

# Capítulo 12

## Antigenotoxicidad y citotoxicidad de alimentos

Romero-Jiménez M<sup>1</sup>, Anter J<sup>1</sup>, Lozano-Baena MD<sup>1</sup>, Tasset-Cuevas I<sup>1</sup>, Campos-Sánchez J<sup>1</sup>, Rhouda T<sup>1</sup>, Font R<sup>3</sup>, De Haro A<sup>3</sup>, Analla M<sup>2</sup>, Muñoz-Serrano A<sup>1</sup>, Alonso-Moraga A<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Dep. Genética, Edificio Gregor Mendel (C5), Campus Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; <sup>2</sup>Dep. Biology, Abdelmalek Essaadi University, PO Box 2121, 93002 Tetouan, Maroc; <sup>3</sup>Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba; Tel: 957 218674; Fax: 957 212072; CE: <sup>4</sup><ge1almoa@uco.es>

### RESUMEN

Los alimentos de origen vegetal son unos firmes candidatos para ser considerados como *alimentos funcionales* y jugar un papel en prevención y tratamiento de enfermedades degenerativa. Se han estudiado aceites de uso alimentario y esenciales, bebidas, plantas medicinales, plantas de consumo como *Borago officinalis*, *Brassica carinata* o *Raphanus sativus* cuya capacidad para acumular metales es bien conocida, y ciertos componentes activos de los alimentos citados. Se ha utilizado el sistema de Mutaciones y Recombinaciones Somáticas en células en proliferación de discos imaginales alares de *Drosophila melanogaster* (SMART) para determinar su seguridad alimentaria así como su papel en la protección del daño de ADN. Al mismo tiempo se analiza la potencia tumorigénica en líneas celulares promielocíticas humanas (HL-60) de las sustancias que previamente han sido detectadas como antimutagénicas frente a genotoxinas de tipo oxidativo. Se relacionan las respuestas antimutagénicas y citotóxicas de las sustancias ensayadas con su contenido en fenoles, glucosinolatos e isotiocianatos.

Palabras clave: antimutágenos, vegetales, *Drosophila melanogaster*, células HL-60.

### Introducción

El objetivo principal de la Toxicología Genética es asesorar sobre el daño genético causado por diferentes agentes ambientales. A este respecto, los alimentos están entre los elementos que más directa y fuertemente interaccionan con las células somáticas del cuerpo humano. Las bases de datos científicas nos ofrecen enormes cantidades de artículos experimentales de laboratorio, estudios clínicos o epidemiológicos que tratan sobre la anti/mutagenicidad y anti/carcinogenicidad de constituyentes de la dieta (Knasmüller y Verhagen, 2002). Muchas de las terapias recientes para paliar o prevenir las enfermedades degenerativas relacionadas con el cáncer incluyen el uso de preparados botánicos tradicionales. Aunque algunos de estos vegetales o de sus componentes pueden ser bioactivados y resultar produciendo cáncer, la mayoría de las comúnmente usadas son consideradas como productos comerciales saludables (Zhou *et al*, 2004).

Los datos epidemiológicos relacionan el origen del cáncer con procesos inflamatorios persistentes que están a su vez asociados a un exceso de radicales de oxígeno y nitrógeno. Las inflamaciones específicas están relacionadas con riesgo de cáncer localizado y una considerable cantidad de datos sugieren que los radicales de oxígeno y nitrógeno excretados por neutrófilos, macrófagos y linfocitos actúan como carcinógenos endógenos, y dan cuenta de parte del alto riesgo de cánceres asociados a inflamaciones (Fitzpatrick, 2001). Un exceso de especies reactivas de oxígeno (EROS) produce estrés oxidativo, siendo la oxidación el proceso que más contribuye al daño genético basal (Burcham, 1999). El peróxido de hidrógeno puede actuar bien directamente sobre el ADN o modulando la transcripción y

suprimiendo rutas de reparación genómicas. Allen y Tresini (2000) han descrito más de doscientos efectos del peróxido de hidrógeno sobre más de cien genes. Tal exceso de EROS puede ser detoxificados por sistemas enzimáticos u no enzimáticos que modularán algunos de sus efectos (Kruck, 1998).

Muchas sustancias vegetales protegen de los xenobióticos bien induciendo enzimas detoxificadoras, bien inhibiendo enzimas oxidativas o bien detoxificando directamente al mutágeno. Aunque el conocimiento de mecanismos específicos de acción de muchos fitoquímicos es todavía pobre, debido a la gran variedad de carcinógenos potenciales contenidos en la dieta, tales xenobióticos sólo pueden ser evitados en teoría. Una estrategia alternativa está teniendo lugar actualmente, cual es consumir anticarcinógenos y Antimutágenos deliberadamente que puedan prevenir o revertir algunos de los efectos producidos por los carcinógenos.

El objetivo general de nuestros trabajos es realizar un barrido en los componentes comunes de la dieta mediterránea para localizar sustancias antimutagénicas que puedan ser además citotóxicas frente a células cancerosas en proliferación. Para ello se utiliza el sistema de detección de mutágenos/antimutágenos eucariótico de discos imaginales alares en proliferación de *Drosophila melanogaster* y cultivos *in vitro* de células cancerosas para llevar a cabo ensayos de citotoxicidad. Un tipo y otro de pruebas complementan la información requerida para poder aconsejar sobre el consumo de ciertos alimentos como funcionalmente beneficiosos.

### Metodología

1. *Test de Mutaciones y Recombinaciones Somáticas de*

## *Drosophila*

El test SMART está basado en la detección de pérdida de heterocigosidad en células somáticas de discos imaginales alares en proliferación de *Drosophila melanogaster*. Dicha pérdida de heterocigosidad puede deberse a mutación puntual, delección, no disyunción o recombinación somática entre otros eventos. Se usan dos marcadores (*mwh* y *flr*) que afectan al número y forma de tricomas por célula del ala del individuo adulto.

### 1.1 Estirpes de *Drosophila*

Se han usado las siguientes líneas de *Drosophila melanogaster*, con marcadores genéticos en el brazo izquierdo del cromosoma 3.

- 1.- *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep bx<sup>34e</sup> e<sup>s</sup> Bd<sup>S</sup>*
- 2.- *mwh/mwh*,

### 1.2. Cruzamientos

Se realizan los cruzamientos con moscas de al menos un día de edad y se mantienen 48 horas antes de iniciar la puesta de huevos. Se pueden utilizar dos tipos de cruzamiento:

- 1º Cruzamiento estándar:  
♀ *mwh/mwh* x ♂ *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>*
- 3º Cruzamiento estándar:  
♀ *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>* x ♂ *mwh/mwh*

Los individuos descendientes de estos cruzamientos son transheterocigotos para los marcadores utilizados: *mwh/flr<sup>3</sup>* y *mwh/Bd<sup>S</sup>*

### 1.3. Sincronización de las larvas a tratar

Se realizan puestas de huevos en levadura fresca hidratada durante un tiempo limitado de 8 horas y se dejan desarrollar las larvas hasta los tres días  $\pm$  4 horas de edad. De este modo la edad de las larvas a tratar tendrá un rango máximo de 3 días  $\pm$  4 horas. Después de este tiempo las larvas son retiradas del medio utilizando una solución de cloruro sódico al 20% y finalmente son lavadas con agua de modo que están listas para ser tratadas.

### 1.4. Tratamientos

#### 1.4.1. Ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad

Las pruebas de genotoxicidad fueron llevadas a cabo siguiendo el protocolo general de Graf et al (1983) sobre larvas de 72 horas  $\pm$  4 horas que son tratadas con concentraciones crecientes del compuesto o mezcla de compuestos a ensayar. Durante aproximadamente 48 horas, las larvas son alimentadas en el medio asignado hasta que pasan al estado de pupa.

Después de emerger de este estado, los adultos resultantes fueron recogidos y almacenados en solución de etanol al 70%. Las moscas analizadas rutinariamente en el ensayo SMART de alas son las transheterocigotas *mwh/flr<sup>3</sup>*. Las moscas tratadas *mwh/Bd<sup>S</sup>* son fácilmente identificables por el carácter aserrado ("Beaded-Serrate"; (*mwh/Bd<sup>S</sup>*) de las alas y son analizadas solamente cuando se quiere cuantificar la proporción de la actividad genotóxica debida a la recombinación.

### 1.5. Análisis microscópico de las alas

Las alas de *Drosophila melanogaster* se componen de dos capas de células, dorsal y ventral. En las moscas de

fenotipo salvaje, cada una de estas células emite un único pelo. El análisis de las alas se realiza bajo un microscopio a 400 aumentos y consiste en localizar clones o células individuales que manifiesten un fenotipo mutante *mwh* o "Flare", sobre el fondo de células de fenotipo salvaje. Las manchas que aparecen en las alas transheterocigóticas son agrupadas en 3 diferentes categorías:

-Manchas simples pequeñas: correspondientes a una o dos células que exhibían el fenotipo *mwh*. Esta categoría corresponde a delecciones, mutaciones genéticas y recombinación somática entre los 2 genes marcadores, ocurridas durante la última fase mitótica.

- Manchas simples grandes: correspondientes a 3 o más células que muestran los fenotipos *mwh* o *flr<sup>3</sup>*. Esta categoría corresponde al mismo tipo de mutación y recombinación que la categoría anterior pero con la diferencia de que ocurre más tempranamente durante el desarrollo larvario.

-Manchas gemelas: corresponden a dos clones yuxtapuestos, uno que muestra el fenotipo *mwh* y el otro con el fenotipo *flr<sup>3</sup>*. Esta categoría corresponde únicamente a fenómenos de recombinación entre el gen *flr<sup>3</sup>* y el centrómero.

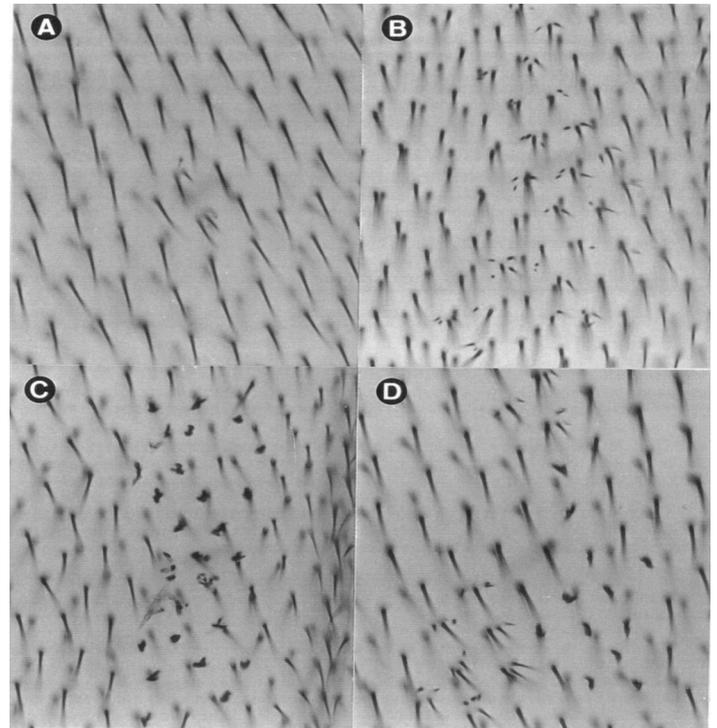


Figura 1. Vista a 400x de los diferentes tipos de mutaciones. (A) Manchas simples pequeñas *mwh* (1 ó 2 células); (B) Manchas simples grandes *mwh* (>2 células); (C) Manchas simples grandes *flr<sup>3</sup>*; (D) Manchas gemelas.

### 1.6. Evaluación de los datos y análisis estadístico

Los resultados del test SMART se expresan como frecuencia relativa del número de manchas por ala. El análisis de los datos está basado en la comparación de las frecuencias observadas entre las series tratadas y los controles. El número total de manchas y la suma de las tres categorías fueron también evaluadas. Se utilizó un procedimiento de multidecisión para determinar si los resultados eran positivos, negativos o por el contrario no se podían establecer conclusiones, dependiendo de la frecuencia con la que se presentaban las manchas en las

alas. En este trabajo se utilizó el test para comparar los controles y los tratados.

El porcentaje de inhibición ejercido por los compuestos fenólicos simples o la combinación de ambos fue calculado a partir de la frecuencia total con la que se daban las manchas por ala:

Porcentaje de Inhibición =  $100 \times [(genotoxina\ sola - tratamiento\ combinado) / genotoxina\ sola]$ .

2. Ensayos de citotoxicidad

2.1. Cultivos celulares

Las líneas mielomonocíticas HL60, extensamente usada como modelo en ensayos de citotoxicidad fue suministrada por el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Córdoba, España. Las células HL60 fueron cultivadas de forma rutinaria usando una suspensión en medio RPMI que contiene L-glutamina (G7513, Sigma) a 0,200 g/l, una mezcla de antibióticos (Penicilina / Estreptomicina / Anfotericina, A5955, Sigma) y suplementado con un 10% de suero fetal bovino (cat. nº S01805, Linus) inactivado por calor, en una atmósfera humidificada al 70%, con un 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37°C. Para los ensayos, las células son sembradas a una densidad de 5 x 10<sup>4</sup> células/ml e incubadas en placas con pocillos de 2 ml. Los compuestos a ensayar son filtrados y añadidos entonces y a las 72 h se cuentan las células.

2.2. Ensayo de exclusión del azul tripán

Se toman alícuotas de 10 µl de suspensión celular y son teñidas con 10 µl de solución azul tripán y en una cámara de Neubauer bajo un microscopio invertido se cuentan las células viables y no viables. Las no viables se teñirán con dicho colorante y las viables no. La viabilidad celular a las 72 horas es calculada de la siguiente forma: % de viabilidad =  $100 \times \text{células no teñidas} / \text{células no teñidas} + \text{células teñidas}$ . La figura 3 muestra un ejemplo del seguimiento de cultivos sin tratar (control) y tratados a diferentes dosis de una determinada planta en el que se han llevado a cabo conteos cada 24 horas.

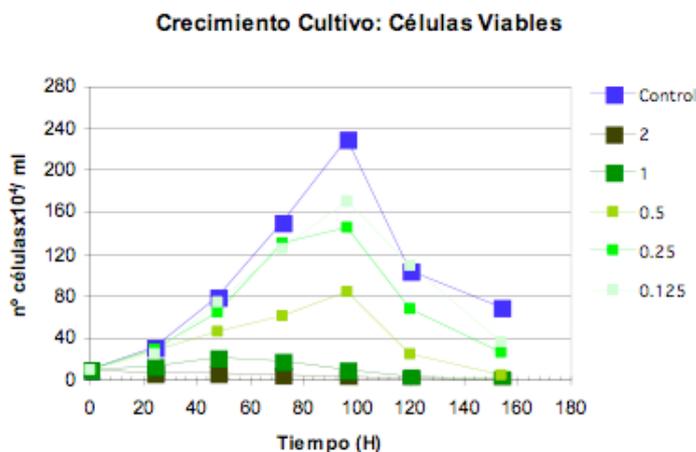


Figura 2. Crecimiento tumoral de células HL-60 en cultivos control y tratados con diferentes concentraciones de Brassica carinata.

Resultados

La figura 3 muestra los resultados obtenidos para los ensayos de genotoxicidad del peróxido de hidrógeno en el sistema eucariótico de células somáticas de discos

imaginales alares de *Drosophila melanogaster*. El peróxido de hidrógeno ha resultado altamente mutagénico en dicho sistema como ya demostraron Romero-Jiménez et al, 2005). Por tanto se considera apropiado su uso como control positivo de mutágeno de tipo oxidativo para el resto de experiencias de antigenotoxicidad.

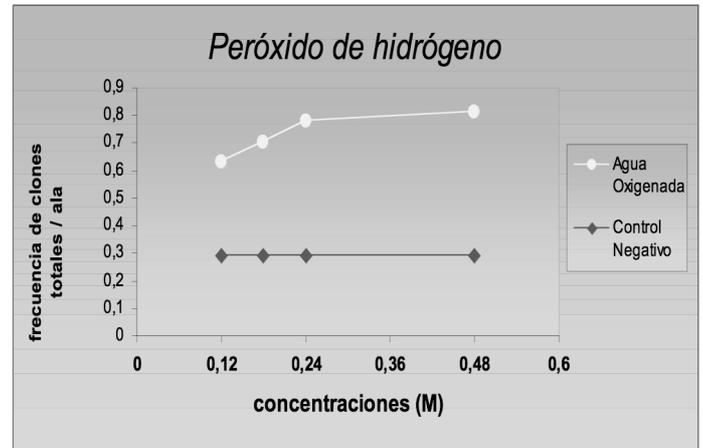


Figura 3. Potencia mutagénica del peróxido de hidrógeno en el test SMART.

La versatilidad y adecuación del test SMART es muy alta, debido a que se pueden ensayar tanto sustancias simples, como mezclas complejas naturales (alimentos, bebidas) o mezclas artificiales constituidas por mutágenos y antimutágenos. Las sustancias que ha ensayado nuestro grupo de investigación para detectar su actividad genotóxica, antigenotóxica o tumorigénica son muy variadas.

- Los antiparasitarios derivados del anillo nitrofurano usados para combatir infecciones por parásitos diversos suelen ser altamente genotóxicos y además inducir cáncer; nuestro grupo trabajó con ciertos de estos derivados encontrando que algunos de los sintetizados recientemente pero no comercializados no eran genotóxicos, aunque sí seguían cumpliendo muy eficazmente su acción inhibitoria del parásito *Trypanosoma cruzi* que provoca la enfermedad de Chagas (Alonso-Moraga y Graf, 1989).
- Las bebidas alcohólicas derivadas de la vid con denominación de origen y controles de calidad estrictos (vinos tintos, blancos y brandy) así como algunos de los fenoles contenidos en ellas (rutina y quercitina) son, en general, seguros (no genotóxicos) con la excepción de un vino sin denominación de origen (Graf et al, 1994).
- Los plaguicidas (herbicidas, fungicidas e insecticidas) también pueden ser ensayados mediante el sistema SMART (Osaba et al, 1999; Osaba et al., 2002)
- Nuestro grupo ha conseguido ensayar la actividad genotóxica y antigenotóxica de sustancias oleosas como son los aceites alimentarios, esenciales y ciertos de sus componentes, encontrando que la mayoría de ellos no sólo son seguros en la alimentación sino que tienen un importante papel en el mantenimiento de la integridad genómica, es decir, son antigenotóxicos (Rojas-Molina et al, 2005; Campos, 2003; Idaomar et al, 2002). La única excepción con resultados de alta genotoxicidad es el aceite de soja debido a su alto contenido en ácido linoleico.
- Las plantas medicinales y ciertos condimentos

alimentarios encierran un elevado potencial como nutraceuticos que está en función de su contenido fenólico. Estudios de antigenotoxicidad han demostrado que las plantas medicinales más comúnmente usadas en todo el mundo son antigenotóxicas, fundamentalmente debido a la capacidad antioxidante de sus fenoles (Romero-Jiménez et al, 2005; El-Hamss et al, 1999; El-Hamss et al, 2002).

Tabla 1. Resumen de los resultados de antigenotoxicidad y actividad tumorocida de diversos alimentos, nutraceuticos y moléculas simples contenidos en ellos.

Sustancia	Antígeno toxicidad	Actividad tumorocida
<b>Aceite oliva virgen extra</b>	■	■
Trioleína		
Tirosol		
Hidroxitirosol		
Escualeno		
Aceite de orujo	■	
Aceite de soja	▲	
Aceite de girasol	■	
Aceite de lino	■	
<b>Ac. borraja</b>		
Ácido γ-linolénico	■	
Aceites esenciales labiateae	■	
<b>Manzanilla</b>		
<b>Uña de Gato</b>		
Apigenina	■	
Ácido protocateico	■	
Bisabolol	■	
<b>Tila</b>		
<b>Valeriana</b>		
Ácido valerénico	n.d.	0
Valepotriatos	n.d.	■
Limoneno	n.d.	■
Quercitina	n.d.	■
<b>Menta</b>		
<b>Poleo</b>		
Mentol	n.d.	■
Pulegona	n.d.	■
Carvacrol	n.d.	■
<b>Borraja de flor azul</b>		
<b>Borraja de flor blanca</b>		
Ácido rosmarínico	■	■
Ácido siríngico	■	0
Ácido sinápico	■	0
<b>Mostaza etiope</b>		
<b>Rábano raíz</b>		
<b>tratado con metales</b>	▲	■
Sinigrina	■	0
Sinigrina + mirosinasa	■	■

■: posee actividad antigenotóxica en el sistema SMART de *Drosophila melanogaster* o tumorocida frente a células tumorales HL-60, en diferentes intensidades; ▲: es genotóxico; n.d.: no existen datos; 0: no posee actividad antigenotóxica o tumorocida.

● También los alimentos derivados de borragináceas o de crucíferas son altamente eficaces frente al daño al ADN producido por sustancias de tipo oxidativo. La planta comestible *Borago officinalis*, la mostaza etiope (*Brassica carinata*) y el rábano (*Raphanus sativa*) son antimutagénicas. Esta potencia antimutagénica es debida a compuestos de tipo fenólico (Lozano-Baena et al, 2005) como a los glucosinolatos o sus productos de hidrólisis los isotiocianatos contenidos fundamentalmente en las crucíferas (Lozano-Baena et al, 2005; Villatoro-Pulido et al, 2007).

La Tabla 1 muestra un resumen de resultados obtenidos por nuestro grupo para alimentos, nutraceuticos y ciertos

componentes en los ensayos SMART y de citotoxicidad frente a células tumorales HL-60. La mayoría de ellos son antigenotóxicos y tumorocidas. Se destaca el aceite de soja que es altamente mutagénico, con tasas superiores al control positivo peróxido de hidrógeno, así como la raíz de *Raphanus sativa* que previamente ha bioacumulado metales (metaloides) tales como Pb, Cd y As. Al ensayar sustancias complejas como alimentos, plantas medicinales o nutraceuticos y sus componentes activos más importantes, se puede discriminar cuál de ellos es el que le confiere sus propiedades saludables respecto a los dos grandes objetivos que nos planteamos: el papel de dichos compuestos en la protección del ADN frente a xenobióticos como las especies reactivas de oxígeno y su potencia tumorocida. Ambas propiedades son las deseables en los alimentos que diariamente el hombre consume de forma crónica.

**Agradecimientos**

Estos trabajos han sido financiados por la Universidad de Córdoba (Programa Propio) y por la Dirección General de Asuntos Europeos y Cooperación exterior y la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresas de la Junta de Andalucía.

**Referencias**

Allen RG, Tresini M (2000): Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28: 463-499.

Alonso-Moraga A, Graf U (1989): Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis* 4: 105-110.

Burcham PC (1998): Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 13: 287-305.

Campos J (2003): Evaluación genotoxicológica del Aceite de oliva y de los subproductos derivados de su elaboración. Tesis Doctoral, Univ. Córdoba.

El-Hamss R, Idaomar M, Alonso-Moraga A, Muñoz-Serrano A (2002): Antimutagenic properties of bell and black peppers. *Food Chem. Toxicol* 41: 41-47.

El Hamss R, Idaomar M, Analla M, Muñoz-Serrano A, Sanchez-Campos J, Alonso Moraga A (1999): A dose dependent antigenotoxic effect of turmeric. *Mutat Res* 446: 135-139.

Fitzpatrick FA (2001): Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Immunopharmacol* 1: 1651-1667.

Graf U, Alonso-Moraga A, Castro R, Diaz-Carrillo E (1994): Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Food Chem Toxicol* 32: 423-430.

Graf U, Juon H, Katz AJ, Frei H, Würzler FE (1983): A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutat Res* 120: 233-239.

Idaomar M, El Hamss R, Bakkali F, Mezzoug N, Zhiri A, Baudoux D, Muñoz-Serrano A, Liemans V, Alonso-Moraga A (2002): Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 513: 61-68.

Knasmüller S, Steinkellner H, Majer BJ, Nobis EC, Scharf

- G, Kassie F (2002): Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. *Food Chem Toxicol* 40: 1051-1062.
- Kruk I (1998): "Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species". Springer-Verlag (Berlin).
- Lozano-Baena MD, Tasset I, De-Haro A, Muñoz-Serrano A, Alonso-Moraga A (2005): Tumoricide and antigenotoxic effects of olive oil, seed oils and fresh plant of *Borago officinalis* and *Brassica carinata*. International Conference on Industrial Crops and Rural Development. AAIC Annual Meeting.
- Osaba L, Aguirre A, Alonso-Moraga A, Graf U (1999): Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 439: 49-61.
- Osaba L, Rey M J, Aguirre A, Alonso A, Graf U (2002): Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*: role of nitrosation. *Mutat Res* 518: 95-106.
- Rojas-Molina M, Campos-Sánchez J, Analla M, Muñoz-Serrano A, Alonso-Moraga A (2005): Genotoxicity of vegetable cooking oils in the *Drosophila* wing spot test. *Env Mol Mutag* 45: 90-95.
- Romero-Jiménez M, Campos-Sánchez J, Analla M, Muñoz-Serrano A, Alonso-Moraga A (2005): Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat Res* 585: 147-155.
- Villatoro-Pulido M, del Río-Celestino M, De Haro-Bravo I, Font R, de Haro-Bailón A, Alonso-Moraga A (2007): genotoxicity testing of arsenic, lead and cadmium in radish plants grown on polluted soils. 14th International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region.
- Zhou S, Koh H-L, Gao Y, Gong Z-Y, Lee EJD (2004): Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. *Life Sciences*. 74: 935-968.