



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

GRADO EN BIOLOGIA

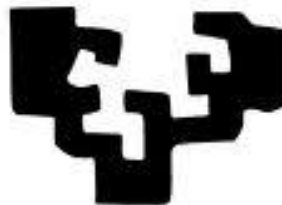
TRABAJO DE FIN DE GRADO

Efecto de 6 antioxidantes frente a
la toxicidad del DBPDE en
células XEM2

Aida Villarroel

Leioa, Julio 2013

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ÍNDICE	páginas
Resumen/Abstract	3-4
Introducción	5-12
-PAHs y activación metabólica	5-6
-DBPDE	7-8
-Daño oxidativo y su papel en enfermedades crónicas	8-9
-Antioxidantes	9-12
Coenzima Q10	10-11
Butil hidroxianisol	11
Silibin	11
Licopeno	12
Turmérico	12
6-gingerol	12
-Objetivo	13
Materiales y Métodos	13-17
-Reactivos	13
-Línea Celular	13-14
-Ensayo de mutación HPRT	14-17
-Análisis Estadístico	17
Resultados	17-19
Discusión	19-22
-Citotoxicidad y Mutagenicidad del DBPDE	19
-Efecto protector de CoQ10 y 6-gingerol	19-20
-BHA, silibin, licopeno y turmérico	20-22
Referencias	22-25

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son un grupo de compuestos mutagénicos a los que los seres vivos estamos expuestos continuamente. En la primera fase del metabolismo de estos xenobióticos se generan epóxidos, intermediarios reactivos, capaces de generar aductos con el DNA produciendo lesiones en el material genético. Además, también se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan estrés oxidativo dañando las células. Este tipo de lesiones puede conducir a la aparición de cáncer y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la distrofia lateral amiotrófica. Ciertos compuestos denominados antioxidantes tienen capacidad de combatir estos radicales reactivos. Este estudio tiene como objetivo analizar el efecto de seis antioxidantes (Coenzima Q10, butil hidroxianisol, silibin, licopeno, turmérico y 6-gingerol) frente a la toxicidad de uno de estos intermediarios reactivos, el (\pm)-anti-11, 12-dihidróxido-13,14-epóxido-11,12,13,14-tetrahidrodibenzo[a, l]pireno (DBPDE) en células XEM2 de mamífero. Se empleó el ensayo de mutación HPRT para determinar la tasa de supervivencia y la frecuencia de mutación de las células después de ser tratadas con el DBPDE y los antioxidantes. La toxicidad del DBPDE se comprobó y se observó dos posibles efectos para los antioxidantes. Por un lado, la CoQ10 y el 6-gingerol mostraron un efecto protector frente al PAH. Sin embargo, los otros antioxidantes no presentaron efecto protector. El BHA, el silibin, el licopeno y el turmérico presentaron una toxicidad similar a la del DBPDE. Esto puede ser debido a que los antioxidantes son específicos en el tipo de radicales que neutralizan y a la dosis empleada. Los antioxidantes solo tienen efecto protector cuando se emplea su dosis óptima. En otras concentraciones pueden ser incluso dañinos.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of mutagenic compounds that living organisms are daily exposed to. Cells have each own mechanisms to detoxify these compounds and eliminate them. The biotransformation of these substances are grouped in the xenobiotic metabolism. In the xenobiotic metabolism some reactive

intermediates called epoxides are formed. Epoxides can generate DNA adducts producing some lesions on the genetic material. Moreover, reactive oxygen species (ROS) are also formed, which lead to oxidative stress and cause cellular damage. That kind of lesions can lead to the development of certain diseases such as cancer or neurodegenerative diseases as Alzheimer, Parkinson disease and lateral amyotrophic disease. Certain compounds known as antioxidants are able to act towards these reactive radicals. The aim of this study is to analyse the effect of six antioxidants (Coenzyme Q10, butylated hydroxyanisole, silibin, lycopene, turmeric and 6-gingerol) against the toxicity of one of these radicals, the (±)-anti-11,12-dihydroxy-13,14-epoxide-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[a, l]pyrene (DBPDE), on XEM2 mammalian cells. The HPRT-mutation assay was used to determine cell survival rate and the mutation frequency after treating them with DBPDE and antioxidants. DBPDE toxicity was checked and two possible effects were found out for antioxidants. On one hand, CoQ10 and 6-gingerol showed a protective effect against PAH. However, the other antioxidants did not show it. BHA, silibin, lycopene and turmeric showed a toxicity similar to DBPDE. This can be due to the specificity of the antioxidants to scavenge reactive radicals, and also due to the dose used. Antioxidants only have protective effect when the optimal dose is used. Other concentrations can be even damaging.

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos estamos expuestos constantemente a lesiones en el DNA. Entre estas fuentes diarias de daño encontramos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos agentes tienen facilidad para inducir lesiones que interfieren en la replicación normal del DNA, porque pueden distorsionar la estructura del mismo, incorporándose en él o modificando sus bases. Todo esto altera la estabilidad genómica favoreciendo fenómenos de carcinogénesis.

PAHs y activación metabólica

Los PAHs son un grupo de compuestos orgánicos que actualmente están recibiendo gran atención debido a su ubicuidad en la naturaleza y a su potencial carcinogénico. Estos tóxicos se forman como resultado de la combustión incompleta de la materia orgánica a temperaturas elevadas. Están presentes en los alquitranes, en el tubo de escape de vehículos, en el humo del tabaco, en incendios forestales y también en alimentos, como contaminantes depositados del aire y como subproductos generados durante el procesado de los alimentos a altas temperaturas.

El PAH más estudiado es el Benzo[a]pireno ya que da lugar a metabolitos carcinogénicos y mutagénicos (Mahadevan *et al.*, 2001).

Químicamente, los PAHs son un amplio grupo de compuestos altamente lipofílicos. Estos compuestos difieren en estructura, tamaño y actividad biológica, pero todos ellos consisten en dos o más anillos bencénicos condensados.

Las estructuras aromáticas presentes en estos compuestos parecen ser las responsables de su toxicidad, pero para poder causar daño deben ser activados (Lagerqvist, 2008).

La activación metabólica de estos compuestos se lleva a cabo a través del metabolismo de xenobióticos. Los seres vivos son capaces de catalizar una serie de reacciones en las que los PAHs sufren biotransformación. Durante estas reacciones se generan

intermediarios metabólicos altamente reactivos que pueden inducir la aparición de mutaciones en el DNA (Fig. 1), (Dreij *et al.*, 2004).

El metabolismo de xenobióticos se divide en dos fases a través de las cuales se busca hacer hidrosolubles estos tóxicos lipofílicos para que puedan ser excretados. En la fase I, las enzimas del citocromo P450 desempeñan un papel crucial. En esta primera fase participan oxidasas, epóxido hidrolasas y otras enzimas que catalizan diversas reacciones químicas para detoxificar xenobióticos empezando a hacerlos más solubles. El P450 activa los PAHs al oxidarlos para crear compuestos polares, que son especies reactivas capaces de interactuar con macromoléculas celulares como ácidos nucleicos y proteínas. Los diol-epóxidos (PAH-DE) son uno de estos intermediarios que reaccionan con el DNA generando aductos con la guanina y la adenina (Lagerqvist *et al.*, 2008).

Además, el metabolismo de los PAHs también da lugar a la formación de ROS que incrementan la peroxidación de los lípidos de la membrana celular, producen daño oxidativo en las proteínas y en el DNA y, como consecuencia mutagénesis que perjudica el desarrollo, crecimiento y supervivencia de las células (Zheng *et al.*, 2011).

Según la estructura y posición del grupo epóxido, los PAHs pueden clasificarse en PAH-DE con región fiordo o con región bahía. Los PAH-DE con región fiordo tienen una estructura ligeramente más flexionada que los PAH-DE con región bahía. Esto se debe al impedimento estérico en la región de epoxidación. Las diferencias entre estos grupos tienen implicación en la potencial toxicidad de los compuestos. Estudios anteriores muestran que los aductos resultantes de los PAH-DE región fiordo tienen una mayor flexibilidad que les permite eludir la vía de reparación por excisión de nucleótidos (NER) y debido a esto son más reactivos y mutagénicos contra el DNA (Lagerqvist *et al.*, 2008).

En la fase II del metabolismo de biotransformación están implicadas sulfatasas, glutatión transferasas y otras enzimas que intervienen en reacciones de conjugación y que actúan dando lugar a compuestos hidrosolubles que pueden ser excretados a través de la orina o de la bilis (Liska, 1998).

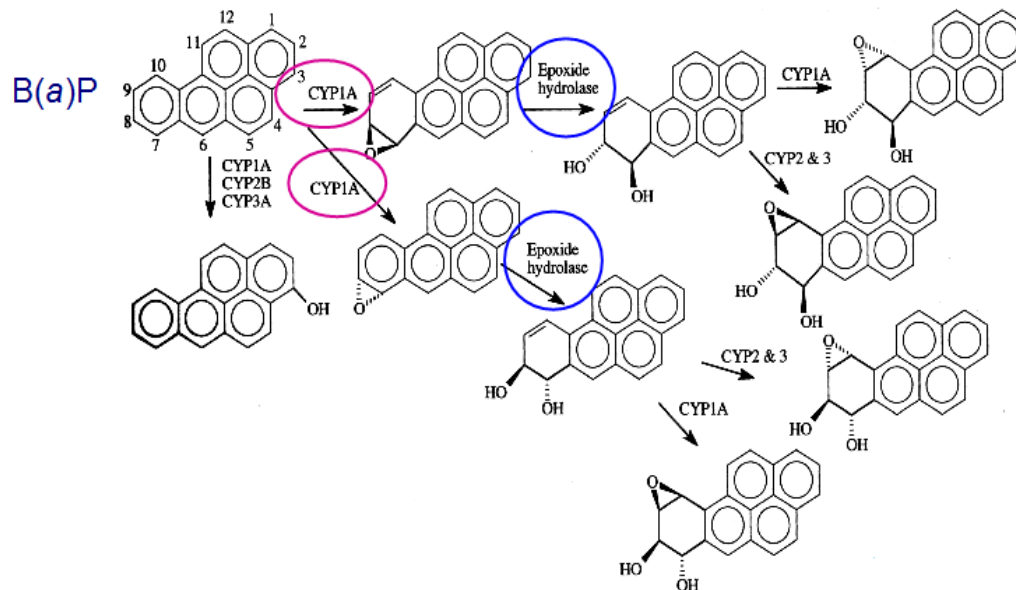


Figura 1.- Activación del DBP. Formación de intermediarios reactivos.

DBPDE

El DBPDE, (\pm)-anti-11,12-dihidróxido-13,14-epóxido-11,12,13,14-tetrahidrodibenzo [a,l]pireno (Fig. 2), es un diol-epóxido derivado del dibenzo[a,l]pireno con región fiordo, lo que lo convierte en un compuesto altamente mutagénico. EL DBPDE ha sido empleado para este proyecto dado que estudios anteriores muestran que los epoxidos con región fiordo son más tóxicos y mutagénicos que los de región bahía debido a su capacidad para eludir al sistema NER de reparación de lesiones en el DNA (Lagerqvist *et al.*, 2008).

También se ha propuesto recientemente que el DBPDE es capaz de formar enlaces no covalentes mediante uniones Van der Waals a una hebra del DNA y uniones covalentes a la otra hebra, lo que refuerza su habilidad para evadir al sistema NER. Además, el DBPDE genera aductos con la N6-deoxyadenosina lo que bloquea fuertemente la progresión de la horquilla de replicación (Lagerqvist *et al.*, 2008).

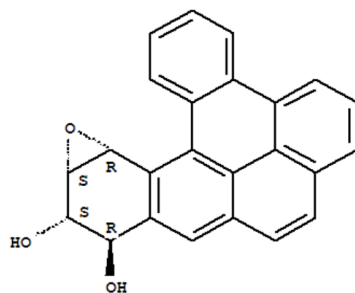


Figura 2.- Estructura química del (±)-anti-11,12-dihidróxido-13,14-epóxido-11,12,13,14-tetrahidrodibenzo[a, 1]pireno (DBPDE).

Daño oxidativo y su papel en enfermedades crónicas

El oxígeno es un elemento utilizado en muchas reacciones metabólicas, desde metabolismo celular hasta la señalización intercelular. Sin embargo, el oxígeno también puede causar estrés oxidativo al formar ROS.

Las ROS son altamente reactivas y pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, al dañar las membranas celulares y la actividad de las enzimas que intervienen en la reparación del DNA. Las ROS pueden ser generadas de manera endógena o provenir de fuentes exógenas (Kryston *et al.*, 2011). Algunas de las fuentes son la radiación ionizante, el metabolismo de xenobióticos, la actividad de mitocondrias y peroxisomas, y la activación inflamatoria celular (Klauning *et al.*, 2011).

La radiación ionizante genera la radiolisis de moléculas de agua generando así ROS. Los xenobióticos causan daño mediante su metabolismo directo dando intermediarios reactivos o mediante la activación de fuentes endógenas de ROS (Rice-Evans y Burdon, 1993). La mayoría de las ROS endógenas son producidas en la mitocondria, donde se generan radicales superóxidos muy reactivos involucrados en la inducción de carcinogénesis (Klaunig *et al.*, 2011).

El cáncer es una enfermedad que resulta de la acumulación de lesiones en el DNA sin reparar. Esto lleva a la formación de células capaces de proliferar eludiendo los sistemas de reparación encargados de asegurar la integridad genómica. Esta enfermedad se

caracteriza, por un crecimiento incontrolado de las células, que adquieren capacidad de invasión y metástasis.

Estas características se deben a mutaciones en el material genético que producen la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (Hanahan y Weinberg, 2000). El gen supresor de tumores p53 aparece mutado en prácticamente todos los tipos de cáncer. Este gen codifica para un factor de transcripción que actúa regulando el ciclo celular.

El daño oxidativo está relacionado con la aparición de tumores a través de la modificación de bases del DNA, lo que conduce inevitablemente a cambios en la información genómica.

Otras enfermedades asociadas al estrés oxidativo y a las lesiones en el DNA son las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica. Los síntomas asociados a las enfermedades neurodegenerativas se deben a la disfunción mitocondrial que lleva a la sucesión de unos eventos en cadena que perturban el equilibrio de ROS y abruma el sistema antioxidante (Hoeijmakers, 2009).

Antioxidantes

Los antioxidantes aparecen en plantas comestibles y son producidos por ciertos tipos de células animales. Reciben su nombre debido a que son capaces de neutralizar las ROS impidiendo así las lesiones oxidativas del DNA y otras biomoléculas.

Los antioxidantes actúan retrasando o inhibiendo la oxidación de sustratos. Neutralizan los radicales libres donando uno de sus propios electrones, atrayendo a los radicales y evitando así que inicien reacciones en cadena que puedan dañar el DNA, lípidos y proteínas (Kaur y Kapoor, 2001).

Son varios los mecanismos protectores que estas sustancias llevan a cabo contra el daño producido en el DNA. Pueden unirse de manera covalente o por reacciones de asociación a la sustancia reactiva evitando su incorporación a las células o su capacidad

de atacarlas. Este mecanismo de acción se conoce como “scavenging”. Otro modo de acción consiste en evitar la formación de intermediarios tóxicos, por ejemplo mediante la inhibición de la fase I del metabolismo de xenobióticos. También pueden inducir enzimas detoxificantes de la fase II aumentando así la excreción de los compuestos tóxicos (Lagerqvist 2008).

La efectividad de los antioxidantes depende de diversos factores como la polaridad del propio antioxidante, que el sustrato sea lipídico, el pH, la temperatura, y de las propiedades físicas del alimento del que se extrae. La importancia de los antioxidantes que se incorporan a través de la dieta depende de su mecanismo de absorción y biotransformación (Huang *et al.*, 1997).

Estudios anteriores revelan que los antioxidantes tienen cierto papel protector contra la radiación UV en la piel (Dinkova- Kostova *et al.*, 2008). En cuanto a la protección frente a la mutagenicidad inducida por PAH-DE, se ha observado que los antioxidantes protegen las células de manera selectiva, ya que no son eficaces contra todos los agentes dañinos, y en ocasiones pueden presentar un cierto efecto sinérgico o aditivo con ciertos productos químicos (Lagerqvist 2008).

Coenzima Q10 (CoQ10)

La coenzima Q10 es un miembro de una familia de ubiquinonas. Todos los animales incluyendo el ser humano son capaces de sintetizar dicha sustancia. Su nombre se debe a la ubiquidad con que estos elementos aparecen en todos los seres vivos y a su estructura química, ya que contiene un grupo conocido como benzoquinona.

Las ubiquinonas son moléculas liposolubles debido a su cola de isoprenos. Se encuentran en las membranas celulares y en las lipoproteínas. El grupo benzoquinona es capaz de aceptar y donar electrones, lo que es crucial en el papel antioxidante de la coenzima Q10.

La coenzima Q10 puede aparecer en tres estados de oxidación: reducido (CoQ10H₂); como semiquinona, radical intermediario (CoQ10H), y como forma totalmente oxidada (CoQ10).

En su forma reducida es un antioxidante liposoluble muy efectivo. CoQ10H2 protege a las células de lesiones en el DNA y en las lipoproteínas. Esto lo consigue inhibiendo la peroxidación lipídica en membranas y proteínas de baja densidad expuestas a condiciones de oxidación. Además, neutraliza radicales libres directamente. La forma reducida es capaz de regenerar el alfa-tocoferol (vitamina E) desde su forma oxidada radical alfa-tocoferoxilo (**Wissam *et al.*, 2000**).

Butil hidroxianisol (BHA)

El BHA es una mezcla de dos isómeros el 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol y el 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol. La capacidad antioxidante del BHA se debe a que el oxígeno reacciona preferentemente con esta molécula en vez de oxidar grasas o aceites, además es liposoluble. Por esto, el BHA también se usa para evitar que las grasas se pongan rancias, se puede encontrar en la mantequilla, en la carne, en los cereales, en el chicle, en la cerveza, en las patatas deshidratadas, en productos de cosmética, en productos derivados del petróleo etc.

Sin embargo, las mismas características que hacen al BHA buen conservante puede tener efectos adversos para la salud. El BHA presenta también propiedades oxidantes que pueden inducir la carcinogénesis y mutagénesis. En contraste, estas mismas reacciones pueden combatir el estrés oxidativo convirtiendo al BHA en un antioxidante (*Gadow et al.*, 1997).

Silibin

Este antioxidante puede aparecer como liposoluble o hidrosoluble, según los complejos estudiados. De ambas formas, tiene capacidad para combatir el estrés oxidativo inhibiendo la peroxidación lipídica. Ambos complejos tienen actividad inhibitoria contra el enzima xantina oxidasa, la cual interviene en el metabolismo de purinas generando ROS (*Basaga et al.*, 1997).

Licopeno

El licopeno es un carotenoide presente en muchas frutas y verduras, especialmente en el tomate y productos derivados. Es un pigmento rojo liposoluble que se oxida con facilidad. Es sintetizado por determinadas plantas y microorganismos protegiéndolos de la radiación ultravioleta. Los animales, en cambio, no son capaces de producirlo.

La capacidad antioxidante del licopeno se debe a su habilidad para potenciar el metabolismo de xenobióticos (Heber y Lu, 2002). Este pigmento es capaz de restaurar enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GSH-Px) y la glutatión reductasa (GR). Además, reduce los niveles del peróxido lipídico malondialdehído. También tiene capacidad para combatir las especies reactivas de nitrógeno. Todo esto lo hace favorable para combatir enfermedades cardiovasculares, diabétes, cáncer, osteoporosis, enfermedades hepáticas, cataratas y problemas de fertilidad (Kalai *et al.*, 2011).

Turmérico

El turmérico es una sustancia que se encuentra en un rizoma. Sus efectos beneficiosos se deben a la acción antioxidante del curcumin, el principio activo presente en el turmérico. Diferentes estudios muestran la capacidad de esta sustancia para absorber radicales de oxígeno, para realzar la neutralización de radicales, para proteger las membranas celulares inhibiendo la peroxidación lipídica y para reducir metales. Este componente ayuda a inhibir el proceso de oxidación que hace que los aceites y grasas se vuelvan rancios. Estas mismas propiedades antioxidantes ayudan a prevenir el desarrollo tumoral (Tilak *et al.*, 2004).

6-Gingerol

El 6-gingerol es una cetona fenólica presente en el rizoma del jengibre. El 6-gingerol actúa suprimiendo la proliferación celular, induciendo la apoptosis y frenando el ciclo celular en G1 (Lee *et al.*, 2008). El uso de esta sustancia ha aumentado debido a su baja toxicidad y a sus múltiples aplicaciones farmacológicas, ya que tiene propiedades antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorias, y antiproliferativas. (Pawar *et al.*, 2011).

Objetivo

Según estima la Organización Mundial de la Salud, hoy en día una de las principales causas de muertes en todo el mundo es el cáncer, teniendo mayor afección los cánceres de pulmón, estómago e hígado. Es por ello que el efecto cancerígeno de algunos compuestos tóxicos que afectan al ser humano está teniendo un especial interés actualmente.

Debido a que son múltiples las fuentes de exposición a agentes capaces de dañar el DNA es importante identificar estos agentes dañinos, prevenir su dispersión e intentar evitar o remediar las lesiones que causan (Boström *et al.*, 2002).

Por la implicación de estos contaminantes en el desarrollo de enfermedades como el cáncer que deterioran las células provocando en muchos casos la muerte del organismo en cuestión resulta de gran interés el estudio de estos compuestos tóxicos y de sus posibles antagonistas. Es por ello que el presente proyecto tiene como objetivo evaluar el efecto de seis antioxidantes diferentes en células de mamífero XEM2 tratadas previamente con DBPDE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El DBPDE se obtuvo de NCI Chemical Repository, Kansas City, MO, USA. La Hipoxantina, la azaserina, la timidina y la 6-tioguanina se obtuvieron de Sigma. La HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), el DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media) y la tripsina se obtuvieron de Invitrogen life Technologies.

Línea celular

La línea celular empleada fue XEM2. Esta línea celular deriva de la línea V79 (fibroblastos de pulmón de hamster chino). Por ingeniería genética, se ha transformado la línea V79 para que exprese de manera estable el citocromo CYP1A1 del hígado de rata.

La línea celular XEM2 es crucial para ensayos de mutagenicidad de compuestos que sufren activación metabólica ya que las enzimas del citocromo son imprescindibles. En este estudio se escogió esta línea celular por ser fácil de cultivar, tener un crecimiento rápido, y por que su cariotipo es estable y solo presenta un cromosoma X con el locus HPRT muy conveniente para estudios de mutagenicidad (Doehmer *et al.*, 1990).

El medio utilizado para cultivar las células fue el DMEM con 9% suero y 0.9% penicilina/estreptomicina. Las condiciones de incubación fueron 37°C y 5% CO₂.

Ensayo de mutación HPRT

El ensayo de mutación HPRT se usó para evaluar la mutagenicidad y citotoxicidad tras tratar las células con antioxidantes y agentes carcinógenos (Jenssen, 1984). Este ensayo se basa en el gen Hprt. Este gen está situado en el cromosoma X y codifica para un enzima no esencial, la hipoxantina fosforibosiltransferasa (hprt) que cataliza reacciones de reciclaje de purinas libres en las células.

Tras tratar las células con DBPDE combinado con los antioxidantes la frecuencia de mutación puede calcularse con el ensayo de mutación HPRT. Para ello hay que cultivar las células en un medio selectivo DMEM con 6-tioguanina (6TG-DMEM). Este medio es tóxico para las células ya que estas incorporarán las bases. Las células mutadas carecen de proteína hprt, y por tanto sobrevivirán sintetizando nuevas bases y crecerán en las placas de selección (Fig. 3), (Stout *et al.*, 1985).

Tres días antes de comenzar el experimento, las células fueron cultivadas en medio DMEM con hipoxantina, azaserina y timidina, HAST-DMEM (1µl/ml DMEM) para reducir las mutaciones espontáneas.

El experimento se inició sembrando 5×10^5 células en frascos de 25 cm² con 8 ml de DMEM. Las células se incubaron una noche en condiciones normales (37°C y 5% CO₂). Después se aplicaron los diferentes tratamientos, con o sin PAH y antioxidante en 4 ml de HBSS⁺⁺.

La concentración de DBPDE empleada fue 0,5 µM. La concentración usada para cada antioxidante fue un 10% del IC₅₀ de cada uno de ellos (CoQ10: 0,01 mg/ml; BHA: 0,001 µM; silibin: 0,01 µM; licopeno: 0,053 mg/ml; turmerico: 0,36 µM; 6-gingerol:

17,4 μM). El IC50 se determinó en estudios anteriores (no publicados) mediante el ensayo DRAG, el cual se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Johansson *et al.*, (2004).

El tratamiento se consideró terminado cuatro horas después de ser aplicado ya que es cuando la formación de aductos se detiene (Lagerqvist *et al.*, 2008). El HBSS⁺⁺ se reemplazó por 8 ml de DMEM. Después de dos días de recuperación de las células, estas se sembraron para determinar la tasa de supervivencia y de mutación.

Para determinar la tasa de supervivencia las células se sembraron en placas petri (10 cm) con 10 ml de DMEM e incubadas durante una semana. Después se fijaron con azul de metileno en metanol (4 g/l) y se calculó la tasa de supervivencia contando colonias y comparando con el control (sin DBPDE, sin antioxidante) que se asumió que tenía un 100% de supervivencia.

La tasa de supervivencia de las células XEM2 después de ser tratadas con o sin DBPDE y antioxidante se calculó como porcentaje de control. El error estándar se calculó para siete experimentos independientes. Se asignó el 100% de supervivencia a las células que no fueron tratadas con DBPDE ni con ningún antioxidante. El resto de las tasas de supervivencia fueron calculadas en función del control.

Para determinar la tasa de mutación, 2×10^5 células fueron sembradas en frascos de 75 cm^2 y tras 3 días de incubación después del tratamiento. Después se dejaron crecer durante otros 4 días y se sembraron de nuevo. Finalmente, a los 3 días se sembraron las células en placas petri de 10 cm con 10 ml de 6TG-DMEM. Paralelamente se sembraron placas con 10ml de DMEM. Las colonias fueron fijadas y teñidas, después de una semana de incubación, con azul de metileno en metanol (4 g/ml). A partir de los recuentos del número de colonias de ambos tipos de placas (con medio selectivo y no selectivo) se pudo determinar la frecuencia de mutación, número de mutaciones por cada 10^5 células viables (Lagerqvist 2008).

La frecuencia de mutación de las células XEM2 después de los diferentes tratamientos se calculó como número de mutaciones por cada 10^5 células viables. El error estadístico se calculó para cinco experimentos independientes.

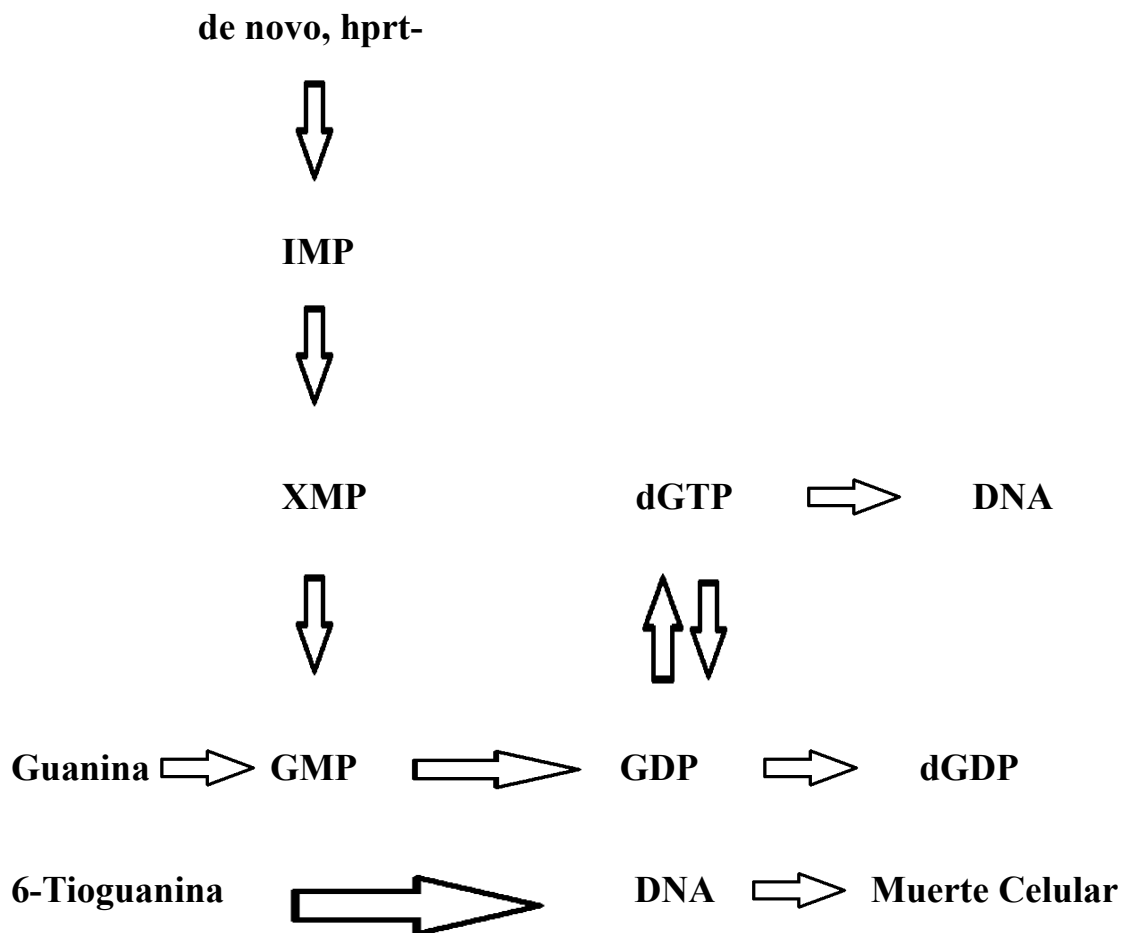


Figura 3.- Esquema de la participación de la proteína hprt en la síntesis de nucleótido. Se puede ver el efecto tóxico de la 6-tioguanina que se emplea como medio selectivo es el ensayo de mutación HPRT.

Análisis estadístico

Se usó el test de la t de Student para determinar si las diferencias al comparar la tasa de supervivencia y la frecuencia de mutación de las células tratadas con antioxidantes y las células control era estadísticamente significativa. También se analizó la diferencia en las tasas entre las células tratadas con antioxidantes y DBPDE y las células tratadas sólo con DBPDE. Se considero estadísticamente significativo cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

En la figura 4 se puede observar que la tasa de supervivencia para aquellas células tratadas solo con DBPDE disminuye siendo cercana al 60% del grupo control. Al comparar la tasa de supervivencia de las células tratadas solo con antioxidantes con el control se observa que, excepto aquellas tratadas con BHA, el resto presentan un tasa de supervivencia significativamente menor que el control. Las células tratadas con BHA tiene una tasa de supervivencia superior pero este valor no es estadísticamente significativo (Fig. 4).

Al comparar las tasa de supervivencia de las células tratadas con antioxidante y DBPDE con las tratadas solo con DBPDE se observa que al añadir antioxidantes el porcentaje de supervivencia es mayor. Sólo para el grupo de tratamiento DBPDE+6-gingerol esta diferencia resulta estadísticamente significativa (Fig. 4).

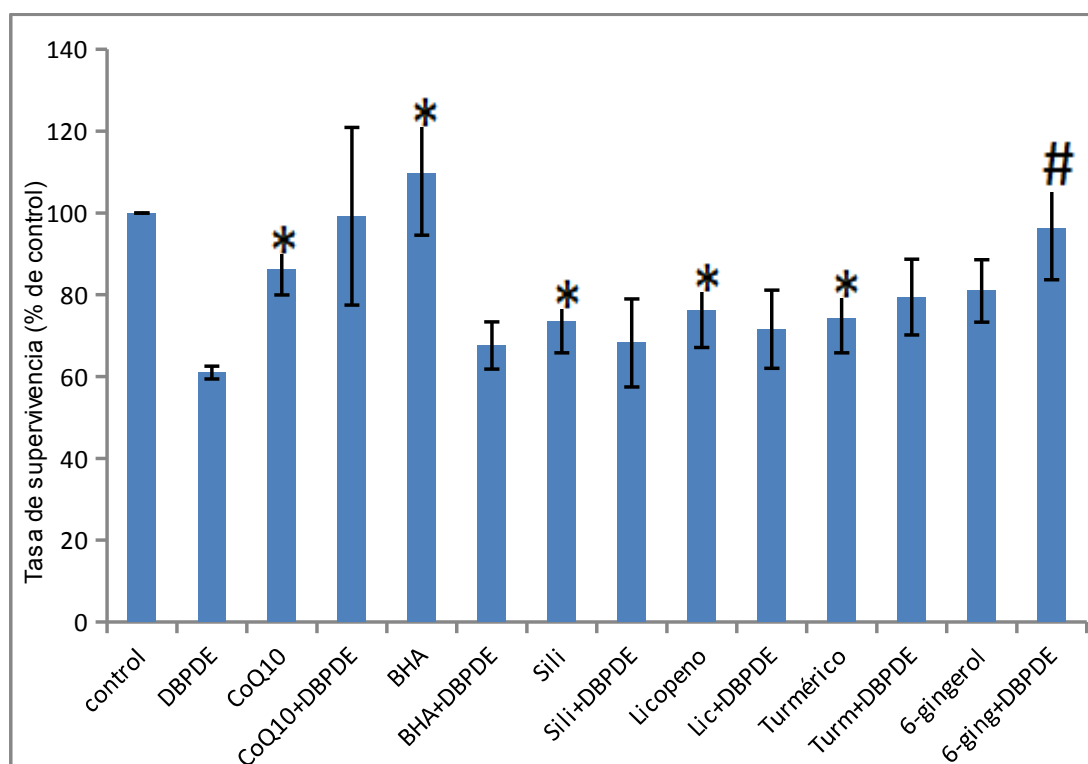


Figura 4.- Tasa de supervivencia de las células XEM2 como porcentaje de control. Las barras representan el error estándar calculado para 7 experimentos independientes. *Diferencia con el control estadísticamente significativa ($p < 0,05$). #Diferencia con el grupo de tratamiento DBPDE estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

En la figura 5 se observa que la frecuencia de mutación por cada 10^5 células viables para las células tratadas solo con DBPDE está entorno a 4 mutaciones. Esta frecuencia es ligeramente superior a la del control que representa las mutaciones espontáneas, es decir las que aparecen cuando no se suministra PAH-DE ni antioxidante.

Las frecuencias de mutación para los grupos de tratamiento que solo han recibido antioxidante son similares a las del control. Se observa que las células tratadas con silibin presentan una frecuencia de mutación menor que la del control. Las células tratadas con el resto de antioxidantes presentan una frecuencia de mutación superior al control. El test T de Student revela que esta diferencia no es significativa estadísticamente (Fig. 5).

Las frecuencias de mutación de los grupos de tratamiento que han recibido antioxidante y DBPDE son ligeramente mayores que cuando solo reciben DBPDE. Estas diferencias tampoco resultan estadísticamente significativas (Fig. 5).

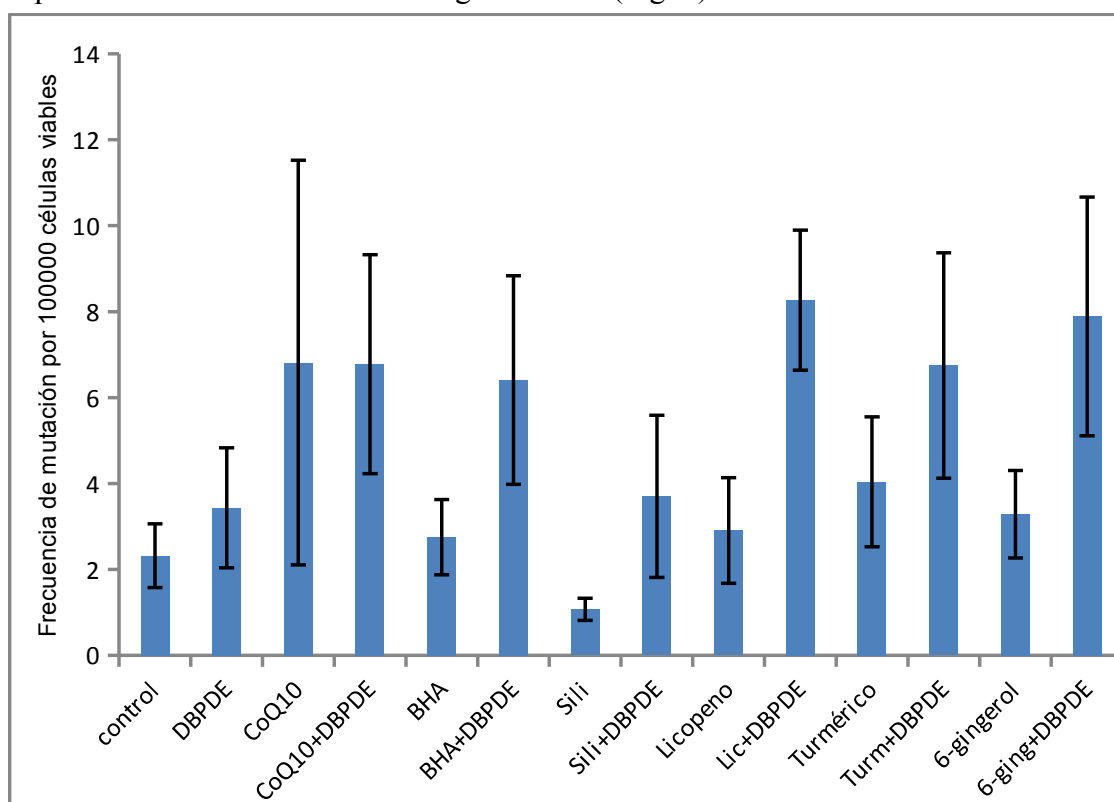


Figura 5.- Frecuencia de mutación de las células XEM2 como número de mutaciones por cada 10^5 células viables. Las barras representan el error estándar para 5 experimentos independientes. *Diferencia con el control estadísticamente significativa ($p < 0,05$). #Diferencia con el grupo de tratamiento DBPDE estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

En este estudio, se usó el ensayo hprt para investigar la capacidad protectora de ciertos antioxidantes presentes en la dieta. Para ello se analizó la citotoxicidad y mutagenicidad de los mismos en células XEM2 después de tratarlas con DBPDE.

Citotoxicidad y mutagenicidad del DBPDE

Al analizar los resultados de supervivencia y frecuencia de mutación para las células tratadas con DBPDE se observa que la tasa de supervivencia es del 60%, considerablemente menor que la del control (Fig. 4). Sin embargo, el número de mutaciones que causa no es mucho mayor a la frecuencia de mutación del control (Fig. 5).

Existe una discrepancia entre los resultados obtenidos y otros publicados anteriormente en los que la frecuencia de mutación del DBPDE era hasta 4 veces mayor. Esta reducción en el número de mutaciones puede deberse a la facilidad que tiene el DBPDE para hidrolizarse y también a su corta vida media de 13 minutos (Lagerqvist et al., 2011).

Efecto protector de CoQ10 y 6-Gingerol

Al analizar los resultados puede verse que las células tratadas con Coenzima Q10 presentan una de las tasas de supervivencia más altas. Al comparar las células tratadas con DBPDE y CoQ10 con aquellas tratadas solo con DBPDE, observamos un cierto efecto protector ya que la tasa de supervivencia para el primer grupo es cercana al control o incluso superior (Fig. 5).

Cuando analizamos la frecuencia de mutación para estos grupos vemos que es superior a la del DBPDE y a la del control (Fig 5). Esto sugiere que el antioxidante no tiene capacidad para proteger las células. Sin embargo, como la frecuencia de mutación del DBPDE es más baja de lo esperada como se ha explicado anteriormente, esta comparación no resulta concluyente. Además, debido a la gran variabilidad entre

réplicas el error estandar calculado es demasiado alto y las diferencias no son significativos.

Sería necesario realizar más réplicas para poder concluir que el efecto protector que muestran los resultados de las tasas de supervivencia son ciertos. Esto sería lo esperable dado que el mecanismo de acción de la CoQ10 consiste en unirse a radicales libres neutralizándolos (Wissam *et al.*, 2000).

Algo similar sucede con el 6-Gingerol. Los resultados sugieren también un cierto papel protector frente al DBPDE. Cuando este antioxidante se usa combinado con el DBPDE, la tasa de supervivencia supera a la que presentan las células tratadas solo con el PAH-DE (Fig. 4). Sin embargo la frecuencias de mutación del grupo de tratamiento DBPDE+6-gingerol es mayor a la del grupo de tratamiento DBPDE (Fig. 5).

BHA, silibin, licopeno y turmérico

Los antioxidantes BHA Silibin, Licopeno y Turmérico, combinados con DBPDE o solos presentan una toxicidad parecida a la del DBPDE. Al analizar las tasas de supervivencia correspondientes a estos antioxidantes se puede ver que son próximas a la del DBPDE (Fig. 4).

Se observa que las células tratadas con estos antioxidantes combinados con DBPDE presentan unas frecuencias de mutación superiores a la de las células tratadas solo con DBPDE (Fig 5). Esto podría indicar un posible efecto aditivo, pero como la frecuencia de mutación para el DBPDE ha resultado más baja de lo esperado, la comparación no es concluyente. Sería recomendable realizar repeticiones del experimento para poder determinar si estos antioxidantes tienen un efecto aditivo y aumentan la toxicidad del DBPDE o si tienen una toxicidad similar a éste y por ello no disminuyen la aparición de mutaciones.

Observando los resultados, las células tratadas solo con BHA presentan la tasa de supervivencia más elevada, superando al control y a la Coenzima Q10. Sin embargo, cuando se combina con DBPDE, la tasa de supervivencia cae hasta niveles próximos a la del DBPDE (Fig. 5).

Cuando se analizan las células tratadas solo con BHA, la frecuencia de mutación es similar a la del control, esto es a las mutaciones espontáneas. Cuando las células son tratadas con BHA y DBPDE de manera combinada la frecuencia de mutación aumenta considerablemente (Fig. 5). Esto parece indicar un posible efecto aditivo o sinérgico. Cuando el antioxidante y el PAH-DE se combinan la toxicidad del PAH-DE aumenta (Gadow *et al.*, 1997). Pero el test t de Student indica que la diferencia con el grupo control y el grupo de tratamiento DBPDE no es estadísticamente significativa, por tanto no se puede concluir si realmente existe este efecto aditivo. Sería necesario realizar más experimentos.

Según estudios anteriores, los seis antioxidantes elegidos tienen la capacidad de unirse a radicales y eliminarlos protegiendo el DNA de posibles lesiones, lo que se conoce como scavenging. En contra de lo esperado, solo dos de los antioxidantes testados, la CoQ10 y el 6-Gingerol parecen ejercer cierto efecto protector frente al DBPDE. Esto puede deberse a que los antioxidantes según muestran algunos estudios pueden ser selectivos con el tipo de radicales reactivos que neutralizan (Lagerqvist 2008). Por ello, una manera de continuar estudiando la eficacia de estos antioxidantes sería analizar su efecto frente a los aductos generados por otros PAHs.

También puede ser que la eficacia de los antioxidantes se haya visto codicionada por la concentración empleada de los mismos ya que los antioxidantes solo tienen efecto protector cuando son empleados en su dosis óptima, si no pueden causar daños (Holdst y Williamson, 2008). Otras variables relacionadas con el diseño y desarrollo del experimental también pudieron condicionar los resultados obtenidos.

Para concluir, este proyecto puede servir como base para continuar investigando la acción protectora de los antioxidantes presentes en la dieta que pueden reducir el riesgo de las enfermedades asociadas con el envejecimiento mejorando así la calidad de vida. Dos de los antioxidantes estudiados parecen mostrar cierto efecto protector, sin embargo es necesario comprobarlo realizando más réplicas del experimento, así como otros ensayos *in vitro*.

Si los resultados apoyaran esta hipótesis serían necesarios estudios *in vivo* ya que un problema que suele aparecer al trabajar con antioxidantes es la diferencia entre los resultados *in vivo* e *in vitro*. Esto sugiere que hay muchas otras interacciones bioquímicas que no se tienen en cuenta en los ensayos *in vitro*.

Futuros experimentos deberían también investigar el efecto de diferentes antioxidantes contra una combinación de PAHs. Esto sería más relevante puesto que los humanos estamos expuestos a una amplia variedad de estos tóxicos a diario. Otro futuro estudio podría ser analizar la capacidad protectora de diferentes antioxidantes frente a diversos agentes mutagénicos ambientales. Los antioxidantes pueden tener efectos sinérgicos o antagonísticos y por ello sería conveniente examinar sus propiedades frente a diferentes compuestos.

Una limitación de los estudios en humanos es determinar la dosis óptima que hay que usar. Es importante recordar que los antioxidantes generan efectos protectores en dosis óptimas. En dosis superiores o inferiores pueden aumentar el riesgo de aparición de ciertas enfermedades (Holdst y Williamson, 2008). Pero una limitación de los estudios en humanos es la variabilidad entre individuos dentro de la población .

REFERENCIAS

- Basaga, H., Poliz, G., Tekaya, C., Arase, I. 1998. "Free Radical Scavenging and Antioxidative Properties of 'Silibin' Complexes on Microsomal Lipid Peroxidation." *Cell Biochem Func.* **15** (1), 27-33.
- Boström, C. E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernstrom, B., Kyrllund, H., Rannung, T., Tornqvist, M., Victorin, K., Westerholm, R., 2002. "Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air". *Environ Health Perspect.* **110** (3), 451-488.
- Dinkova-Kostova, A. T. 2008. "Phytochemicals as Protectors Against Ultraviolet Radiation: Versality of Effects and Mechanisms." *Planta Med.* **74**, 1548-1559.

- Doehmer, J. Seidel, A., Oesch, F., Glatt, H. R. 1990. "Genetically engineered V79 Chinese hamster cells metabolically Activate the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide." *Environ Health Persp.* **88**, 63-65.
- Dreij, K., Bajack, E., Sundberg, K., Gusnanto, A., Cotgreave, I., Jenström, B. 2004. "DNA adducts of benzo[a]pyrene- and dibenzo[a,l]pyrene-diolepoxides in human lung epithelial cells: Kinetics of adduct-removal, effects on cell cycle check points and gene expresion." *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.* **24**, 549-566.
- Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, C. F. 1997. "Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA." *J. Agrid Food Chem.* **45** (3), 632-638.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell.* **100**, 57-70.
- Heber, D., Lu, Q. 2002 "Overview of Mechanisms of Action of Lycopene". *Exp Biol Med.* **227** (10), 920-923.
- Holst, B., Williamson, G. 2008. "Nutrient and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyong antioxidants." *Curr Opin Biotech.* **19**, 73-82.
- Hoeijmakers. J. H. 2009. " DNA damage , Aging and Cancer." *New England Joun Med.* **361** (15), 1475-1485.
- Huang, S. W. Frankel, E.N., German, J.B. 1997. "Partition of Selected Antioxidants in Corn Oil-Water Model Systems." *J. Agrid Food Chem.* **45** (6), 1991-1994.
- Jenssen, D. (1984). "A quantitative test for mutagenicity in V79 Chinese hamster cells." Elsevier, Amsterdam, pp. 269-290.
- Johansson, F., Allkvist, A., Erixon, K., Malmvarn, A., Nilsson, R., Bergman, A., Helleday, T., Jenssen, D., 2004. " Screening for genotoxicity using the DRAG assay: investigation of halogenated environmental contaminants." *Nucleid Acid Res.* **563** (3), 35-47.

- Kalai, V., Vijayakumar, A., Suresh Kumar, K., Nath Singh, G. 2011. "Lycopene's Effects on Health and Diseases: A comprehensive review of the literature".
- Kaur, C., Kapoor, H. C. 2011. "Antioxidants in fruits and vegetables- the millennium's health." *Intl Journ Food Sci Tech.* **36**:703-725.
- Klaunig, J. E., Wang, Z., Pu, X., Zhou, S. 2011. "Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis." *Toxicol Appl Pharmacol.* **254**, 86-99
- Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., Georgakila, A. G. 2011. "Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis." *Mutant res.* **711**, 193-201
- Lagerqvist, A. 2008. "Factors Influencing the Yield of Mutations induced by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons". *Dept Genetics, Microbiology & Toxicology Stockholm University.* 1-70. Ph.D. Dissertation.
- Lagerqvist, A., Hakansson, D., Prochazka, G., Lundin, C., Dreij, K., Segerback, D., Jernstrom, A., Tornqvist, M., Seidel, A., Erixon, K., Jenssen, D., 2008. "Both dose replication bypass fidelity and repair efficiency influence the yield of mutations per target in mammalian cells induced by benzo(a)pyrene-diol-epoxide and dibenzo(a,l)pyrene-diol-epoxide." *DNA Repair.* (Amst).
- Lagerqvist, A., Hakansson, D., Franz, H., Seidel, A. and Jenssen, D. 2011. "Structural requirements for mutation formation from polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides in their interaction with food chemopreventive compounds." *Food Chem Toxicol.* **49**, 879-886.
- Lee, D. H., Cekanova, M., Baek, S.J. 2008. "Multiple Mechanisms Are Involved in 6-Gingerol-Induced Cell Growth Arrest and Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells". *Mol Carcinog.* **47** (3), 197-208.
- Liska, D. J. 1998. "The Detoxification Enzyme Systems" *Alternative Medicine Review.* **3** (3), 187-198.
- Mahadevan, B., Luch, A., Bravo, C. F., Atkin, J. 2005. "Dibenzo[a,l]pyrene induced DNA adduct formation in lung tissue *in vivo*." *Cancer Letters.* **227**, 25-32.

- Pawar, N., Pai, S., Ninbalkar, M., Dixit, G. 2011. "RP-HPLC analysis of phenolic antioxidant compound 6-gingerol from different ginger cultivars." *Food Chem* **126**, 1330-1336.
- Rice-Evans, C., Bourdon, R. 1993. "Free radical-lipid interactions and their pathological consequences." *Prog. Lipid Res.* **32**, 71-110.
- Stout, J. T., Caskey, C. T 2011. "Homologous recombination in vertebrate cells." *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 8388-8394.
- Tilak, J. C., Banerjee, M., Mohan, H., Devasagayam, T. P. 2004. "Antioxidant availability of turmeric in relation to its medicinal and culinary uses." *Phytother Res.* **18** (10), 798-804.
- Wissam, H., Bhagavan, H. N., Chopra, R. K., Chow, C. K. 2000. "Dietary Coenzyme Q10 and Vitamin E Alter the Status of These Compounds in Rat Tissues and Mitochondria." *J. Nutr.* **113** (9), 2342-2348.
- Zheng, Z., Park, S. Y., Lee, M., Won, N. H., Sull, D. 2011. "Effects of Benzo(a)pyrene on the Expression of Heat Shock Proteins, Pro-inflammatory Cytokines and Antioxidant Enzymes in Hepatic Tumors Induced by Rat Hepatoma N1-S1 Cells." *Journal Korean Med Sci.* **26**, 222-230.