

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**



Capacidad protectora de *Myrciaria dubia* “camu camu” ante el daño genético inducido por estrés oxidativo, evaluado in vitro, en la línea celular de ovario de “hámster chino” *Cricetulus griseus* e in vivo en *Drosophila melanogaster* “mosca de la fruta”

**Tesis para optar el Grado de Doctor en Ciencias Biomédicas**

**Autor**

**Ms. José Antonio Gutiérrez Bustamante**

**Asesor**

**Dr. Juan Jorge Huamán Saavedra**

**TRUJILLO – 2007**

**N°de Registro: \_\_\_\_\_**

**JURADO EVALUADOR**

---

**Dr. José Llanos Quevedo**  
**Presidente**

---

**Dra. Elva Sánchez Burga**  
**Secretario**

---

**Dr. Juan Jorge Huamán Saavedra**  
**Miembro**

Nombre: José Antonio Gutiérrez Bustamante  
Dirección: Mz. T-22 Urb. San Andrés V Etapa Víctor Larco- Trujillo  
Teléfono: 421690 - 281521 - 285706 - 9156710

e-mail: gutierrezbus@gmail.com  
A mis adorados padres, lo más sublime  
que Dios ha podido darme:

**ARTURO y FILONILA**

que por su invaluable apoyo y sacrificio  
hicieron posible la culminación de mi  
carrera Doctoral.

Con inmenso cariño a mis queridos hermanos:  
**ESPERANZA, JOSÉ SANTOS y SEGUNDO JESÚS**

por ser constante estímulo de superación.

A **ELENA DE JESÚS**, por su amor  
y apoyo constante

A **MARIANA DE JESÚS**,  
mi adorada hija.

## **Agradecimientos**

Quiero hacer extensivo mi reconocimiento especial y mi gratitud profunda al **Dr. Juan Jorge Huamán Saavedra**, por su desinteresada y correcta orientación en la elaboración de esta Tesis.

Asimismo, mi agradecimiento de manera especial a la **Universidad Nacional de Trujillo** por haber contribuido a la realización de mis estudios doctorales.

Hago también extensivo mi sincero agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a la culminación de esta tesis.

## INDICE

	Pag.
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	
..	1
II. MATERIAL	Y
MÉTODOS.....	7
2.1 MATERIAL.....	7
2.1.1 Material biológico.....	7
2.2 METODOS Y TECNICAS.....	7
2.2.1 PREPARACION DE LA MUESTRA .....	7
2.2.2 EXPERIMENTOS IN VITRO.....	7
2.2.2.1 Inducción de genotoxicidad y antimutagenicidad... 8	
2.2.2.2 Ensayos de aberraciones cromosómicas... 9	
2.2.3 EXPERIMENTOS IN VIVO.....	10
2.2.3.1 Determinación de la toxicidad.....	10
2.2.3.2 Tratamientos a ensayar.....	10
2.2.3.3 Evaluación de genotoxicidad y antimutagenicidad 11	
2.2.4 PRUEBAS ESTADISTICAS.....	12
III. RESULTADOS.....	
13	
IV. DISCUSIÓN.....	
19	
V. CONCLUSIONES.....	
24	
VI. PROPUESTA.....	25
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXOS	

## RESUMEN

Muchos mutágenos y carcinógenos conocidos actúan a través de mecanismos oxidativos que dañan al ADN, en el presente trabajo se ha evaluado la capacidad protectora de *Myrciaria dubia* “camu camu” en un sistema in vitro constituido por la línea celular CHO –K1 de ovario de hámster chino *Cricetulus griseus* así como en un sistema in vivo con *Drosophila melanogaster*

Para la evaluación de genotoxicidad y antimutagenicidad in vitro se empleó el ensayo de aberraciones cromosómicas (AC) utilizando las 3 dosis de “camu camu” (1,0; 5,0; 10,0%) que presentaron menor citotoxicidad, mediante co-tratamiento con peróxido (  $H_2O_2$  ) por 30 minutos de exposición y para los ensayos in vivo se utilizó el Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART) versión alas con una dosis de 25% de camu camu en cotratamiento con etilnitrosourea (ENU) .

Los resultados mostraron una disminución de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las células de ovario CHO – k1 , en los tratamientos de 5 y 10% así como una disminución en la



frecuencia de manchas (36 y 23% ) en ala de *Drosophila melanogaster* al ser cotratados con camu camu al 25%,

Se concluye por lo tanto que *Myrciaria dubia* “camu camu” si posee efecto protector ante el daño al DNA.

### ABSTRACT

It is well known that carcinogen and mutagens act through oxidatives mechanisms that they damage to the DNA, in this research we evaluate the protective capacity of *Myrciaria dubia* “camu camu” in vitro in an system constituted by cellular line CHO - K1 of ovary of hamster chinese *Cricetulus griseus* as well as in a system in vivo with *Drosophila melanogaster*.

For test the genotoxicity and antigenotoxicity in vitro we used the aberrations chromosomal Test (AC) we used “camu camu” 3 doses (1,0; 5,0; 10,0) that presented minor citotoxicity, by peroxide ( $H_2O_2$ ) co-treatment for 30 minutes of exposition and for the test in vivo it was used Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in wings with doses of 25% camu camu by ethilnitrosoarea co-treatment (ENU)

The results showed a disminution of the frequency of chromosomal aberrations in the cells of ovary CHO - k1 , as well as a

disminution in the frequency of spots in wing of *Drosophila melanogaster* when they were co treated with camu camu,

In conclusion *Myrciaria dubia* "camu camu" has protective effect before the damage to DNA.

## I. INTRODUCCION

Las plantas medicinales en muchas comunidades y grupos etnicos del Perú aún representan la única fuente terapéutica. *Myrciaria dubia* "camu camu" pertenece a la familia Myrtaceae, género Myrciaria; especie arbustiva nativa de la región amazónica del Perú, es una de las plantas más utilizadas por sus propiedades antioxidantes y por sus múltiples usos terapéuticos así como por su sabor agradable como bebida. Este frutal contiene 2780 mg. de ácido ascórbico en 100 gramos de pulpa sin ser un cítrico, superando significativamente a la naranja y el limón, en los cuales, la concentración fluctúa entre 59 y 51mg/100g. respectivamente<sup>1-2</sup>

Así mismo comparando con la naranja el "camu camu" provee diez veces más hierro, tres veces más de niacina, dos veces más de riboflavina y 50% más de fósforo. Además la pasta se

emplea para mermeladas, jugos néctares, tortas, cócteles, helados, vinos y licores <sup>3</sup>.

El alto contenido de ácido ascórbico y su capacidad como antioxidante ubica al "camu camu" como un frutal importante para la Fármacoindustria. Es así que en Estados Unidos se ha introducido en el mercado tabletas de ácido ascórbico, producidas de "camu camu" <sup>4-5</sup>.

Estos compuestos antioxidantes presentes en la dieta humana pueden prevenir efectos genéticos de mutagénesis y carcinogénesis, es así que muchos estudios han demostrado que el incremento en el consumo de frutas y vegetales ricos en antioxidantes disminuye el nivel de daño oxidativo del DNA <sup>6-7-8</sup>

Existen investigaciones realizadas en extractos de *Toxicodendron quercifolium* y el musgo *Agaricus blazei* en los que se ha demostrado la actividad antígenotóxica in vivo con el ensayo de micronúcleos (MN) en médula ósea de ratón e in vitro con la prueba de aberraciones cromosómicas en células de ovario de hámster chino CHO-K1 <sup>9-10-11</sup>

Edenharder, (2002)<sup>12</sup> usó varios sistemas de ensayo para la evaluación de genotoxicidad, Inducida por 2-acetylaminofluorene ó 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine demostrando el efecto protector contra la genotoxicidad en bebidas, frutas, vegetales y otras especies. Asimismo Edenharder, (2003)<sup>13</sup> reportó que el homogenado de espinaca, alcachofa, durazno y uvas negras reduce la inducción de micronúcleos (MN) en médula ósea de ratón tratada con benzo pyreno.

El daño a la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) es una de las consecuencias más nocivas del estrés oxidativo y se considera responsable de la aparición de diversas enfermedades de alta incidencia en países con larga expectativa de vida; asimismo, desempeña un papel central en los procesos de envejecimiento<sup>14</sup>.

Muchos mutágenos y carcinógenos conocidos actúan a través de mecanismos oxidativos que dañan al ADN, siendo éste uno de los principales blancos de los radicales libres en la célula y las modificaciones que sufre como consecuencia, son relevantes para la pérdida de la homeostasis celular, la cual puede prolongarse debido a las funciones del ADN como reservorio activo de información. Es por ello que se estudian intensamente los agentes y mecanismos del daño por especies reactivas de oxígeno (ERO), ya

que su esclarecimiento va parejo a la elucidación de la patogenia de enfermedades de gran morbilidad y mortalidad<sup>15</sup> como el cáncer.<sup>16</sup>

En la molécula de ADN, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico de las especies reactivas del oxígeno (ERO), que llegan al interior del núcleo celular ya sean generadas como consecuencia de un agente externo, así como consecuencia de procesos metabólicos celulares<sup>17</sup>.

Cuando se produce un desbalance entre la producción de oxidantes y antioxidantes, se está en presencia del estado conocido como estrés oxidativo, donde estas moléculas son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, y, llegar a producir daño celular<sup>18</sup>.

Consecuentemente, existen reportes de antioxidantes naturales capaces de minimizar los efectos de los compuestos ERO tales como vitaminas, minerales, fenoles y aceites esenciales, los que han demostrado efectos inhibitorios sobre la genotoxicidad, tanto en ensayos in vivo como in vitro.

En este sentido existen sistemas de ensayo del daño al ADN que permiten evaluar en condiciones ideales la interacción de la molécula de ADN con diversos agentes protectores en condiciones controladas, lo que brinda una aproximación inicial al posible empleo de éstos en la protección del ADN contra agentes genotóxicos.

Es así que, para demostrar esta capacidad protectora se utiliza un método que consiste en la inducción del daño empleando como sistema de experimentación in vitro a la línea celular de ovario de hámster chino ***Cricetulus griseus*** CHO-K1.<sup>19</sup>

Esta línea celular constituye un material biológico de experimentación de fácil manejo, posee propiedades que la hacen idónea para estudios de daño genético a nivel cromosómico. Es versátil por el número y tipo de ensayos diferentes que se pueden realizar con ella para evaluar genotoxicidad de compuestos ambientales<sup>20</sup>

Asimismo existen sistemas in vivo que utilizan a ***Drosophila melanogaster***, “mosca de la fruta” la cual ofrece diversas cualidades como ciclo de vida corto, fácil inducción de mutaciones, manejo sencillo y bajos costos de mantenimiento, que

permiten evaluar la genotoxicidad así como los efectos protectores de un agente antioxidante<sup>18</sup>.

Dada la importancia en la búsqueda de productos antígenotóxicos y teniendo en cuenta que la Selva Amazónica de nuestro país es uno de los territorios privilegiados por la presencia de ***Myrciaria dubia***, “camu camu” el presente trabajo tiene como finalidad evaluar la capacidad protectora de ***Myrciaria dubia*** frente al daño genético inducido por estrés oxidativo en células de ovario de hámster chino ***Cricetulus griseus*** y en ***Drosophila melanogaster*** “mosca de la fruta”

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo General

Determinar la capacidad protectora del extracto de ***Myrciaria dubia*** “camu camu” utilizando la línea celular de ovario de hámster chino CHO-K1 y ***Drosophila melanogaster*** “mosca de la fruta” como modelos biológicos.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar las concentraciones menos tóxicas de ***Myrciaria dubia*** “camu camu” en la línea celular de ovario de hámster chino CHO-K1 ***Cricetulus griseus*** y en ***Drosophila melanogaster*** “mosca de la fruta”

- Determinar el efecto protector de *Myrciaria dubia* camu camu en la línea celular de ovario de hamster chino CHO-K1 *Cricetulus griseus* ante el daño inducido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## II. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Material Biológico

Extracto acuoso de *Myrciaria dubia* “camu camu”.

Línea celular de ovario de “hámster chino” CHO-K1

*Cricetulus griseus*

Cepa transheterocigota w+/w- de *Drosophila melanogaster* cruzamiento estándar del ensayo de mutación y recombinación somática (SMART)

### 2.2 Métodos y Técnicas

#### 2.2.1 Preparación de la muestra:



Con el extracto acuoso comercial ® de *Myrciaria dubia* “camu camu” (100%) se preparó los tratamientos a ensayar (0.1; 1.0; 5.0: 10: 15 %), realizando las diluciones con agua destilada.

### **2.2.2 Experimentos in vitro**

Se utilizó la línea celular de ovario de hámster chino

® Fitosana

CHO-K1, *Cricetulus griseus*<sup>21</sup> la cual se cultivó en Ham's F12 (Gibco) suplementado con 2% de estreptomicina-penicilina, 0,5 % de L-glutamina y 10 % de suero bovino fetal (SBF); esta línea se utilizó como control negativo y como control positivo la línea celular CHO-K1 adicionándole peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 5 x 10<sup>-5</sup> mol.

La capacidad de formar colonias de la línea celular CHO-K1 en 18 horas de exposición, fue el indicador de toxicidad para evaluar 5 concentraciones (0,1; 1.0; 5.0; 10.0; 15.0 %) de *Myrciaria dubia* “camu camu” obtenidas a partir del extracto acuoso.

#### **2.2.2.1 Inducción de genotoxicidad y antimutagénesis**

Para los estudios de genotoxicidad y antimutagenicidad se empleó el ensayo de aberraciones cromosómicas (AC) según Gallowey, (1986)<sup>22</sup> con las 3 dosis de “camu camu” que ocasionaron menor citotoxicidad, mediante co-tratamiento por 30 minutos de exposición<sup>22</sup> como sigue:

Tratamiento x 30 minutos	Repeticiones
Control negativo	4
Control positivo: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5 x 10 <sup>-5</sup> mol) = I	4
Camu camu A *	4
Camu camu B *	4
Camu camu C *	4
I + A	4
I + B	4
I + C	4

\* = concentración de “camu camu” no tóxica

Por cada tratamiento se analizaron 100 células del cultivo de la línea celular.

### 2.2.2. Ensayo de aberraciones cromosómicas

Las células de la cepa CHO –K1 de ovario de hamster chino fueron sembradas en placas petri conteniendo 10 mL de medio fresco Ham – F12 (Gibco), 10% de suero bovino fetal (Gibco) . Faltando 2 horas de incubación se agregó colchicina a todos los tratamientos. Los cultivos fueron cosechados e incubado a 37°C por 10 minutos en solución hipotónica de KCl 0,075 M y luego fijados en

una solución de metanol/ácido acético (3:1). Posteriormente las láminas fueron coloreadas por 10 minutos con Giemsa al 10%. Se analizaron 100 metafases por tratamiento según Savage, (1976)<sup>23</sup>.

### **2.2.3 Experimentos *in vivo***

Se utilizó una línea homocigota de *Drosophila melanogaster*<sup>24</sup> obtenida por cruzamientos endogámicos.

#### **2.2.3.1 Determinación de la toxicidad de “camu camu”**

La sobrevivencia de los adultos de *D. melanogaster* fue el parámetro a utilizar para evaluar la toxicidad de “camu camu” a las concentraciones de 5, 25, 50 y 100 %, para lo cual se preparó un medio a base de plátano licuado al que se adicionó las concentraciones de “camu camu” antes mencionadas. Con los datos obtenidos se determinó la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) mediante el análisis de regresión y correlación<sup>25</sup>.

#### **2.2.3.2 Tratamientos a ensayar**

Se preparó 150 mL. de medio de cultivo a base de plátano el que se repartió en seis porciones de 25 mL, en la primera se añadió sacarosa al 5% considerándolo como control negativo, en la segunda

y tercera porción se agregó etilnitrosourea (ENU) 0,01 0,1 mmol respectivamente representando este tratamiento el control positivo, las tres restantes porciones se sirvieron en frascos de mostaza previamente esterilizados (25mL.) donde se colocaron las larvas de *D. melanogaster* transheterocigotas

### **2.2.3.3 Evaluación de Genotoxicidad y antimutagenicidad**

Los estudios de genotoxicidad y antimutagenicidad, fueron evaluados a través de la frecuencia de mutaciones a nivel de alas en la progenie adulta de larvas transheterocigóticas cotratadas de forma crónica con la concentración de “camu camu” de menor toxicidad, utilizando el cruzamiento estándar del ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) de alas<sup>24</sup>.

### **Tratamientos de genotoxicidad y antimutagenicidad**

Tratamiento 72 horas	Repeticiones
Camu camu * = A	4
Control sacarosa 5%	4
ENU 0,01 mmol = I	4
I + A	4
ENU 0,1 mmol = II	4
II + A	4

\*concentración mayor no tóxica de *Myrciaria dubia*  
“camu camu”

#### **2.2.3.4 Pruebas estadísticas**

Los datos fueron procesados mediante las pruebas t de Student, la prueba de ajuste a la distribución binomial y la de probabilidad exacta de Fisher; se comprobó la normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett)<sup>25</sup>

### III. RESULTADOS

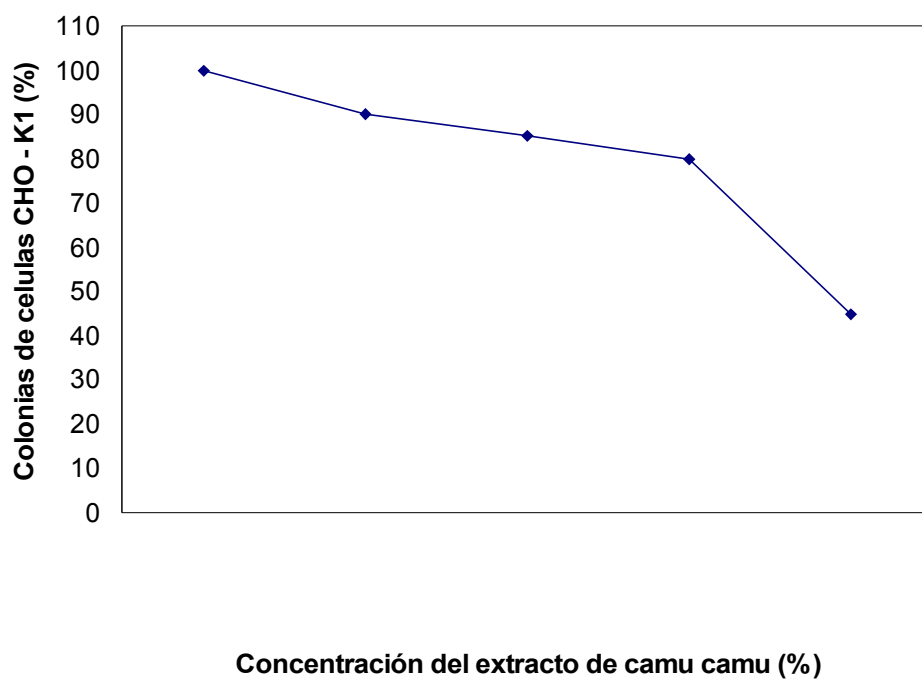
Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten demostrar en las figuras N° 1 y 2 los efectos de toxicidad causados por el extracto de *Myrciaria dubia* camu camu en los dos modelos biológicos, como se demuestra en ambas curvas de sobrevivencia se manifestó un efecto dosis dependiente que en el caso de la citotoxicidad en la línea celular CHO-k1 permitió delimitar un rango de menor efecto debajo del 15% (1, 5 y 10%), en tanto que en *Drosophila melanogaster* todas las concentraciones probadas fueron superiores a la dosis letal media, eligiéndose la concentración de 25%.

En relación a la capacidad protectora que presenta *Myrciaria dubia* camu camu contra el daño inducido por estrés oxidativo los resultados que se presentan en la tabla N°1 muestran una disminución significativa en la frecuencia de aberraciones cromosómicas producidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células CHO K-1, sometidas al co-tratamiento con las concentraciones de 5 y 10% de *Myrciaria dubia* camu camu.

Con respecto a la frecuencia total de manchas en las alas de *Drosophila melanogaster* obtenidas con el Test de Recombinación Somática utilizado para comprobar la genotoxicidad del ENU y

antimutagenicidad de *Myrciaria dubia* se demostró que en los co-tratamientos con el extracto de camu camu al 25% comparadas con la concentración del control positivo la frecuencia total de manchas simples y totales disminuyó significativamente entre el 36 y 23 % a las concentraciones de 0,1 y 0,01 mmol. de ENU. respectivamente.

**Fig. 1 Curva dosis efecto de la capacidad de formar colonias de celular CHO - K1 con el extracto de M. dubia camu camu - durante 18 h**





**Fig. 2 Curva dosis respuesta con los valores promedios de las frecuencias de los adultos sobrevivientes (%), a las diferentes concentraciones de M. dubia camu camu**

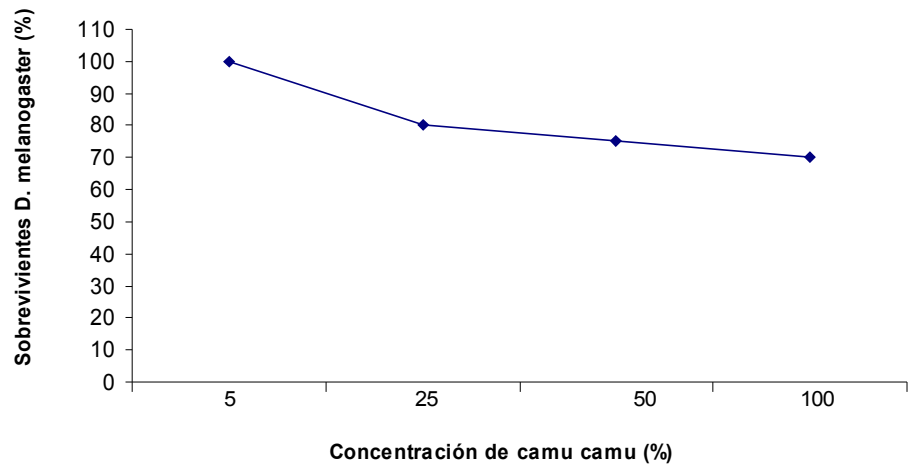


Tabla 1 . Disminución de las aberraciones cromosómicas inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células de ovario de hámster chino CHO – K1 por efecto del extracto de *Myrciaria dubia* “camu camu” con aplicación de co-tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos

Frecuencias por cada 100 células						
Tratamiento (30 min)	Células anormales	Gaps	Aberraciones		Total de aberraciones (-gaps)	
			B+	B++		
IM						
0%	4	2	2	2	4	
100						
I	12	2	4	6	10	86
A*	4	2	2	0	2	96
B*	6	4	2	4	6	92
C*		8	0	0	8	8
95						
I + A*	9	5	3	2	5	
98						
I + B*	3**	1	1	2	3	
97						
I + C*	3**	0	2	1	3	
98						
<b>Leyenda:</b>						

A\* 1% camu camu      B\*= 5% camu camu

C\*= 10 % camu camu      I = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 x 10<sup>-5</sup> mol

\*\* = altamente significativo    B+ = cromatídica      B++ = cromosómica

Tabla 2. Efecto del extracto de *Myrciaria dubia* (Md) sobre la genotoxicidad de ENU, evaluado en el ensayo SMART de alas de *Drosophila melanogaster* resultados de los cotratamientos ENU 0,01 mmol + Md 25 % y ENU 0,1 mmol + Md 25 %

Tratamiento	No. de alas	Manchas simples pequeñas			Manchas simples grandes			Manchas gemelas			Total de manchas		
		N	F	%	N	f	%	N	f	%	N	f	%
Control sacarosa 5 %	30	13	0,43		5	0,16		2	0,06		20	0,6	60
Md 25 %	30	15	0,50		5	0,16		1	0,03		21	0,7	70
ENU 0,01 mmol	30	18	0,60		8	0,34		0	0,00		26	0,8	80
Cotratamiento	30	8	0,26	36	4	0,02	2	0	0,00	0	12	0,4	36
ENU 0,1 mmol	30	18	0,60		8	0,15		3	0,10		29	0,9	90
Cotratamiento	30	14	0,46	23	2	0,16	0	0	0,00	1	16	0,5	23

N: número de manchas, f: manchas/ala, %: porcentaje de reducción de manchas del cotratamiento respecto al control positivo, Md: ***Myrciaria dubia***, ENU: etilnitrosourea.

#### IV. DISCUSION

En el presente trabajo se ha utilizado dos modelos biológicos para monitorizar el daño al DNA así como la protección del mismo. En uno de los modelos se ha inducido el daño al DNA en la línea celular de ovario de hámster chino CHO-K1 ***Cricetulus griseus*** utilizando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al  $5 \times 10^{-5}$  mol (Tabla 1), induciéndose aberraciones tipo gap, cromatídicas y cromosómicas como se sabe  $H_2O_2$  hace que en la molécula de ADN, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas queden expuestos al ataque electrofílico de las especies reactivas del oxígeno (ERO), que llegan al interior del núcleo celular<sup>26</sup> ocasionando daño oxidativo al DNA.

Existen diferentes tipos de daño oxidativo al ADN, entre los que se han reportado: ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o de las 2 hebras, modificación de las bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina) y la formación de uniones cruzadas (*cross-links*) ADN-ADN ó ADN proteína, a través de diferentes mecanismos<sup>27</sup>

Los oxidantes mutágenos que incluyen radiaciones ionizantes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bleomicina, neocarzinostatina y complejo Cu-fenantrolina, son capaces de producir sitios apurínicos AP por oxidación de la desoxirribosa del ADN<sup>28</sup>

Además dentro de este modelo se ha realizado el cotratamiento de las células CHO-K1 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las concentraciones de ***Myrciaria dubia*** al 1, 5 y 10% encontrándose una disminución significativa en la frecuencia de aberraciones cromosómicas al (5 y 10 %) con respecto al control (Tabla 1), esto se debería a la presencia de ácido ascórbico en ***Myrciaria dubia*** en una concentración que supera a las concentraciones presentes en los cítricos sin pertenecer este vegetal a esta familia de cítricos.

Como es conocido el ácido ascórbico (AA) tiene actividad antimutagénica y anticarcinogénica. Según Halliwell (2001)<sup>29</sup> el AA,

es un derivado soluble en agua que tiene actividad antioxidante considerable in vitro, en parte debido a su facilidad para oxidarse y porque el radical del semidehidroascorbato derivado de él tiene baja reactividad. Asimismo surgen controversias sobre los efectos del AA debido a que a elevadas concentraciones induce roturas de segmentos de DNA, formándose micronúcleos y aberraciones cromosómicas, por esta razón en el presente trabajo se ha considerado las concentraciones de 1, 5 y 10% (Fig. 1) del extracto de camu camu las cuales están por debajo del 15% concentración a la cual se observó un menor porcentaje de colonias .

Como se sabe la función principal de los antioxidantes es como captador de radicales libres. La vitamina C y el  $\beta$ -caroteno actúan como captadores de oxígeno "singlet", y la vitamina E y también el  $\beta$ -caroteno actúan como interruptores de la reacción en cadena. La vitamina C es un antioxidante soluble en agua capaz de regenerar a la vitamina E. Esta última y el  $\beta$ -caroteno son antioxidantes liposolubles. La vitamina E es eficiente a altos niveles de presión de oxígeno y el  $\beta$ -caroteno a bajos niveles. Todos pueden trabajar solos o sinérgicamente para evitar o retardar reacciones oxidativas que pudieran con el tiempo llevar a enfermedades degenerativas <sup>30</sup>

En el segundo modelo utilizado en el presente trabajo, constituido por *Drosophila melanogaster*, se utilizó como mutágeno al etilnitrosourea (ENU) el cual es un potente alquilante de átomos de oxígeno causante de lesiones mutagénicas. En este modelo se evaluó a través del Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en alas, la capacidad de *Myrciaria dubia* de proteger contra el daño inducido con ENU al momento de realizar el co-tratamiento con la concentración de 5% (Fig. 2), observándose una reducción de las frecuencias de manchas en las alas (36 y 23%) comparadas con el control positivo (60%), (Tabla 2).

La capacidad inhibitoria del camu camu sobre la inducción de los eventos genéticos medidos por el ensayo mosaico del ala de *Drosophila melanogaster*, específicamente de los eventos mutacionales, quedó demostrada con la reducción de los porcentajes de las frecuencias de manchas totales en los cotratamientos aplicados respecto al control positivo (Tabla 2). ENU es un potente alquilante de átomos de oxígeno causante de lesiones mutagénicas<sup>18</sup>, lo que concuerda en este experimento con las frecuencias incrementadas de manchas simples en relación con los controles negativos; por lo tanto, los porcentajes de reducción de manchas simples y totales, obtenidos con los cotratamientos respecto a ENU a las 2 concentraciones probadas, sugieren que la protección del camu camu al ADN podría darse haciendo que las

posiciones de oxígenos sean menos accesibles a la alquilación por ENU, reacción que por demás, debe involucrar una oxidación-reducción para la formación de los aductos causantes de los eventos mutacionales.

Estos resultados ratifican y amplían las propiedades antígenotóxicas de esta especie vegetal permiten inferir que uno de los posibles mecanismos antígenotóxicos del camu camu esté en relación con su acción antioxidante.

Al respecto según Rupérez (2002)<sup>31</sup> reportó la actividad antioxidante del extracto acuoso de *Fucus vesiculosus* (alga) asociándolos a su alto contenido polifenólico <sup>32</sup> y se ha sugerido que los polifenoles fitoquímicos dietéticos previenen daño oxidativo en las membranas biológicas importantes <sup>33</sup>. Muchas especies algal también contienen los phenolics del polyphloroglucinol (phlorotannins)<sup>34</sup> y en varios casos, la actividad antioxidante de algas podría ser debido a estos compuestos.

Según Liu y otros. (2003)<sup>35</sup> y Berger (2005)<sup>36</sup>, un suplemento dietético antioxidante puede reducir el nivel del daño oxidativo del DNA y proteger las células normales contra los efectos secundarios adversos de algunos protocolos de la quimioterapia del cáncer. En esta investigación, utilizamos la prueba somática de la mutación y de



la recombinación del ala en la *D. melanogaster* porque representa una manera rápida y barata de evaluar la genotoxicidad/ y la antigenotoxicidad de compuestos solos como de mezclas complejas<sup>37</sup> .

## V. CONCLUSIONES

1. *Myrciaria dubia* camu camu, posee efecto protector contra el daño a la molécula de DNA en las células de ovario de hámster chino CHO-K1
2. *Myrciaria dubia* camu camu posee efecto protector contra el daño a la molécula de DNA en *Drosophila melanogaster* mosca de la fruta
3. La frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por peróxido en las células de ovario de hámster chino CHO-K1 disminuye con el co-tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y extracto de *Myrciaria dubia* camu camu al 5 y 10%

4. La frecuencia de manchas en las alas de *Drosophila melanogaster* disminuyó en 23 y 36% en el cotratamiento con ENU y extracto acuoso de *Myrciaria dubia* al 5%

## VI. PROPUESTA

Las civilizaciones antiguas prefirieron muchas plantas por sus propiedades curativas. Este conocimiento se fue transmitiendo a lo largo de los siglos, sin que se supiera por qué o cómo actuaban, pero sí era indiscutible que las plantas podían curar diversas afecciones y constituían la mayor fuente de medicamentos para el hombre y los animales.

Hoy se sabe que las propiedades medicinales de las plantas son responsabilidad de algunos grupos de sustancias de diversa composición química conocidas como metabolitos secundarios, o

sea, productos de procesos resultantes de la asimilación de nitrógeno. Existen distintas teorías que tratan de explicar el porqué de la presencia de estas sustancias. ¿Son desechos, reserva o defensa contra plagas? Sea cual fuera la razón de la existencia de dichos compuestos, éstos no aparecen siempre en las mismas especies, ni en iguales proporciones y por lo general están en forma de compuestos y no en forma pura. Su marcada acción fisiológica sobre el organismo humano y animal les confiere su valor medicinal,<sup>38</sup> siendo indiscutibles las ventajas de estas sustancias obtenidas del metabolismo de las plantas para la más natural asimilación por el hombre a diferencia de los medicamentos sintéticos que por definición le son extraños. A pesar de la considerable actividad científica mundial en la identificación de sustancias químicas en productos naturales, las investigaciones hasta obtener él o los principios activos responsables de las propiedades reportadas para una planta, suelen ser muy largas y costosas, lo cual es cuestionable, pues una preparación de planta bien estandarizada, puede ser tan efectiva como un principio activo puro.<sup>39</sup>

Aun hoy el 75 % de la población mundial utiliza las plantas medicinales y el uso tradicional fundamental es como decocciones de las plantas enteras o de sus partes y no de sus principales componentes aislados y purificados. Se estima en 5 000 el número de especies vegetales estudiadas exhaustivamente para una posible

aplicación médica, pequeña fracción del total estimado en 300 000 especies.<sup>40-41</sup>

La utilización de extractos totales de las plantas ejerce en muchos casos, un efecto más beneficioso sobre el organismo humano que la acción del compuesto aislado y produce menos efectos secundarios indeseables. Este postulado constituye el fundamento de la fitoterapia, que tantos adeptos gana en nuestros días en el mundo entero.<sup>42</sup>

Por otro lado las hipótesis sobre la participación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en numerosas patologías, entre ellas el cáncer, ha condicionado que muchos investigadores propongan el uso de tratamientos antioxidantes. Antes de proceder a un ensayo clínico de esta índole, debe tenerse en consideración los siguientes aspectos:

- Vínculo del daño oxidativo en la fisiopatología de la enfermedad
- Papel del desbalance oxidativo en el proceso patológico
- Presencia de fallos en el sistema antioxidante.
- Localización del daño oxidativo.
- Posibilidad de alcanzar concentraciones deseadas en el sitio blanco.
- Impacto del antioxidante seleccionado en el proceso oxidativo.

- Tolerancia y seguridad de las dosis empleadas.

En el tratamiento del cáncer, los mecanismos ejercidos por la mayoría de los agentes quimioterapéuticos y radiaciones ionizantes en la muerte de la célula tumoral, transcurren a través de un incremento en la generación de más radicales libres guiando a un daño tisular irreversible; por lo que el tratamiento con antioxidantes constituye un aprovechamiento terapéutico.<sup>43</sup>

Existen numerosos estudios clínicos que describen la efectividad del uso terapéutico de altas dosis de vitaminas antioxidantes y antioxidantes naturales en general en el tratamiento del cáncer.<sup>44</sup> Se han publicado numerosos artículos y revisiones acerca del papel de los antioxidantes, la dieta y las modificaciones del estilo de vida sobre la prevención de la enfermedad. Sin embargo, el papel potencial de estos factores en el control del cáncer humano ha sido ampliamente ignorado. Los antioxidantes mejoran la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes cancerosos, por lo que su utilización debe extenderse, no solo dirigido a la prevención, sino a los nuevos esquemas terapéuticos en esta patología

En este sentido la propuesta está dirigida a establecer un programa que permita difundir la importancia que tiene el consumo de ***Myrciaria dubia*** “camu camu” como un medio de protección ante el daño que ocasionan al DNA las diferentes sustancias a las

que actualmente está expuesto el ser humano. Se ha considerado las siguientes etapas:

I.- IMPACTO O BENEFICIOS ESPERADOS

II. ESTABLECER LOS OBJETIVOS

III. PROGRAMACIÓN DE ACTIVIDADES

### **I. IMPACTO O BENEFICIOS ESPERADOS**

El impacto que se espera es disminuir las enfermedades oncológicas en las poblaciones con alto riesgo de exposición a agentes mutágenos como es el caso de los herbicidas utilizados por los agricultores y los pobladores (niños, mujeres en edad reproductiva) aledaños a la zonas de aplicación de estos agentes.

Asimismo en cualquier otra población expuesta a diferentes agentes genotóxicos como es el caso de los pobladores cercanos a los servicentros (grifos).

### **II. OBJETIVOS**

#### GENERAL

Establecer un programa de difusión sobre el efecto protector ante el daño al DNA de *Myrciaria dubia* “camu camu”

#### ESPECIFICOS

- Difundir el efecto protector de *Myrciaria dubia* camu camu en poblaciones de alto riesgo a daño genético.

- Promover el consumo de *Myrciaria dubia* camu camu para prevenir el daño al DNA en la población.

### **III.- PROGRAMACIÓN DE ACTIVIDADES**

- Establecer contacto con las empresas dedicadas a la medicina naturista para difundir los resultados del presente trabajo e impulsar el consumo de camu camu
- Difundir a través de charlas el consumo de camu camu en poblaciones con riesgo genético.
- Publicación de los resultados en una revista científica
- Participación en Jornadas académicas científicas
- Publicación en una página Web

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calzada J. 143 Frutales Nativos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Agronomía. Editorial El Estudiante. Lima. Perú. 1980.
2. Riva R. Tecnología del cultivo de "camu camu" en la Amazonía Peruana. INIA-EE-Pucallpa-Perú. 1996.
3. Duke JA, Vásquez R. Amazonian Ethnobotanical Dictionary. C.R.C.Press. 1994.
4. Villachica H, Carvalho J, Muller C. Frutales y hortalizas promisoras de la Amazonía. FAO-Tratado de Cooperación Amazónica. 1996.



- 5.FAO. Nutrición y Normas Alimentarias en Relación con las Frutas Tropicales. 1996. En: Consulta Internacional sobre frutas Tropicales.Kuala Lumpur, Malasia.
- 6.Duthie SJ, Ma A, Ross MA and Collins AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. 1996. Cancer Res 56:1291-1295.
- 7.Collins BH, Horská A, Hotten PM, Riddoch C and Collins AR. Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro. 2001. Nutr Cancer 39:148-153
- 8.Dusinská M, Kazimirová A, Barancoková M, Beno M, SmolkováB, Horská A, Raslová K, Wslová L and Collins AR. Nutritional supplementation with antioxidants decreases chromosomal damage in humans. 2003. Mutagenesis 18:371-376.
- 9.Mersch-Sudermann V, Kassie F, Bohmer S, Lu W-Q, WohlfahrthR, Sobel R, Brunn HE, ElSohly MA, Ross AS and Stahl TKhoury . Extracts of Toxicodendrn quercifolium caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cells of CD1mice. 2004. Food and Chem Toxicol 42:1611-1617.
- 10.Guterres ZR, Mantovani MS, Eira AF, Ribeiro LR and Jordão BQ. Genotoxic and antigenotoxic effects of organic extracts of mushroom Agaricus blazei Murrill on V79 cells. 2005. Genet Mol Biol 28:458-463

11. Bellini MF, Angeli JPF, Matuo R, Terezan AP, Ribeiro LR and Mantovani MS. Antigenotoxicity of Agaricus blazei mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberrations and cytokinesis block micronucleus in CHO-k1 cells. 2006. *Toxicol in Vitro* 20:355-360.

12. Edenharder R, Sager JW, Glatt H, Muckel E and Platt KL. Protection by beverages, fruits, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in metabolically competent V79 cells. 2002. *Mutat Res* 521:57-72.

13. Edenharder R, Krieg H, Kottgen V, Platt KL. Inhibition of clastogenicity of benzo[a]pyrene and of its trans-7,8-dihydrodiol in mice in vivo by fruits, vegetables, and flavonoids. 2003. *Mutat Res* 537:169-181.

14. Hartman P, Shankel D. Antimutagens and anticarcinogens. 1990. *Environ Mol Mutagen*;15:145-82.

15. Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B. Oxygen free radicals and human diseases. *J R Soc Health* .1991;111(5):172-7.

16. Clemens MR. Free radicals in chemical carcinogenesis. *Klin. Wochenschr.* 1991;69 (21-23):1123-34.

17. Price MA, Tullius TD. Using hydroxyl radicals to probe ADN structure. *Methods Enzimol.* 1992; 212:194-219

18. Capiro N. Capacidad protectora de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. ante el daño genético inducido por estrés oxidativo. 2001. Rev Cubana Invest Biomed ;20(1):33-7.
19. Prieto-González E, Arencibia R, Dávila N, Llópiz J. Evaluación de la capacidad protectora de 3 biomoléculas en un sistema in vitro de daño al ADN. 1997. Rev Cubana Invest Biomed 16(1):69-70
20. Sánchez-Lamar A. Utilización de la línea celular CHO en los ensayos de Genotoxicidad. 1999. Rev Cubana Invest Biomed ; 18(1):19-21.
21. Armstrong MJ, Bean CL, Galloway MS. A quantitative assesment of the cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese Hamster ovary cells. 1992. Mutat Res ;265:45-60.
22. Galloway MS, Ivett JL. Chemically induced aneuploidi in mammalian cells in culture. 1986. Mutat Res;167:89-105.
23. Savage JRK. Classification and relationship of induced chromosomal structural changes. 1976. J Mol Genet 13:103-122.
24. Graf U, Wurgler AJ, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB. 1984. Environm Mutagenesis;6:153-88.
25. Steel J, Torrie R. Bioestadística. edit. Omega. Madrid-España. 1985.

- 26.Price MA, Tullius TD. Using hydroxyl radicals to probe ADN structure. *Methods Emzimol* . 1992.212:194-219.
- 27.González Hernández Y, Prieto González E. Efectos sobre los ácidos nucleicos. *Estrés oxidativo en Biomedicina*. 2001.
- 28.García Triana B, Pérez Trueba G. Especies reactivas del oxígeno y cáncer: mecanismos de acción. *Estrés oxidativo en Biomedicina*. 2001.
- 29.Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. 2001. *Mutat Res* 475:29-35.
- 30.Hernández, H. Antioxidantes en alimentos. *Investigación en alimentos*. 2003. vol. 4 N°4.
- 31.Rupérez P, Ahrazem O, Leal JA. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. 2002. *J Agric Food Chem* 50:840-845
- 32.Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Pulido R and Saura-Calixto F. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. 2001. *J Sci Food Agric* 81:530-534.
- 33.Decker EA. Phenolics: Prooxidants or antioxidants? 1997. *Nutr Rev* 55:396-407.
- 34.Nakamura T, Nagayama K, Uchida K and Tanaka R. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. 1996. *Fish Sci* 62:923-926.

- 35.Liu X, Zhao J, Zheng R. DNA damage of tumor-associated lymphocytes and total antioxidant capacity in cancerous patients. 2003. Mutat Res 539:1-8.
- 36.Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? 2005. Clin Nutr 24:172-183.
- 37.Graf U, Spanó MA, Guzmán Rincón J, Abraham SK and Andrade HH. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies of antigenotoxicity. 1996. Afr Newslett on Occup Health and Safety 6(Suppl 1):9-13.
- 38.Granda M, Fuentes V, Acosta L, Cabrera I. Sustancias biológicamente activas En: Plantas medicinales I. La Habana:CIDA;1988:4 -7.
- 39.Morón F, Sierra P, Villán J, Martínez MJ. Programa de Medicina Tradicional Herbolaria en Cuba. Las plantas medicinales en la terapéutica. Rev Cubana Med Gen Integr 1991. 7(3):276-84.
- 40.Henriques JA, Moreno PR, Poser GL, von Querol CC. Genotoxic effect of alkaloids. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991. 86(Supl 2):71-4.

- 41.Xue jun Y, De Xiang L, Hechuan W, Yo Z. A study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceutical used in Chinese traditional medicine. 1991.Mutat Res 260:73-82.
- 42.Carbajal D, Casacó A, Arruzabala L, González R, Fuentes V. Pharmacological screening of planta decoctions commonly used in Cuban folk medicine. J Ethnopharmacol 1991;33:21-41.
- 43.Kong Q, Lillehei KO. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. Med Hypotheses 1998;51:405-9
- 44.Riodan HD et al. High-dose intravenous vitiamin C in the treatment of a patient with renal cell carcinoma of the kidney. J Orhom Med 1998;13(2):72-3.

# **ANEXOS**

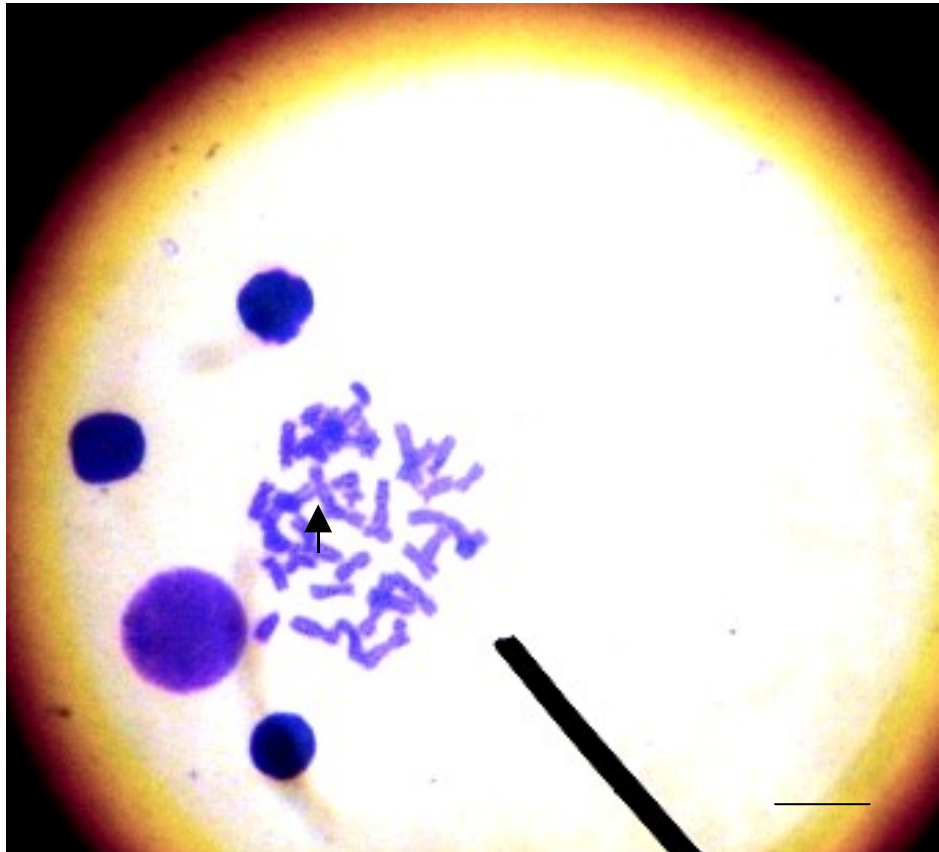


Fig. 1 Aberraciones cromosómicas ocasionadas por  $H_2O_2$  en células de la línea celular de ovario de hámster chino **Cricetulus griseus** (100X)



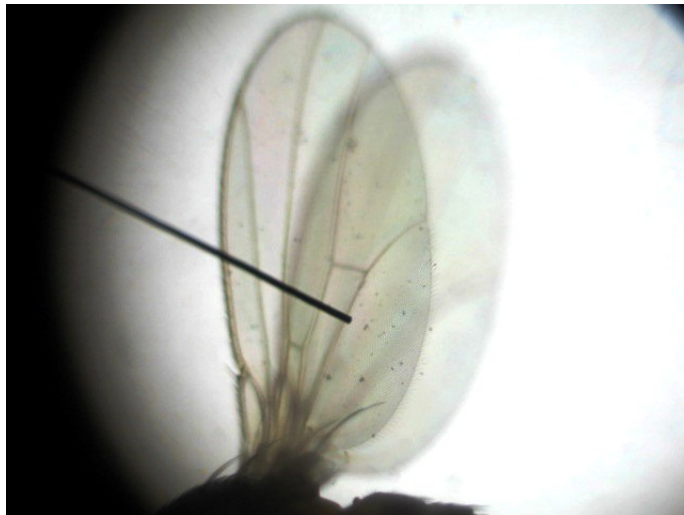


Fig. 2 Presencia de manchas en las alas de *Drosophila melanogaster* ocasionadas por .ENU (8X)