madurados y la cerveza, entre otros <sup>(1)</sup>; **c.** en subproductos de la industria y en el humo de cigarro. Su capacidad para producir alteraciones a nivel molecular ha sido estudiada mediante diferentes mecanismos <sup>(2, 3, 4)</sup>. Las nitrosaminas son compuestos metabolizados principalmente en el hígado y se consideran hepatotóxicos y organotrópicos. El mecanismo de acción de dichos compuestos es bien conocido ya que actúan como iniciadores de procesos cancerígenos en más de 40 especies del reino animal incluyendo al hombre <sup>(1)</sup>.

Por otro lado, en estudios epidemiológicos utilizando poblaciones humanas de diferentes localizaciones geográficas y costumbres dietéticas han sugerido que los constituyentes de los alimentos juegan un papel modulador importante en la incidencia de algunos tipos de cáncer <sup>(5)</sup>. Los alimentos naturales, en su mayoría frutas y verduras, contienen compuestos con capacidad protectora contra la acción de diversos agentes tóxicos. Se pueden señalar compuestos como la vitamina C, la

vitamina E, la vitamina A, los carotenoides, las isoflavonas, los taninos, las quinonas, los compuestos fenólicos, el selenio, los niveles de grasa (saturada y poliinsaturada), entre otros<sup>(6)</sup>.

Recientemente se ha incrementado la atención hacia dichos moduladores de carcinogénesis de origen dietético, llevándose a cabo gran número de estudios con animales para evaluar su efecto. En muchos casos los hallazgos obtenidos de los estudios epidemiológicos son consistentes con los obtenidos a partir de los estudios con animales. Las guías para reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer mediante la dieta han sido el resultado de algunos de estos estudios, pero a la fecha no se ha encontrado el compuesto dietético "ideal", el cual provea inhibición universal contra todos los tipos de cáncer. Como el cáncer es una enfermedad multietapas muy complicada, afectada por una gran variedad de factores los cuales aún están relativamente escondidos, no es posible lograr una completa quimioprotección<sup>(6)</sup>.

En los últimos años se ha progresado en la comprensión de los mecanismos básicos mediante los cuales algunos constituyentes dietéticos inhiben o promueven el cáncer, sin embargo, no ha sido posible aún evaluar el potencial de un compuesto dado en términos de afección en humanos en varios órganos o bajo diferentes regímenes de exposición.

Los constituyentes dietéticos pueden reducir la iniciación del proceso de malignidad gracias a la inhibición de la formación del carcinógeno final mediante la alteración del balance de activación o mediante las rutas de detoxificación bioquímica del procarcinógeno. Esto se puede lograr a través del bloqueo directo o reduciendo el daño al ADN en las células blanco. Otros compuestos actúan como antipromotores y son capaces de interferir con el desarrollo del cáncer en estados subsecuentes a la iniciación. Existen evidencias que indican que algunos compuestos, principalmente con capacidad antioxidante, pueden interaccionar con tóxicos disminuyendo<sup>(7, 8, 9, 10, 11, 12, 13)</sup> o aumentando<sup>(14)</sup> el efecto nocivo de dichos compuestos.

Entre los compuestos que poseen dichas propiedades se encuentran los carotenoides (carotenos y xantofilas). El  $\beta$ -caroteno se encuentra en grandes concentraciones en vegetales amarillos, naranja y verdes (especialmente calabazas y zanahorias) y es el principal precursor de la vitamina A<sup>(7,15)</sup>. Varios estudios

epidemiológicos han demostrado que existe una relación inversa entre el consumo de  $\beta$ -caroteno y la incidencia de algunos tipos de cáncer como el de pulmón, estómago, colon, próstata y cervix <sup>(11, 12)</sup>. También existen evidencias de que todos los carotenoides poseen dicho potencial-protector o modulador, independientemente de su capacidad como precursores de la vitamina A, es decir que no se requiere que un carotenoide sea nutricionalmente activo para ejercer una acción protectora <sup>(7, 8)</sup>.

En este trabajo se determinó el efecto del extracto de carotenoides del chile chilaca así como el efecto de sus dos carotenoides principales puros, luteína y  $\beta$ -caroteno, contra el daño citotóxico y genotóxico provocado por la dietilnitrosamina a células hepáticas de rata.

El chile es un producto ampliamente consumido en México y es muy importante conocer la capacidad que tiene tanto como nutriente como por la actividad biológica de sus constituyentes. Es necesario impulsar el estudio de los tóxicos a los que se enfrenta el mexicano y la forma más adecuada de aminorar sus consecuencias, probablemente mediante el aprovechamiento de los beneficios de la dieta como es el caso de los carotenoides.

### III-ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

#### A. CAROTENOIDES

##### 1. DEFINICION

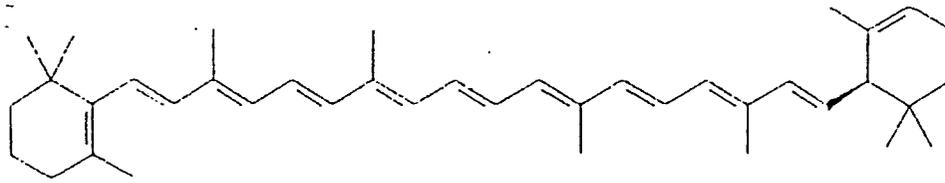
Los carotenoides son isoprenoides o tetraterpenos con 40 átomos de carbono los cuales se encuentran presentes en tejidos vegetales, microorganismos, insectos, algunos peces y aves. Existen tres clases de carotenoides: a. los carotenos, los cuales son compuestos hidrocarbonados (por ejemplo el  $\alpha$ -caroteno y el  $\beta$ -caroteno); b. las xantofilas, las cuales contienen oxígeno (por ejemplo la luteína y la zeaxantina); y c. conjugados con azúcares y otras moléculas <sup>(7, 8, 16)</sup> (Figura 1). De los aproximadamente 600 carotenoides naturales completamente caracterizados, menos del 10% son precursores de la vitamina A en mamíferos.

Los carotenoides más abundantes en la naturaleza, como la fucoxantina, neoxantina y violaxantina, son nutricionalmente inactivos. El principal carotenoide provitamina A en mamíferos es el  $\beta$ -caroteno seguido de la  $\beta$ -criptoxantina y el  $\alpha$ -caroteno.

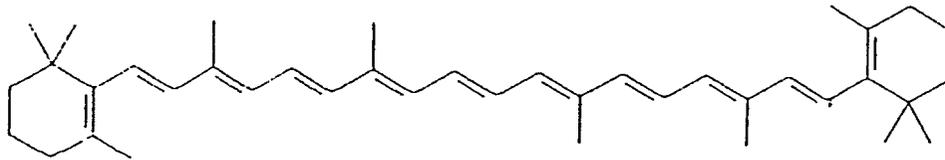
##### 2. HISTORIA

Los estudios acerca de estos pigmentos comenzaron en el siglo XIX, cuando en 1831 se aisló por primera vez un pigmento amarillo cristalino (caroteno) y en 1837 se le dio el nombre de xantofilas. Para principios del siglo XX, ya se sabía que se trataba de una extensa familia de compuestos <sup>(17)</sup>.

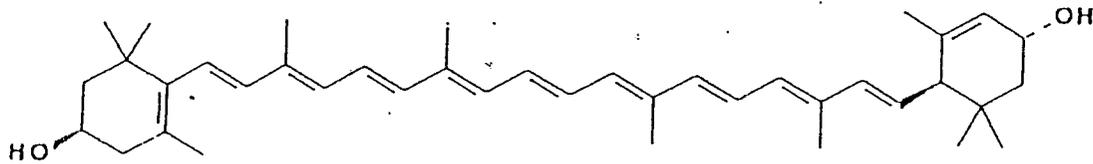
En 1913, McCollum y Davis publicaron la existencia de un factor liposoluble en la dieta que promovía el crecimiento en ratas. Posteriormente se le dio el nombre de vitamina A y se observó que prevenía la ceguera nocturna y promovía la diferenciación celular. En 1930, Karrer y colaboradores determinaron la estructura del  $\beta$ -caroteno y en 1931 la de la vitamina A. De esta forma se pudo comprender mejor el papel del  $\beta$ -caroteno como precursor de la vitamina A <sup>(17)</sup>.



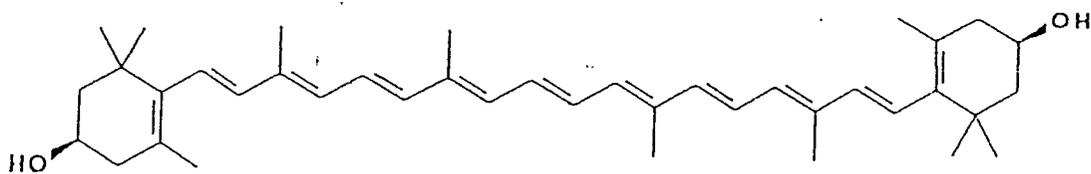
**$\alpha$ -CAROTENO**



**$\beta$ -CAROTENO**



**LUTEINA**



**ZEAXANTINA**

**FIGURA 1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE CAROTENOIDES**

### 3. METABOLISMO

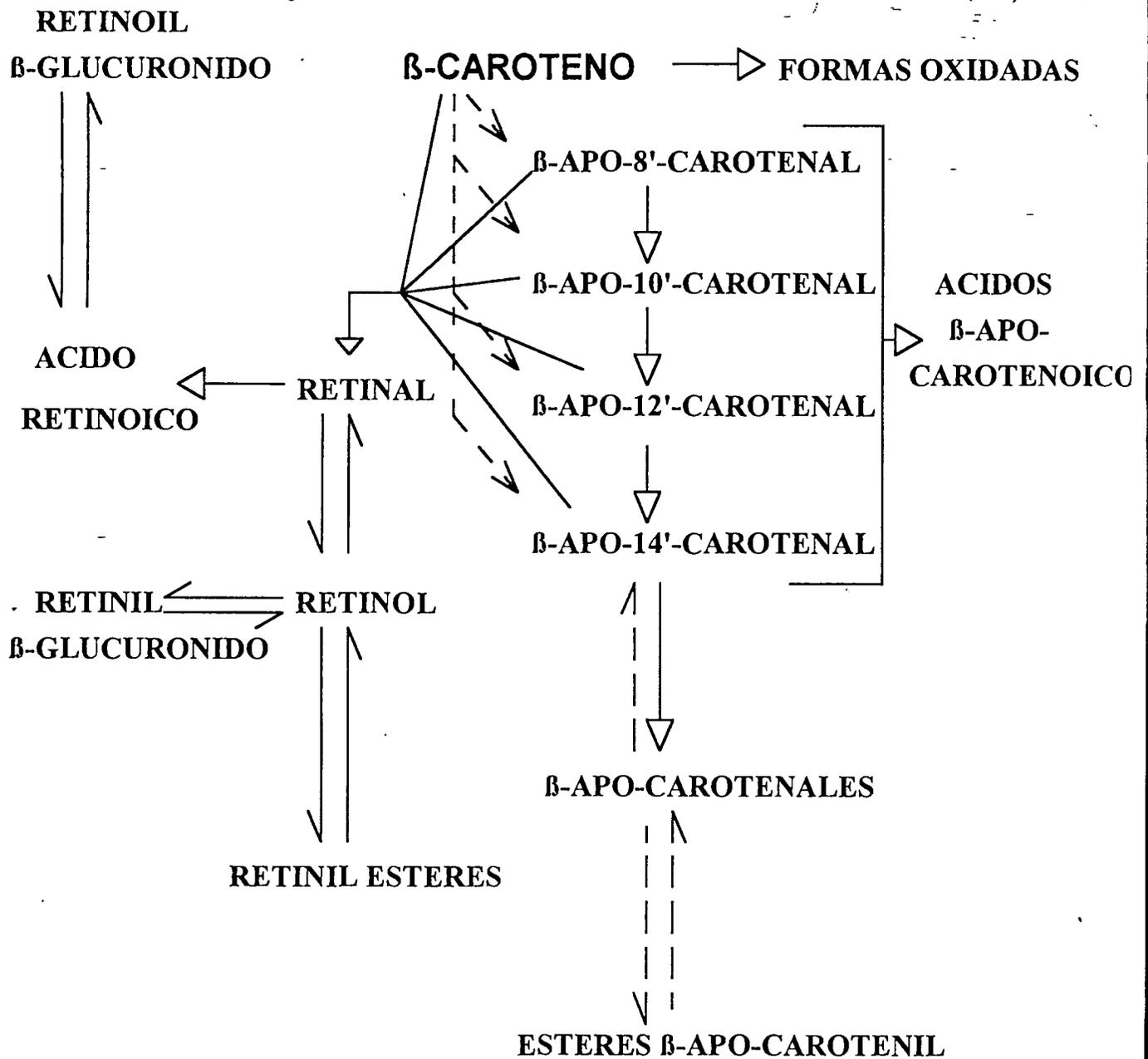
Entre 1928 y 1929, Euler y Moore demostraron que el  $\beta$ -caroteno es precursor de la vitamina A en mamíferos. Surgieron dos hipótesis al respecto:

- a. El  $\beta$ -caroteno sufre una ruptura central en el doble enlace 15-15" para producir dos moléculas de vitamina A.
- b. La ruptura es en la periferia para producir una molécula de vitamina A vía la formación de  $\beta$ -apo-carotenales en serie <sup>(18)</sup>.

El rompimiento del  $\beta$ -caroteno para formar moléculas de vitamina A es un proceso que requiere de oxígeno y el retinal es el producto primario de la reacción (Figura 2). La interconversión de retinal a retinol se lleva a cabo gracias a la presencia de alcohol deshidrogenasas dependientes de NAD. La enzima responsable de generar esta reacción se encuentra en la fracción citoplasmática de células de intestino e hígado y es una oxigenasa <sup>(18)</sup>. Los hallazgos encontrados hacían suponer que el rompimiento del  $\beta$ -caroteno era central, produciendo dos moléculas de retinal <sup>(18, 19)</sup>.

Otros estudios han demostrado que la conversión de  $\beta$ -caroteno a vitamina A disminuye inversamente a la ingesta del carotenoide, dicha disminución depende de la dosis, observándose con dosis de hasta uno o dos veces veces los requerimientos diarios. La disminución en la biopotencia del  $\beta$ -caroteno sigue una cinética tipo Michaelis-Menten. Basados en la investigación del metabolismo de carotenoides, se ha propuesto una guía de conversión de  $\beta$ -caroteno a retinol (Cuadro 1).

Para  $\beta$ -caroteno disuelto en soluciones oleosas, el factor de conversión es de 1:3.33 (una molécula de retinol producida por 3.33 moléculas de  $\beta$ -caroteno ingerido) es el adecuado para un intervalo de 1,500 a 4,000  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno. Para dosis mayores, el factor disminuye de acuerdo a los resultados encontrados con animales de laboratorio. Para  $\beta$ -caroteno en vegetales, se debe considerar un factor de conversión de 1:6.0 para ingestas de 1,500-4,000  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno; es decir, un factor mayor si la ingesta es menor y un factor menor si la ingesta es mayor. Por otro lado, si la cantidad ingerida de  $\beta$ -caroteno corresponde al intervalo de 1 a 10 veces el requerimiento diario de vitamina A, el  $\beta$ -caroteno es completamente absorbido y



- REACCIONES ENZIMATICAS CONOCIDAS.
- - - - REACCIONES ENZIMATICAS PROBALES PERO NO DEMOSTRADAS.
- --- REACCIONES PROBABLEMENTE BIOLÓGICAS.

FIGURA 2. RUTA METABOLICA DEL  $\beta$ -CAROTENO.

ADAPTADO DE: OLSON (1989)

**CUADRO 1. CONVERSION DE LA INGESTA  
DE  $\beta$ -CAROTENO A RETINOL.**

| INGESTA DE $\beta$ -CAROTENO ( $\mu$ g) | RETINOL ( $\mu$ g)                         |                                      |
|---|--|--------------------------------------|
|   | DE $\beta$ -CAROTENO<br>EN SOLUCION OLEOSA | DE $\beta$ -CAROTENO<br>EN VEGETALES |
| 1,500                                   | 1.87 $\mu$ g                               | < 6.0 $\mu$ g                        |
| 1,500-4,000                             | 3.33 $\mu$ g                               | 6.0 $\mu$ g                          |
| > 4,000                                 | > 3.33 $\mu$ g                             | > 6.0 $\mu$ g                        |

ADAPTADO DE: PALLET Y YOUNG (1993)

transformado a vitamina A con una relación de una molécula de  $\beta$ -caroteno por molécula de retinol <sup>(16)</sup>. La FAO/OMS (1965), recomendó que, en ausencia de datos más específicos para alimentos, la biodisponibilidad del  $\beta$ -caroteno deberá ser considerada como un tercio, y la eficiencia de conversión en el cuerpo como la mitad del  $\beta$ -caroteno disponible; por lo tanto, la eficiencia de utilización del  $\beta$ -caroteno por el ser humano se considera como un sexto; es decir que 1  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno en la dieta tiene la actividad biológica de 0.167  $\mu$ g de retinol. Por el contrario, si el  $\beta$ -caroteno se encuentra disuelto en grasa o aceite, entonces se considera que 1  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno corresponde a la actividad biológica de 0.3  $\mu$ g de retinol según IUPAC. En el Cuadro 2 se muestra el contenido de carotenoides en algunos alimentos <sup>(20)</sup>. Para otros carotenoides el factor de conversión a retinol es de 12, es decir 12  $\mu$ g de carotenoides corresponden a 1 equivalente de retinol. Se considera que 1 equivalente de retinol es igual a 1  $\mu$ g de vitamina A y es aproximadamente la tercera parte de 1 unidad internacional de retinol.

Se ha demostrado que el mecanismo de regulación para la absorción y la transformación de  $\beta$ -caroteno a nivel celular es el transporte pasivo a través de la membrana citoplasmática y, una vez dentro, sigue un proceso enzimático regulado, así que el  $\beta$ -caroteno excedente es re-excretado al intestino <sup>(13, 21)</sup>. Los carotenoides y los retinoides se almacenan principalmente en el tejido adiposo y en el hígado (80-85 y 8-12% respectivamente) <sup>(22, 23)</sup>.

#### **4. CAPACIDAD BIOLÓGICA DE LOS CAROTENOIDES.**

Los carotenoides son sintetizados exclusivamente por organismos fotosintéticos <sup>(17)</sup>, en estos organismos, su función principal es la de proteger contra la fotosensibilización <sup>(24)</sup>. Estos pigmentos proveen un amplio intervalo de color, desde el amarillo claro hasta el rojo oscuro. Cuando se encuentran a complejados con proteínas se aprecian tonos verdes o azules <sup>(17)</sup>.

En mamíferos, los carotenoides cumplen con diversas funciones como son: actuar como precursores de la vitamina A, fotoprotección, atrapar radicales libres, mejorar la respuesta inmunológica, entre otras. De especial interés es su actividad antimutagénica en sistemas microbiológicos y, sobre todo, su capacidad

**CUADRO 2. CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN ALIMENTOS.**

| ALIMENTO      | CONTENIDO DE CAROTENOIDES<br>(mg / 100 g) |
|---------------|---|
| CARNES        | 0.04                                      |
| PESCADO       | 0.07                                      |
| HUEVO         | 0.01-0.15                                 |
| MANTEQUILLA   | 0.07-0.43                                 |
| QUESO         | 0.07-0.71                                 |
| LECHE DE VACA | 0.01-0.06                                 |
| FRIJOL        | 0.3-0.5                                   |
| BROCOLI       | 2.5                                       |
| CALABAZA      | 0.3                                       |
| ZANAHORIA     | 2.85-7.0                                  |
| PAPAS         | 6.4                                       |
| ESPINACA      | 6.0                                       |
| JITOMATE      | 6.4                                       |
| MANZANA       | 0.01-0.03                                 |
| PLATANO       | 0.03-0.22                                 |
| NARANJA       | 0.05-0.1                                  |

ADAPTADO DE: BRIVIVA Y SIES (1994)

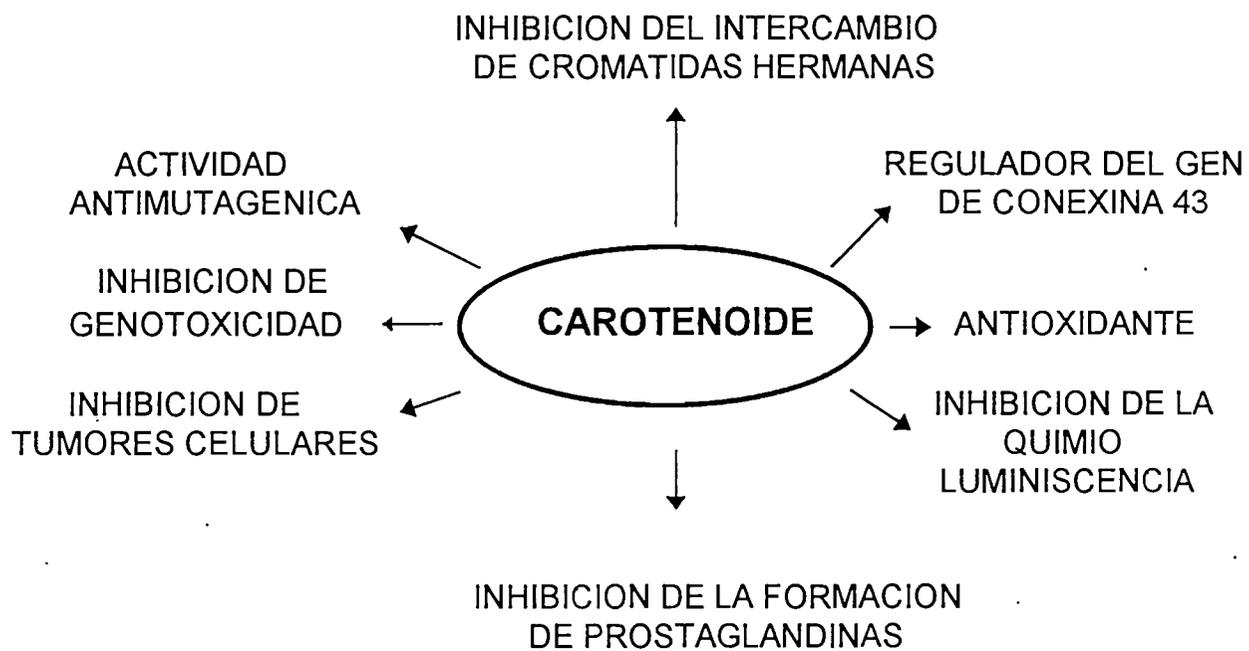
anticarcinogénica tanto en sistemas celulares como en individuos completos <sup>(15)</sup>. Los efectos de los carotenoides sobre las células se muestran en la Figura 3 <sup>(11)</sup>.

## 5. CAROTENOIDES COMO ANTIOXIDANTES: MECANISMOS DE ACCION.

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado la función anticancerígena de los carotenoides y de la Vitamina A <sup>(5, 25, 26)</sup>. En dichos estudios epidemiológicos y en estudios de laboratorio con animales o cultivo de órganos y células se ha observado que no es necesario que los carotenoides tengan función de provitamina A para ser capaces de ejercer su acción como agentes quimioprotectores o antimutagénicos. Como un ejemplo se tiene el caso de la cantaxantina, un pigmento carotenoide que no es convertido en vitamina A en organismos animales pero que si posee propiedades protectoras contra la fotosensibilización (UV) y contra agentes químicos los cuales son capaces de causar cáncer <sup>(8, 27, 28)</sup>. Sin embargo, el efecto de los carotenoides no es siempre benéfico. Se ha observado que el  $\beta$ -caroteno es capaz de potenciar el efecto genotóxico de la aflatoxina B<sub>1</sub> en hepatocitos <sup>(14)</sup>, así como incrementar los niveles de peróxidos en plasma e hígado de rata <sup>(29)</sup>. Debido a resultados como los mencionados, existe controversia para poder atribuir con precisión los efectos protectores de los carotenoides. En este sentido es muy importante considerar que, si bien los carotenoides poseen capacidad protectora, no hay que perder de vista que bajo determinadas circunstancias pueden actuar de manera contraria, de tal manera que es muy importante definir tanto las situaciones en las que actúan como protectores como aquéllas en las que realizan la función contraria.

Se define como antioxidante biológico a aquel compuesto que protege un sistema biológico contra los efectos dañinos de reacciones que puedan causar oxidaciones excesivas <sup>(29)</sup>.

Entre los mecanismos antioxidantes se encuentran la desactivación de especies electrónicamente activadas como el oxígeno singulete y de especies químicas reactivas como los radicales peroxilos y alquilos generados dentro de las células. Los carotenoides son capaces de actuar a diferentes niveles del proceso



**FIGURA 3. EFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE LAS CELULAS.**

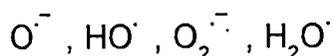
oxidativo, atrapando formas de oxígeno reactivo generados en las células como resultado de los procesos metabólicos o la exposición a xenobióticos <sup>(29)</sup>.

Se ha sugerido que el potencial quimioprotector y antígenotóxico de los carotenoides podría relacionarse con su actividad antioxidante, pero posiblemente intervengan otros mecanismos tales como las interacciones entre los antioxidantes a nivel celular <sup>(29)</sup>. Uno de los carotenoides más abundantes e importantes para el hombre es el  $\beta$ -caroteno (por ser el principal precursor de la vitamina A), sobre el cual se han realizado un gran número de estudios para tratar de discernir el mecanismo por el cual es capaz de ejercer su acción quimioprotectora en sistemas biológicos.

Existen diversas fuentes de radicales libres en sistemas biológicos, los cuales se dividen básicamente en cuatro grupos<sup>(30)</sup>.

\* Radicales generados de compuestos como flavinas y quinonas, los cuales son poco bioactivos.

\* Radicales de oxígeno o hidróxido:



\* Radicales análogos:  $\text{RO}_2^{\cdot}$  (R=grupo alquilo u otro)

\* Radicales de residuos de aminoácidos, tales como el radical tirosil y el radical cisteinil encontrados en proteínas.

\* Radicales intermediarios de substratos como metano o alcohol

Los agentes carcinógenos, al ser metabolizados, pueden generar uno o varios tipos de radicales libres y de esta forma reaccionar con moléculas como el  $\beta$ -caroteno o con macromoléculas del organismo y causar daño.

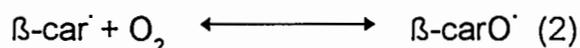
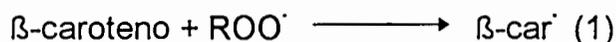
Se sabe que el  $\beta$ -caroteno es un antioxidante natural y se ha tenido considerable interés en elucidar cómo, gracias a dicho mecanismo, es capaz de

ejercer su acción protectora en sistemas biológicos. La efectividad del  $\beta$ -caroteno como inactivador de radicales libres se ha demostrado ampliamente, sin embargo, la importancia de esta capacidad en mamíferos es incierta. Por esta razón se ha incrementado el interés de demostrar la posibilidad de que el  $\beta$ -caroteno posea la habilidad de reaccionar directamente con los radicales peróxidos involucrados en la lipoperoxidación <sup>(31)</sup>.

El  $\beta$ -caroteno posee un sistema de dobles enlaces conjugados en su molécula que le imparte características pro-oxidantes, haciéndolo muy susceptible al ataque de radicales peróxido.

Los mecanismos de acción antioxidante propuestos para el  $\beta$ -caroteno, y por consiguiente para otros carotenoides se comentan a continuación:

El radical resultante (1) reacciona rápida y reversiblemente con el oxígeno para formar una nueva cadena acarreadora de radical peróxido:



En este punto, el  $\beta$ -caroteno sufre una rápida autooxidación. Sin embargo, este mecanismo depende de la presión parcial de oxígeno como resultado de la reversibilidad de la reacción (2) ya que el radical  $\beta\text{-car}^\cdot$  se estabiliza por resonancia, así que cuando la presión parcial de oxígeno es muy baja o disminuye, el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la izquierda y por consecuencia se produce menor concentración de radicales peróxido y por lo tanto reduce la capacidad de autooxidación del sistema.

La reactividad del  $\beta$ -caroteno frente a radicales peróxidos y la estabilidad del radical  $\beta\text{-car}^\cdot$  resultante son imprescindibles para la capacidad autooxidativa de la molécula ya que, en primer lugar, la reactividad del  $\beta$ -caroteno significa que posee el potencial de competir, aún cuando se encuentre en baja concentración, por radicales peróxido derivados de otras moléculas lipídicas. En segundo lugar, la estabilidad del radical  $\beta\text{-car}^\cdot$  producido significa que a presiones parciales bajas de oxígeno dicho radical predominará sobre la cadena acarreadora de radical peróxido ( $\beta\text{-carO}^\cdot$ ) y de

esta manera, el radical  $\beta$ -car<sup>·</sup> puede ser eliminado del sistema al reaccionar con otro radical peróxido libre:



Esta reacción es más rápida que la reacción de terminación peróxido-peróxido. En los tejidos de mamíferos, la presión parcial de oxígeno es muy baja, por lo que el  $\beta$ -caroteno tiene el potencial de actuar como un antioxidante bloqueador de las reacciones de peroxidación de lípidos, complementado con el papel de la vitamina E.

Es importante notar que la capacidad poco común del  $\beta$ -caroteno como antioxidante bloqueador de la cadena de peroxidación de lípidos puede ser exhibida por otros sistemas que contengan dobles enlaces conjugados, por lo que se esperaría que otros carotenoides, incluso compuestos retinoides, presentaran dicha propiedad.

Mediante este mismo mecanismo, el  $\beta$ -caroteno es capaz de atrapar e inactivar radicales libres que de una u otra forma entran en el organismo derivados de especies químicas reactivas o del efecto de la fotosensibilización originada por la luz UV<sup>(32)</sup>.

El  $\beta$ -caroteno reacciona más eficazmente contra ciertos tipos de radicales libres que el  $\alpha$ -tocoferol > propilgalato > triptofano > glutatión. Existe una diferencia de 100 veces entre el primero y el último<sup>(33)</sup>.

## 6. PROMOCION DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA

La respuesta inmune es requerida contra la patogenicidad de organismos infecciosos, pero otra función es la de prevenir enfermedades crónicas como es el cáncer. Varias células del sistema inmune son capaces de inhibir células tumorales.

El  $\beta$ -caroteno puede tener un efecto en la respuesta inmune independiente de su actividad como provitamina A. El  $\beta$ -caroteno y otros carotenoides (con o sin actividad de provitamina A) con nueve o más dobles enlaces conjugados pueden promover la función inmune ya que son capaces de secuestrar especies oxigenadas

reactivas y otros radicales libres. La vitamina A, en contraste, no puede secuestrar a este tipo de compuestos y es relativamente un antioxidante pobre <sup>(34)</sup>, aún cuando sí es capaz de promover la respuesta inmune <sup>(35)</sup>. Durante la respuesta inmune, especialmente la respuesta inicial a la infección, se utilizan radicales libres y moléculas oxigenadas reactivas por ciertas células de la sangre (neutrófilos principalmente) para combatir a los microorganismos. En este caso, los radicales libres son benéficos, sin embargo, si son sobreproducidos pueden causar daño celular en los tejidos corporales <sup>(36)</sup>.

Las células involucradas en la generación de una respuesta inmune específica pueden también ser afectadas por radicales libres de otra procedencia. Algunos informes preliminares comparan la actividad del  $\beta$ -caroteno y de la vitamina A, y muestran que ambos nutrientes previenen la involución inducida por el estrés del timo y aumenta el número de linfocitos circulantes. También se ha observado cierta protección para los macrófagos ya que el  $\beta$ -caroteno y la cantaxantina inhiben la pérdida de receptores de membrana y el número de células T se incrementa considerablemente. Por otro lado, se ha demostrado que los carotenoides tienen efecto protector contra procesos cancerígenos <sup>(36)</sup> (Figura 4).

## 7. OTRAS FUNCIONES

Adicionalmente a los mecanismos descritos, se han observado otros efectos provocados por la acción de los carotenoides tales como la modulación de sistemas enzimáticos P-450 <sup>(37, 38)</sup>, lo cual sugiere que los carotenoides son capaces de modificar la activación metabólica de algunos compuestos tóxicos.

Otro mecanismo de acción es la capacidad de diferentes carotenoides para promover la comunicación intercelular (gap), observación efectuada a partir de estudios *in vitro*. Este tipo de comunicación célula-célula puede restringir la expansión clonal de células dañadas.

Todas las propiedades antes descritas se consideran propias de la acción de los carotenoides y no se le atribuyen a la acción de la vitamina A <sup>(7, 8, 11, 12)</sup>.

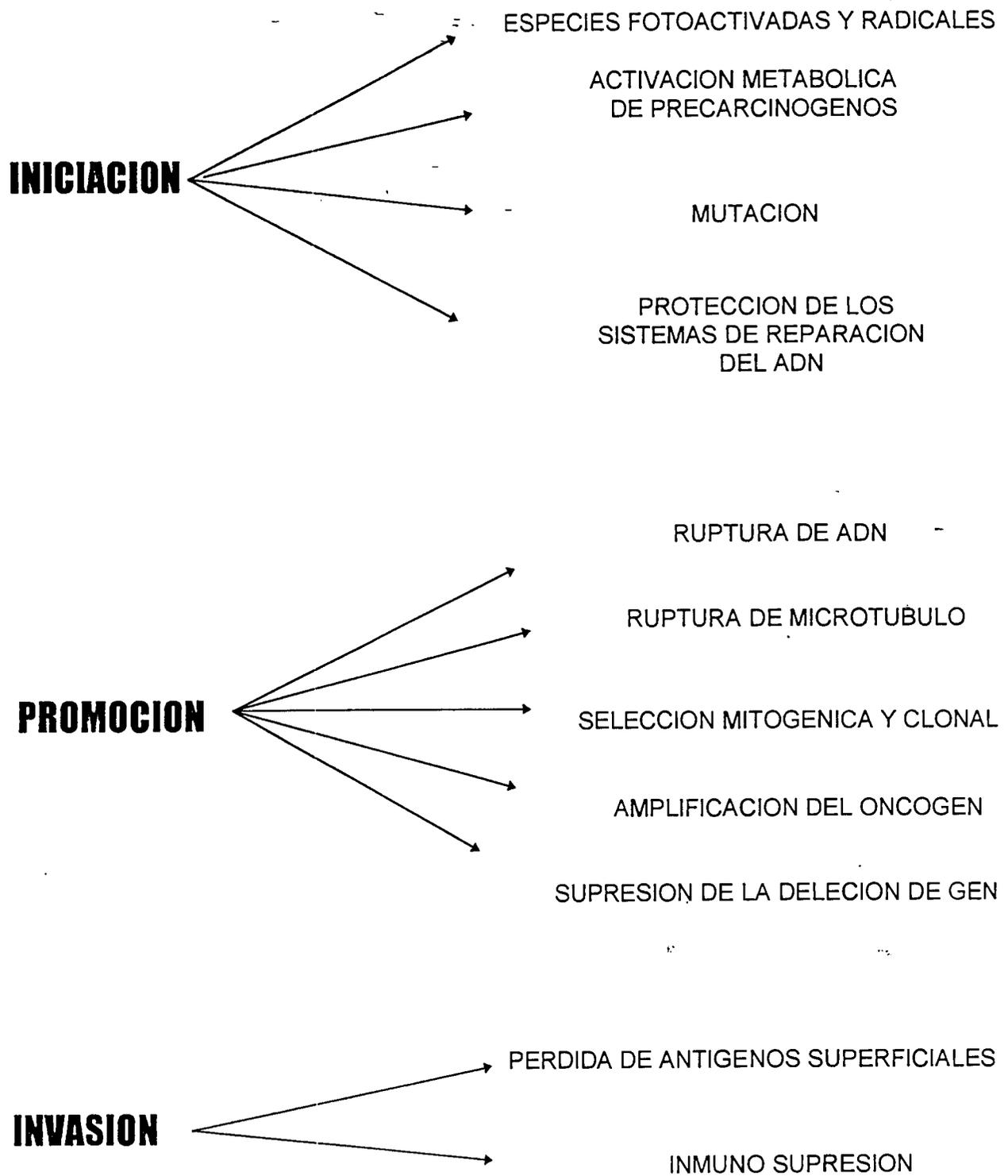


FIGURA 4. SITIOS DE ACCION DE CAROTENOIDES  
EN EL PROCESO NEOPLASICO

## 8. TOXICIDAD DE CAROTENOIDES.

La falta de carotenoides provitamina A en el organismo puede contribuir a la deficiencia de dicha vitamina, lo cual produce efectos adversos en el crecimiento y el desarrollo, la reproducción y la resistencia a infecciones. Un padecimiento severo debido a la falta de vitamina A es la seroftalmia. Estos efectos pueden llegar a ser irreversibles si no se administra la vitamina A a tiempo <sup>(17)</sup>. La dosis diaria recomendada de vitamina A es de 1250 a 2500 UI (757 eq. de retinol) en niños menores de 4 años, de 2500 a 5000 (1515 eq. de retinol) en niños mayores de 4 años y adultos y de 5000 a 8000 (2424 eq. de retinol) en mujeres embarazadas y en lactancia.

La Organización Mundial de la Salud ha autorizado la fortificación de alimentos con vitamina A y en zonas donde la prevalencia de la deficiencia de dicha vitamina es alta, se administran dosis de hasta 200,000 UI cada 3 a 6 meses para maximizar la concentración de la vitamina en el hígado. Esta acción se considera segura y tiene como objetivo principal el de prevenir la seroftalmia.

Sin embargo, con dosis únicas de 100,000  $\mu\text{g}$  de vitamina A en infantes y 600,000  $\mu\text{g}$  en adultos se ha observado hipervitaminosis A aguda. La hipervitaminosis A crónica se ha reportado con dosis de 10,000  $\mu\text{g}$  al día en infantes y con dosis de 50,000  $\mu\text{g}$  al día en adultos. La hipervitaminosis A presenta efectos nocivos ya que se ha observado que predispone a hepatitis viral, cirrosis y sensibilización hepática. Puede actuar como un agente teratogénico o embriotóxico si se administra en exceso a mujeres embarazadas. En estudios de prevención de ciertos tipos de cáncer se ha observado que megadosis de vitamina A sola o en combinación con  $\beta$ -caroteno pueden incrementar la incidencia de cáncer de pulmón <sup>(17, 69)</sup>.

El exceso en consumo de carotenoides no genera forzosamente una alta concentración de vitamina A en los tejidos y no provoca hipervitaminosis A aunque si se observa que el nivel de retinol sanguíneo aumenta.

Al exceso de carotenoides en el organismo se le llama hipercarotenemia y sus efectos se observan al consumir más de 300  $\mu\text{g}$  / día. No se observan efectos nocivos en la salud humana y desaparecen lentamente al eliminar el exceso en el

consumo. El efecto más común es el de la pigmentación naranja de la piel, sobre todo las palmas de las manos y las plantas de los pies <sup>(17)</sup>.

El concepto de bionutrición explora el papel de algunos componentes de la dieta y su acción inhibitoria sobre el efecto de sustancias tóxicas. Algunos tóxicos de importancia presentes en los alimentos son los que conforman el grupo de las nitrosaminas, las cuales se tratan a continuación.

## **B. NITROSAMINAS**

Las nitrosaminas forman un grupo de compuestos químicos genotóxicos. Se encuentran en algunos alimentos, en el agua y en el medio ambiente y pueden formarse endógenamente en el organismo. Son capaces de inducir cáncer en animales experimentales y se ha demostrado que algunos compuestos representativos de esta familia inducen cáncer en por lo menos 40 especies animales diferentes incluyendo primates superiores. Se ha sugerido, en estudios experimentales y epidemiológicos que el ser humano es susceptible a desarrollar carcinogénesis por estos compuestos y por lo tanto su presencia en alimentos se puede considerar como un factor de riesgo etiológico para ciertos tipos de cáncer como el de esófago, estómago y nasofaríngeo.

### **1. HISTORIA**

En 1962, Druckey y Preussmann <sup>(1)</sup> postularon que la formación de nitrosaminas carcinogénicas podía tener lugar en el humo de cigarro vía la interacción de óxidos de nitrógeno y aminos del tabaco. Ender y col., en 1964 <sup>(1)</sup>, encontraron trazas de dietilnitrosamina en alimento para ovejas conservado con nitritos así como indicios de hepatotoxicidad en los animales. En 1967, Sander emitió la primer prueba inequívoca de la formación endógena de nitrosaminas en animales experimentales. En 1975, Finet y col. lograron establecer que mediante la dieta era posible la exposición de humanos a compuestos N-nitroso con características carcinogénicas <sup>(1)</sup>.

## 2. FORMACION DE NITROSAMINAS

Las nitrosaminas pertenecen al grupo de compuestos N-nitroso, al que también pertenecen las nitrosamidas. De manera general, las nitrosaminas son derivados N-nitroso de aminas secundarias, mientras que las nitrosamidas son derivados N-nitroso de ureas, amidas, carbamatos, guanidinas, etc. Las diferencias entre estos dos tipos de compuestos no sólo se basan en su estructura química sino que existen diferencias biológicas y ambientales entre ambos; por ejemplo, las nitrosaminas son más estables que las nitrosamidas y ambos son compuestos potencialmente carcinógenos a través de diferentes mecanismos químicos<sup>(40)</sup>.

La formación de nitrosaminas estables ocurre dentro y fuera del organismo, siendo los principales precursores las diferentes aminas secundarias, terciarias y los nitritos. Los requerimientos fundamentales para la síntesis de nitrosaminas son el nitrógeno amino secundario y los nitritos en medio ácido con su máximo cercano a pH 3.4. La reacción de nitración es más rápida con aminas básicas débiles que con aminas de basicidad fuerte. Algunos aniones como halógenos y tiocianatos promueven el proceso de nitración y por otro lado, los antioxidantes como el ascorbato y la vitamina E inhiben la reacción<sup>(1, 41)</sup>.

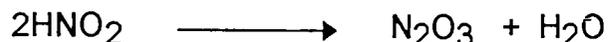
Los mecanismos químicos de nitración de aminas en alimentos es un proceso complejo y ha sido investigado por diversos grupos<sup>(1, 42, 43)</sup>, de manera general es como se describe a continuación.

En algunos procesos de preparación y conservación de alimentos se forman óxidos de nitrógeno en estados de oxidación +3 y +4 que pueden reaccionar con compuestos amino y otros nucleófilos para producir grupos N-, C-, O- y S-nitroso.

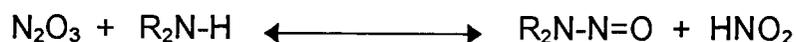
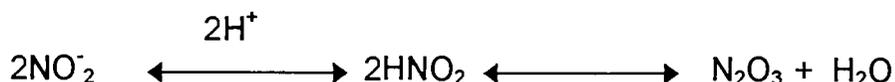
Las principales fuentes de óxidos de nitrógeno (agentes nitrosantes) provienen de la adición de nitrito o nitrato a los alimentos y del calentamiento o secado de alimentos con gases de combustión en los que el nitrógeno molecular puede oxidarse. Como se mencionó, las reacciones de nitración pueden verse influidas por la presencia de inhibidores de nitración como el ascorbato y la vitamina E (compuestos con capacidad redox) y catalizadores como los iones metálicos, los

compuestos carbonilos y los aniones nucleofílicos como el ión cloro, yodo y tiocianato.

La especie nitrosante es el anhídrido nitroso,  $N_2O_3$ , el cual se forma a partir de dos moléculas de ácido nitroso <sup>(40, 41)</sup>:



La reacción de formación de nitrosaminas puede ejemplificarse:



Las condiciones en el tracto digestivo, desde la boca hasta el recto favorecen la formación de nitrosaminas *in vivo*. En la boca, las bacterias presentes promueven la reducción de nitratos a nitritos y posiblemente promuevan también la formación de nitrosaminas en ese sitio. En el estómago, tanto condiciones normales de acidez como condiciones hipoacídicas favorecen la formación de nitrosaminas. El pH normal del estómago es ideal para las reacciones de nitrosación, y en condiciones de hipoacidez, existe en el estómago gran carga microbiana que, como ya se mencionó, promueve la reducción de nitratos y favorece la formación de nitrosaminas a pH neutro. Esto ocurre de manera similar en el intestino delgado y el colon.

### 3. NITROSAMINAS EN ALIMENTOS

Durante siglos, se han utilizado mezclas de sales inorgánicas para el curado de carnes. Actualmente se sabe que el ión nitrito es el que se encarga de llevar a cabo esta función, por lo que se utiliza el nitrito directamente en el alimento. El papel

que juega el nitrito es muy importante en el curado de carnes ya que, en primer lugar, posee acción antimicrobiana y particularmente inhibe el crecimiento de *Clostridium botulinum* mediante mecanismos y participación de cofactores que no se conocen del todo. Otra función del nitrito es la de impartir color rojo a la carne. Este color proviene de pigmentos como la nitrosilmioglobina y la nitrosilhemoglobina formadas cuando el nitrito se reduce a óxido nítrico el cual reacciona con la mioglobina y la hemoglobina. De no formarse estos pigmentos, la carne tomaría un color grisáceo poco apetecible. Finalmente, el nitrito proporciona un sabor deseable a "curado" a varios productos como el tocino, las salchichas, el jamón y otros productos cárnicos <sup>(1)</sup>.

Los niveles permisibles de nitritos en alimentos curados varían de país a país en un intervalo de 10 a 200 ppm. El nitrito no se encuentra en cantidades significativas en los alimentos, por lo que la fuente principal son las carnes curadas. En algunas formulaciones se adicionan nitratos a los alimentos curados, los cuales se reducen para formar nitritos. La mayor parte de los nitritos que se encuentran en humanos provienen de dichas reacciones de reducción de nitratos a nitritos llevadas a cabo por microorganismos en la boca y el tracto digestivo. Además, los nitratos se encuentran ampliamente distribuidos en vegetales como la calabaza, la coliflor, la zanahoria, la espinaca, etc. a niveles variables que oscilan entre 1000 y 3000 ppm. Se ha estimado que la ingesta diaria total de un adulto es de 100 mg de nitratos de los cuales los vegetales aportan el 85% mientras que las carnes curadas únicamente el 9%.

Los nitratos *per se* no implican riesgos a la salud, su importancia toxicológica radica en su fácil conversión a nitritos por bacterias nitrificantes presentes en algunos alimentos, en la saliva y en el tracto gastrointestinal. Por otro lado, los nitritos tienen efectos tóxicos, entre ellos la meta-hemoglobinemia y también funcionan como precursores de nitrosaminas <sup>(40, 41)</sup>.

Los precursores de nitrosaminas son compuestos muy variados que van desde sustancias completamente inocuas como prolina, arginina, lisina, lecitina y colina; como de agentes contaminantes de alimentos ya sean residuos de plaguicidas muchos de ellos utilizados en la agricultura; alcaloides así como también drogas y aditivos alimentarios.

- Los alimentos implicados son principalmente: carnes y productos cárnicos, pescado, queso, leche, vegetales, huevo, así como en bebidas alcohólicas además de las existentes en el humo de cigarro. En el Cuadro 3 se muestra el contenido de dimetilnitrosamina- o dietilnitrosamina en algunos alimentos. Los niveles de nitrosaminas tienden a incrementarse con la temperatura de cocción de los alimentos así como en el almacenamiento de los alimentos con un alto contenido de nitritos y por un tiempo considerable <sup>(1)</sup>. Los alimentos más comúnmente contaminados con compuestos N-nitroso se pueden clasificar como sigue:

- Alimentos conservados por la adición de nitritos y nitratos: Productos cárnicos curados, en particular el tocino y los quesos.
- Alimentos conservados por ahumado como el pescado y los productos cárnicos. En este caso el humo contiene óxidos de nitrógeno.
- Alimentos secados con gas como la malta para producir cerveza y whisky, leche en polvo con bajo contenido de grasa y sus productos.
- Alimentos enlatados y conservados con sal, en particular de origen vegetal en los que se lleva a cabo una reducción microbiana de nitrato a nitrito.
- Alimentos almacenados en condiciones húmedas que favorezcan la contaminación por hongos, en especial el crecimiento de *Fusarium moniliforme*.
- Migración y formación de nitrosaminas por contacto con materiales como chupones de hule y empaques plásticos.

Definitivamente, los niveles de exposición a este tipo de compuestos depende de las modificaciones en las técnicas de conservación de dichos alimentos lo cual depende de las normas que se estipulen en cada país. En países en desarrollo como China, la presencia de nitrosaminas en la dieta es considerablemente mayor así como el nivel de exposición debido a que la reglamentación permite niveles superiores de nitritos en alimentos en comparación con otros países <sup>(44, 45, 46, 47)</sup>.

**CUADRO 3. CONTENIDO DE DIMETILNITROSAMINA  
O DIETILNITROSAMINA EN ALIMENTOS.**

| ALIMENTO            | DIMETILNITROSAMINA O DIETILNITROSAMINA<br>( $\mu\text{g} / \text{Kg}$ ) |
|---------------------|---|
| PRODUCTOS CARNICOS  |   |
| CURADOS             | 1.0-5.0   |
| TOCINO FRITO        | <23   |
| PESCADO SECO        | 3.0-39.0  |
| PRODUCTOS LACTEOS   | 1-6   |
| VEGETALES ENLATADOS |   |
| O FERMENTADOS       | <5.0  |
| CERVEZA             | 0.5   |
| BEBIDAS ALCOHOLICAS | <2.0  |

ADAPTADO DE: TRICKER Y PREUSSMANN (1991)

#### 4. TOXICIDAD DE NITROSAMINAS

Cerca de 300 compuestos N-nitroso han mostrado ser carcinogénicos en más de 40 especies animales incluyendo primates superiores <sup>(48)</sup>. La carcinogenicidad de diferentes nitrosaminas ha sido comprobada por varios estudios. La dimetilnitrosamina y la dietilnitrosamina son dos de los más potentes carcinógenos de este grupo. Ambos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en alimentos, en bebidas alcohólicas y en el humo de cigarro. Sus principales sitios de acción son <sup>(41)</sup>.

- ◆ Dimetilnitrosamina: hígado, riñón, pulmones y cavidades nasales.
- ◆ Dietilnitrosamina: hígado, riñón, pulmón, cavidades nasales, esófago, estómago, laringe, tráquea y bronquios.

#### 5. MECANISMOS DE CARCINOGENESIS

Las nitrosaminas son estables bajo condiciones fisiológicas y, como otros grupos de carcinógenos químicos, requieren activación metabólica para efectuar su acción tóxica. El proceso de activación está mediado por sistemas enzimáticos del tipo P-450 que involucran, al menos en algunos casos, la hidroxilación del carbono adyacente al grupo N-nitroso para producir una  $\alpha$ -hidroxinitrosamina <sup>(1, 41)</sup> (Figura 5). La oxidación inicial o hidroxilación produce intermediarios inestables. En forma espontánea se elimina un aldehído por ruptura del enlace C-N y se produce un compuesto alquildiazohidróxido. Finalmente se forma un ión alquildiazonio electrofílico el cual es el carcinógeno final y tiene la capacidad de reaccionar con sitios nucleofílicos de diversos constituyentes celulares. En el caso de las nitrosaminas superiores homólogas, se ha demostrado la  $\beta$ -oxidación de las cadenas laterales.

La alquilación del ADN se considera como el blanco celular crítico en la iniciación de procesos carcinogénicos. Las proporciones relativas de alquilación en los átomos de N y O tanto de las bases púricas como pirimídicas dependen del

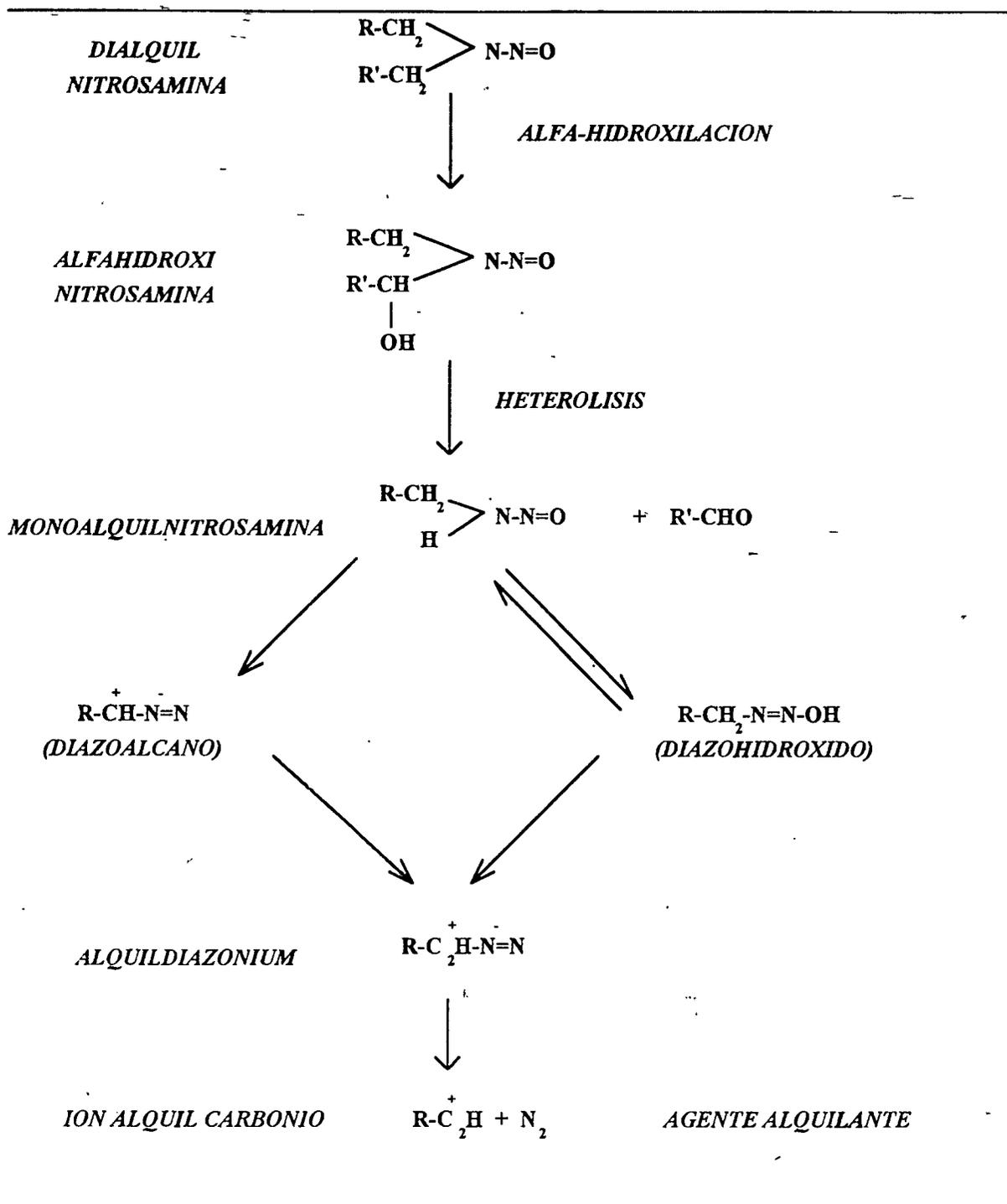


FIGURA 5. MECANISMO DE ACTIVACION DE DIALQUILNITROSAMINAS.  
FORMACION DEL AGENTE ALQUILANTE.

agente alquilante y de la especificidad de la activación P-450 en diferentes tejidos. Los resultados de diversos estudios *in vitro* sugieren que los compuestos N-nitroso exhiben su actividad biológica en forma similar en tejidos humanos y animales. Otros estudios muestran que en cultivo de tejidos humanos explantados (bronquios, esófago, vejiga, colón y páncreas) son capaces de metabolizar dialquilnitrosaminas (simétricas simples) como nitrosodimetilamina y nitrosodietilamina, pero no todos los tejidos son capaces de metabolizar dialquilnitrosaminas cíclicas y asimétricas <sup>(1, 49)</sup>. El ión alquil carbonio es el responsable de la alquilación de ácidos nucleicos, sin embargo no todas las modificaciones de bases son biológicamente importantes. La alquilación en la posición 7 de la guanina, la base más comúnmente modificada del ADN por dialquilnitrosaminas, no muestra correlación con la actividad carcinogénica. Una posición significativa de productos alquilados del ADN son representados tanto por la hidrólisis o apurinación o apirimidación enzimática. De mayor interés y probablemente más relevante en cuanto a los mecanismos de carcinogénesis es la metilación en la posición O(6) de la guanina. La formación y persistencia de residuos de O<sup>6</sup>-alquilguanina y O<sup>4</sup>-alquiltimina son considerados importantes en la incorporación de bases no complementarias durante la síntesis de polirribonucleótidos y polidesoxirribonucleótidos <sup>(49)</sup>.

Una característica importante de las nitrosaminas es que son particularmente efectivas cuando la exposición es por vía oral, en dosis pequeñas y por largos períodos de tiempo. Esto es particularmente relevante en seres humanos. Estos compuestos son sistemáticamente organotrópicos e inducen tumores en tejidos blanco independientemente de la ruta de administración; todos los órganos son susceptibles a la acción carcinogénica de estos compuestos. La organotropía carcinogénica de las nitrosaminas puede deberse a una combinación de diferentes capacidades de activación de las subclases de enzimas en diferentes tejidos y la capacidad de reparación de O<sup>6</sup>-alquilguanina y O<sup>4</sup>-alquiltimina en diferentes órganos o en diferentes tipos celulares en el mismo órgano <sup>(50)</sup>.

## 6. HEPATOTOXICIDAD DE NITROSAMINAS

El concepto de daño celular debe ser entendido en términos de eventos biológicos que cambian la función o la estructura de los componentes celulares, se define como un estado de función celular patológicamente alterado. Las células en condiciones fisiológicas normales se encuentran en homeostasis, cuando se exponen a un estímulo dañino, las células invierten energía metabólica para mantener el proceso de homeostasis. Si el estímulo es lo suficientemente severo o prolongado, la capacidad celular para adaptarse se verá excedida y sobrevienen alteraciones funcionales, se dice entonces que ha sufrido daño. Si el daño es subletal, la célula sobrevive aunque su funcionamiento sea anormal. El daño subletal crónico o una alteración de los factores ambientales pueden inducir a la célula a permanecer estable, pero estos daños también pueden continuar y deteriorar los mecanismos funcionales y estructurales a tal punto que la célula no se podrá recuperar jamás. A este punto se le ha llamado "el punto de no retorno" y no se ha definido con precisión ni estructural ni funcionalmente, sin embargo es posible definirlo empíricamente. Es importante definir las alteraciones estructurales y funcionales que tienen lugar en o cerca de dicho punto. Estas alteraciones parecen ser importantes para determinar la muerte celular <sup>(51)</sup>.

El hígado es el principal sitio de biotransformación de las nitrosaminas. Recibe el 25% del flujo cardíaco y tiene la función principal de recibir y procesar los compuestos químicos absorbidos por el tracto gastrointestinal. La mayoría de las enzimas de la Fase I se localizan en el retículo endoplásmico, donde se metabolizan los xenobióticos lipofílicos. No es un proceso de detoxificación sino un mecanismo de convertir a los compuestos liposolubles poco excretables en compuestos más hidrosolubles fácilmente excretables. Esto ocasiona que en muchos casos los compuestos electrofílicos resultantes sean altamente reactivos con los constituyentes celulares básicos: proteínas, ARN y ADN. Estas interacciones pueden alterar el funcionamiento celular normal y ocasionar toxicidad y carcinogenicidad. Debido a que el hígado es el principal órgano en la biotransformación, puede ser el principal blanco de electrófilos tóxicos o carcinogénicos generados en la biotransformación de xenobióticos <sup>(51)</sup>.

Cuantitativamente, el 90% de las reacciones de oxidación de xenobióticos de la fase I es catalizada por el sistema enzimático de monooxigenasas del citocromo P-450. El 10% restante de las reacciones se lleva a cabo por el sistema flavin-monooxigenasa y las hidroxilasas de molibdeno. Las nitrosaminas son bioactivadas mediante el sistema P-450, la isoforma de la enzima depende del tipo de nitrosamina. Las reacciones principales son una hidroxilación al carbón  $\alpha$  y una N-dealquilación para formar el electrófilo final el cual es un ión alquildiazonio. La fase II de la biotransformación tiene como función principal la de regular la excreción de compuestos endógenos vía la formación de compuestos más hidrosolubles. Las reacciones más importantes son la glucuronidación, la sulfatación, la conjugación con glutatión y la acetilación <sup>(51)</sup>.

El glutatión es un tripéptido de glicina, glutamina y cisteína. El mecanismo de acción involucra un ataque nucleofílico del átomo sulfhidrilo del glutatión al átomo electrofílico. Esto resulta en la formación de un enlace tioeter entre el xenobiótico y el glutatión. Los sustratos principales son cualquier xenobiótico con un carbón, nitrógeno, azufre u oxígeno electrofílico. Los compuestos altamente polares son sustratos pobres para la glutatión transferasa que es la enzima encargada de catalizar la reacción. Su principal función es la de evitar la peroxidación de lípidos <sup>(51)</sup>.

Existen evidencias de que la dimetilnitrosamina provoca necrosis centrizonal y esteatosis en el hígado. La esteatosis se define como alteraciones del metabolismo de lípidos. La necrosis se asocia no solo a daño en el citoplasma, sino también a cambios a nivel molecular. Un daño continuo puede provocar daño hepático crónico asociado con fibrosis, y si se prolonga, puede desencadenar un proceso cirrótico <sup>(51)</sup>.

La dimetilnitrosamina (DMN) y la dietilnitrosamina (DEN) son compuestos alquilantes, carcinogénicos y esteatogénicos potentes en el hígado, sin embargo no provocan lipoperoxidación. Son potentes hepatotóxicos *in vivo*, sin embargo no provocan muerte celular en hepatocitos aislados; posiblemente debido a que los niveles de P-450 en los hepatocitos aislados se ven disminuidos <sup>(3)</sup>. Además, se ha observado que dichas nitrosaminas se metabolizan preferentemente por una o varias formas diferentes a la P-450 2E1 en presencia de NADPH y oxígeno <sup>(49)</sup>.

El metabolismo de DEN produce acetaldehído, etanol, etileno, nitrito y etilamina. Los dos últimos compuestos se consideran como parte de un proceso de destoxificación <sup>(51)</sup>.

Se ha observado que la DEN produce tumores hepatocelulares en un lapso de tiempo de 5 semanas al administrarse en el agua de uso a ratas en dosis de 0.5 mg / 100 ml <sup>(52)</sup>, así como con dosis diarias de 1, 2 y 3 mg / kg. de peso corporal / día <sup>(53)</sup>

#### IV- JUSTIFICACION

Debido a que las interacciones entre compuestos provenientes de los alimentos tienen efectos a nivel nutricional, metabólico y toxicológico, beneficiando o perjudicando al organismo es muy importante conocer a los compuestos capaces de interactuar entre sí, su mecanismo de acción y el impacto de dicha interacción a nivel biológico. Se requieren datos científicos que permitan conocer a fondo la complejidad de los efectos de la dieta en el ser humano y aumentar la eficiencia en el aprovechamiento de los alimentos, así como disminuir significativamente el daño provocado por diferentes tóxicos.

Actualmente, el conocimiento de la interacción a nivel nutricional entre compuestos de los alimentos ha sido utilizada con fines prácticos, por ejemplo el uso de la vitamina C para aumentar la absorción de hierro. Sin embargo, no existe suficiente información científica que permita comprender el papel de ciertos nutrimentos en el metabolismo de sustancias tóxicas generadas o presentes en los alimentos, tal es el caso de la interacción molecular a nivel toxicológico entre los carotenoides y las nitrosaminas durante el metabolismo hepático.

Como se ha indicado anteriormente, es claro que el hombre está expuesto a las nitrosaminas de manera inevitable, considerando que también se forman endógenamente. El papel de las nitrosaminas en el proceso de la transformación neoplásica es relevante ya que son agentes iniciadores. Por su vía de administración y por la alta actividad metabólica del hígado, este órgano es blanco para la acción tóxica de algunas nitrosaminas, incluyendo la dietilnitrosamina. Sin embargo, el hígado también es reservorio de carotenoides por lo que en un sistema real estas dos familias de compuestos se encuentran en contacto dentro de la célula. Es muy importante conocer el tipo de interacción que se lleva a cabo entre estos compuestos, así como el nivel al que se realiza (celular o molecular) y de esta manera determinar las consecuencias a nivel toxicológico.

Este trabajo pretende contribuir, con información original en el campo de la toxicología de alimentos, con datos científicos acerca de la capacidad de los carotenoides para proteger contra el daño provocado por la dietilnitrosamina a nivel celular y molecular en un sistema *in vitro* de células hepáticas de mamífero y de esta

formā determinar si la acción de los carotenoides contribuye a disminuir el efecto tóxico de las nitrosaminas como agentes iniciadores del proceso carcinogénico. Con estos datos se podría aportar información valiosa acerca de las alternativas para disminuir el potencial tóxico de las nitrosaminas presentes en el medio ambiente y en los alimentos, posiblemente mediante el mejor aprovechamiento de nutrimentos naturales con capacidades protectoras como es el caso de los carotenoides.

## V- HIPOTESIS

Los carotenoides presentes en el chile chilaca así como sus componentes carotenoides puros son capaces de disminuir el daño citotóxico y genotóxico provocado por dietilnitrosamina en cultivo primario de hepatocitos.

## **VI. OBJETIVOS**

### **A. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la citotoxicidad y la genotoxicidad de dietilnitrosamina (DEN) en cultivo primario de hepatocitos y estudiar el efecto de algunos componentes de la dieta en la inhibición del daño.

### **B. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar los parámetros citotóxicos causados por la dietilnitrosamina, el extracto de carotenoides de chile así como de sus principales componentes puros.
- Evaluar el efecto de los carotenoides sobre el daño citotóxico de DEN.
- Determinar los parámetros genotóxicos de DEN y de los carotenoides.
- Evaluar el efecto de los carotenoides sobre el daño genotóxico provocado por DEN.

## VII- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El experimento completo se realizó en nueve etapas las cuales se describen a continuación:

### **ETAPA 1: EXTRACCION, CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE CAROTENOIDES DEL CHILE CHILACA (*Capsicum spp.*).**

Los objetivos en esta etapa fueron los de obtener un extracto de carotenoides caracterizado y cuantificado para utilizarlo en los estudios de quimioprotección.

### **ETAPA 2: DETERMINACION DE LA $CL_{50}$ DE DIETILNITROSAMINA EN SUSPENSION DE HEPATOCITOS.**

Se realizó un estudio preliminar en suspensión de hepatocitos para encontrar la  $CL_{50}$ . En primer lugar se determinó el número óptimo de células para realizar este estudio mediante el método de MTT. El número de células adecuado fue de 20,000 células viables por pozo. Las concentraciones de dietilnitrosamina probadas fueron: 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 10 mM y 50 mM. Los tiempos de exposición fueron 2, 4, 6, 8 y 10 horas.

### **ETAPA 3: DETERMINACION DEL TIEMPO NECESARIO DE EXPOSICION EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS.**

Al obtenerse la  $CL_{50}$  en suspensión de hepatocitos, se estandarizó el método en cultivo para determinar el tiempo óptimo de exposición. Se realizó el experimento a 6, 8, 10 y 12 horas.

### **ETAPA 4: DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES INOCUAS DE TRANS- $\beta$ -CAROTENO Y LUTEINA ASI COMO DE LOS SOLVENTES UTILIZADOS COMO VEHICULOS.**

Las concentraciones utilizadas en cada caso fueron:

Trans- $\beta$ -caroteno: 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M.

Luteína: 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M.

**ETAPA 5 :** DETERMINACION DEL EFECTO DE LOS CAROTENOIDES AL INCUBAR SIMULTANEAMENTE CON LA DIETILNITROSAMINA.

**ETAPA 6:** DETERMINACION DEL EFECTO DE LOS CAROTENOIDES AL PREINCUBAR UNA HORA CON EL CAROTENOIDE Y POSTERIORMENTE CON LA NITROSAMINA.

**ETAPA 7:** ELABORACION DE UNA CURVA DOSIS-RESPUESTA DE DIETILNITROSAMINA TOMANDO COMO RESPUESTA EL DAÑO GENOTOXICO.

Se encontraron tanto las concentraciones de dietilnitrosamina óptimas para causar daño genotóxico así como el tiempo de exposición requerido. Las concentraciones de dietilnitrosamina probadas fueron: 50 mM, 10 mM, 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 2.5  $\mu$ M.. Los tiempos probados fueron: 2, 4, y 6 horas.

**ETAPA 8:** DETERMINACION DE LA INOCUIDAD DE LOS CAROTENOIDES .

Se determinó la inocuidad de cada carotenoide para el estudio a nivel genético con las concentraciones utilizadas en el estudio citotóxico.

**ETAPA 9:** EVALUACION DEL EFECTO QUIMIOPROTECTOR DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO GENOTOXICO DE DIETILNITROSAMINA 5 Y 2.5  $\mu$ M.

## VIII-PROTOCOLO DE TRATAMIENTOS.

### 1. ESTUDIO CITOTOXICO

#### ESTRATEGIA 1: ADMINISTRACION SIMULTANEA.

TRATAMIENTO 1: CONTROL

TRATAMIENTO 2: DEN 50 mM

TRATAMIENTO 3:  $\beta$ -CAROTENO 50  $\mu$ M

TRATAMIENTO 4: LUTEINA 1 $\mu$ M

TRATAMIENTO 5: EXTRACTO 1 $\mu$ M eq. LUTEINA

TRATAMIENTO 6: THF 0.5%

TRATAMIENTO 7: DMSO 0.35%

TRATAMIENTO 8: DMSO 0.57%

TRATAMIENTO 9: DEN 50 mM +  $\beta$ -CAROTENO 50  $\mu$ M

TRATAMIENTO 10: DEN 50 mM + LUTEINA 1 $\mu$ M

TRATAMIENTO 11: DEN 50 mM + EXTRACTO 1 $\mu$ M eq. LUTEINA

TRATAMIENTO 12: DEN 50 mM + THF 0.5%

TRATAMIENTO 13: DEN 50 mM + DMSO 0.35%

TRATAMIENTO 14: DEN 50 mM + DMSO 0.57%

#### ESTRATEGIA 2: PREINCUBACION CON EL CAROTENOIDE.

TRATAMIENTO 1: CONTROL

TRATAMIENTO 2: DEN 50 mM

TRATAMIENTO 3:  $\beta$ -CAROTENO 50  $\mu$ M

TRATAMIENTO 4: LUTEINA 1 $\mu$ M

TRATAMIENTO 5: EXTRACTO 1 $\mu$ M eq. LUTEINA

TRATAMIENTO 6: THF 0.5%

TRATAMIENTO 7: DMSO 0.35%

TRATAMIENTO 8: DMSO 0.57%

TRATAMIENTO 9:  $\beta$ -CAROTENO 50  $\mu$ M (1 HORA) - LAVADO - DEN 50 mM

TRATAMIENTO 10: LUTEINA 1 $\mu$ M (1 HORA) - LAVADO - DEN 50 mM

TRATAMIENTO 11: EXTRACTO 1 $\mu$ M eq. LUT. (1 HORA) - LAVADO - DEN 50 mM

TRATAMIENTO 12: THF 0.5% (1 HORA) - LAVADO - DEN 50 mM

TRATAMIENTO 13: DMSO 0.35% (1 HORA) - LAVADO - DEN 50 mM

TRATAMIENTO 14: DMSO 0.57% (1 HORA) - LAVADO - DEN 50 mM

## 2. ESTUDIO GENOTOXICO

ESTUDIO CON DEN 5  $\mu$ M:

TRATAMIENTO 1: CONTROL

TRATAMIENTO 2: DEN 5  $\mu$ M

TRATAMIENTO 3:  $\beta$ -CAROTENO 50  $\mu$ M

TRATAMIENTO 4: LUTEINA 1 $\mu$ M

TRATAMIENTO 5: EXTRACTO 1 $\mu$ M eq. LUTEINA

TRATAMIENTO 6: THF 0.5%

TRATAMIENTO 7: DMSO 0.35%

TRATAMIENTO 8: DMSO 0.57%

TRATAMIENTO 9:  $\beta$ -CAROTENO 50  $\mu$ M (1 HORA) - LAVADO - DEN 5  $\mu$ M

TRATAMIENTO 10: LUTEINA 1 $\mu$ M (1 HORA) - LAVADO - DEN 5  $\mu$ M

TRATAMIENTO 11: EXTRACTO 1 $\mu$ M eq. LUT. (1 HORA) - LAVADO - DEN 5  $\mu$ M

TRATAMIENTO 12: THF 0.5% (1 HORA) - LAVADO - DEN 5  $\mu$ M

TRATAMIENTO 13: DMSO 0.35% (1 HORA) - LAVADO - DEN 5  $\mu$ M

TRATAMIENTO 14: DMSO 0.57% (1 HORA) - LAVADO - DEN 5  $\mu$ M

ESTUDIO CON DEN 2.5  $\mu$ M:

TRATAMIENTO 1: CONTROL

TRATAMIENTO 2: DEN 2.5  $\mu$ M

TRATAMIENTO 3:  $\beta$ -CAROTENO 50  $\mu$ M

TRATAMIENTO 4: LUTEINA 1 $\mu$ M

TRATAMIENTO 5: EXTRACTO 1 $\mu$ M eq. LUTEINA

TRATAMIENTO 6: THF 0.5%

TRATAMIENTO 7: DMSO 0.35%

TRATAMIENTO 8: DMSO 0.57%

TRATAMIENTO 9:  $\beta$ -CAROTENO 50  $\mu$ M (1 HORA) - LAVADO - DEN 2.5  $\mu$ M

TRATAMIENTO 10: LUTEINA  $1\mu\text{M}$  (1 HORA) - LAVADO - DEN  $2.5\mu\text{M}$

TRATAMIENTO 11: EXTRACTO  $1\mu\text{M}$  eq. LUT. (1 HORA) - LAVADO - DEN  $2.5\mu\text{M}$

TRATAMIENTO 12: THF 0.5% (1 HORA) - LAVADO - DEN  $2.5\mu\text{M}$

TRATAMIENTO 13: DMSO 0.35% (1 HORA) - LAVADO - DEN  $2.5\mu\text{M}$

TRATAMIENTO 14: DMSO 0.57% (1 HORA) - LAVADO - DEN  $2.5\mu\text{M}$

## IX- MATERIALES Y METODOS

### A. MATERIALES:

#### 1. QUIMICOS.

a. **CAROTENOIDES:** Se utilizó un extracto de carotenoides obtenido de chile chilaca (*Capsicum spp.*) el cual fue cosechado el 8 de diciembre de 1994 en Michoacán, liofilizado el 15 de diciembre de 1994, pulverizado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y protegido de la luz. La luteína utilizada fue purificada de un extracto de xantofilas de flor de cempasúchil llamado Cromophyll ORO 20 donado por la compañía de pigmentos naturales Bioquimex. Trans- $\beta$ -caroteno (95% pureza) fue comprado en Sigma Chemical.

Para la solución madre de  $\beta$ -caroteno se utilizó como vehículo tetrahidrofurano grado HPLC 99.99% pureza (OmniSolv) y para la luteína y el extracto de carotenoides de chile se utilizó DMSO 99.9% pureza (Mallinckrodt).

b. **REACTIVOS:** La colagenasa (tipo IV) utilizada para la perfusión, la dietilnitrosamina (DEN) así como todos los reactivos utilizados para el cultivo de las células fueron adquiridos en Sigma Chemical. El medio de cultivo utilizado fue el medio Eagle modificado por Dulbecco (Sigma D-6780) adicionado con 15 UI de insulina y 200  $\mu\text{l}$  de penicilina-estreptomicina por cada 100 ml de medio y suero de bovino al 10%. Para el estudio genotóxico se utilizó timidina ( $\text{T}^3\text{H}$ ) (Life Science Amersham TRK61 B342).

2. **BIOLOGICOS:** Se utilizaron ratas Wistar macho de 250-350 g peso, se alimentaron *ad libitum* y se mantuvieron bajo temperatura y humedad controlada. Antes de someterlas a la perfusión se mantuvieron en ayuno por 16 horas.

## B. METODOS.

### 1. EXTRACCION DE LOS CAROTENOIDES DE CHILE CHILACA

(*Capsicum spp.*).

Para la extracción de carotenoides del chile y de la luteína a partir del Cromophyll ORO 20 se utilizó el método oficial de la AOAC (1990) <sup>(54)</sup>, para muestras secas, mediante una saponificación en frío. La muestra fue liofilizada y pulverizada previamente y se mantuvo a -20°C y protegida de la luz (Figura 6).

### 2. CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE LOS CAROTENOIDES DE CHILE CHILACA (*Capsicum spp.*).

El análisis se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en un equipo Perkin Elmer modelo 400 con un detector Perkin Elmer UV/VIS a una longitud de onda de 460 nm y un integrador Perkin Elmer LCI-100. La columna utilizada fue Novapack C-18 y la fase móvil consistió en agua / tetrahidrofurano / acetonitrilo en una relación 2.5 : 20 : 77.5 <sup>(55)</sup>.

Para el análisis de los carotenoides se realizaron curvas patrón de trans-β-caroteno y trans-luteína con los compuestos puros. Se obtuvieron las siguientes ecuaciones lineales:

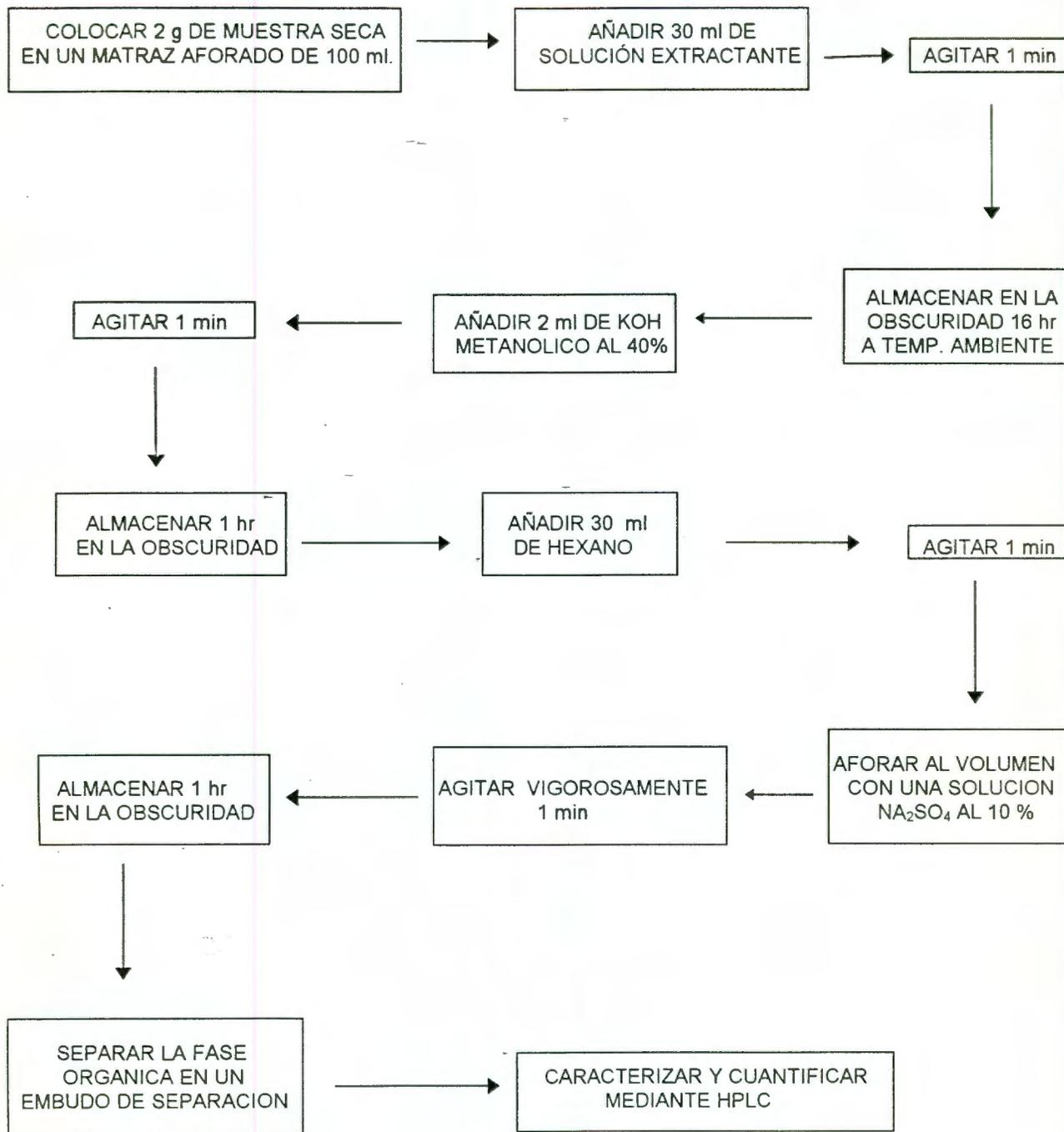
a. Trans-β-caroteno:  $y = 0.000163 + 3.672925 e^{-9} x$ , R = 0.9998

b. Trans-luteína:  $y = -0.00310152 + 2 e^{-8} x$ , R = 0.9969

donde: y = concentración de carotenoide en µg / µl

x = área bajo la curva

Después de caracterizar y cuantificar los carotenoides del extracto, éste fue concentrado en un rotavapor y redisolto en 100 ml de dimetilsulfóxido. Las concentraciones finales fueron determinadas nuevamente mediante el mismo método para su uso en los estudios biológicos. Se mantuvieron protegidos de la luz, a -20°C y bajo atmósfera de N<sub>2</sub> hasta su uso.



**FIGURA 6. METODO DE EXTRACCION DE CAROTENOIDES (AOAC, 1990)**

### 3. OBTENCION Y CULTIVO DE HEPATOCITOS

La obtención de los hepatocitos se realizó mediante el método de perfusión hepática *in situ* con colagenasa <sup>(56)</sup> (Figura 7).--

El principio de éste método es el de provocar la separación de las células mediante la digestión de la colágena que las mantiene unidas. Se utilizan dos soluciones diferentes ya que la primera sirve para lavar las células y eliminar el calcio presente, el cual propicia la unión de las células, y la segunda contiene colagenasa al 0.05% para digerir la matriz de colágena. De esta manera se obtiene una suspensión celular (Figura 8).

La viabilidad celular inicial se determinó según el método de exclusión con azul de tripano. Los cálculos necesarios para obtener los datos del porcentaje de viabilidad celular mediante dicho método son:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = (\text{Número de células vivas} / \text{número total de células}) \times 100$$

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento} &= (\text{Número total de células} / 4) \times 10^4 \times 10 \\ &= \text{Número de células} \times 10^5 / \text{ml.} \end{aligned}$$

donde:  $10^4$  = factor de volumen del hematocitómetro y  $10$  = factor de dilución.

### 4. METODO DE LAS SALES DE TETRAZOLIUM (MTT) PARA DETERMINAR LA VIABILIDAD DE CELULAS EN CULTIVO.

El método utilizado fue el método de Mosmann modificado por Sladowsky (1993) <sup>(57)</sup> para placas de 96 pozos (Figura 9).

Principio de la prueba:

Las células viables son capaces de transformar las sales amarillas de tetrazolium (MTT) a un compuesto insoluble de formazán morado gracias a la acción de oxigenasas mitocondriales. El color formado es directamente proporcional al porcentaje de células viables. Para la determinación se utilizó un lector de ELISA Labsystems Multiscan Multisoft a 540 y 620 nm.

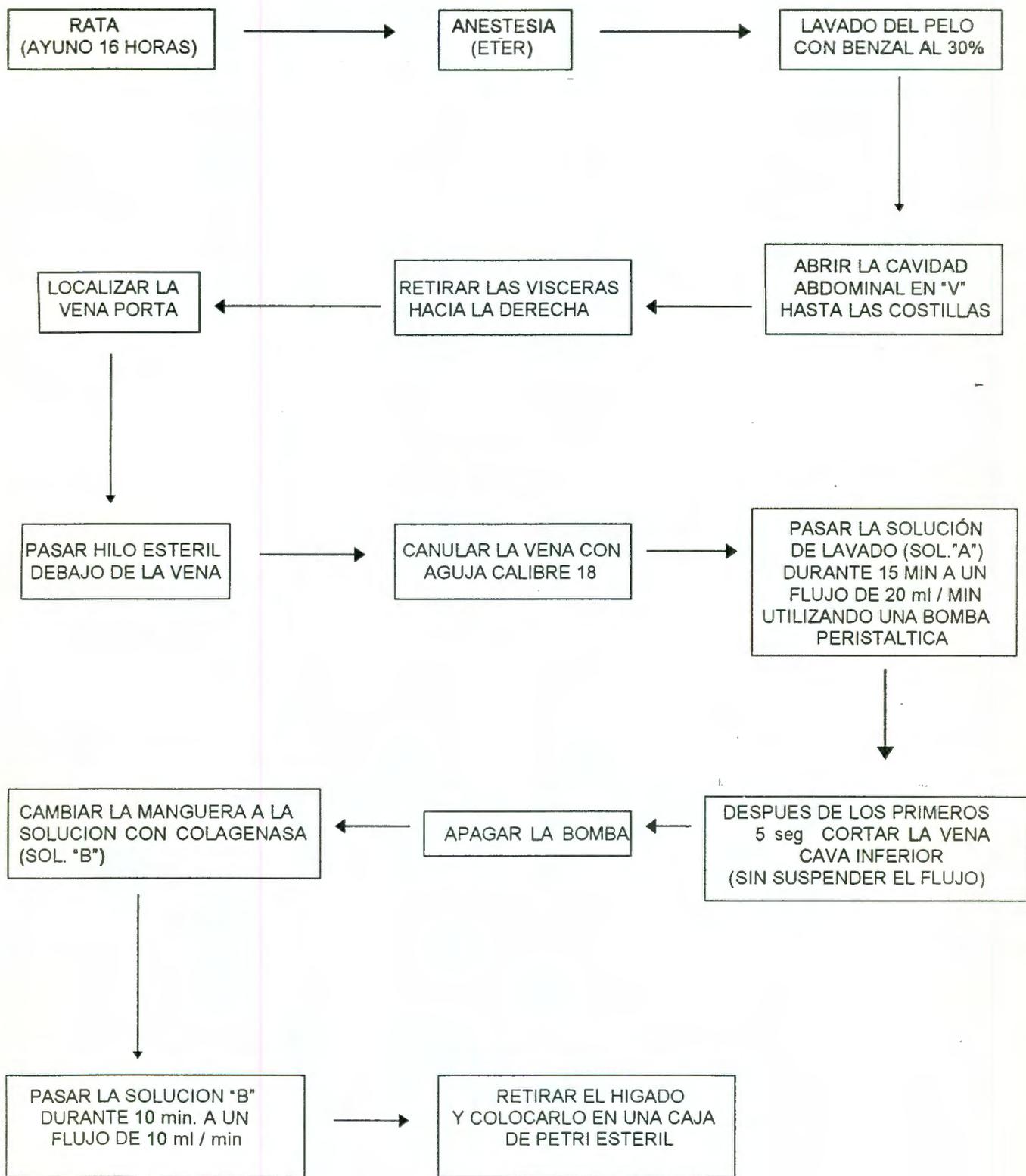
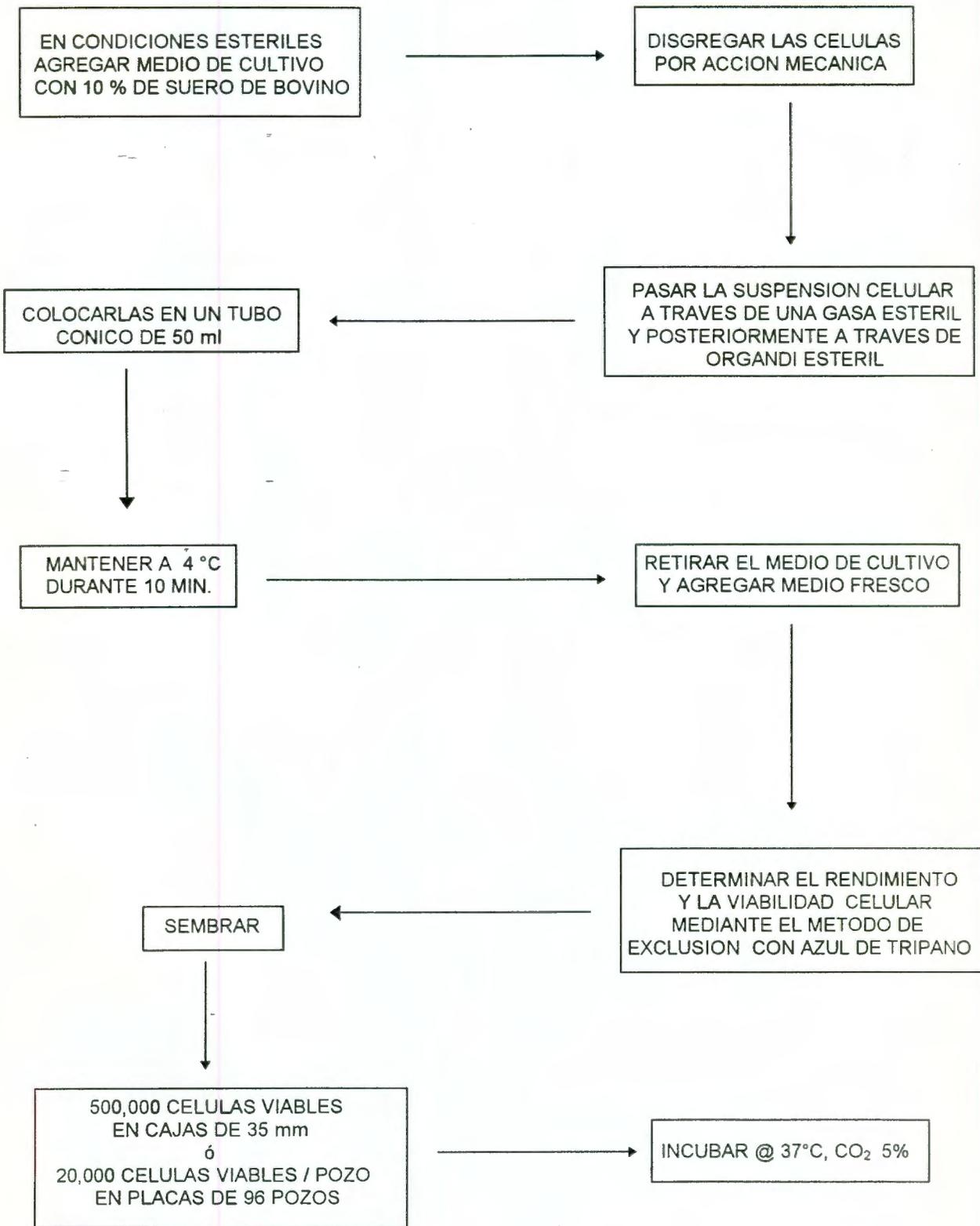


FIGURA 7. METODO DE PERFUSION HEPATICA



**FIGURA 8. OBTENCION DE UNA SUSPENSION CELULAR Y CULTIVO DE HEPATOCITOS**

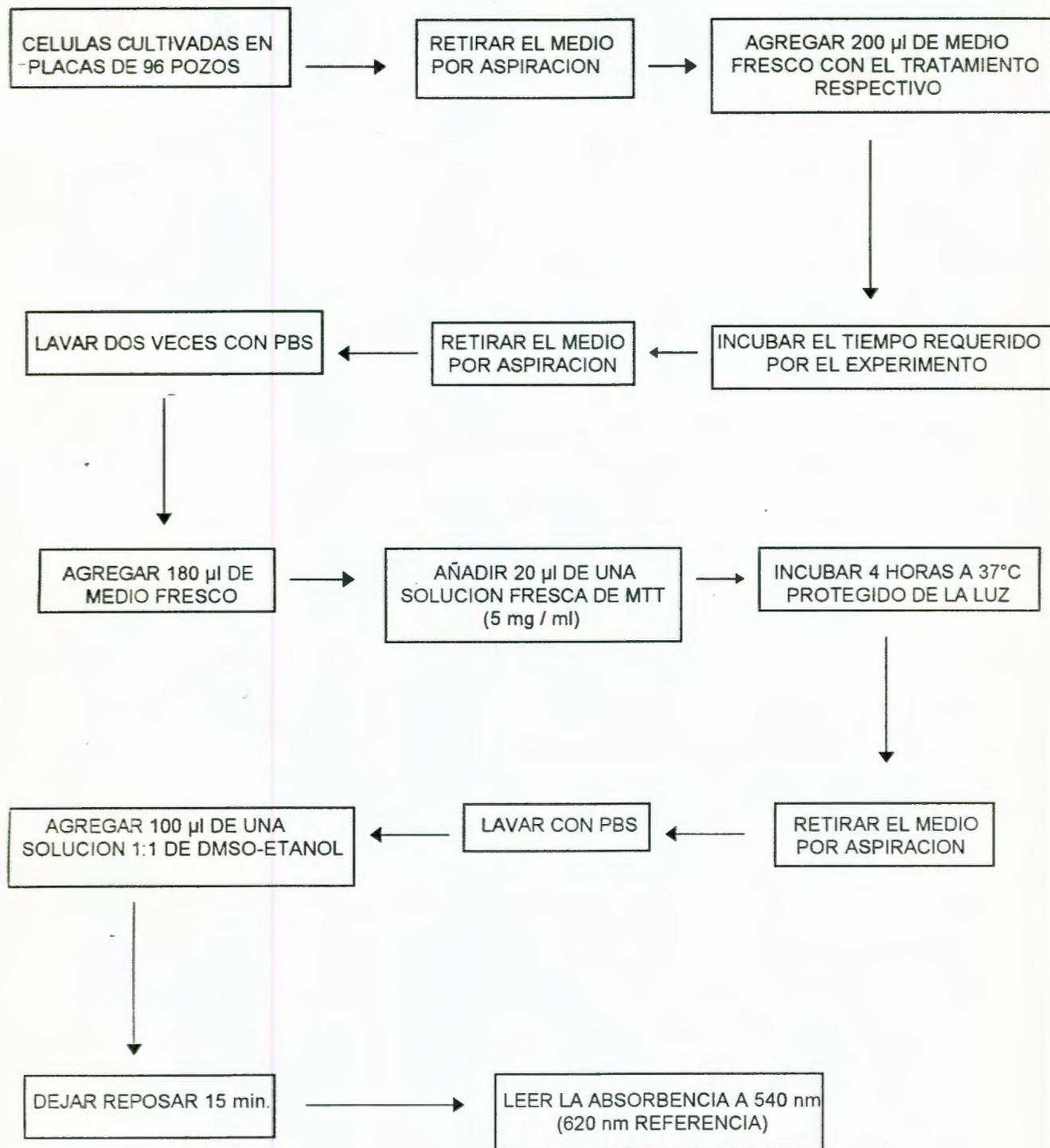


FIGURA 9. METODO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)

Los cálculos necesarios para determinar el porcentaje de viabilidad celular son:

$$\Delta \text{ Abs} = \text{Abs}_{(540)} - \text{Abs}_{(620)}$$

Donde :  $\Delta \text{ Abs}$  = resta de la absorbencia a 540 nm menos la absorbencia a 620 nm para cada muestra.

La  $\Delta \text{ Abs}$  obtenida para el caso de las células control se considera como 100% de viabilidad y el porcentaje de viabilidad para las células expuestas a los diferentes tratamientos se calcula como sigue:

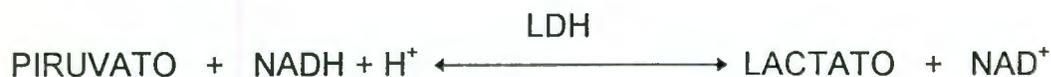
$$\% \text{ Viabilidad} = (\Delta \text{ Abs tratamiento} / \Delta \text{ Abs células control}) \times 100$$

## 5. METODO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR CITOTOXICIDAD.

Los experimentos para el estudio citotóxico se llevaron a cabo mediante el procedimiento descrito en la Figura 10.

## 6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA LACTATO DESHIDROGENASA.

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática. Se utiliza como marcador bioquímico de daño por lisis celular. Al exponer a las células a un compuesto citotóxico se puede provocar la ruptura de la membrana celular y de esta manera se libera la enzima. La actividad de la lactato deshidrogenasa se basa en la siguiente reacción <sup>(58)</sup>:



La velocidad de disminución de NADH se determinó espectrofotométricamente a 365 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2. Para realizar la determinación se utilizó un kit de diagnóstico Merck (nº 15862) (Figura 11) cuyo principio se basa en el método oficial de Schneider y Lenmann <sup>(58)</sup> y está optimada por la Sociedad Alemana para Química Clínica.

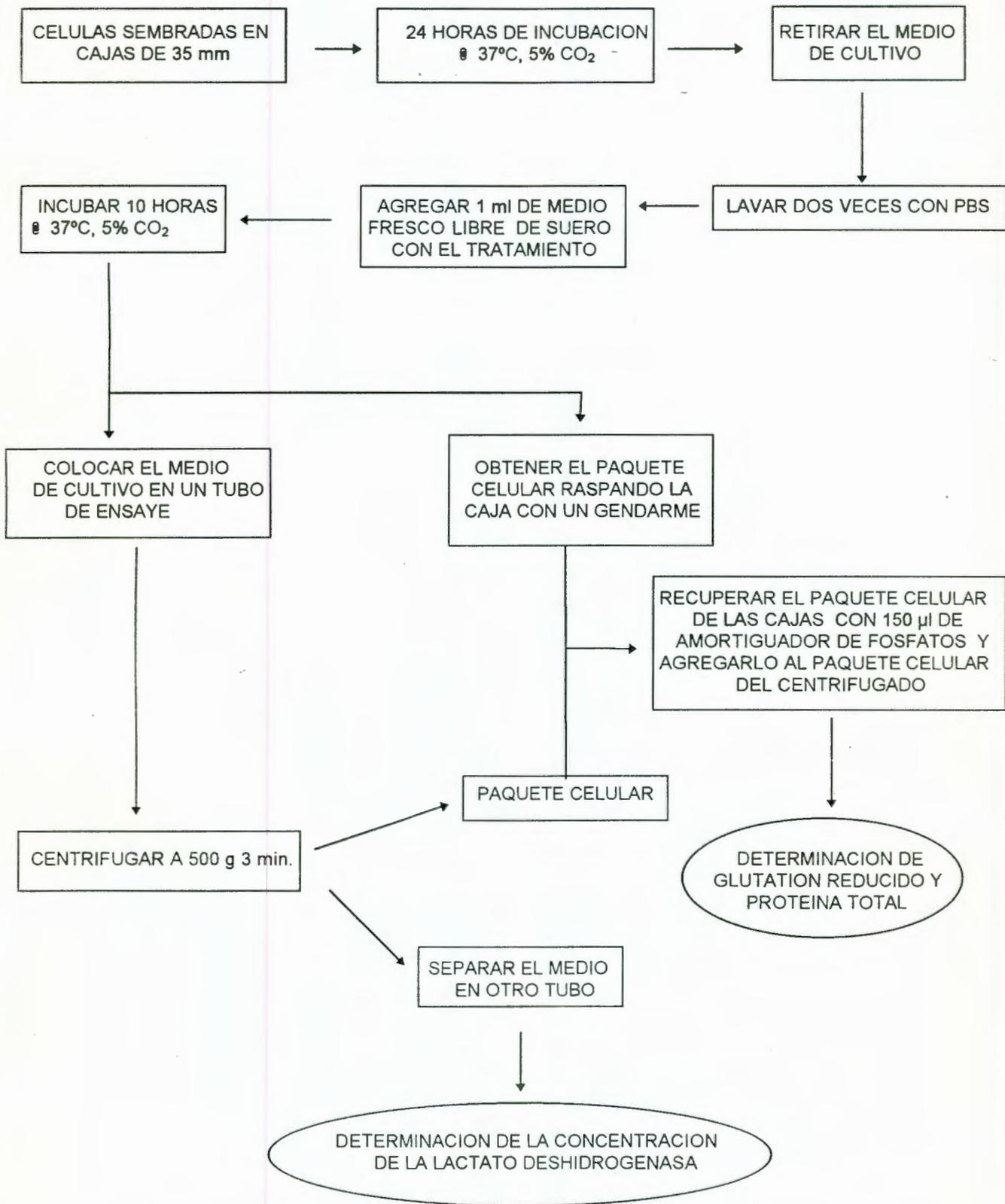
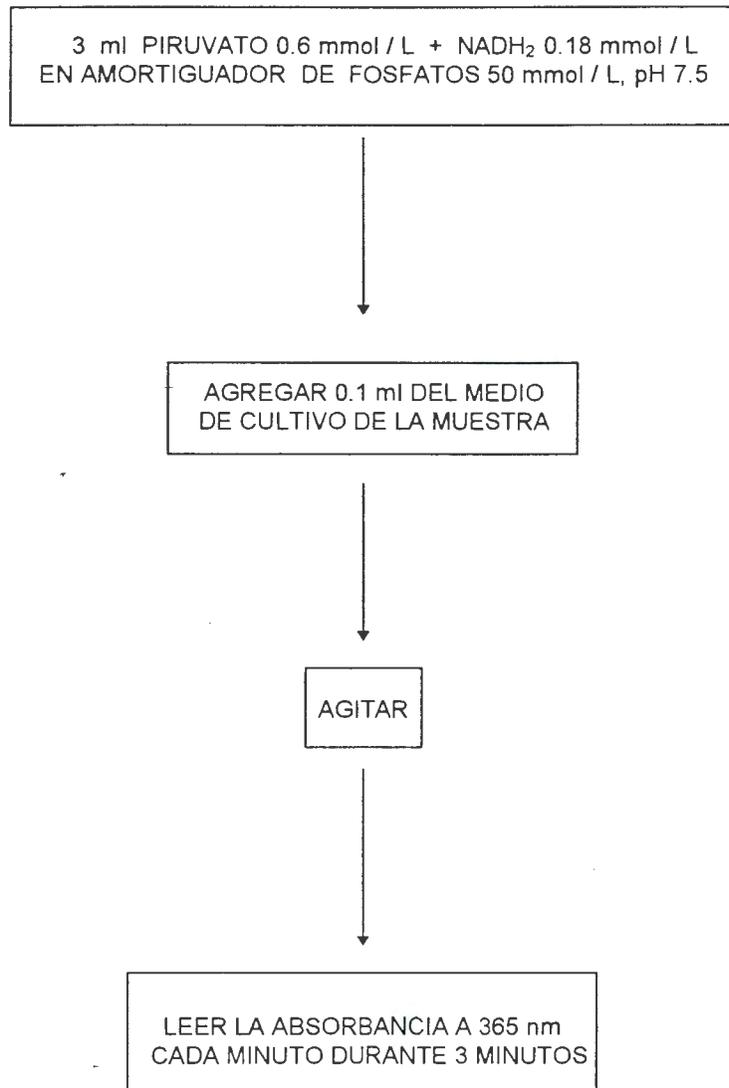


FIGURA 10. METODO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR CITOTOXICIDAD.



**FIGURA 11. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA  
DE LACTATO DESHIDROGENASA**

La actividad de la enzima se calcula de la siguiente manera:

$$\Delta E_{365} / \text{min} = (\text{Abs}_{365} \text{ final} - \text{Abs}_{365} \text{ inicial}) / 2 \text{ min}$$

$$U / L = \Delta E_{365} / \text{min} \times 9118$$

donde: 9118 es la coeficiente de absorbitividad para la LDH obtenido directamente del método utilizado, a 365 nm y a 37 °C, el cual corresponde a U / L (unidades internacionales de LDH por litro).

Nota: Una unidad internacional (U) de enzima es la cantidad de enzima necesaria para transformar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en 1 minuto.

## 7. CUANTIFICACION DE GLUTATION REDUCIDO TOTAL.

La determinación de glutatión reducido total (GSH), se llevó a cabo mediante un método fluorométrico <sup>(59)</sup>. La prueba se basa en el principio de formar un compuesto fluoróforo mediante la unión del GSH y orto-ftaldehído. La determinación se realizó en un fluorómetro Sequoia-Turner mod 450, a 430 nm para fluorescencia y 360 nm para activación (Figura 12).

De la curva patrón se obtuvo la siguiente ecuación lineal:

$$y = 6.7132 x + 3.0426, R = 0.9999$$

donde: y = fluorescencia a 430 nm y activación a 360 nm.

x = concentración  $\mu\text{M}$  de glutatión reducido.

## 8. DETERMINACION DE PROTEINA TOTAL.

El método utilizado fue el descrito por Bradford (1976) <sup>(60)</sup> el cual consiste en formar un complejo proteína-colorante. El color formado fue determinado a 620 nm en un lector de ELISA Labsystems Multiscan Multisoft ya que este método ha sido modificado para realizar la determinación en microplaca (Figuras 13 y 14).

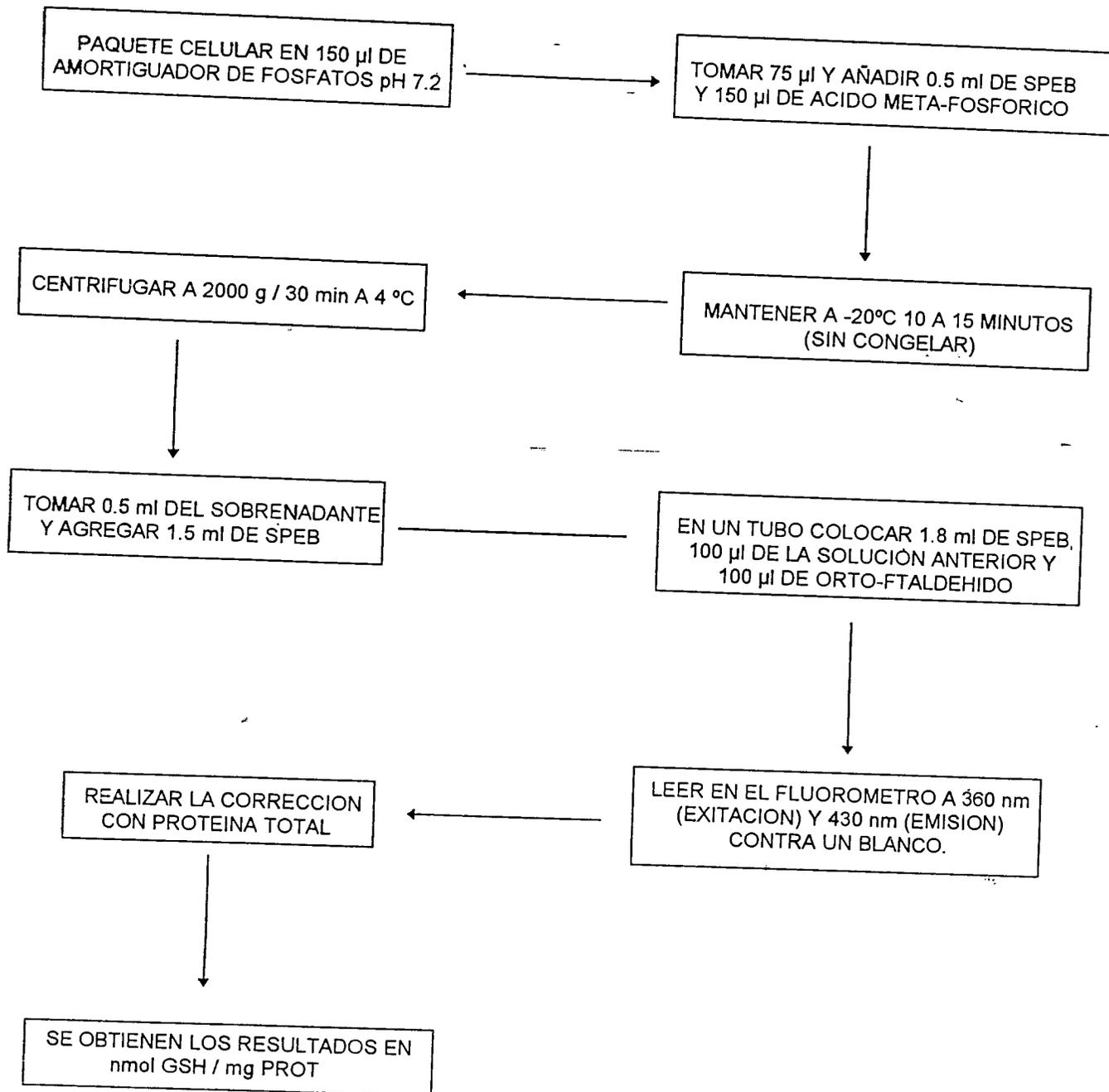
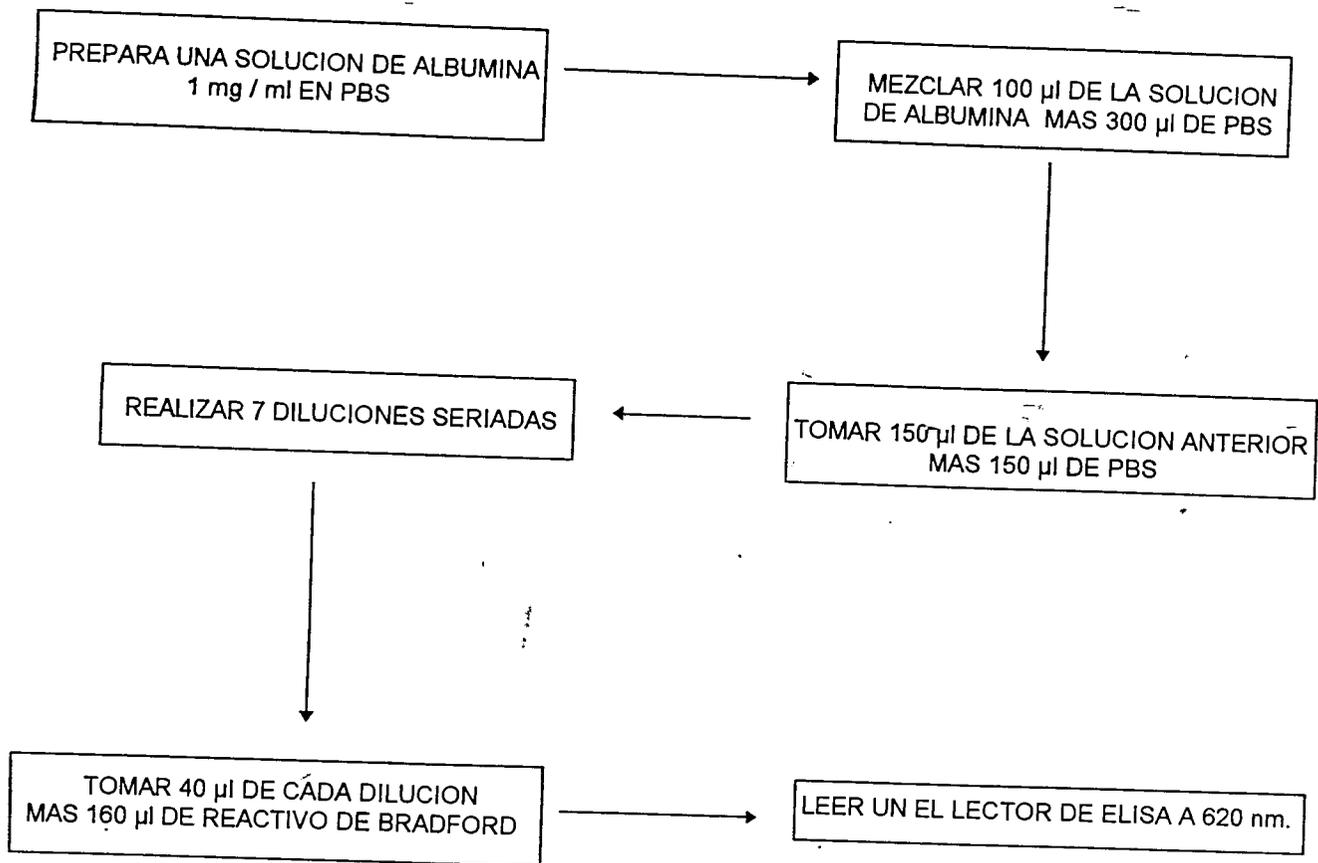


FIGURA 12. CUANTIFICACION DE GSH TOTAL.



Se obtuvo la siguiente ecuación lineal de la recta:

$$y = 4.09531 e^{-3} x - 7.549 e^{-3}$$

Donde: y = absorbencia a 620 nm y x = concentración en µg / ml

**FIGURA 13. CURVA PATRON DE PROTEINA**

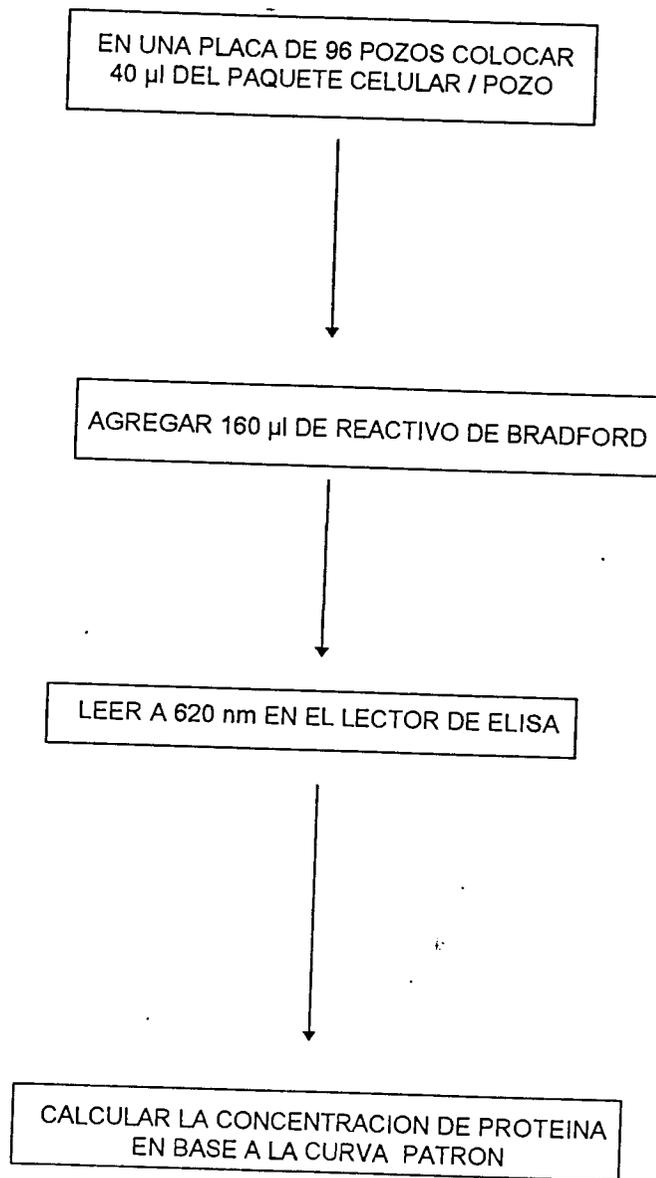


FIGURA 14. DETERMINACION DE PROTEINA TOTAL

## 9. METODO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR GENOTOXICIDAD.

Para realizar el estudio genotóxico se llevó a cabo la estrategia experimental que se muestra en la Figura 15.

## 10. METODO DE SINTESIS NO PROGRAMADA DE ADN.

El daño genotóxico se determinó mediante el método de síntesis no programada de ADN <sup>(61, 62)</sup>, cuantificando la reincorporación de timidina tritiada ( $T^3H$ ) al ADN. Este método se basa en el principio de que un compuesto genotóxico provoca daños en el material genético y estos daños son reparados reincorporando timidina. La reincorporación de esta base es directamente proporcional al daño causado y para la cuantificación se utilizó un contador de centelleo Beckman LS 6000 SC obteniendo los datos en desintegraciones por minuto (Figura 16).

## 11. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS:

Para los estudios *in vitro* se utilizó un sistema de bloqueos por tratamiento y por animal mediante la prueba de rango múltiple de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  empleando el paquete estadístico Statgraphics.

Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado y se realizaron por lo menos dos experimentos independientes en cada caso.

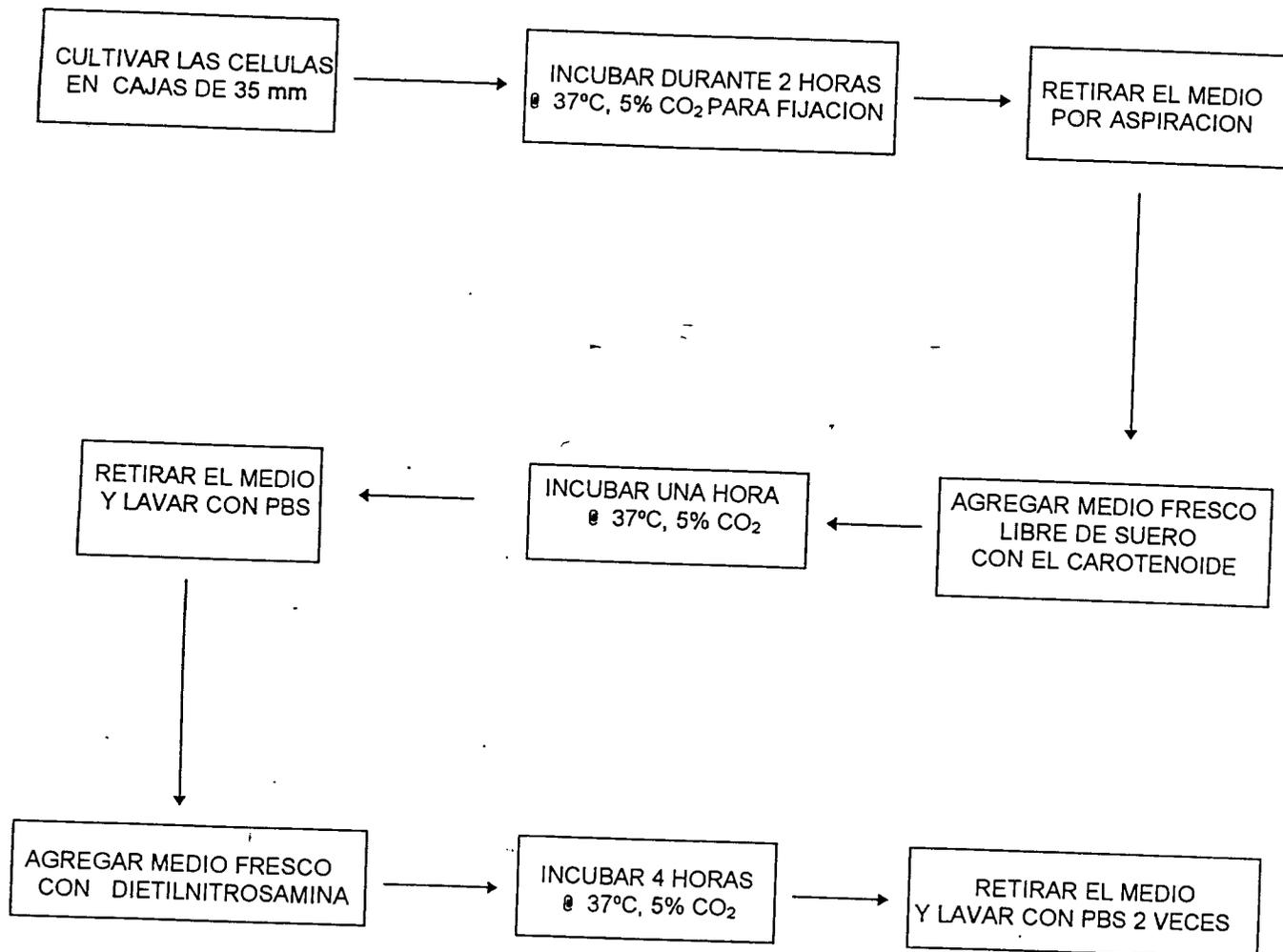


FIGURA 15. METODO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR GENOTOXICIDAD.

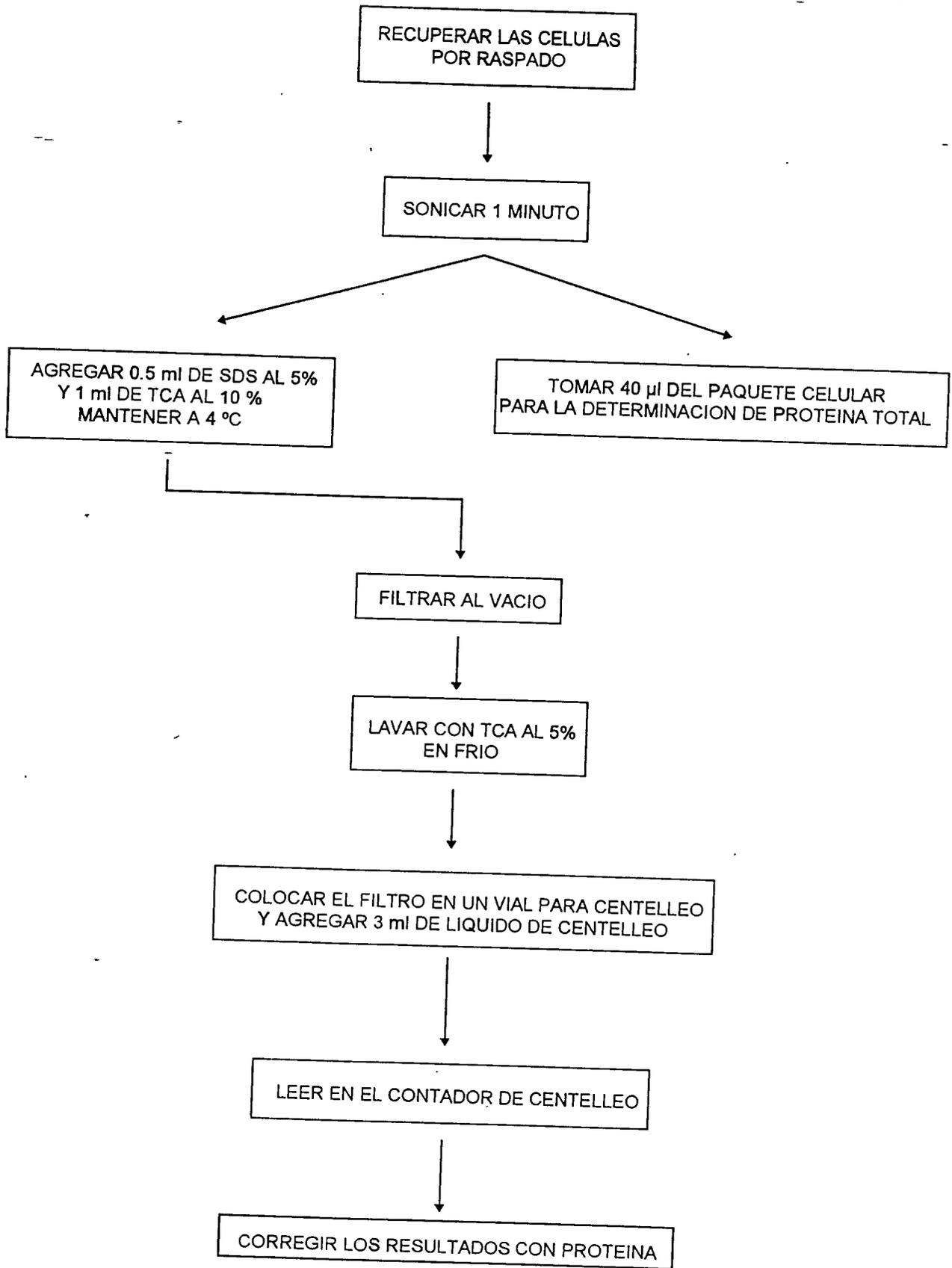


FIGURA 16. METODO DE SINTESIS NO PROGRAMADA DE ADN

## X-RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE CAROTENOIDES:

En la Figura 17 se muestra el perfil cromatográfico del extracto de carotenoides de chile chilaca verde (*Capsicum spp.*). El pico "a" corresponde a una xantofila no caracterizada en este estudio pero muy probablemente se trate de neoxantina o violaxantina <sup>(63)</sup>. El pico "b" corresponde a trans-luteína y el pico "c" corresponde a trans-β-caroteno. La cuantificación de los carotenoides se resume en el Cuadro 4.

Se observó que la luteína corresponde al 50% aproximadamente del total de las áreas mientras que el β-caroteno corresponde únicamente al 12 %. Las concentraciones molares encontradas de luteína y β-caroteno fueron  $9.4 \times 10^{-5}$  M y  $3.58 \times 10^{-6}$  M respectivamente. El total de xantofilas fue de  $1.731 \times 10^{-4}$  M eq. luteína y el total de carotenoides fue de  $1.766 \times 10^{-4}$  M. Siguiendo la misma metodología, se obtuvo del producto comercial donado por Bioquimex la presencia de trans-luteína en 94% del total de las áreas y en una concentración de  $2.6 \times 10^{-4}$  M lo cual corresponde a un rendimiento total de 0.1856 mg de luteína / mg de muestra seca (18.56%). Este rendimiento se encuentra muy cerca del reportado por el fabricante (20%). El cromatograma se muestra en la Figura 18.

### 2. ESTUDIO CITOTOXICO:

En la segunda etapa del estudio se realizó, de manera preliminar, la curva dosis-respuesta de la DEN en suspensión de hepatocitos utilizando el método de viabilidad celular de MTT. Previamente se optimizó el número de células necesarias para realizar dicho estudio. Se encontró que se requieren 20,000 células viables por pozo. En la Figura 19 se muestra la curva después de 6 horas de exposición. Los datos se presentan como porcentaje de viabilidad celular con respecto a la viabilidad de las células control sin tratamiento. Se observó que la concentración necesaria de DEN para causar aproximadamente el 50% de muerte celular fue de 50 mM ( $p < 0.05$ ); con las dosis de 10 mM y menores no se registraron efecto sobre la viabilidad celular ( $p \geq 0.05$ ). Estos resultados concuerdan con lo observado por otros autores ya que se ha

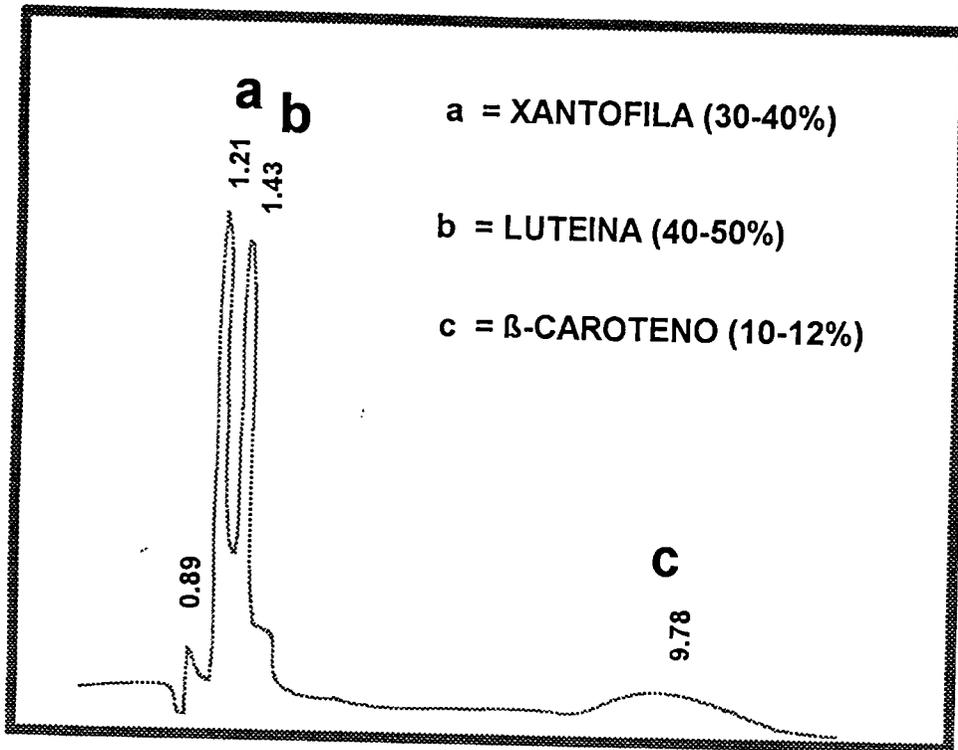
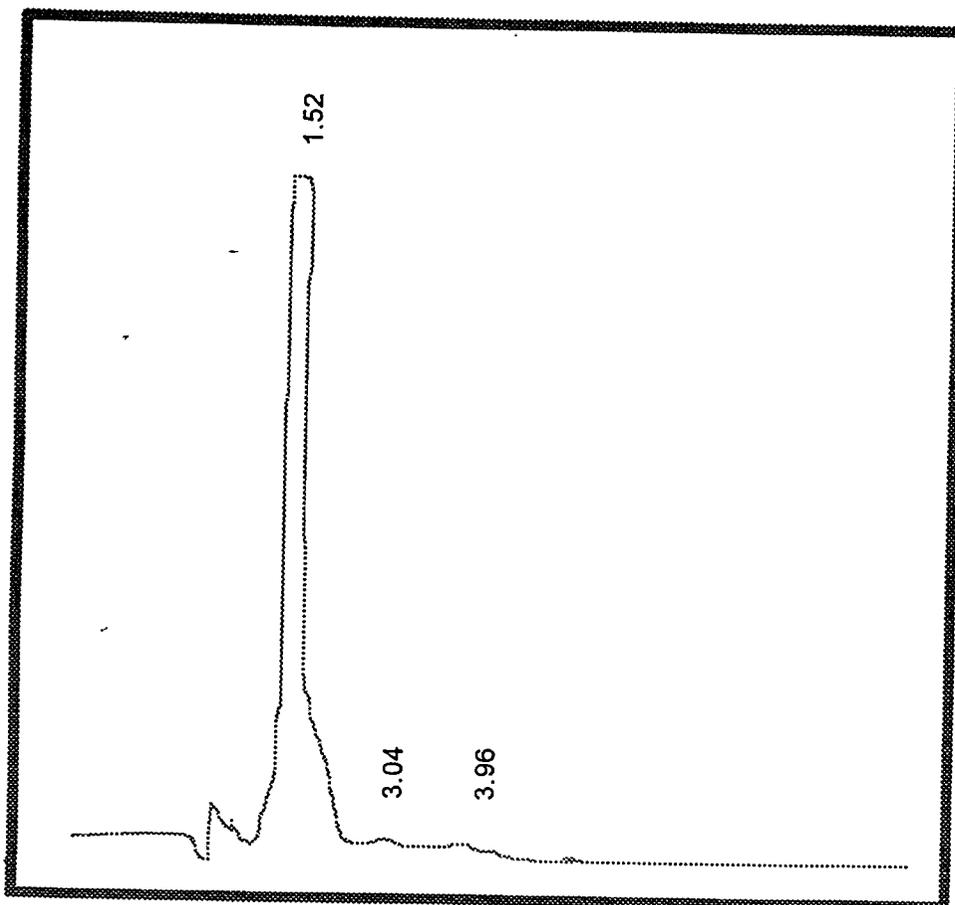


FIGURA 17. PERFIL CROMATOGRAFICO DE LOS CAROTENOIDES DE CHILE CHILACA

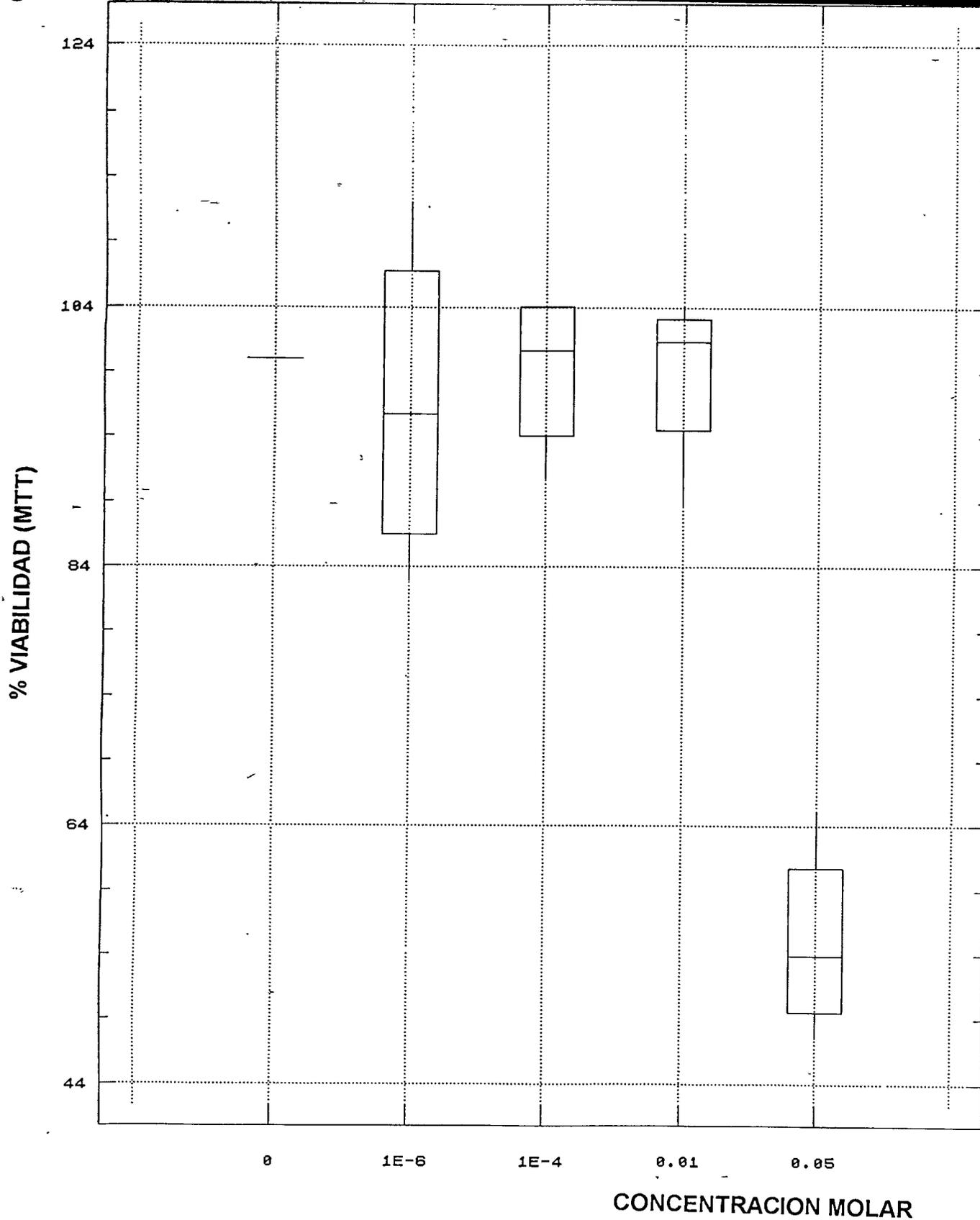
**CUADRO 4. PERFIL DE CAROTENOIDES DEL EXTRACTO DE CHILE CHILACA (*Capsicum spp.*).**

|                           | XANTOFILA <sup>1</sup> | TRANS LUTEINA        | TRANS β-CAROTENO     |
|---------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| PICO                      | a                      | b                    | c                    |
| TIEMPO DE RETENCION (min) | 1.2                    | 1.5                  | 9.3                  |
| % AREA                    | 38                     | 50                   | 12                   |
| CONC. µg/µl               | 4.49X10 <sup>1</sup>   | 5.35X10 <sup>1</sup> | 1.92X10 <sup>2</sup> |
| CONC. MOLAR               | 7.9X10 <sup>5</sup>    | 9.4X10 <sup>5</sup>  | 3.58X10 <sup>6</sup> |

1. XANTOFILA NO CARACTERIZADA, PROBABLEMENTE NEOXANTINA O VIOLAXANTINA



**FIGURA 18. CROMATOGRAMA DE LA LUTEINA PURIFICADA DEL PRODUCTO COMERCIAL.**



**FIGURA 19. CURVA DOSIS RESPUESTA DE DEN EN HEPATOCITOS EFECTO CITOTOXICO EN 6 HORAS DE EXPOSICION**

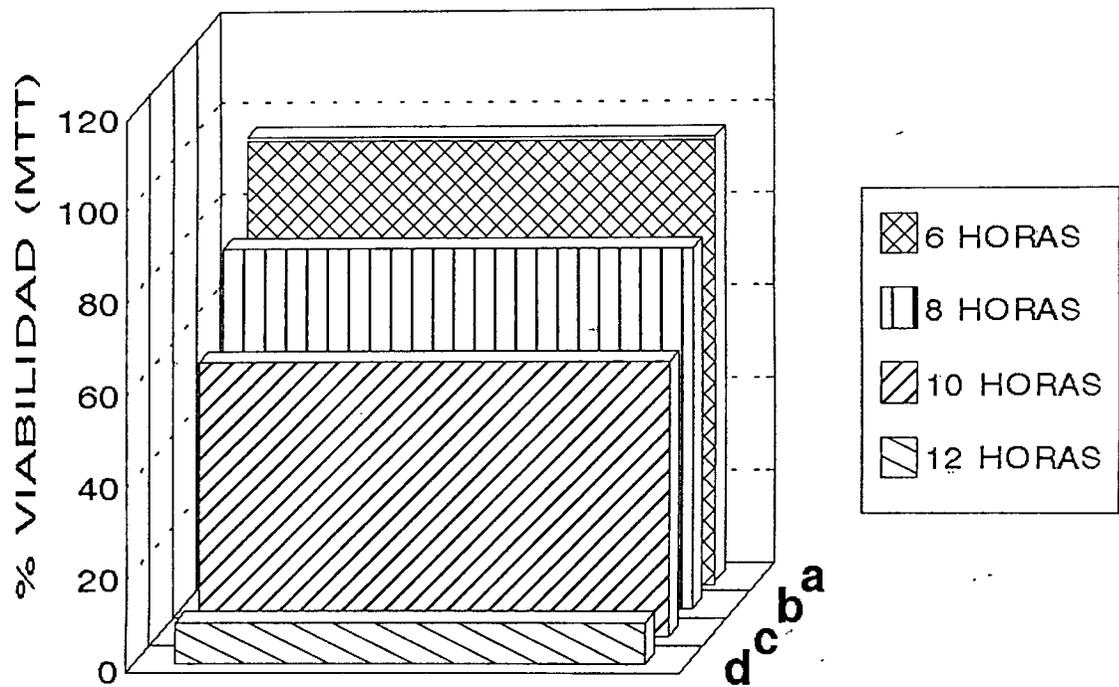
determinado que las dialquilnitrosaminas no son hepatotóxicos potentes en hepatocitos aislados, debido posiblemente a que los niveles de P-450 en los hepatocitos se ven altamente disminuidos <sup>(3)</sup>.

Tomando como base estos resultados, se realizó la tercera etapa del estudio, la cual consistió en determinar el tiempo de exposición necesario para que la DEN (50 mM) causara el 50% de muerte celular pero ahora en cultivo primario de hepatocitos. En la Figura 20 se observa que el tiempo requerido para causar este efecto es de 10 horas de exposición ( $p < 0.05$ ). Dicho resultado correlaciona tanto con el método de MTT como por la determinación de la concentración de lactato deshidrogenasa liberada como indicador de daño a la integridad de la membrana celular.

En la cuarta etapa, se determinaron las concentraciones máximas de cada carotenoide para ser utilizadas en el estudio. La insolubilidad de los carotenoides en agua hace indispensable la utilización de solventes orgánicos los cuales limitan las concentraciones de los carotenoides en sistemas biológicos. En el Cuadro 5 se muestra el efecto de los vehículos utilizados sobre la viabilidad celular; el THF para el  $\beta$ -caroteno y el DMSO para la luteína y el extracto. Los datos concuerdan con Cooney y col. (1993) <sup>(64)</sup> quienes demuestran que a 0.5% v/v de dichos solventes no hay toxicidad. El tetrahidrofurano ha sido encontrado como el mejor solvente para  $\beta$ -caroteno en sistemas celulares tanto por su alta solubilidad como por la inocuidad del solvente a concentraciones adecuadas <sup>(65)</sup>.

En la Figura 21 se muestra que el  $\beta$ -caroteno en concentración de 100  $\mu$ M disminuye la viabilidad celular ( $p < 0.05$ ) debido posiblemente a la concentración del solvente utilizado como vehículo ya que en este caso su presencia representa un alto porcentaje (1.0%) en el medio de cultivo. Por otro lado, la concentración de  $\beta$ -caroteno de 50  $\mu$ M fue inocua para los hepatocitos ya que no se registró disminución en la viabilidad celular ( $p \geq 0.05$ ) además de que el solvente utilizado en este caso se encuentra en un porcentaje adecuado (0.5%) y fue bien tolerado por las células (Cuadro 5). Debido a lo anteriormente observado, se utilizó dicha concentración de  $\beta$ -caroteno para los estudios *in vitro*.

En la Figura 22 se observan los resultados para luteína. En este caso la concentración de 10  $\mu$ M no resultó ser la adecuada para las células ( $p < 0.05$ ) debido principalmente a la concentración de DMSO requerido (3.5%) (Cuadro 5). La luteína



## FIGURA 20. EFECTO DE DEN 50 mM EN HEPATOCITOS DE RATA

CELULAS EN CULTIVO CON 20 HORAS DE INCUBACION Y EXPUESTAS A DEN 50 mM DURANTE 6, 8, 10 Y 12 HORAS. LOS DATOS SE MUESTRAN COMO PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA MEDIANTE EL METODO DE MTT.

a, b, c y d SIGNIFICAN DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA ( $p < 0.05$ )

**CUADRO 5. EFECTO DE LOS VEHICULOS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR  
EN HEPATOCITOS DE RATA**

| % VIABILIDAD<br>CELULAR | THF           |              |              |
|-------------------------|---------------|--------------|--------------|
|                         | 1%            | 0.5%         | 0.1%         |
|                         | 70-80         | 110-90       | 110-90       |
|                         | (100 $\mu$ M) | (50 $\mu$ M) | (10 $\mu$ M) |

\*LOS NUMEROS ENTRE PARENTESIS INDICAN LA CONCENTRACION DE B-CAROTENO QUE SE ENCONTRARIA DISUELTA EN CONCENTRACION DE THF.

| % VIABILIDAD<br>CELULAR | DMSO         |             |
|-------------------------|--------------|-------------|
|                         | 3.5%         | 0.35%       |
|                         | 30-40        | 110-90      |
|                         | (10 $\mu$ M) | (1 $\mu$ M) |

\*LOS NUMEROS ENTRE PARENTESIS INDICAN LA CONCENTRACION DE LUTEINA QUE SE ENCONTRARIA DISUELTA EN DICHA CONCENTRACION DE DMSO.

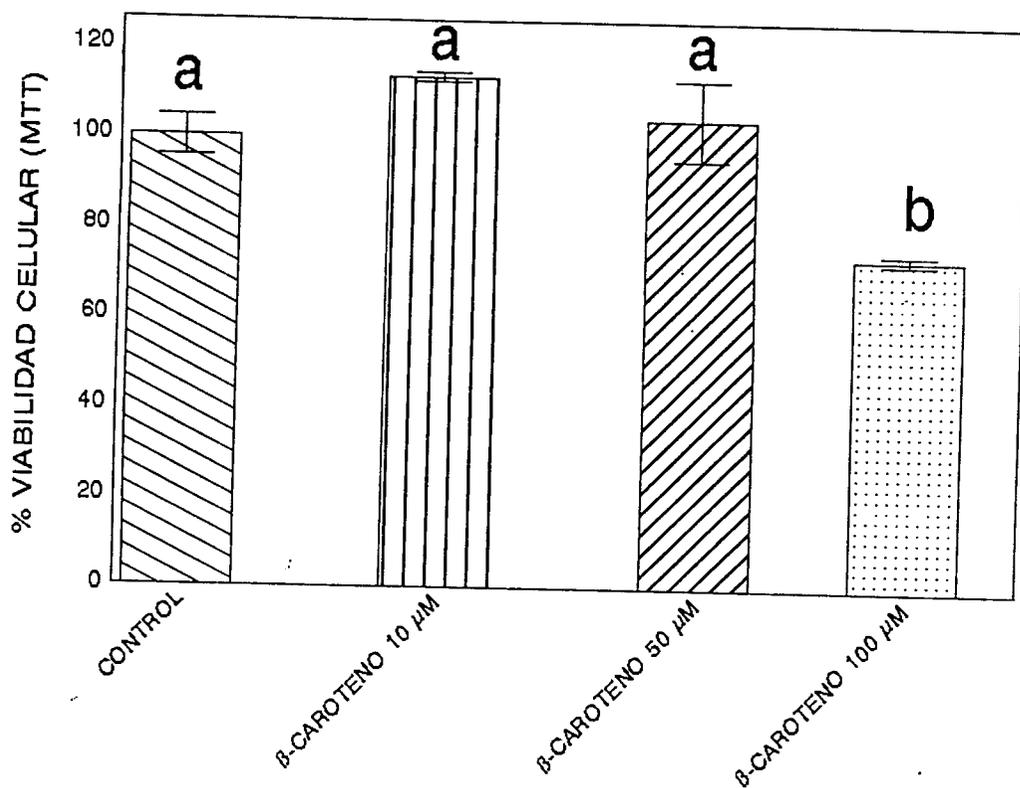
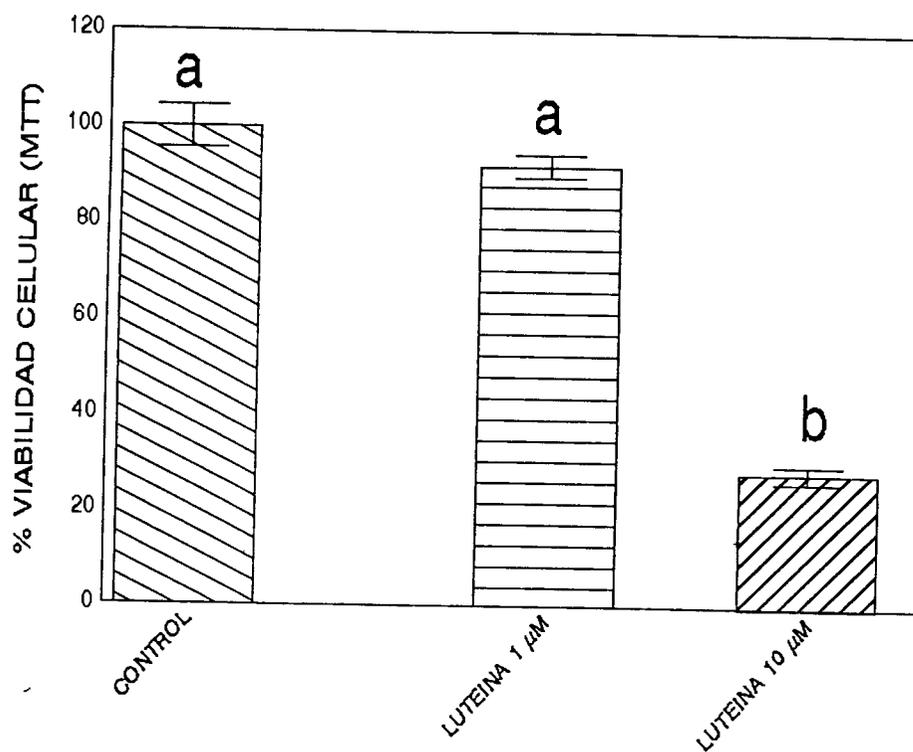


FIGURA 21. EFECTO DEL TRANS  $\beta$ -CAROTENO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE HEPATOCITOS

CELULAS CON 2 HORAS DE INCUBACION Y EXPUESTAS A  $\beta$ -CAROTENO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DURANTE 10 HORAS

a y b SIGNIFICAN DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA ( $p < 0.05$ )



## FIGURA 22. EFECTO DE TRANS LUTEINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE HEPATOCITOS

CELULAS CON 20 HORAS DE INCUBACION EXPUESTAS A LUTEINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DURANTE 10 HORAS

a y b SIGNIFICAN DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA ( $p < 0.05$ )

en una concentración de 1  $\mu\text{M}$  no provocó daño a nivel de viabilidad celular y la concentración de DMSO (0.35%) fue bien tolerada por las células ( $p \geq 0.05$ ).

Para estudiar el efecto de la interacción entre la DEN y cada carotenoide o el extracto por separado se siguieron dos estrategias (etapas 5 y 6). Por un lado se administraron simultáneamente los dos compuestos y se observó que ninguno de los carotenoides, o el extracto, interfirieron con el efecto citotóxico de la DEN 50 mM debido a que la concentración de lactato deshidrogenasa (LDH) libre fue semejante a la liberada en presencia del tóxico (Figura 23) ( $p < 0.05$ ). La determinación de glutatión reducido (GSH) total (Figura 24) en presencia de la DEN no disminuyó significativamente con respecto al control ( $p \geq 0.05$ ), probablemente debido a que la nitrosamina no es capaz de generar lipoperoxidación.

La segunda estrategia fue preincubar durante una hora con cada uno de los carotenoides o bien el extracto, lavar para eliminar trazas de los componentes extracelulares y del solvente que pudieran interferir con el resultado, y exponer a la nitrosamina. De manera similar que en el caso anterior, no se observó efecto sobre la citotoxicidad de la DEN mediante la determinación de la actividad enzimática de la LDH (Figura 25), ni se redujo el consumo de GSH total ( $p < 0.05$ ) (Figura 26).

Bajo las condiciones experimentales del estudio, se observó que la dietilnitrosamina provocó muerte celular sólo a concentraciones altas (50 mM). Algunos autores afirman que las nitrosaminas no son compuestos hepatotóxicos en hepatocitos aislados debido a la baja actividad enzimática de los sistemas P-450 después de tiempos largos de incubación<sup>(3)</sup>. En este experimento no fue posible reducir el tiempo de incubación previa al tratamiento (20 horas) debido a que la dietilnitrosamina no provocó muerte celular significativa en tiempos menores a 8-10 horas por lo que no se podía realizar el experimento completo en un día y se decidió desfasarlo en dos días, el primero para la obtención y cultivo de los hepatocitos y el segundo para el estudio de citotoxicidad, pero cabe mencionar que aún en los experimentos realizados el mismo día, con cultivos de 2 horas de incubación, el efecto observado siguió el mismo comportamiento. Los resultados obtenidos en esta etapa del estudio indican que los carotenoides no son capaces de interferir con el daño provocado por la DEN (50 mM) a nivel citotóxico debido probablemente a que el daño causado a este nivel fue funcional o estructuralmente irreversible. La relación nitrosamina-carotenoide fue de 1000:1 para

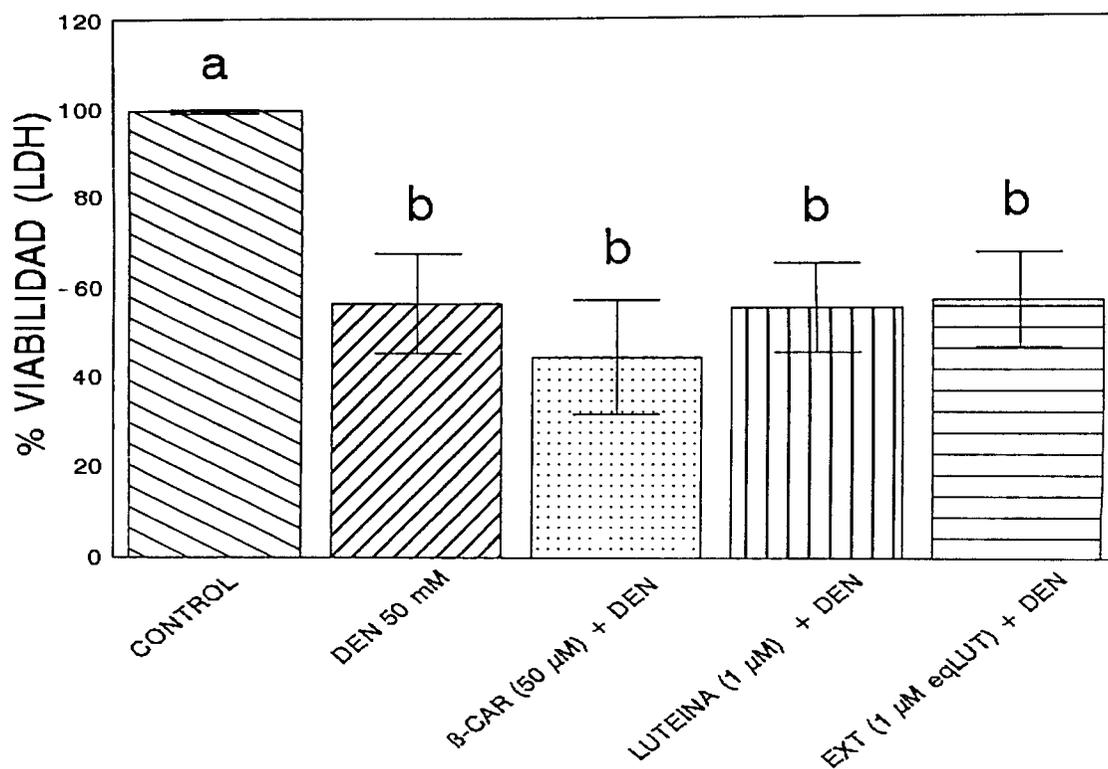


FIGURA 23. EFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO CITOTOXICO DE DEN 50 mM  
 CUANTIFICACION DE LDH (ADMINISTRACION SIMULTANEA)

CELULAS CON 20 HORAS DE INCUBACION Y EXPUESTAS AL EFECTO DE DEN 50 mM Y CADA CAROTENOIDE SIMULTANEAMENTE. LOS DATOS SE MUESTRAN COMO PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR DETERMINADO COMO CONCENTRACION DE LDH LIBRE.

a y b SIGNIFICAN DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA (P<0.05)

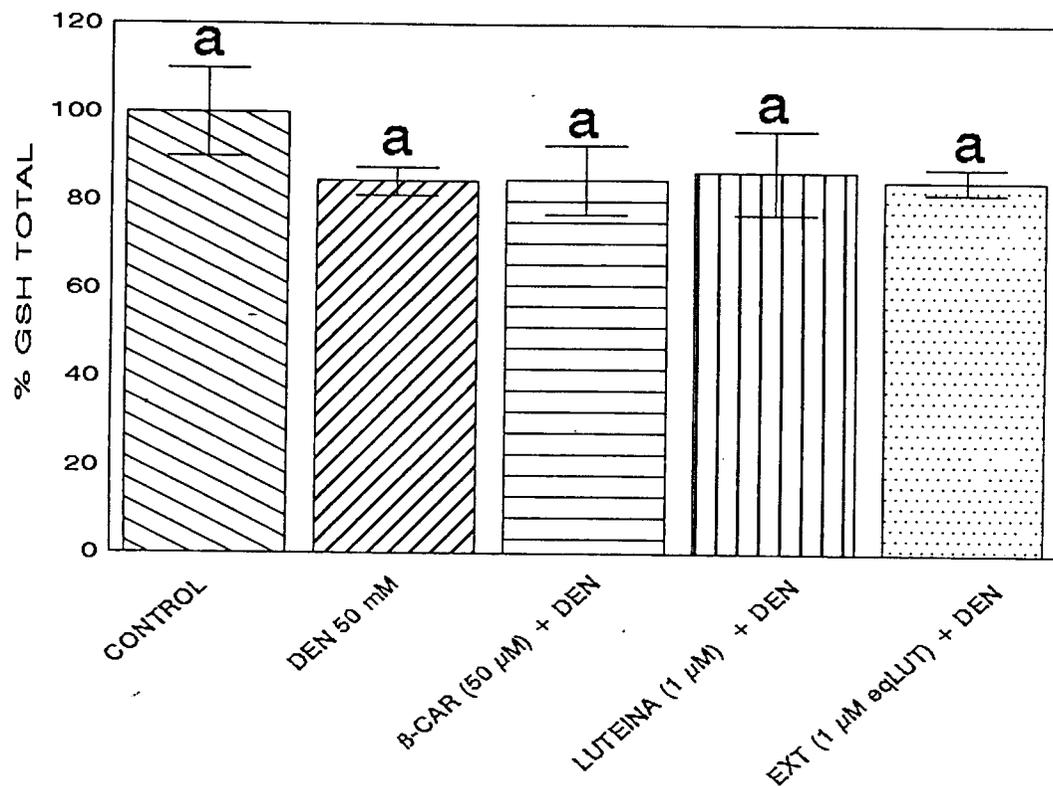


FIGURA 24. EFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO CITOTÓXICO DE DEN 50 mM

CUANTIFICACION DE GSH (ADMINISTRACION SIMULTANEA)

CELULAS CON 20 HORAS DE INCUBACION Y EXPUESTAS AL EFECTO DE DEN 50 mM Y CADA CAROTENOIDE SIMULTANEAMENTE. LOS DATOS SE MUESTRAN COMO PORCENTAJE DE GSH TOTAL CON RESPECTO AL CONTROL.

NO HAY DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA ( $P > 0.05$ )

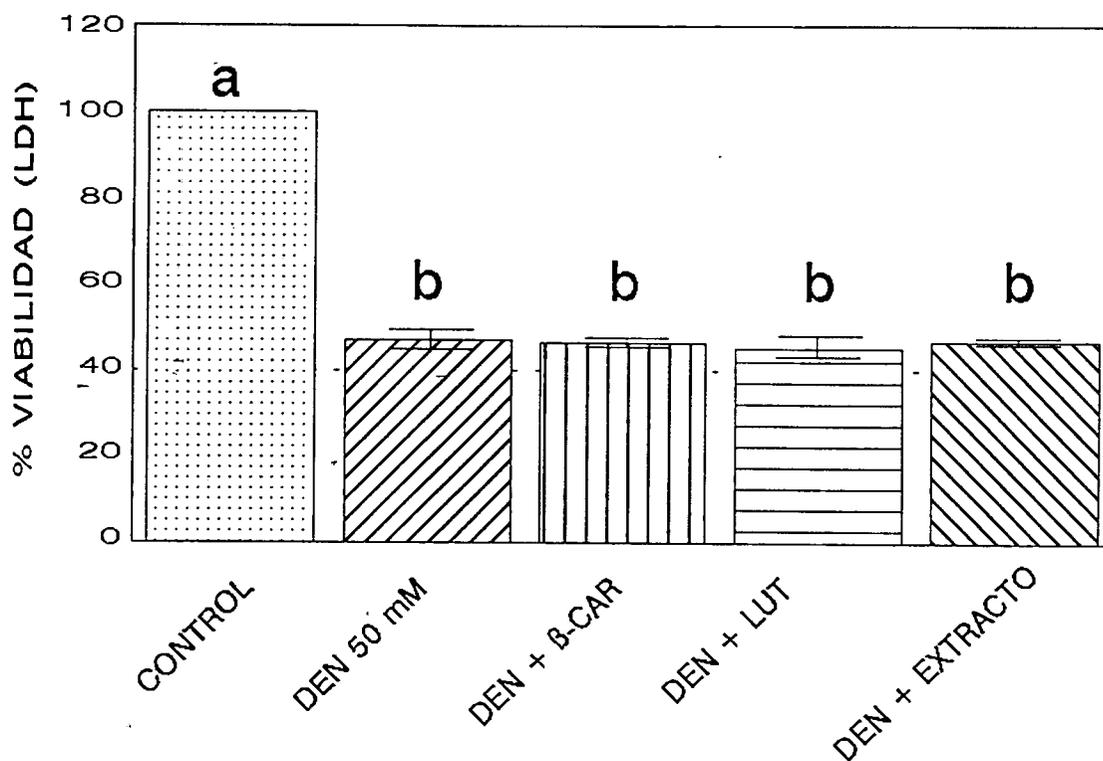


FIGURA 25. EFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO CITOTOXICO DE DEN 50 mM  
 CUANTIFICACION DE LDH (PREINCUBACION)

CELULAS CON 20 HORAS DE INCUBACION Y EXPUESTAS A LA PREINCUBACION CON CADA CAROTENOIDE DURANTE 1 HORA Y POSTERIORMENTE A LA DEN DURANTE 10 HORAS. LOS DATOS SE MUESTRAN COMO PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA MEDIANTE LA CONCENTRACION DE LDH LIBRE.

a y b SIGNIFICAN DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA (P<0.05)

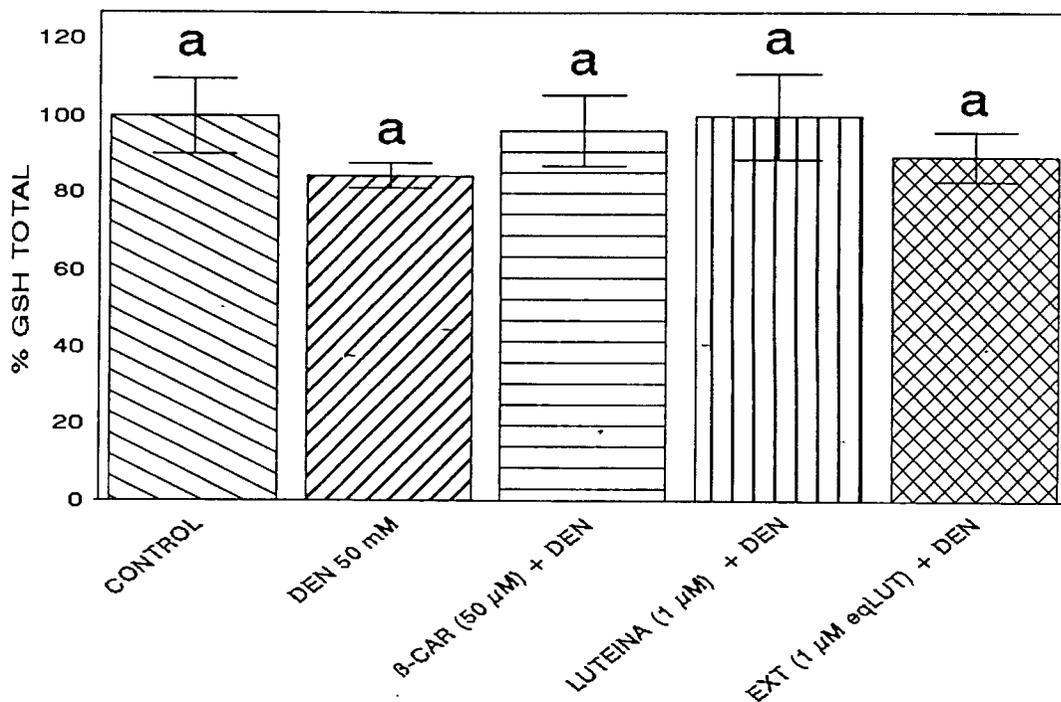


FIGURA 26. EFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO CITOTÓXICO DE DEN 50 mM

### CUANTIFICACION DE GSH (PREINCUBACION)

CELULAS CON 20 HORAS DE INCUBACION Y EXPUESTAS A LA PREINCUBACION CON CADA CAROTENOIDE DURANTE 1 HORA Y POSTERIORMENTE A LA DEN 50 mM DURANTE 10 HORAS. LOS DATOS SE MUESTRAN COMO PORCENTAJE DE GSH TOTAL CON RESPECTO AL CONTROL.

NO HAY DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA ( $P > 0.05$ )

el  $\beta$ -caroteno y de 1000:0.5 para la luteína lo que indica que se requieren megadosis de nitrosamina para afectar la viabilidad celular y se debe considerar que posiblemente a dosis menores que la  $CL_{50}$  el daño provocado puede ser severo y tal vez irreversible. Con respecto al bajo consumo de GSH en presencia del tóxico los resultados concuerdan con lo encontrado por otros autores <sup>(53)</sup> quienes indican que las nitrosaminas no afectan los niveles de GSH en sistemas celulares, posiblemente debido a que no generan lipoperoxidación <sup>(51)</sup>, sin embargo se sabe que las nitrosaminas producen un agente alquilante potente y el GSH actúa preferentemente sobre estos compuestos. Es posible que el resultado obtenido en este estudio se deba más al daño irreversible causado por la dosis utilizada de nitrosamina que a la incapacidad del GSH para realizar su acción detoxificante en células funcionales.

### **3. ESTUDIO GENOTOXICO:**

En la Figura 27 se presenta la curva dosis-respuesta de la DEN (séptima etapa) tomando como respuesta el porcentaje de reincorporación de  $T^3H$  con respecto a células control (sin tratamiento). Arbitariamente se consideró como 100% el registro de reincorporación basal obtenido para el control.

Se observa que con la concentración de 50 mM utilizada en el estudio citotóxico ( $CL_{50}$ ), el porcentaje de reincorporación es muy cercano a cero, probablemente debido a que los mecanismos enzimáticos celulares están dañados en extremo y ya no son capaces de responder. Lo mismo sucedió para las concentraciones de 10 mM y 50  $\mu$ M (subletales) las que mostraron niveles de reincorporación similares al control pero en este caso debido al daño funcional o estructural provocado en los sistemas enzimáticos de reparación. A partir de las concentraciones de 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 2.5  $\mu$ M se observó que ya no hubo daño a nivel funcional ya que los sistemas enzimáticos de reparación actuaron de acuerdo a lo esperado, por lo que se puede apreciar el efecto genotóxico real causado por la DEN a estas concentraciones.

En la Figura 28 se muestra la misma curva pero únicamente después de 4 horas de exposición y se observa claramente el efecto de la nitrosamina a altas concentraciones (50 mM, 10 mM y 50  $\mu$ M). Después de este tiempo, la DEN (10  $\mu$ M) fue capaz de causar 2.5 veces más daño genotóxico con respecto a las células control,

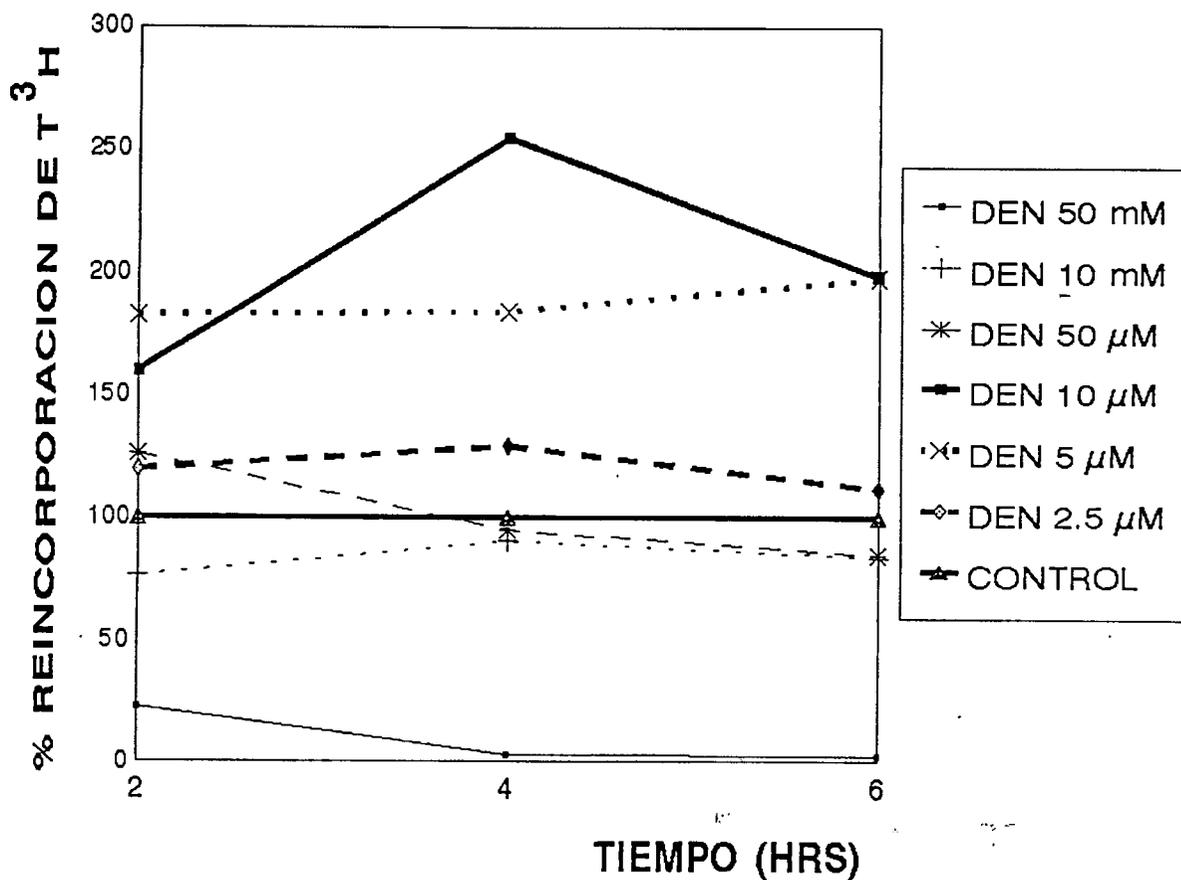
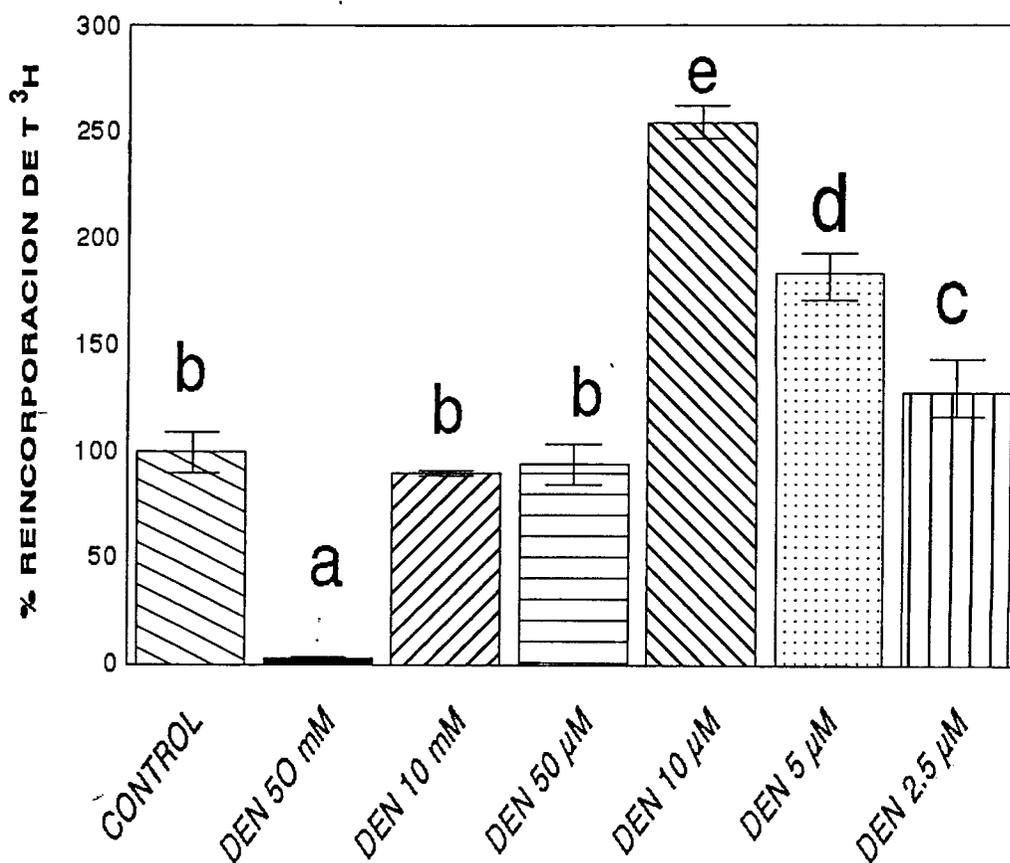


FIGURA 27. CURVA DOSIS-RESPUESTA DE DEN EN HEPATOCITOS  
(EFECTO GENOTOXICO)

CELULAS CON DOS HORAS DE INCUBACION Y  
EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DEN  
DURANTE 2, 4 Y 6 HORAS. LOS DATOS SE MUESTRAN  
COMO PORCENTAJE DE REINCORPORACION DE  
TIMIDINA MARCADA CON RESPECTO AL CONTROL.



**FIGURA 28. EFECTO GENOTOXICO DE DEN EN HEPATOCITOS  
4 HORAS DE EXPOSICION**

CELULAS CON DOS HORAS DE INCUBACION Y EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DEN DURANTE 4 HORAS. LA RESPUESTA OBSERVADA ES EL PORCENTAJE DE REINCORPORACION DE TIMIDINA MARCADA CON RESPECTO AL CONTROL.

a, b, c, d y e SIGNIFICAN DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA ( $p < 0.05$ )

la concentración de 5  $\mu\text{M}$  causó 2 veces más daño y la concentración de 2.5  $\mu\text{M}$  únicamente 1.3 veces más ( $p < 0.05$ ). Los datos se resumen en el Cuadro 6 en donde se observan los registros en DPM /  $\mu\text{g}$  de proteína y el porcentaje de reincorporación de  $\text{T}^3\text{H}$  con respecto al control. Conforme la reincorporación es mayor que la del control, hay mayor daño a nivel genético.

En la Figura 29 se observa que los carotenoides y sus respectivos vehículos no resultaron tener efecto genotóxico a las concentraciones probadas (octava etapa).

Se estudió el efecto de la interacción entre los carotenoides y la DEN a concentraciones 2.5 y 5  $\mu\text{M}$ , preincubando una hora con el respectivo carotenoide. En la Figura 30 se observa el efecto cuando se utilizó DEN 2.5  $\mu\text{M}$ . El daño provocado por el tóxico fue de aproximadamente 37%. Los carotenoides disminuyeron el daño entre 30-37% ( $p < 0.05$ ), lo que significa que la inhibición del efecto genotóxico fue casi completa. Estos datos son muy importantes para la ciencia de los alimentos ya que demuestran que compuestos presentes en la dieta, como son los carotenoides, pueden anular el efecto tóxico de las nitrosaminas presentes en alimentos procesados.

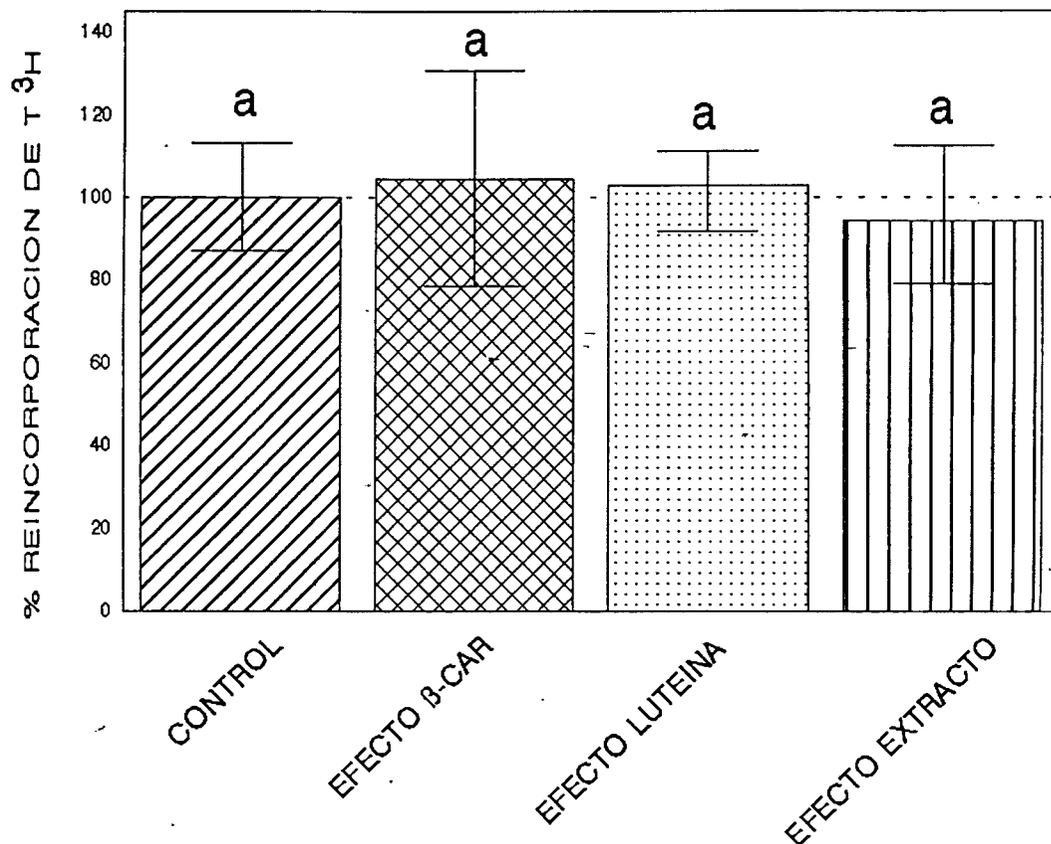
El efecto de la interacción utilizando DEN (5  $\mu\text{M}$ ) se observa en la Figura 31, la cual causó aproximadamente el doble del daño genotóxico con respecto al control ( $p < 0.05$ ). El  $\beta$ -caroteno fue capaz de disminuirlo en un 30% ( $p < 0.05$ ) aproximadamente y el extracto en un 40% ( $p < 0.05$ ).

La luteína no fue capaz de interferir en este sentido ( $p \geq 0.05$ ). En las mismas Figuras 30 y 31 se observa que los vehículos no alteraron el efecto genotóxico de la DEN 2.5 y 5  $\mu\text{M}$  respectivamente ( $p \geq 0.05$ ), por lo que el efecto observado con los carotenoides es real y significa que probablemente los carotenoides contribuyen a disminuir la absorción de la nitrosamina o evitar la formación del metabolito final.

En el Cuadro 7 se resumen los resultados del efecto quimioprotector de los carotenoides sobre la genotoxicidad de la DEN. Se observan los resultados como DPM /  $\mu\text{g}$  de proteína, % de daño causado y % de inhibición del daño (protección). Es probable que la razón por la cual la luteína no fue capaz de disminuir el daño provocado por la DEN (5  $\mu\text{M}$ ) pero si el causado por la concentración de 2.5  $\mu\text{M}$ , sea un efecto de carácter dosis-dependiente. La relación luteína:DEN fue de 1:2.5 en el primer caso y de 1:5 en el segundo. El extracto de carotenoides se utilizó en base a su contenido de luteína pero se debe recordar que además contenía otros carotenoides

CUADRO 6. DAÑO GENOTOXICO PROVOCADO POR DIETILNITROSAMINA (DEN) EN 4 HORAS DE EXPOSICION

| TRATAMIENTO     | DPM/ $\mu$ g PROTEINA | % REINCORPORACION<br>CON RESPECTO AL CONTROL |
|-----------------|-----------------------|--|
| CONTROL         | 20.39                 | 100  |
| DEN 50 mM       | 0.534                 | 2.6  |
| DEN 10 mM       | 18.41                 | 90.29  |
| DEN 50 $\mu$ M  | 19.30                 | 94.65  |
| DEN 10 $\mu$ M  | 51.91                 | 254.58                                       |
| DEN 5 $\mu$ M   | 37.51                 | 183.96                                       |
| DEN 2.5 $\mu$ M | 26.29                 | 128.96                                       |



## FIGURA 29. EFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE LA REPARACION NO PROGRAMADA DE ADN

CELULAS CON DOS HORAS DE INCUBACION Y EXPUESTAS EN CADA CASO A  $\beta$ -CAROTENO  $50 \mu\text{M}$ , LUTEINA  $1 \mu\text{M}$  Y EXTRACTO  $1 \mu\text{M}$  EQ. A LUTEINA DURANTE 6 HORAS. LOS DATOS SE MUESTRAN COMO PORCENTAJE DE REINCORPORACION DE TIMIDINA MARCADA CON RESPECTO AL CONTROL.

LAS LETRAS MINUSCULAS SIGNIFICAN QUE NO HAY DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA ( $p > 0.05$ )

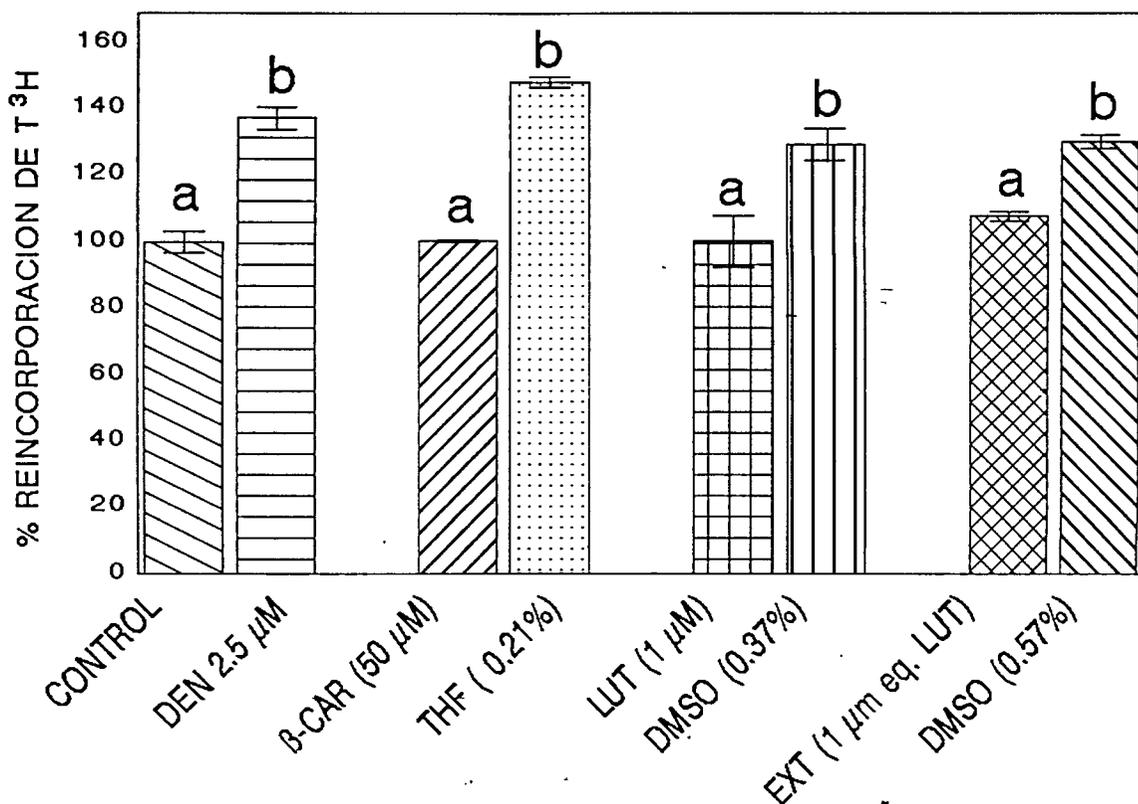


FIGURA 30 .EFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO GENOTOXICO CAUSADO POR DEN 2.5 μM EN HEPATOCITOS

CELULAS CON DOS HORAS DE INCUBACION Y PREINCUBADAS DURANTE 1 HORA CON CADA CAROTENOIDE. POSTERIORMENTE EXPUESTAS A DEN 2.5 μM DURANTE 4 HORAS. LAS BARRAS DE THF Y DMSO MUESTRAN EL EFECTO DE CADA SOLVENTE SOBRE EL DAÑO PROVOCADO POR LA DEN A LOS PORCENTAJES SEÑALADOS. LOS DATOS SE MUESTRAN COMO PORCENTAJE DE REINCORPORACION DE TIMIDINA MARCADA CON RESPECTO AL CONTROL.

a y b SIGNIFICAN DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA (p<0.05)

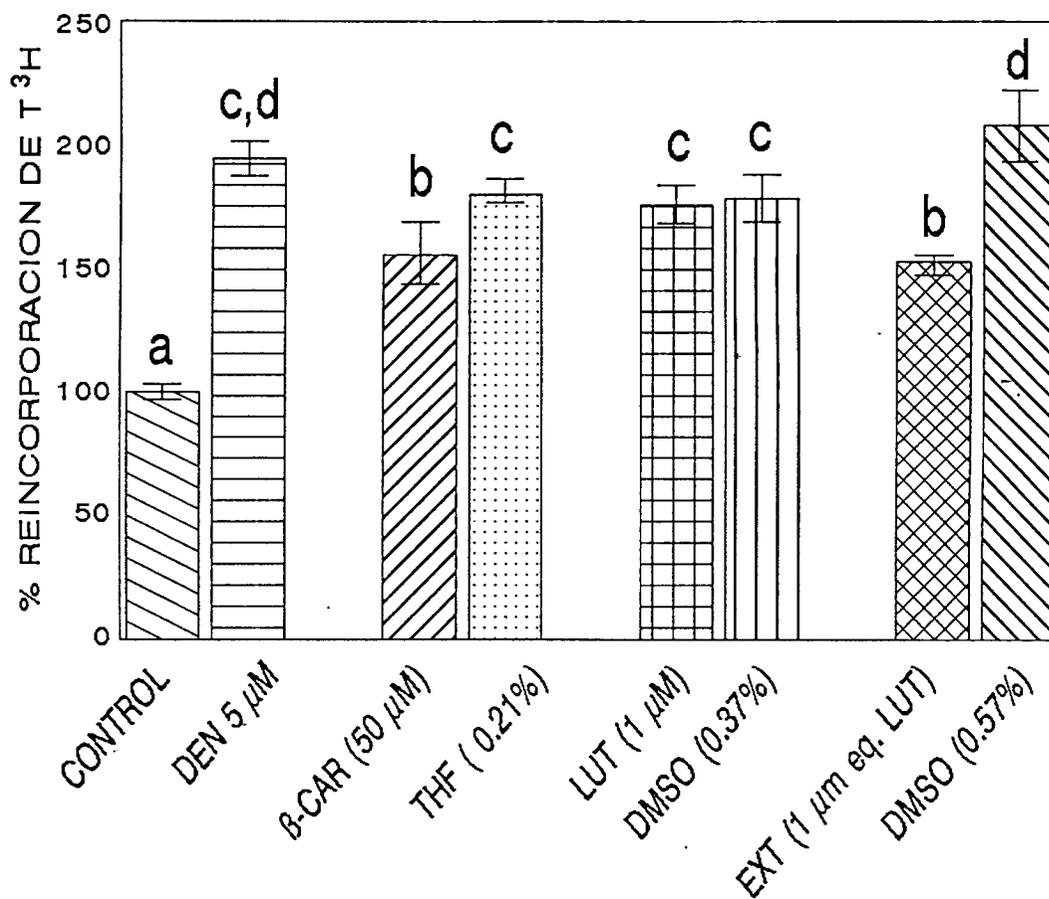


FIGURA 31 .EFECTO DE LOS CAROTENOIDES SOBRE EL DAÑO GENOTOXICO CAUSADO POR DEN 5 μM EN HEPATOCITOS

CELULAS CON DOS HORAS DE INCUBACION Y PREINCUBADAS DURANTE 1 HORA CON CADA CAROTENOIDE. POSTERIORMENTE EXPUESTAS DURANTE 4 HORAS A DEN 5 μM. LAS BARRAS DE THF Y DMSO MUESTRAN EL EFECTO DE CADA SOLVENTE SOBRE EL DAÑO PROVOCADO POR LA DEN A LOS PORCENTAJES SEÑALADOS. LOS DATOS SE MUESTRAN COMO PORCENTAJE DE REINCORPORACION DE TIMIDINA MARCADA CON RESPECTO AL CONTROL.

a, b, c y d SIGNIFICAN DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA (p<0.05)

CUADRO 7. RESUMEN DEL TRATAMIENTO GENOTOXICO

| GRUPO CONTROLES             |        | VS DEN 2.5 µM |                                       |              | VS DEN 5 µM   |                        |              |
|-----------------------------|--------|---------------|---------------------------------------|--------------|---------------|------------------------|--------------|
| TRATAMIENTO                 | % DAÑO | DPM / µg PROT | DPM / µg PROT. % DISMINUCION DEL DAÑO | % INHIBICION | DPM / µg PROT | % DISMINUCION DEL DAÑO | % INHIBICION |
| CONTROL                     | ----   | 10.04         | ----                                  | ----         | ----          | ----                   | ----         |
| DEN 2.5 µM                  | 36.95  | 13.75         | 13.75                                 | ----         | ----          | ----                   | ----         |
| DEN 5 µM                    | 94.05  | 19.5          | ----                                  | ----         | 19.5          | ----                   | ----         |
| β-CAROTENO 50 µM            | 0      | 10.99         | 10.05                                 | 36.85        | 99.73         | 16.35                  | 31.47        |
| LUTEINA 1 µM                | 0      | 10.78         | 10.05                                 | 36.85        | 99.73         | 18.56                  | 0            |
| EXTRACTO (1 µM eq. LUTEINA) | 0      | 9.25.         | 10.8                                  | 29.34        | 79.40         | 15.17                  | 41.44        |
|                             |        |               |                                       |              |               |                        | 33.46        |
|                             |        |               |                                       |              |               |                        | 44.06        |

(incluyendo  $\beta$ -caroteno) en aproximadamente un 50%. Por otro lado, el  $\beta$ -caroteno se agregó en una relación 10:0.5 y 10:1 con respecto a las dosis empleadas de DEN.

El efecto genotóxico de la DEN sobre el metabolismo hepático en células de mamífero fue anulado (100% de inhibición del daño) o disminuido hasta en un 40%, dependiendo de la concentración de dietilnitrosamina, en presencia de los carotenoides utilizados, lo cual indica que los carotenoides inhiben la fase de iniciación neoplásica provocada por la dietilnitrosamina en hepatocitos de rata.

Dichos resultados concuerdan con lo observado por otros autores en diferentes sistemas celulares y con otros agentes tóxicos, como el efecto protector del  $\beta$ -caroteno contra la generación del intercambio de cromátidas hermanas en células de ovario de hámster chino frente a especies reactivas de oxígeno <sup>(10)</sup> o en células de mama de ratón frente a dimetilbenzantraceno, dietilnitrosamina y metilnitrosourea <sup>(9)</sup>.

Las concentraciones de DEN para causar daño genotóxico obtenidas en este estudio correlacionaron, en orden de magnitud, con las utilizadas por otros autores. Pool y col (1990) <sup>(4, 66)</sup> encontraron que concentraciones de DEN entre 6.5 a 25  $\mu$ M causaron de 20-35% de daño genotóxico mediante la cuantificación de ruptura de cadenas simples de ADN en hepatocitos de rata, hámster y cerdo. Loquet y col (1982) <sup>(2)</sup> encontraron que dosis entre 10-200  $\mu$ M causaron una reducción en la eficiencia de clonación de aproximadamente 50% en células transformadas.

Por otra parte, en otros estudios realizados con carotenoides, el orden de magnitud utilizado fue semejante al utilizado en la presente investigación <sup>(9, 10, 13)</sup> con resultados favorables al reducir también el daño de otros tóxicos.

Extrapolar los resultados de pruebas *in vitro* a la situación *in vivo* no es fácil ya que se debe considerar que en un sistema *in vivo* existen muchos factores que afectan la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los compuestos dietéticos; sin embargo, es una muy buena aproximación a lo que puede suceder en la realidad, sobre todo si se considera que las concentraciones del tóxico utilizadas en el estudio genotóxico son del orden de magnitud de las que se encuentran en el organismo (debido a la acción de microorganismos y a las condiciones del tracto gastrointestinal) o en alimentos ya que se ha analizado que la concentración de dietilnitrosamina en alimentos varía de 4.5 a 0.1 ppm dependiendo del tipo de alimento <sup>(1)</sup>. En el ser humano, el reservorio principal de carotenoides es el tejido adiposo con un

80-85% del total de los carotenoides y en el hígado se almacenan del 8-12%, en músculo 2-3% y aproximadamente el 1% en suero. La concentración en hígado es de aproximadamente 36  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g}$  / g de tejido) al considerar que la concentración de carotenoides en suero humano es de 1.5-3  $\mu\text{M}$  (donde el  $\beta$ -caroteno constituye aproximadamente del 15-30% y el 70-85% restante corresponde principalmente a  $\alpha$ -caroteno, licopeno, luteína y criptoxantina) <sup>(23, 36, 67)</sup>. Como puede observarse, las concentraciones de los carotenoides y la nitrosamina están acordes con las que se encuentran tanto en alimentos como en el ser humano.

En los últimos años se han realizado diversos estudios en poblaciones humanas para determinar el papel de los carotenoides como compuestos protectores contra la incidencia de cáncer en pulmón, esófago, cavidad oral, faringe, estómago, páncreas, colon, recto, vejiga, cervix, mama, ovario, próstata y piel <sup>(68)</sup>. En alguno casos, las evidencias indican que si existe un papel modulador de los carotenoides y en otros casos no se observa diferencia significativa. Incluso se ha reportado casos en los que se ha utilizado  $\beta$ -caroteno simultáneamente con vitamina A en megadosis como complemento alimenticio en fumadores y ex-fumadores y los resultados han sido desfavorables ya que la incidencia de cáncer ha aumentado <sup>(69)</sup> debido a que dosis altas de  $\beta$ -caroteno podrían ocasionar que actúe como prooxidante. Esto indica que no se puede generalizar el efecto de los carotenoides para todos los órganos, además de que hay que considerar el uso de dosis adecuadas así como la interacción entre los diferentes tipos de agentes protectores.

Lo anterior sugiere que los carotenoides son capaces de beneficiar al organismo siempre y cuando se ingieran en dosis adecuadas como por ejemplo, las contenidas en los alimentos. El abuso en el consumo de estos nutrimentos puede provocar resultados indeseables.

El presente estudio proporcionó información científica original en las áreas de química y toxicología de alimentos acerca de la toxicidad de la dietilnitrosamina, cuya prevalencia en el medio ambiente y en alimentos está bien documentada. Los datos obtenidos sobre la capacidad de algunos carotenoides para disminuir el efecto genotóxico de dicho compuesto en células de mamífero cuyo metabolismo es semejante al humano, refuerzan el conocimiento de los posibles mecanismos de su detoxificación. Fue posible demostrar que un extracto de carotenoides, obtenido

directamente de un alimento, tiene esta capacidad. El haber utilizado como modelo una variedad de chile verde de alto consumo en México, aporta conocimientos directamente utilizables en la dieta popular.

Esta información puede ser aprovechada para reforzar, modificar o innovar programas enfocados a la alimentación humana en los que se consideren las interacciones metabólicas de los alimentos que puedan beneficiar al organismo. Además, es posible impulsar la utilización de los carotenoides como pigmentos naturales en alimentos de consumo humano ya que representan un gran potencial en este sentido y han sido escasamente explotados, considerando su abundancia en la naturaleza así como su importancia biológica y no solamente cosmética. Se puede además enfocar su uso en alimentos procesados que contengan tóxicos provenientes de los aditivos o del procesamiento mismo, como son las nitrosaminas. Sin embargo se debe considerar que los carotenoides son termolábiles de manera que se requiere un manejo especial para su introducción en alimentos procesados.

El conocimiento del efecto benéfico de los carotenoides en el organismo son sólo una muestra del potencial que tienen los constituyentes naturales de la dieta frente a compuestos tóxicos, contaminantes del medio ambiente y los alimentos, incluyendo aquellos que, como las nitrosaminas, son capaces de causar daños tan severos como lo es el cáncer.

## XI- CONCLUSIONES

- El perfil de carotenoides de chile chilaca (*Capsicum spp.*) presenta tres carotenoides principales; luteína,  $\beta$ -caroteno y un tercer carotenoide, probablemente neoxantina o violaxantina, en relación de 50, 12 y 38%, respectivamente.
- En cultivo primario de hepatocitos, la concentración necesaria de dietilnitrosamina para provocar aproximadamente el 50% de muerte celular ( $CL_{50}$ ) fue de 50 mM después de 10 horas de exposición.
- Las concentraciones inocuas de los carotenoides utilizados fueron  $\beta$ -caroteno (50  $\mu$ M), luteína (1  $\mu$ M) y el extracto de chile chilaca (1  $\mu$ M eq. luteína). La solubilidad de los carotenoides obligó a utilizar solventes como el THF y el DMSO y esto limitó incrementar dichas concentraciones ya que provocaban daño a celular y posiblemente alteraban el metabolismo del tóxico. Una opción sería concentrar más los carotenoides en la medida que su solubilidad en dichos solventes lo permita.
- El daño citotóxico de la DEN (50 mM) no se ve afectado por la presencia simultánea o previa de luteína (1  $\mu$ M),  $\beta$ -caroteno (50  $\mu$ M) o el extracto de chile (1  $\mu$ M eq. luteína) determinado mediante el parámetro de viabilidad celular.
- Las concentraciones de DEN requeridas para causar daño genotóxico fueron de 10, 5 y 2.5  $\mu$ M registrándose 2.5, 2 y 1.3 veces más el daño con respecto al control respectivamente. Las concentraciones subletales de 50  $\mu$ M y 10 mM causaron daño a nivel funcional y estructural en la células, la concentración de 50 mM ( $CL_{50}$ ) provocó daño irreversible sobre la función y estructura celular.
- El  $\beta$ -caroteno y el extracto fueron capaces de disminuir el daño a material genético causado por 5  $\mu$ M de DEN en 30-40% y todos los carotenoides anularon el daño provocado por 2.5  $\mu$ M de DEN.

- Se demostró que los carotenoides tienen el potencial de disminuir la capacidad genotóxica de la dietilnitrosamina en células de mamífero mediante un comportamiento dosis-dependiente, actuando como agentes protectores en el nivel de iniciación del proceso carcinogénico.
- Finalmente es importante resaltar que las concentraciones de carotenoides utilizadas en este estudio son del orden de magnitud de las que se encuentran en el organismo o en los alimentos, lo que indica que no es necesario utilizar megadosis para obtener un efecto benéfico. Esto sugiere que es muy importante consumir una dieta balanceada que proporcione estos nutrimentos al organismo en dosis adecuadas y con esto se obtendrán los beneficios de los carotenoides tanto nutricionales como protectores.

## XII- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Tricker, A.R. y Preussmann, R. (1991). Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms, and carcinogenic potential. **Mutation Research. 259, 277-289.**
2. Loquet, C. y Wiebel, F.J. (1982). Geno- and cytotoxicity of nitrosamines, aflatoxin B<sub>1</sub>, and benzo(a)-pyrene in continuous cultures of rat hepatoma cells. **Carcinogenesis. 3, (10) 1213-1218.**
3. Reitman, F.A., Shertzer, H.G. y Berger, M.L. (1988). Toxicity of methylating agents in isolated hepatocytes. **Biochemical Pharmacology. 37, (16) 3183-3188.**
4. Pool, B.L., Brendler, S.Y., Liegibel, U.M., Tompa, A. y Schmezer, P. (1990). Employment of adult mammalian primary cells in toxicology: *in vivo* and *in vitro* genotoxic effects of environmental significant N-nitrosodialkylamines in cells of the liver, lung, and kidney. **Environmental and Molecular Mutagenesis. 15, 24-35.**
5. Peto, R., Doll, R. Buckley, D., y Sporn, M.B. (1981). Can dietary  $\beta$ -carotene materially reduce human cancer rates? **Nature. 290, 201-208.**
6. Hecht, S.S. (1993). Understanding carcinogenes and anticarcinogenes in food. **Food Technology. February. 14-16**
7. Goodwin, T.W. (1986). Metabolism, Nutrition, and function of carotenoids. **American Review of Nutrition. 6, 273-297.**
8. Olson, J.A. (1989). Provitamin A function of carotenoids: the conversion of  $\beta$ -carotene into vitamin A. **Journal of Nutrition. 119, 105-108.**

9. Manoharan, K. y Banerjee, M.R. (1985).  $\beta$ -cätotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Report. 783-789.**
10. Weitzman, S.A., Weitbrg, A.B., Clark, E.P. y Stossel, T.P. (1985). Phagocytes as carcinogens malignant transformation produced by human neutrophils. **Science. 227, 1231-1233.**
11. Krinski, N.I. (1993). Effects of carotenoids on cells. **Molecular Aspects in Medicine. 14, 241-246.**
12. Krinski, N.I. (1994). The biological action of carotenoids. **Pure Applied Chemistry. 66, 1003-1010.**
13. Scita, G., Aponte, G.W., y Wolf, G. (1993). Uptake and cleavage of  $\beta$ -carotene by cultures of small intestinal cells and human lung fibroblasts. **Methods in Enzymology. 214, 21-32.**
14. Yu, M.W., Zhang, Y.J., Blaner, W.S. y Santella, R.M. (1994). Influence of vitamins A, C, and E and  $\beta$ -carotene on aflatoxin B<sub>1</sub> binding to DNA in woodchuck hepatocytes. **Cancer. 73, ISS 3, 596-604.**
15. Krinski, N.Y. (1990). Carotenoids in medicine. En: **Carotenoids: Chemistry and Biology. Plenum Press. N. Y. 279-311.**
16. Pallet, K y Young, A. (1993). Carotenoids . En: **Antioxidants in higher plants. CRC Press. Boca Ratón, Florida. p. 59**
17. Tee, E.S. (1992). Carotenoids and retinoids in human nutrition. En: **Critical Reviews in food science and nutrition. CRC Press Inc. Boca Ratón , Florida. 31 (1/2): 103-163.**

18. Olson, J.A. y Hayaishi, O. (1965). The enzymatic cleavage of  $\beta$ -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. **Biochemistry. 54, 1364-1369.**
19. Goodman, D.S., Huang, H.S. y Shiratón T. (1966). **Journal of Biological Chemistry. 241, (9) 1929-1932.**
20. Briviva, K y Sies H. (1994). Nonenzymatic antioxidant defense systems. En: **Natural antioxidants in human health and disease. De, por Balz Frei. Academic Press N.Y. 107-128**
21. Brubacher, G.B. y Weiser, H. (1985). The vitamin A activity of  $\beta$ -carotene. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research. 55, 5-15.**
22. Parker, R.S. (1989). Carotenoids in human blood and tissues. **Journal of Nutrition. 119, 101-104.**
23. Schmitz, H.H., Poor, C.L., Wellman, R.B., Erdman, J.W. Jr. (1991). Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in liver, kidney, and lung tissue. **Journal of Nutrition. 121, 1613-1621.**
24. Mathews-Roth, M. (1992). Technics for studying photoprotective function of carotenoid pigments. **Methods in Enzymology. 213, 479-484.**
25. Williams, D. (1988). Anticarcinogenesis and tumor promoters in foods. En: **Food toxicology. A perspective on the relative risks. Marcel Dekker; Inc. IFT Basic Simposiums series. 101-150.**
26. Ziegler, R.G. (1989). A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. **Journal of Nutrition. 119, 116-122.**

27. Moon, R.C. (1989). Comparative aspects of carotenoids and retinoids as chemopreventive agents of cancer. **Journal of Nutrition. 119, 127-134.**
28. Matheus-Roth, M.M. (1982) Antitumor activity of  $\beta$ -carotene, canthaxanthin and phytoene. **Oncology. 39, 33-37.**
29. Palozza, P. y Krinski, N.I. (1992). Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: An overview. **Methods in Enzymology. 213, 403-420.**
30. Ochiai, E. (1993). Free radicals and metals in biology. **Journal of Chemical Education. 70 (2) 128-133.**
31. Burton, G. (1989). Antioxidant action of carotenoids. **Journal of Nutrition. 199, 109-111.**
32. Burton, G.W. y Ingold, R.O. (1984).  $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science 224, 569-573.**
33. Hartman, P.E. y Shankel, D.M. (1990). Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis. 15, 145-182.**
34. Bendich, A. (1989). Carotenoids and the immune response. **Journal of Nutrition. 119, 112-115.**
35. Rose, D.P. (1982) Micronutrients in carcinogenesis. En: **Environmental aspects of cancer. The role of macro and micro components of food. Food and nutrition Perss. Inc. 127-156.**

36. Davison, A., Rousseau, E. y Dunn, B. (1993). Putative anticarcinogenic actions of carotenoids: nutritional implications. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 71, 732-745.**
37. Edes, T.E., Thornton, W. y Shah, J. (1989). Beta-carotene and aryl hydrocarbon hydroxylase in the rat: an effect of beta-carotene independent of vitamin A activity. **Journal of Nutrition. 119, 796-799.**
38. Tan, B. y Chu F.L. (1991). Effects of palm carotenoids in rat hepatic cytochrome P-450 mediated benzo(a)pyrene metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition. 53, 1071s-1075s.**
39. Zhang, L.X., Cooney, R.V. y Bertram, J.S. (1991). Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in CH3/10T1/2 cells: relationships to their cancer chemopreventive action. **Carcinogenesis. 12, 2109-2114.**
40. Hotchkiss, J.H. (1989). Preformed N-nitroso compounds in foods and beverages. En: Nitrate, nitrite and nitroso compounds in human cancer. Forman and Shuker (eds), **Cancer Surv: 8, 295-321.**
41. Concon, J.M. (1988). En: **Food Toxicology. Principles and concepts.** Marcel Dekker INC. N.Y.p 630-665.
42. Challis, B.C. y Challis J.A. (1982). N-nitrosamines and N-nitrosoimines in S. Patau. (Ed.) **The chemistry of amines, nitroso and n-nitrocompounds and their derivatives.** Wiley, N.Y. 1151-1223.
43. Williams, D.H.L. (1983). Nitrosation mechanisms. **Advances in Physic and Organic Chemistry. 19, 381-428.**

44. Singer, G.M., Ji, C., Roman, J., Li, M.H. y Lijinsky, W. (1986). Nitrosamines and nitrosamides precursors in foods from Lixian, China, a high incidence area for oesophageal cancer. **Carcinogenesis**. **7**, 733-736.
45. Lu, S.H., Montesano, R., Zhang, M.S., Feng, C., Luo, F.J., Chui, S.X., Umbenhauer, D., Saffhill, R. y Rajewsky, M.F. (1986). Relevance of N-nitrosamines to oesophageal cancer in China. **Journal of Cell Physiology Suppl.** **4**, 51- 58.
46. Poirier, S., Oshima, H. de-The, G., Hubert, A., Bougarde, M.C. y Bartsen, H. (1987). Volatile nitrosamine levels in common foods from Tunisia, South China and Greenland, high risk areas for nosopharyngeal carcinóma. **International Journal of Cancer** **39**, 293-296.
47. Song, P.J. y Hu, J.F. (1988). N-nitrosamines in chinese foods. **Food Chemical Toxicology**. **26**, 205-208.
48. Lijinsky, E. (1987). Structure-activity relations in carcinogenesis by N-nitroso compounds. **Cancer Methods Review**. **6**, 301-356.
49. Lotlikar, P.D. (1981). Metabolic activation of aromatic amines and dialkylnitrosamines. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology** **99**, 125-136.
50. Lai, D.Y. y Arcos, J.C. (1980). Dialkylnitrosamine bioactivation and carcinogenesis. **Life Sceinces**. **27**, 2149-2165.
51. Lindamood, C. (1991) Xenobiotic biotransformation En: **Hepatotoxicology**. Capítulo 4 Ed. por Meeks, R.G., Harrison, S.D. y Bull, R.J. CRC Press. Inc. Boca Ratón, Florida, U.S.A.p 94-99, 139-142, 156-159, 171-175.

52. Cortinovis, C., Klimek, F. y Nogueira, E. (1991). Rat hepatocarcinogenesis induced by N-nitroso deethylamine and N-nitrosopholine continuously administered at low doses. Form basophilic areas of hepatocytes to hepatocellular tumors. **American Journal of Pathology. 139, ISS 5, 1157-1171.**
53. Aitio, A., Aitio, M.L., Camus, A.M., Cardis E., y Bartsch, H., (1991). Cytochrome P-450 isozyme pattern is related to individual susceptibility to DEN-induced liver cancer in rats. **Japanese Journal of Cancer Research. 82, 146-156.**
54. AOAC Official Methods of analysis (1990). **Vitamins and other nutrients. Method N° 970.64. Extraction of carotenes and xantophylls. 1048-1049.**
55. Bureau, J.L., y Bushway, J.B. (1986). HPLC determination of carotenoids in fruit and vegetables in the United States. **Journal of Food Science. 51, 128-130.**
56. Seglen, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. **Methods in Cell Biology. 13, 29-83.**
57. Sladowski y col (1993). An improved Method of MTT assay. **Journal of Immunological Methods. 157, 203-207**
58. Schneider, K.W. y Lenmann, F.G. (1967). **Arzt. Labor. 13, 339.**
59. DelRaso, N.J. (1992). *In vitro* methods for assessing chemical or drug toxicity and metabolism in primary hepatocytes. En: ***In vitro* methods of toxicology. CRC Press. Boca Ratón, Florida. 176-201.**
60. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry. 72, 248-254.**

61. Mitchell, A.D., Casciano, M.L., Meltz, M.L., Robinson, D.E., San, R.H.C., Williams, G.M. y Von Halle, E.S. (1983). Unscheduled DNA synthesis tests: a report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox Program. **Mutation Research. 123, 363- 410.**
62. Swierenga, S., Bradlaw, J.A., Brillinger, R.L., Gilman J.P., Nestmann, E.R. y San, R.C. (1991). Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: Unscheduled DNA synthesis assay in rat hepatocyte cultures. **Mutation Research. 246, 235-253.**
63. Cámara, B. y Monéger, R. (1978). Free and esterified carotenoids in green and red fruits of *Capsicum annum*. **Phytochemistry. 17, 91-93.**
64. Cooney, R.V., Kappock, IV, T.J., Pung, A. y Bertram, J.S. (1993). Solubilization, cellular uptake, and activity of  $\beta$ -carotene and other carotenoids as inhibitors of neoplastic transformations in cultured cells. **Methods in Enzymology. 214, 55-68.**
65. Craft, N.E. (1992). Relative solubility, stability and absorptivity of lutein and  $\beta$ -carotene in organic solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40, 431-434.**
66. Mendoza-Figueroa, T., López-Revilla, R. y Villa-Treviño, S. (1983). DNA breaks induced by midromolar concentrations of dimethylnitrosamine in liver primary cell cultures from untreated and phenobarbital treated rats. **Toxicology. 27, 55-69.**
67. Krinski, N.I., Russett, M.D., Handelman, G.J. y Snodderly, D.M. (1990). Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma. **Journal of Nutrition. 120, 1654-1661.**

68. Poppel, G. (1993). Carotenoids and cancer: An update with emphasis on human intervention studies. **European Journal of Cancer. V. 9, 1335-1344.**
69. Peterson, K. (1996). Natural cancer prevention trial halted. **Science. Vol. 271, 441.**
70. Díaz del Pino, A. (1959). El cultivo del chile. **Vida rural en México. De. SAG. México. Folleto N° 14. p 28.**
71. Lomelí, A. (1987). El chile y otros picantes. **Colección Biblioteca del consumidor. Segunda edición. México. p.181.**

# **ANEXO 1**

## ***Capsicum spp.***

El chile es una planta clasificada dentro de la familia de las solanáceas, perteneciente al género *Capsicum* <sup>(70)</sup>. Es una planta anual, cultivada en zonas templadas y perenne en zonas tropicales.

El género *Capsicum* es originario de América del Sur (de los Andes y de la cuenca alta del Amazonas: Perú, Bolivia, Argentina y Brasil). La especie *annuum* se aclimató en México, donde actualmente existe la mayor diversidad de chiles. El chile verde (*Capsicum spp.*) es el cultivo hortícola más importante de México y el de mayor consumo popular, especialmente en estado fresco; aunque también se consume procesado. En México existe una gran variedad de chiles en cuanto a la forma, color, sabor, tamaño y pungencia <sup>(70)</sup>.

El fruto del chile es una baya-vaina. Debe su color verde a la gran cantidad de clorofila acumulada en las capas del pericarpio. Los frutos maduros toman color amarillo o rojo debido a los pigmentos carotenoides. La pungencia es debida a los compuestos capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina), los cuales se encuentran presentes en 0.05 a 0.33% en *Capsicum annuum*, y 0.35 a 0.85% en *Capsicum frutescens*. Además se ha reportado que las especies de *Capsicum* contienen glicoalcaloides tales como la solanina y solanidina. La composición química del chile es diferente de una variedad a otra y está sujeta a las condiciones climáticas, agronómicas y de cosecha. En el Cuadro 8 se observa la composición aproximada del chile para 100 g del mismo en estado fresco. Puede observarse que el chile es una fuente de vitaminas y minerales, entre los más importantes se encuentran la vitamina A y la vitamina C <sup>(71)</sup>.

En cuanto a la distribución de los carotenoides presentes en el chile, se observa que el verde contiene una gran cantidad de luteína y  $\beta$ -caroteno, mientras que el rojo (maduro) debe su color principalmente a la capsantina. El contenido de pigmentos en el chile varía de 0.2 a 0.5% <sup>(63)</sup>. En el Cuadro 9 se muestra la distribución de carotenoides en *Capsicum annuum* en dos estados de madurez. En este estudio se utilizó un extracto de carotenoides obtenido de chile chilaca, el cual pertenece a dicha especie.

**CUADRO 8. COMPOSICION QUIMICA DEL CHILE  
POR 100 g DE MATERIAL FRESCO.**

**COMPONENTES PRINCIPALES**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| AGUA                | 91.0 g |
| HIDRATOS DE CARBONO | 5.1 g  |
| PROTEINAS           | 1.3 g  |
| GRASAS              | 0.3 g  |
| FIBRA               | 1.4 g  |
| CENIZAS             | 0.9 g  |

**MINERALES**

|           |          |
|-----------|----------|
| POTASIO   | 234 mg   |
| SODIO     | 58 mg    |
| CLORO     | 37 mg    |
| FOSFORO   | 23 mg    |
| AZUFRE    | 17 mg    |
| MAGNESIO  | 11 mg    |
| CALCIO    | 9 mg     |
| HIERRO    | 0.50 mg  |
| MANGANESO | 0.26 mg  |
| COBRE     | 0.10 mg  |
| YODO      | 0.001 mg |

**VITAMINAS**

|                |          |
|----------------|----------|
| PRO-VITAMINA A | 1,000 UI |
| VITAMINA C     | 120 mg   |
| VITAMINA B1    | 0.03 mg  |
| VITAMINA B2    | 0.05 mg  |
| VITAMINA B5    | 0.20 mg  |
| NIACINA        | 0.45 mg  |

ADAPTADO DE: LOMELI (1987)

**CUADRO 9. DISTRIBUCION DE CAROTENOIDES EN CHILE  
(*Capsicum annum*) EN DOS ESTADOS DE MADUREZ.**

| CAROTENOIDE              | FRUTO VERDE      |       | ROJO MADURO      |       |
|--------------------------|------------------|-------|------------------|-------|
|                          | µg / g peso seco | %     | µg / g peso seco | %     |
| β-CAROTENO               | 54.9             | 24.0  | 271.8            | 15.4  |
| β-CRIPTOXANTINA          | 20.8             | 9.1   | 217.0            | 12.3  |
| CRIPTOCAPSINA            | -----            | ----- | 90.0             | 5.1   |
| LUTEINA                  | 79.9             | 34.9  | -----            | ----- |
| ANTERAXANTINA            | -----            | ----- | 162.4            | 9.2   |
| VIOLAXANTINA             | 33.8             | 14.8  | 125.3            | 7.1   |
| CAPSANTINA               | -----            | ----- | 587.7            | 33.3  |
| CAPSANTINA (5,6 EPOXIDO) | -----            | ----- | 30.0             | 1.7   |
| CAPSORRUBINA             | -----            | ----- | 181.7            | 10.3  |
| NEOXANTINA               | 39.1             | 17.1  | 35.3             | 2.0   |
| ZEAXANTINA               | -----            | ----- | 54.7             | 3.1   |
| <b>TOTAL</b>             | <b>228.5</b>     |       | <b>1755.9</b>    |       |

ADAPTADO DE CAMARA Y MONEGER (1978)



Chile Chilaca

# **ANEXO 2**

## **SOLUCIONES:**

### **i. PERFUSION CON COLAGENASA.**

Solución base (10 X): En 800 ml de agua bidestilada se disolvieron los siguientes compuestos uno por uno: NaCl 80 g, KCl 4.0 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.780 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.51 g, HEPES 23.8 g, rojo de fenol 0.06 g,  $\text{NaHCO}_3$  3.5 g. Se aforó a 1 litro y se esterilizó a 15 lb de presión durante 15 minutos. Se mantuvo en refrigeración.

SOLUCION DE GLUCOSA (10 X): Se disolvieron 9.0 g de glucosa y 1.9 g de EGTA en agua bidestilada, se aforó a 1 litro y se esterilizó a 10 lb de presión durante 10 minutos. Se mantuvo en refrigeración antes de su uso.

SOLUCION DE  $\text{CaCl}_2$  (10 X): Se disolvió 0.560 g de  $\text{CaCl}_2$  en 100 ml de agua bidestilada y se esterilizó a 15 lb de presión durante 15 minutos. Se mantuvo en refrigeración.

SOLUCION DE LAVADO (A) (1 L): En condiciones estériles, se tomaron 100 ml de la solución base, 100 ml de la solución de glucosa, se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 1 N estéril. Se mantuvo en refrigeración.

SOLUCION DE COLAGENASA (B) (1 L): En condiciones estériles, se tomaron 100 ml de la solución base, 10 ml de la solución de cloruro de calcio y se ajustó el pH a 7.2-7.4 con NaOH 1 N estéril. Se mantuvo en refrigeración. El día de uso se agregaron 50 mg de colagenasa tipo VI.

### **ii. MEDIO DE CULTIVO.**

Se disolvió el contenido de un frasco para 1 litro de medio Eagle modificado por Dulbecco (Sigma D-6780) en 800 ml de agua grado HPLC, se agitó sin calentar. Se agregaron 3.7 g de bicarbonato de sodio grado cultivo de células, se agitó hasta

dissolver. Se aforó a 1 litro y se filtró al vacío en condiciones estériles. Se alicuotaron y se ajustó el pH con CO<sub>2</sub> a través de agua y una trampa de algodón estériles. Se agregaron 150 µl de insulina (100 UI / ml) y 200 µl de penicilina estreptomina (Sigma P-7539) a cada 100 ml de medio. Si el medio se iba a utilizar con suero, se agregaban 10 ml de suero de bovino. Todo lo anterior se realizó bajo estrictas condiciones de esterilidad. Se mantuvo a 4°C, protegido de la luz.

### **iii. SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS).**

Para una solución 10 X se disolvieron en 800 ml de agua bidestilada los siguientes reactivos uno por uno: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro 2.3 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro 11.5 g, NaCl 90.0 g. Se ajustó el pH a 7.2-7.4 con NaOH ó HCl 1 N. Se aforó a 1 litro y se esterilizó a 15 lb de presión durante 15 minutos. Se mantuvo en refrigeración.

### **iv. SOLUCION PARA EL METODO DE MTT:**

SOLUCION DE MTT: Solución de 5 mg de MTT por ml de solución en PBS o medio de cultivo libre de suero.

SOLUCION DE DMSO-ETANOL: Se mezcló DMSO y etanol absoluto en partes iguales.

**v. SOLUCION MADRE DE DIETILNITROSAMINA:** Se preparó una solución 0.5 M de dietilnitrosamina.

### **vi. SOLUCIONES DE CAROTENOIDES .**

SOLUCION MADRE DE β-CAROTENO: Se preparó una solución 10 mM de trans β-caroteno en tetrahidrofurano.

SOLUCION MADRE DE LUTEINA: Solución 260 µM de luteína extraída del producto comercial en DMSO.

SOLUCION MADRE DE EXTRACTO DE CAROTENOIDES: Solución 173  $\mu$ M de extracto de carotenoides en DMSO.

**vii. SOLUCIONES PARA EL ANALISIS DE GLUTATION REDUCIDO (GSH).**

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS Y EDTA (SPEB): Se disolvieron 12.0 g de fosfato de sodio monobásico y 1.47 g de EDTA. Se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 1 N y se aforó a 1 litro con agua bidestilada.

SOLUCION DE ACIDO METAFOSFORICO al 25%: Se preparó el día de uso. Se disolvieron 2.5 g de ácido metafosfórico en 7.5 ml de agua bidestilada y se aforó a 10 ml totales.

SOLUCION DE ORTO-FTALDEHIDO: Se preparó el día de uso. Se disolvieron 2.0 mg de orto-ftaldehído en 2 ml de metanol.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRIS-HCl/KCl: Se preparó una solución de Tris base 0.2 M. Se tomaron 25 ml de esta solución y se añadieron 33.7 ml de HCl 0.1 N y 1.148 g de KCl. Se ajustó el pH a 7.2 con HCl ó KOH 1 N. Se aforó a 100 ml.

**viii. SOLUCIONES PARA EL ANALISIS GENOTOXICO.**

SOLUCION DE ACIDO TRICLORO ACETICO AL 10 % P/V.

SOLUCION DE ACIDO TRICLORO ACETICO AL 5 % P/V.

SOLUCION DE SDS AL 1 % P/V.

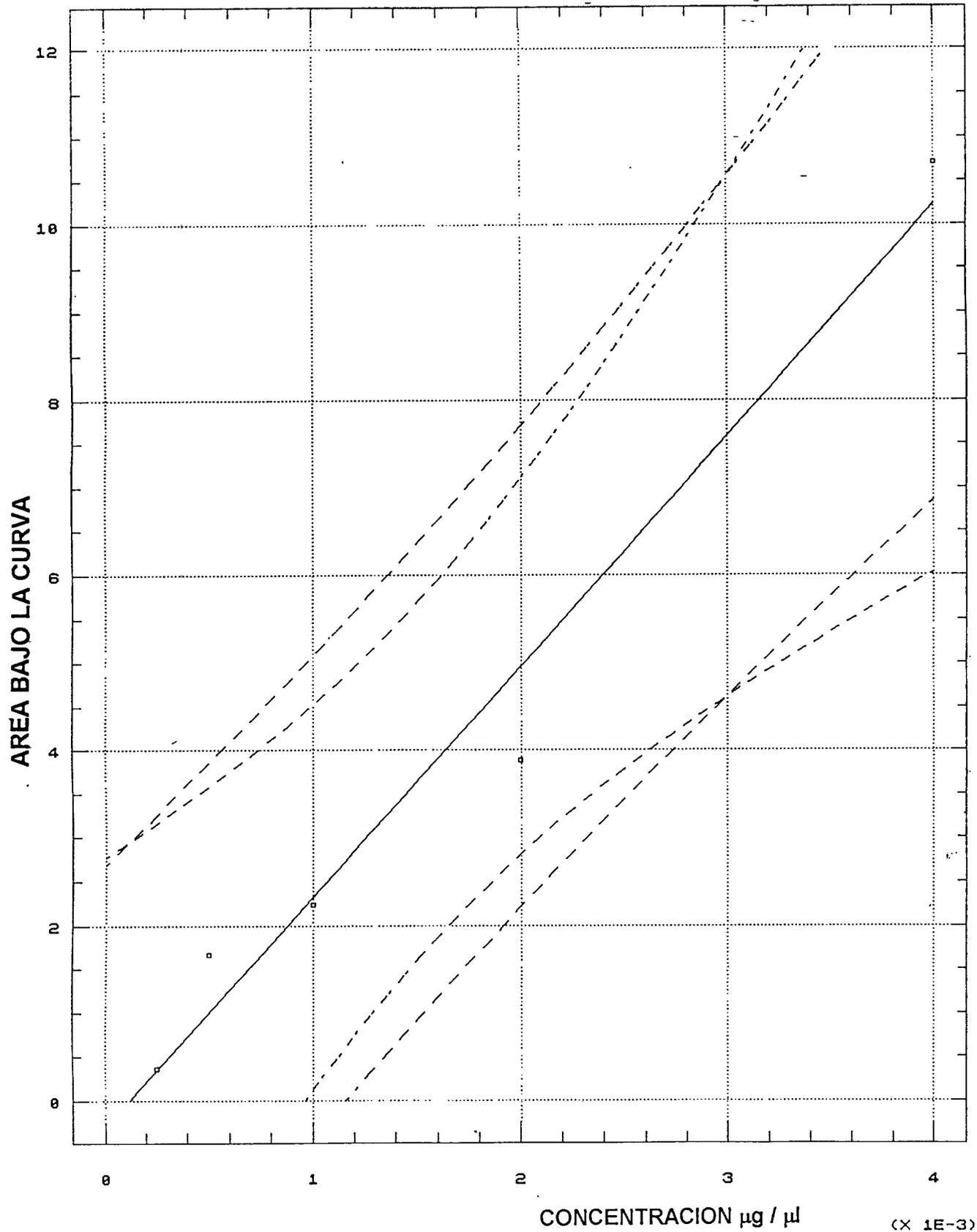
**ix. SOLUCION DE BRADFORD PARA LA DETERMINACION DE PROTEINA TOTAL.**

Se disolvieron 100 mg del reactivo Coomassie Azul Brillante G-250 en 50 ml de etanol al 95%. Se agregaron 100 ml de una solución de ácido fosfórico al 85%

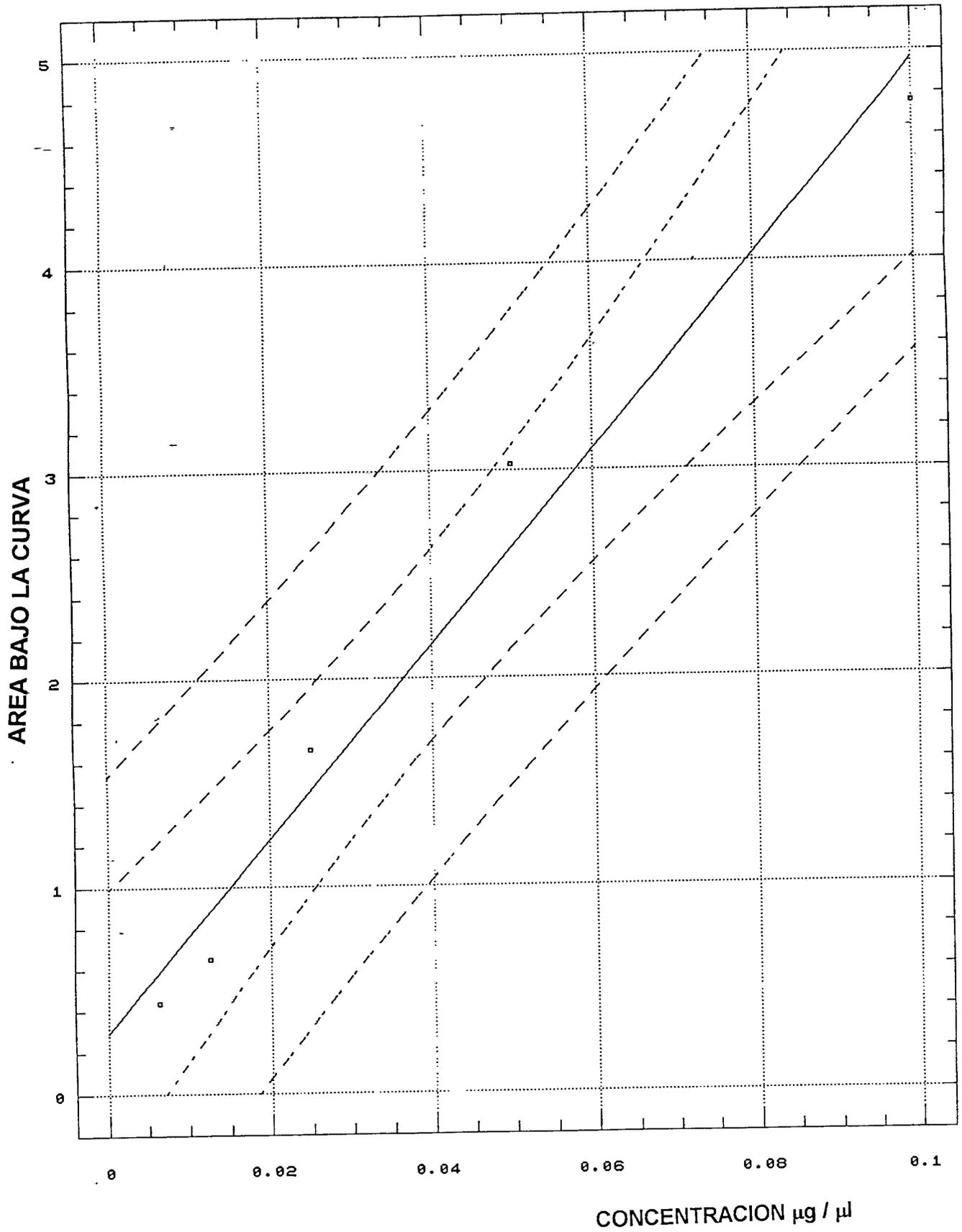
(p/v). Se aforó a 1 litro. Las concentraciones finales del reactivo fueron: 0.01% (p/v) del reactivo Coomassie Azul Brillante, 4.7% (p/v) de etanol y 8.5 % (p/v) de ácido fosfórico

# **ANEXO 3**

(X 100000)

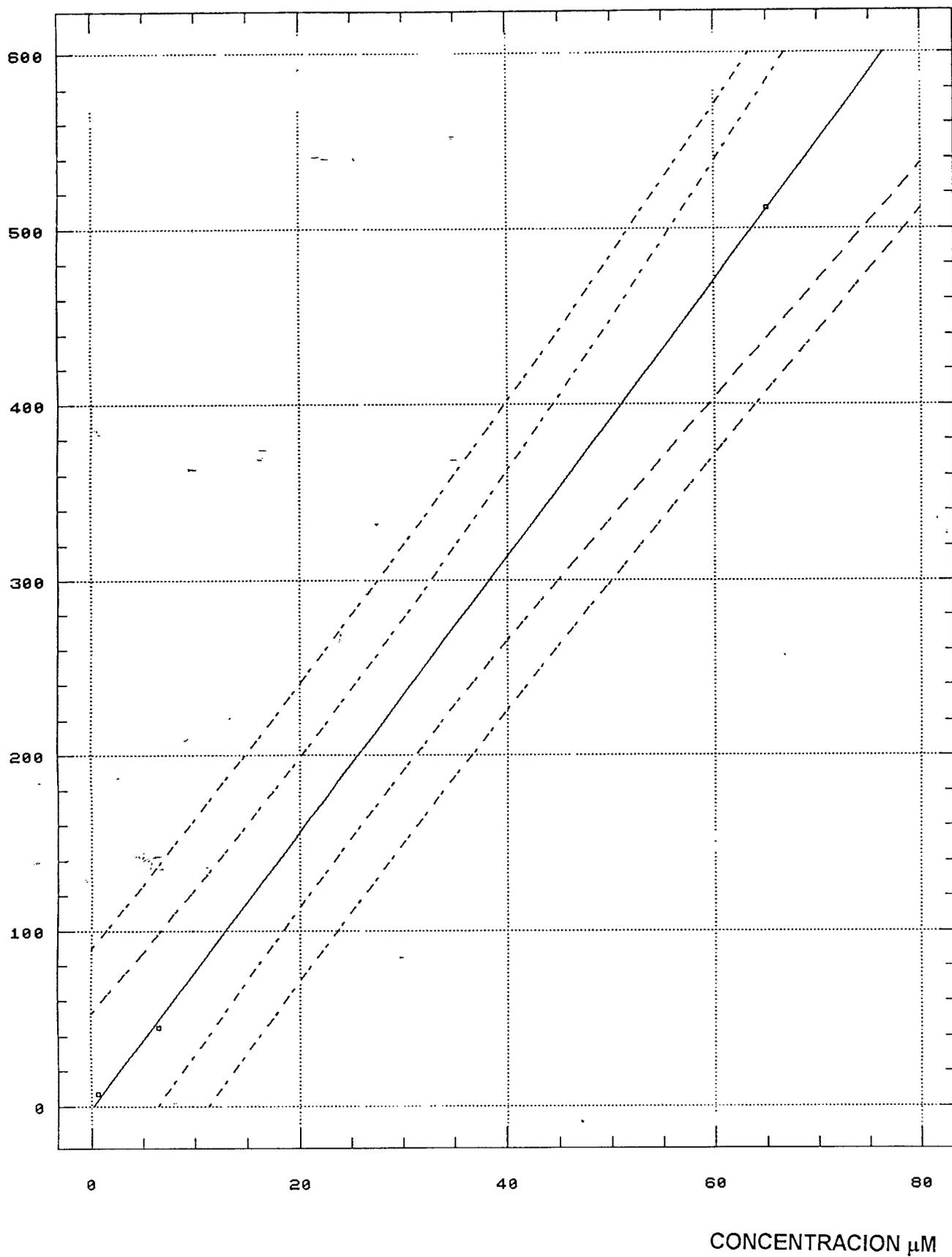


CURVA PATRON DE TRANS  $\beta$ -CAROTENO

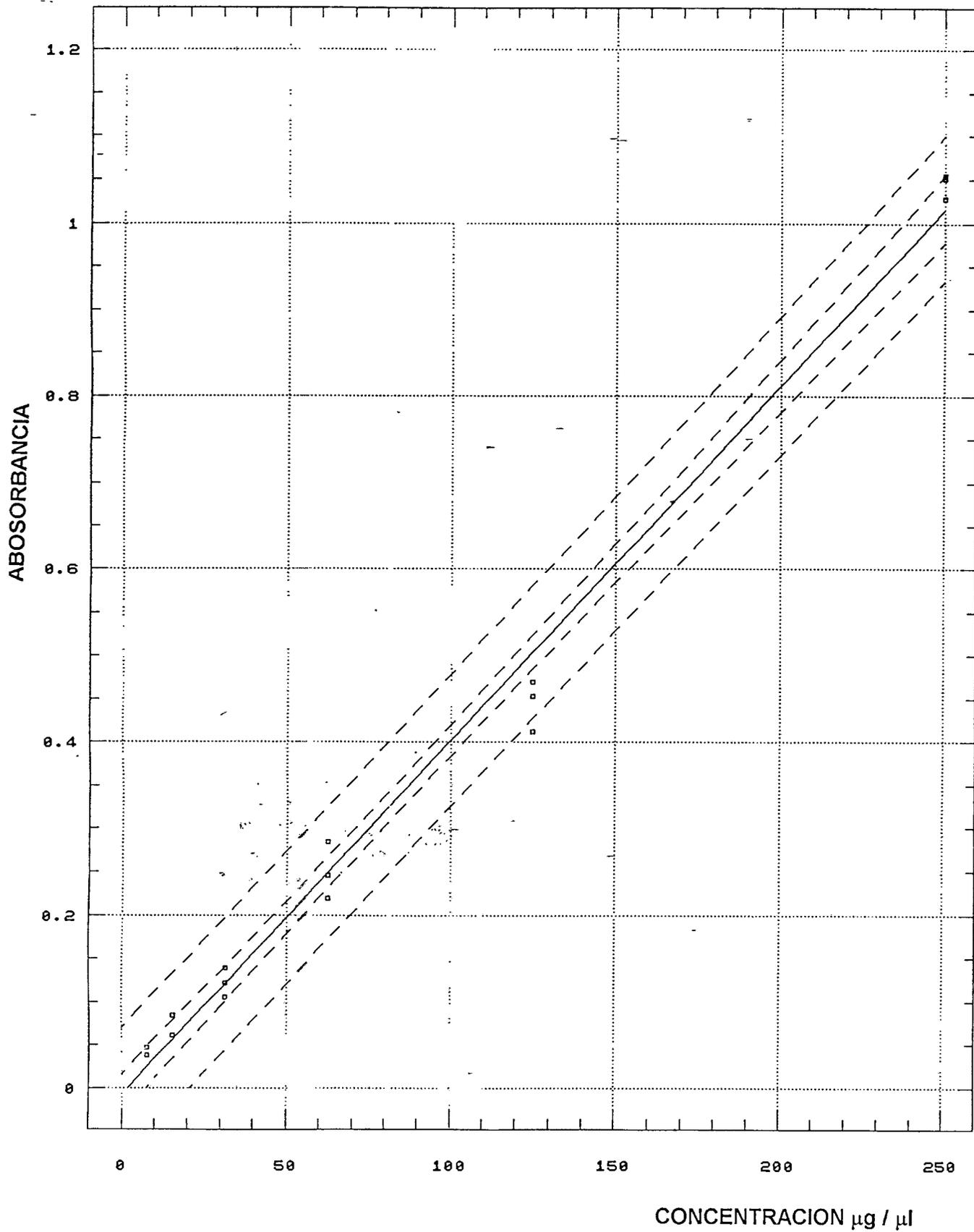


CURVA PATRON DE TRANS LUTEINA

FLUORESCENCIA



CURVA PATRON DE GLUTATION REDUCIDO



CURVA PATRON DE PROTEINA