



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
GRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL
ANTICANCERÍGENO DEL GAZPACCHO**

María Jesús Aznar García

Almería, Septiembre 2017

Directores:

Pablo Campra Madrid

Rebeca Ramos Bueno

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

1. INTERÉS Y OBJETIVOS.....	1
2. FASES DE REALIZACIÓN DEL TFG Y SU CRONOGRAMA ASOCIADO.....	5
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1 Consumo de frutas y hortalizas.....	9
3.2 Producto pasteurizados.....	10
3.3 Composición nutricional y fitoquímicos en hortalizas.....	12
3.3.1 Fitoquímicos.....	12
3.3.2 Compuestos fenólicos.....	13
3.3.3 Carotenoides.....	14
3.3.4 Tomate.....	15
3.3.5 Pimiento.....	17
3.4 Relación entre hortalizas y cáncer.....	18
3.5 Cultivo de líneas celulares: conceptos, manejo y aplicaciones.....	19
3.5.1 Conceptos generales.....	19
3.5.2 Evolución de los cultivos celulares.....	21
3.5.3 Comportamiento de las líneas celulares.....	22
3.5.4 Justificación de los ensayos con líneas celulares <i>in vitro</i>	25
3.5.5 Ventajas e inconvenientes del cultivo celular <i>in vitro</i>	26
3.5.6 Validación y aceptación de los métodos <i>in vitro</i> con cultivos celulares.....	27
3.5.7 Células tumorales de colon. Línea celular HT-29.....	28
3.5.8 Ensayos de citotoxicidad.....	30
3.5.9 Medida de la viabilidad celular.....	30
3.5.10 Elección y justificación del método utilizado.....	32
3.6 Expresión genética y enzimática.....	33
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
4.1 Muestras.....	38
4.2 Cultivos celulares.....	38
4.2.1 Instrumentación.....	38

4.2.2 Medios y reactivos.....	39
4.2.3 Descongelación- Congelación.....	39
4.2.4 Cultivo en monocapa.....	41
4.3 Preparación de las muestras.....	44
4.3.1 Obtención de extractos.....	44
4.3.2 Digestión <i>in vitro</i> del tomate, pimiento dulce y gazpacho.....	48
4.4 Ensayos de viabilidad celular.....	49
4.4.1 Contaje por el método del azul tripán.....	50
4.4.2 Técnicas espectrofotométricas.....	51
4.5 Ensayos de viabilidad celular con las distintas muestras.....	53
4.5.1 Instrumentación.....	53
4.5.2 Medios y reactivos.....	54
4.5.3 Procedimiento.....	54
4.6 Determinación de la actividad en las células apoptóticas.....	58
4.6.1 Instrumentación.....	58
4.6.2 Medios y reactivos.....	59
4.6.3 Ensayo colorimétrico DEVD de la actividad caspasa 3/7 citoplasmática.....	59
4.6.4 Características del núcleo análisis de imágenes fluorescentes.....	60
4.6.5 Actividad ATP por luminiscencia.....	61
4.7 Análisis de la expresión génica.....	61
4.7.1 Procedimiento.....	62
4.8 Determinación de parámetros de calidad en hortalizas.....	62
4.8.1 Sólidos solubles.....	62
4.8.2 Acidez.....	63
4.8.3 Firmeza.....	64
4.8.4 Color.....	64
4.9 Determinación de carotenoides.....	66
4.9.1 Instrumentación y reactivos.....	66
4.9.2 Extracción de carotenoides.....	67
4.9.3 Identificación de los carotenoides.....	67
4.10 Determinación de tocoferoles.....	68
4.10.1 Instrumentación y reactivos.....	68
4.10.2 Procedimiento.....	69

4.10.3	Identificación de los tocoferoles.....	69
4.11	Determinación de flavonoides.....	69
4.11.1	Instrumentación y reactivos.....	69
4.11.2	Procedimiento.....	70
4.11.3	Identificación de flavonoides.....	70
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	72
5.1	Determinación de los parámetros de calidad para las distintas muestras.....	72
5.1.1	Color.....	72
5.1.2	°Brix.....	73
5.1.3	Acidez.....	73
5.1.4	Firmeza.....	74
5.2	Cuantificación de fitoquímicos.....	74
5.3	Ensayos de viabilidad celular.....	75
5.3.1	Ensayos de extractos, de etanol-agua y de éter de petróleo.....	75
5.3.2	Ensayos de hortalizas y distintos gazpachos digeridos.....	77
5.3.3	Ensayos de gazpacho sin digerir, gazpacho pasteurizado y gazpacho casero.....	78
5.4	Análisis multiparamétrico y enzimático.....	79
5.5	Expresión genética.....	82
5.6	Discusión.....	84
6.	CONCLUSIONES.....	90
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.5.3:	Evolución de una línea celular hipotética. Comportamiento a los largo de las semanas.....	24
Figura 3.5.7:	Línea celular HT-29 en cultivo en monocapa.....	29
Figura 4.2.3:	Deposito de nitrógeno líquido.....	40
Figura 4.2.4:	Cabina de flujo laminar.....	42
Figura 4.2.5:	Incubadora de cultivo.....	43
Figura 4.3.1:	Liofilizador.....	47

Figura 4.3.2: Esquema general de la preparación de extractos.....	48
Figura 4.4: Esquema general de un ensayo de viabilidad celular.....	49
Figura 4.4.1: Cámara de recuento celular (Neubauer).....	51
Figura 4.5.3: Placa ELISA ensayo de viabilidad celular día 1: siembra.....	56
Figura 4.5.4: Ejemplo de placa Elisa en el día 2 de ensayo. Adicción de extractos.....	57
Figura 4.5.5: Lector de placas Elisa.....	58
Figura 4.5.6: Esquema general de la técnica del MTT.....	58
Figura 4.8.1: Refractómetro de mano.....	63
Figura 4.8.4: Espectrofotómetro.....	65
Figura 4.9: Equipo de HPLC.....	66
Figura 5.3.1: Viabilidad de células HT-29 frente a diferentes concentraciones de extracto de éter de petróleo y de etanol-agua de las hortalizas ensayadas en fresco (n=2).....	76
Figura 5.3.2: Ensayos de viabilidad de células HT-29 tras la exposición de muestras digeridas de tomate, pimiento, gazpacho comercial pasteurizado y gazpacho comercial no pasteurizado.....	77
Figura 5.3.3: Ensayo de viabilidad de células HT-29 frente a muestras digeridas de gazpacho casero, y gazpacho comercial pasteurizado.....	78
Figura 5.3.4: Ensayo de viabilidad celular HT-29 tras la exposición durante 24 y 48 horas a muestras de gazpacho casero digerido.....	79
Figura 5.4.1: Análisis multiparamétrico de la citotoxicidad de digestos de gazpacho casero contra células HT-29 de cáncer de colon.....	80
Figura 5.4.2: Resultados del análisis multimodal de la citotoxicidad después de la exposición de células HT-29 a concentraciones crecientes de digestos de gazpacho casero durante 24h y 48h.....	81
Figura 5.5.1: Expresión génica de los genes supresores de tumores.....	83

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

Actualmente, y debido a la demanda creciente de unos consumidores cada vez más exigentes y mejor informados, la estrategia de comercialización del sector agroalimentario, tiene como una de sus líneas primordiales de actuación el aumento y la promoción de los valores funcionales de sus productos. Información de interés para el sector hortofrutícola almeriense por sus productos hortofrutícolas, el cual en este trabajo de investigación se hace frente al desarrollo de una línea tumoral de colon con productos hortofrutícolas. El valor funcional constituye una de las opciones de incremento del valor añadido más eficaces y rentables para los productos agroalimentarios, siempre que se consiga trasladar en último término al consumidor final la información adecuada, apoyada en estudios científicos de contrastada solvencia, tales como los realizados por universidades y entidades públicas de investigación.

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones. Los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes:

- Pulmonar (1,69 millones de defunciones)
- Hepático (788.000 defunciones)
- Colorrectal (774.000 defunciones)
- Gástrico (754.000 defunciones)
- Mamario (571.000 defunciones)

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos (Ferlay et al., 2012).

Según estudios de la Organización mundial de la Salud (OMS) se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se debe a los cinco principales factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol.

Una revisión internacional de alto nivel sobre el consumo de frutas y verduras y el riesgo de cáncer coordinada por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) concluyó que el consumo de frutas y verduras puede reducir el riesgo de cáncer, y en

particular de cánceres gastrointestinales. El CIIC calcula que la fracción prevenible de cánceres debidos a una ingesta insuficiente de frutas y verduras oscila en todo el mundo entre el 5% y el 12%, y entre el 20% y el 30% en el caso de los cánceres gastrointestinales.

La quimioprevención del cáncer es el uso de compuestos naturales o sintéticos para bloquear, revertir o prevenir el desarrollo de cáncer invasivo. Una variedad de compuestos dietéticos han sido ampliamente investigados por su posible papel en la quimioprevención a través de la dieta.

Para ello evaluaremos diversas hortalizas por separado, como el tomate y el pimiento dulce, y nuestra primera propuesta que es el gazpacho, frente al cáncer de colon, con el objetivo de dilucidar los beneficios que tiene el aumento de consumo en fresco de hortalizas.

La finalidad de este trabajo es el conocimiento y evaluación de los beneficios que presentan algunas hortalizas tanto por separado como en su conjunto, como es la receta del gazpacho, que más adelante describiremos. Beneficios quimiopreventivos, y así como el estudio de los compuestos fitoquímicos abundantes en alimentos de origen vegetal, ya que hay numerosas evidencias que indican la actividad antitumoral de las frutas y hortalizas.

El objetivo principal de este estudio es cuantificar el potencial anticancerígeno del gazpacho y concienciar a la población de los beneficios del consumo de gazpacho y en general de ciertas hortalizas.

Se plantean cinco objetivos básicos que deben alcanzarse mediante la aplicación de la metodología propuesta:

1. Determinar una serie de parámetros de calidad del gazpacho fresco, así como de sus dos principales ingredientes, el tomate y el pimiento dulce, como son el contenido en sólidos solubles totales, color, firmeza y acidez titulable.
2. Determinar cuantitativamente la actividad antitumoral *in vitro* del gazpacho frente a una línea estandarizada de células de cáncer de colon. Se desarrollarán para ello estudios debidamente controlados de inhibición del crecimiento de una línea celular tumoral causante de cáncer de colon.
3. Caracterización fitoquímica de micronutrientes con potencial valor funcional y antitumoral. No se pretende realizar un análisis fitoquímico exhaustivo, sino caracterizar un perfil básico de marcadores moleculares asociados a la actividad

antitumoral. Fundamentalmente se determinarán los perfiles de carotenoides, flavonoides y tocoferoles en distintos extractos de gazpacho.

4. Determinación de la actividad apoptótica en los casos de mayor actividad inhibitoria, mediante ensayos colorimétricos DEVD de la actividad de caspasa-3/7 citoplasmática, una enzima ligada a los procesos de suicidio celular inducido.
5. Análisis de la expresión génica, determinando los niveles de expresión de los ARNm de Bcl2, Bax, ciclina D1 y p53.

2. FASES DE LA
REALIZACIÓN DEL TFG Y
SUCRONOGRAMA
ASOCIADO

2. FASES DE LA REALIZACIÓN DEL TFG Y SU CRONOGRAMA ASOCIADO.

Estas fases se repiten en el tiempo para cada uno de los ensayos de los cultivos celulares HT-29. Para cada una de las muestras ensayadas.

❖ Fases para la viabilidad celular ensaya para cada muestra es:

Día 1. Descongelación de células, de la línea celular HT-29, del nitrógeno líquido. Se traspasan a un falcon con medio de cultivo, para su crecimiento.

Día 3. Cambio del medio de cultivo celular en el falcon.

Día 5. Cambio del medio de cultivo celular en el falcon.

Una vez que ha llegado a una confluencia del 80% en el falcon, las células ya podemos utilizarlas para ensayar, no siempre crecen igual así que los días pueden variar, para ello las visualizamos en el microscopio óptico.

Día 7. Levantamos las células del falcon para hacer el conteo, y las sembramos en las placas de 96 pocillos para incubar

Día 8. Añadimos la cantidad de muestra, según la concentración deseada, a la placa de 96 pocillos que el día anterior se sembró células.

Medimos mediante el método MTT la absorbancia en el lector ELISA las células con el medio, 24horas después de haberlas sembrado.

Día 9. Mediante el método MTT medimos la absorbancia en el lector ELISA de la placa de 96 pocillos 24horas después de haberle añadido las muestras a ensayar

Día 10. Mediante el método MTT medimos la absorbancia en el lector ELISA de la placa de 96 pocillos 48horas después de haberle añadido las muestras a ensayar

Este proceso se repite cada vez que hagamos un ensayo para cada muestra que se analice.

❖ Fases para los análisis enzimáticos:

Día 1. Descongelación de células, de la línea celular HT-29, del nitrógeno líquido. Se traspasan a un falcon con medio de cultivo, para su crecimiento.

Día 3. Cambio del medio de cultivo celular en el falcon.

Día 5. Cambio del medio de cultivo celular en el falcon.

Una vez que ha llegado a una confluencia del 80% en el falcon, las células ya podemos utilizarlas para ensayar

Día 7. Levantamos las células del falcon para hacer el conteo, y las sembramos en las placas de 96 pocillos para incubar

Día 8. Añadimos la cantidad de muestra, según la concentración deseada, a la placa de 96 pocillos negra que el día anterior se sembró células.

Día 9. Retiramos la muestra añadida el día anterior de gazpacho casero digerido, y posteriormente le añadimos DEVD, para el análisis enzimático. Medimos mediante un lector de placas Multimode de EnSight™ (PerkinElmer, Inc.), analizamos la confluencia, el número de núcleos, la condensación nuclear, el ATP citoplasmático, las células activadas por caspasa y el área de la actividad caspasa.

Día 10. Retiramos la muestra añadida hace 48 horas de gazpacho casero digerido, y posteriormente le añadimos DEVD, para el análisis enzimático. Medimos mediante un lector de placas Multimode de EnSight™ (PerkinElmer, Inc.), analizamos la confluencia, el número de núcleos, la condensación nuclear, el ATP citoplasmático, las células activadas por caspasa y el área de la actividad caspasa.

❖ **Fases para la expresión génica:**

Día 1. Descongelación de células, de la línea celular HT-29, del nitrógeno líquido. Se traspasan a un falcon con medio de cultivo, para su crecimiento.

Día 3. Cambio del medio de cultivo celular en el falcon.

Día 5. Cambio del medio de cultivo celular en el falcon.

Una vez que ha llegado a una confluencia del 80% en el falcon, las células ya podemos utilizarlas para ensayar

Día 7. Levantamos las células del falcon para hacer el conteo, y las sembramos en las placas de 24 pocillos para incubar las células.

Día 8. Añadimos la cantidad de muestra, según la concentración deseada, a la placa de 24 pocillos que el día anterior se sembró células.

Día 10. Retiramos la muestra añadida hace 48 horas de gazpacho casero digerido, y posteriormente levantamos las células de los pocillos para después analizar su expresión génica, Bcl2, BAX, cyclina D1 y p53.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONSUMO DE FRUTAS Y HORTALIZAS

Según los datos del Panel de Consumo Alimentario del Ministerio de Agricultura, alimentación y Medio Ambiente en el año 2016 se redujo el consumo de fruta fresca un 1,2% mientras que el consumo de hortalizas frescas en los hogares se mantienen prácticamente estables, con una ligera caída del 0,4%. Cabe destacar que la principal hortaliza consumida, después de la patata, en los últimos años ha sido el tomate.

Como dato relevante los jóvenes y adultos independientes son los hogares con menor participación en el consumo de hortalizas frescas, pero no obstante crece el consumo per cápita en jóvenes independientes con una variación positiva del 8,5% respecto del año anterior.

La quimiopreención del cáncer es el uso de compuestos naturales o sintéticos para bloquear, revertir o prevenir el desarrollo de cáncer invasivo. Una variedad de compuestos dietéticos han sido ampliamente investigados por su posible papel en la quimiopreención a través de la dieta. Los fitoquímicos bioactivos del consumo de frutas y hortalizas frescas han sido sugeridos como agentes quimiopreventivos (Béliveau *et al.*, 2007; Langner *et al.*, 2012; Cilla *et al.*, 2013). El gazpacho es una sopa fresca tradicional de la dieta mediterránea consistente de una base principal de tomate, aceite de oliva y cantidades menores de otras verduras frescas como pimiento dulce y pepino. El consumo de gazpacho se ha asociado a un menor riesgo cardiovascular en estudios epidemiológicos (Medina-Reimon *et al.*, 2013). Su componente principal, el tomate y los productos a base de tomate, han mostrado potencial anti-proliferativo contra algunos tipos de cáncer en estudios epidemiológicos, clínicos e *in vitro* (Giovannucci *et al.*, 2002; Boivin *et al.*, 2009). Además, se han caracterizado diferentes actividades antitumorales en otros componentes de la mezcla de gazpacho, como el aceite de oliva (Pampaloni *et al.*, 2014), el pepino (Abdelwahab, 2012) y el ajo (Milner, 2006). La mayoría de estos trabajos relacionan la actividad antitumoral con familias diferentes de micronutrientes, tales como los retinoides, compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas B, compuestos de azufre, o moléculas específicas como betacaroteno, licopeno, vitamina D o folato. Sin embargo, evidencias robustas sugieren que estas moléculas podrían no actuar solo, pero su actividad se realza en el contexto de la matriz de alimentos naturales. Las verduras frescas se componen de una mezcla compleja de miles de micronutrientes. Su concentración

efectiva de tejidos después del consumo, y las interacciones entre ellos y con el metabolismo celular que cooperan en el control de procesos cancerosos, son en gran medida desconocidas.

3.2 PRODUCTOS PASTEURIZADOS

Los productos pasteurizados consisten en elevar la temperatura del producto a casi hervirlo para luego ser refrigerada rápidamente, y así muchas de las propiedades vitales de los productos vivos se pierden en el proceso, se reducen los agentes nocivos como las bacterias, parásitos, levaduras, mohos... para que no causen intoxicaciones alimentarias, pero en dicho proceso también terminan su vida las vitaminas y otros nutrientes, además de las bacterias benéficas que contienen.

La principal función de la pasteurización de los productos es prolongar su tiempo de vida en los supermercados a fin de reducir gastos y beneficiar la economía de la empresa.

Cómo funciona la pasteurización:

Los alimentos se procesan térmicamente para matar las bacterias patógenas. Los alimentos también pueden pasteurizarse usando irradiación gamma. Tales tratamientos no hacen que los alimentos radiactivos. El proceso de pasteurización se basa en el uso de una de las siguientes relaciones de tiempo y temperatura.

- Tratamiento de alta temperatura a corto plazo (HTST) - este proceso usa más calor por menos tiempo para matar las bacterias patógenas. Por ejemplo, la leche es pasteurizada a 72 ° durante 15 segundos.
- Tratamiento de baja temperatura a largo plazo (LTLT) - este proceso usa calor más bajo por un tiempo más largo para matar las bacterias patógenas. Por ejemplo, la leche se pasteuriza a 63 ° C durante 30 minutos.

Es importante recordar que los tiempos y las temperaturas dependen de: (1) el tipo de alimento y (2) el resultado final que uno quiere lograr, como retener los nutrientes, color, textura y sabor del alimento.

Procesos utilizados en alimentos pasteurizados

- Pasteurización instantánea - Involucra un tratamiento a alta temperatura, a corto plazo, en el cual los productos vertibles, tales como zumos, se calientan durante 3 a 15 segundos a una temperatura que destruye microorganismos dañinos. Después del

calentamiento, el producto es enfriado y envasado. La mayoría de las cajas de bebidas y bolsas usan este método de pasteurización ya que permite un almacenamiento prolongado sin refrigeración mientras se proporciona un producto seguro.

- **Pasteurización con vapor** - Esta tecnología utiliza calor para controlar o reducir los microorganismos dañinos en la carne. Este sistema pasa las carcasas de carne vacuna recién sacrificadas que ya son inspeccionadas, lavadas y recortadas, a través de una cámara que expone la carne a vapor presurizado durante aproximadamente 6 a 8 segundos. El vapor eleva la temperatura superficial de las canales a (88 ° a 93 ° C). A continuación se enfrían las canales con un chorro de agua fría. Este proceso ha demostrado tener éxito en la reducción de bacterias patógenas, tales como E. coli O157: H7, Salmonella y Listeria, sin el uso de ningún producto químico. La pasteurización con vapor se utiliza en casi el 50% de la carne de vacuno de los Estados Unidos.
- **Irradiación Pasteurización.** Los alimentos, como aves de corral, carnes rojas, especias, frutas y verduras, están sometidos a pequeñas cantidades de rayos gamma. Este proceso controla efectivamente las bacterias vegetativas y patógenos parásitos alimentarios y aumenta el tiempo de almacenamiento de los alimentos.

El efecto de la pasteurización sobre los nutrientes y el sabor:

La pasteurización puede afectar la composición nutritiva y el sabor de los alimentos. En el caso de la leche, por ejemplo, los tratamientos de alta temperatura a corto plazo (HTST) causan menos daño a la composición de nutrientes y características sensoriales de los alimentos que los tratamientos a baja temperatura y de larga duración (LTLT)

Hoy en día, muchos alimentos, como huevos, leche, jugos, especias y helados, se pasteurizan. A veces se aplican temperaturas más altas durante un período de tiempo más corto. Las temperaturas y los tiempos se determinan por lo que se necesita para destruir las bacterias patógenas y otros microorganismos más resistentes al calor que pueden encontrarse en la leche. El líquido se enfría rápidamente a 4 ° C. Otros líquidos, tales como zumos, se procesan térmicamente de una manera similar. Las temperaturas y los tiempos varían, dependiendo del producto y del organismo objetivo.

Trabajos realizados demuestran la gran pérdida de vitamina C, en los productos pasteurizados, disminuyendo entre el 80 y el 100% de la vitamina C (Villareal, 2013)

3.3 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y FITOQUÍMICOS EN HORTALIZAS

3.3.1 FITOQUÍMICOS

Los fitoquímicos son sustancias biológicamente activas, que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, confiriéndoles color, aroma y sabor. No son nutrientes esenciales para la vida, pero tienen efectos positivos en la salud.

En los últimos años, se han considerado elementos importantes en la dieta humana, ya que se ha comprobado su acción como:

- Anticancerígenos, ya que actúan en la detoxificación de drogas, toxinas, carcinógenos y mutágenos, como bloqueadores y supresores, neutralizan radicales libres, inhiben enzimas que activan carcinógenos e inducen a enzimas detoxificadoras de los mismos.
- Protectores contra enfermedades cardiovasculares, debido a que evitan la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), reducen la síntesis y utilización de colesterol y afectan la presión sanguínea y coagulación.
- Beneficiosos agentes retardantes del envejecimiento y enfermedades asociadas (Lampe, 2003; Dávalos *et al.*, 2006).

Los ejemplos más conocidos como fitoquímicos antioxidantes son los compuestos polifenólicos como: ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferoles, terpenoides, fitoestrógenos y fitoesteroles (Burns *et al.*, 2003; Cooper 2004; Sun *et al.*, 2007). La composición y los niveles de los fitoquímicos con actividad antioxidante en los alimentos individuales no reflejan necesariamente la capacidad antioxidante total, ya que ésta depende de la interacción sinérgica o inhibitoria de las diferentes moléculas presentes en el alimento.

Anteriormente, la protección contra diferentes enfermedades era atribuida solamente al contenido de vitamina C, E y carotenoides presentes en los alimentos vegetales (Vinson *et al.*, 1998). Sin embargo, los estudios clínicos han demostrado que el suministro de estos compuestos sujetos con diferentes padecimientos no reducen lo suficiente la incidencia de enfermedades del corazón, daño cerebral y el riesgo de trombosis (Vinson *et al.*, 2001). A partir de entonces se encontró que los compuestos polifenólicos son sustancias que también poseen actividad antioxidante. Hoy se conoce que los fenoles son los fitoquímicos que contribuyen en mayor proporción a la capacidad antioxidante de frutas, hortalizas y granos

(Heo *et al.*, 2007). Por lo tanto, la disponibilidad de información sobre la composición de los fitoquímicos en los alimentos es crucial.

3.3.2 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los fenoles es un amplio grupo dentro del cual están los ácidos fenólicos y los flavonoides entre otros. Los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo hidroxilo. La estructura más sencilla es la del ácido benzoico, pero con otros sustituyentes en el anillo se forman ácidos fenólicos como el cafeico, clorogénico, cumárico y cinámico, comunes en los vegetales. Dicha composición les proporciona propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales. Además, a algunos ésteres de ácidos fenólicos se les atribuye propiedades antitumorales.

Se puede considerar que los flavonoides están conformados por una estructura básica que consta de dos anillos bencénicos en los extremos de la molécula, unidos por un anillo de tres átomos de carbono a la que se le pueden adicionar grupos tales como hidroxilos, metilos, azúcares, etc., generándose de esta manera diferentes tipos de flavonoides tales como flavonoles, flavanonas, flavonas, catequinas, antocianinas e isoflavonoides. Los más comunes en las plantas son: apigenina, quercetina, kaempferol, pinocembrina, galangina, crisina y hesperidina.

Los polifenoles constituyen un grupo de compuestos que desempeñan una importante función en prácticamente todas las interacciones que una planta establece con su entorno (Haslam, 1989). Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores (Formica *et al.*, 1995). Desempeñan un papel importante en la biología vegetal, ya que responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y de la diferenciación de las plantas (Hertog *et al.*, 1996). Las plantas responden a variaciones ambientales, como las ocasionadas por la época del año, la fertilización y los daños producidos por plagas y enfermedades, lo cual influye en la producción de metabolitos secundarios (Strack, 1997). Una característica fundamental del metabolismo secundario es que los productos secundarios no se encuentran uniformemente en toda la planta y son con frecuencia limitados a órganos particulares y a determinadas células y tejidos dentro de ese órgano (Bevan *et al.*, 1989; Van der Meer *et al.*, 1990). Los fitoquímicos fenólicos son metabolitos secundarios que regulan la actividad metabólica, siendo estos esenciales para el desarrollo, es decir, para el crecimiento y la reproducción de las plantas.

La importancia de los fenoles radica en que producen soporte mecánico a las plantas, contribuyen en la coloración de las flores y frutos, protegen contra patógenos y herbívoros y tienen una gran efectividad protegiendo los tejidos frente a la radiación ultravioleta (Strack, 1997). Además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, debido a su actividad antioxidante (Cartaya *et al.*, 2001; Kuskoski *et al.*, 2005), ya que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyendo de esta manera a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. El estudio realizado en 1989 por la OMS ha contribuido al interés despertado por los flavonoides al comprobar que las tasas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares en Francia eran mucho menores que en otros países industriales como EE.UU., ello se atribuyó al consumo de vino, producto que tiene un elevado contenido de polifenoles y flavonoides. Estudios experimentales muestran la existencia de mecanismos que inhiben la activación de carcinógenos que bloquean la iniciación del proceso de carcinogénesis.

3.3.3 CAROTENOIDES

Los carotenoides son un grupo de fitoquímicos que de manera natural se encuentran como pigmentos y son sintetizados invariablemente en los cloroplastos de las plantas superiores. Aunque en este tejido fotosintético su color está oculto por el de la clorofila, son los pigmentos más importantes entre las diversas clases encontradas en la naturaleza. Son responsables de la coloración amarillo, naranja y rojo de las flores, frutos y vegetales (Delgado-Vargas *et al.*, 2003).

La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal formado a partir de ocho unidades isoprenoides de cinco carbonos unidas. Los carotenoides hidrocarbonados son los llamados carotenos, de donde se derivan los que tienen funciones oxigenadas, las cuales son llamadas xantofilas (Ong *et al.*, 1997; Rodríguez, 1999; Che *et al.*, 2003). Éstos pueden ser acíclicos como el licopeno o contener uno o dos anillos al final de la molécula como el β -caroteno y la lúteína.

Se han aislado y caracterizado más de 600 carotenoides que se encuentran de manera natural. Sin embargo, de todos ellos, pocos carotenoides se han encontrado en el ser humano, entre éstos se han identificado al α y β -caroteno, licopeno, zeaxantina y β -criptoxantina.

Existen evidencias acerca de que los carotenoides poseen actividad como provitamina A, considerándose al β -caroteno como el más importante. La provitamina A es transformada a vitamina A en el tracto gastrointestinal, según la necesidad del cuerpo humano. Esta vitamina posee una función importante en la regulación de la visión, crecimiento y reproducción humana. Es esencial para la diferenciación celular normal de la mayoría de los epitelios, incluyendo a los de la piel, bronquios, tráquea, estómago, intestino, útero, riñones y otros órganos (Ong *et al.*, 1997; Rodríguez, 1999; Che *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha demostrado que los carotenoides poseen otros efectos biológicos independientes de su actividad como provitamina A, en especial su propiedad de actuar como antioxidantes. La actividad de protección antioxidante incluye la desactivación de los radicales libres y la captura de especies de oxígeno reactivas (Ong *et al.*, 1997; Rodríguez, 1999; Khor *et al.*, 2001).

También, se les ha relacionado con una mejora del sistema inmune y la disminución del riesgo de desarrollar diversas enfermedades degenerativas incluyendo a varios tipos de cáncer (Michaud *et al.*, 2000; Cooper, 2004; Bertram *et al.*, 2005), enfermedades cardiovasculares y la degeneración muscular relacionada con la edad (Rodríguez, 1999).

Entre los carotenoides conocidos, el β -caroteno ha sido el más extensamente estudiado y se ha demostrado que es uno de los compuestos con mayor actividad en la prevención e incluso supresión de estas enfermedades. Por ello, la importancia de los carotenoides en los alimentos va más allá de su función como pigmentos naturales.

3.3.4 TOMATE

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) contiene diferentes clases de compuestos bioactivos, mayoritariamente antioxidantes, tales como carotenoides, ácido ascórbico (vitamina C) y compuestos fenólicos, los cuales se asocian con los efectos beneficiosos para la salud atribuidos al consumo de este fruto (Raffo *et al.*, 2002).

El tomate y sus derivados son la principal fuente de licopeno en la dieta, el cual ha sido relacionado con multitud de efectos beneficiosos para la salud (Clinton, 1998). B-caroteno y

luteína también están presentes en todos los productos derivados del tomate. La luteína ha sido asociada con un menor riesgo de cáncer de pulmón (Sies, 1991).

El tomate también ha despertado interés por ser una fuente de vitaminas (C y E) y polifenoles (Lenucci *et al.*, 2006). Las concentraciones de las distintas vitaminas pueden sufrir grandes variaciones en la planta, dependiendo de la variedad y del clima. Los factores que influyen en la concentración vitamínica son:

- La presencia de luz, que aumenta el contenido en vitamina.
- La temperatura, una alta temperatura induce la degradación de la mayoría de las vitaminas.
- El grado de maduración, los niveles de carotenoides y el contenido en vitamina C aumentan con la maduración.
- Origen genético, se logró mejorar el contenido en ácido ascórbico de los tomates hasta hacerlo similar al de las frutas cítricas (Montes, 1966).

El contenido en vitamina C puede encontrarse en forma de ácido ascórbico y dehidroascórbico. La estabilidad de esta vitamina depende de la temperatura, concentración de sal en el medio, pH, concentración de oxígeno presente, enzimas, catalizadores metálicos (especialmente la presencia de Cu^{2+} y Fe^{3+}) y de la proporción ascórbico/dehidroascórbico.

El tomate también contiene folatos, que desempeñan importantes funciones en el organismo en cantidades menores que las necesarias para el caso de las vitaminas. Se trata de compuesto esenciales que deben ser incorporados a través de la dieta ya que el metabolismo humano no es capaz de sintetizarlos, y cuya deficiencia se asocia con el riesgo de padecer ciertas enfermedades como la espina bífida (defectos en la formación del tubo neural) y otras enfermedades congénitas, anemia megaloblástica, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (De la Garza *et al.*, 2007)

También es conocida la actividad de los alcaloides presentes en los tomates. Cantidades de α -tomatina, alcaloide mayoritario en la planta de tomate y frutos inmaduros, parece tener un potencial efecto toxico (Friedman *et al.*, 2009). Estos autores estudiaron el efecto citotóxico de extractos con un alto contenido en α -tomatina sobre varias líneas celulares

cancerígenas, obteniéndose para todas las líneas una fuerte actividad inhibitoria del crecimiento celular.

Otro componente del tomate, la fibra, ha sido asociado con una disminución del riesgo de cáncer de colon (Asano *et al.*, 2002), y se encuentra en cantidades apreciables en productos derivados del tomate (USDA, 2004).

Los tomates aunque en menor proporción también contienen ácidos grasos, siendo los mayoritarios el ácido linoleico, el palmítico y el oleico. Considerando la composición en porcentaje relativa a la cantidad de ácidos grasos puede considerarse que su aporte en la dieta es mínimo.

3.3.5 PIMIENTO

El pimiento, *Capsicum annuum* L., tiene un alto contenido en agua y fibra, también son ricos en hidratos de carbono. Se les considera una fuente excelente de vitaminas A, C y E, así como de compuestos fenólicos que ejercen un gran poder antioxidante destacando licopeno y β -caroteno (Sukrasno *et al.*, 1993; Palevitch *et al.*, 1995; Matsufuji *et al.*, 1998; Krinsky, 2001). Además, los cultivares picantes son ricos en capsaicinoides, alcaloides con propiedades farmacológicas específicas (Wachtel, 1999; Daood *et al.*, 2006).

En cuanto al interés nutricional de esta hortaliza son numerosas las propiedades nutritivas y farmacológicas que presenta (Ozgur *et al.*, 2011), en concreto los azúcares y los ácidos orgánicos, contribuyen además, y de forma importante, al sabor característico del pimiento (Jarret *et al.*, 2009). Estos compuestos presentan niveles de acumulación en el fruto diferentes según el genotipo, el grado de madurez y las condiciones de cultivo (Guil *et al.*, 2006).

El pericarpio del pimiento es particularmente rico en flavonoides, los compuestos de mayor importancia en éste son una flavona (luteolina) y un flavonol (quercetina), además a esta clase de flavonoides se le confieren propiedades benéficas que ayudan a combatir enfermedades crónicas degenerativas tales como el cáncer de pulmón y enfermedades coronarias (Howard *et al.*, 2007).

Numerosos estudios sobre pimiento se han centrado en la determinación de carotenoides presentes en distintas variedades. En uno de ellos, se demostró que los carotenoides responsables del color rojo de los frutos son capsantina, capsorubina y capsantina 5,6-epóxido que fueron encontrados solo en el género *Capsicum*. Un estudio comparativo realizado en México de la composición de carotenoides en tres variedades de pimiento, indicaron la presencia mayoritaria de β -caroteno y β -criptoxantina, precursores de la vitamina A.

3.4 RELACIÓN ENTRE HORTALIZAS Y CÁNCER

Cada vez son más las evidencias experimentales que relacionan una nutrición equilibrada con la prevención de enfermedades de alta incidencia en los países desarrollados. Enfermedades como la diabetes, cardiovasculares y cáncer han sido relacionadas directamente con los hábitos alimentarios. La secuenciación del genoma humano ha abierto la puerta a una nueva era de comprensión de los mecanismos moleculares que relacionan salud, dieta y factores ambientales (Desiere, 2004).

Doll *et al.*, 1981, mostraron que entre un 75% y un 80% de todos los cánceres diagnosticados en los Estados Unidos en 1970 podrían haberse prevenido alterando hábitos ligados al modo de vida como la dieta y el consumo de tabaco. En los primeros años fueron frecuentes los estudios sobre la relación entre el consumo de vegetales ricos en fibra dietética y el cáncer de colon (Trock *et al.*, 1990), lo que ha permitido autorizar a la Food and Drug Administration (FDA) la inclusión en el etiquetado alimentario de referencias a este efecto protector del consumo de vegetales (FDA, 2008).

Múltiples estudios epidemiológicos avalan la existencia de una relación causal entre la inclusión de frutas y verduras en la dieta y una reducción en la incidencia de determinados tipos de cáncer, en particular aunque no exclusivamente del tracto gastrointestinal (Talalay, 2001; Beliveau *et al.*, 2007).

El Fondo Mundial para la Investigación del Cáncer (WCRF, en sus siglas en inglés) y el Instituto Americano de Investigación del Cáncer (AICR) han publicado diversos estudios epidemiológicos nutricionales que investigan el consumo de frutas y hortalizas para la prevención del cáncer (WCRF / AICR, 2007). El informe, " Alimentación, Nutrición,

Actividad Física y la prevención del cáncer: una perspectiva global, " fue montado por un panel de expertos y es ampliamente citado en la literatura. El informe presenta evidencias del efecto protector del consumo de frutas frente al cáncer de boca, faringe, laringe, esófago, pulmón, y estómago, y el consumo de hortalizas frente al de boca, faringe, laringe, esófago, y estómago. El informe también destaca los efectos protectores observados en ciertas sustancias fitoquímicas presentes en frutas y verduras frente a distintos tipos de cáncer, incluyendo folato (páncreas), carotenoides (boca, faringe, laringe y pulmón), β - caroteno (esófago), licopeno (próstata), y vitamina C (esófago). Otros estudios epidemiológicos europeos (Soerjomataram *et al.*, 2010), muestran los beneficios del consumo de frutas y verduras para la prevención del cáncer de esófago, faringe, pulmón y estómago.

Son abundantes los trabajos sobre el efecto protector de hortalizas ricas en licopeno contra el cáncer de próstata (Giovannucci, 2002; Miller *et al.*, 2002). Igualmente, la FDA encontró pequeñas evidencias que apoyan la existencia de una asociación entre el consumo de tomate y el riesgo de padecer cáncer (Wicki *et al.*, 2011).

3.5 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES: CONCEPTOS, MANEJO Y APLICACIONES

3.5.1 Conceptos generales

Las líneas celulares son células de un único tipo (humano, animal o vegetal) que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio y que se usan en investigación.

Las células que pertenecen a una misma línea celular son clones unas de otras, consiguiendo así que la línea esté estandarizada y todas ofrezcan las mismas respuestas frente a cualquier alteración.

En los cultivos celulares, las células no están organizadas en verdaderos tejidos, por lo que sólo se puede aproximar a la realidad hasta cierto punto. Puede ser considerado como un paso previo a la investigación con modelos animales, no obstante se consiguen respuestas específicas frente a estímulos concretos.

Es necesario realizar algunas definiciones para instalar un lenguaje común en el manejo de líneas celulares:

- Cultivo celular: Término utilizado para denominar el crecimiento de células *in vitro*, incluyendo el cultivo de células aisladas.
- Cultivo primario: Es el cultivo iniciado a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo. Un cultivo primario debe ser considerado como tal hasta que se subcultive (o repique) con éxito por primera vez. En ese momento se considera una línea celular.
- Línea celular: Una línea celular se origina a partir de un cultivo primario en el momento del primer subcultivo exitoso. El término línea celular implica que los cultivos de la misma consisten en numerosos linajes de células presentes originalmente en el cultivo primario.
- Densidad de saturación: El máximo número de células que se pueden mantener bajo condiciones específicas de cultivo en un recipiente. Este término se expresa usualmente como el número de células por centímetro cuadrado en una superficie de cultivo o el número de células por centímetro cúbico en un cultivo en suspensión.
- Eficiencia de siembra (adhesión): El porcentaje de células sembradas que se adhieren a la superficie del recipiente de cultivo en un tiempo determinado.
- Tiempo de subcultivo: Periodo de tiempo que permanece una población celular en un dispositivo de cultivo (placa, frasco, etc).
- Medio químicamente definido: Solución nutritiva para cultivo de células siendo conocida la estructura química de cada componente. Aunque se sabe que aún los compuestos químicos puros pueden tener algunos contaminantes, se deben usar compuestos químicos de alta calidad con datos analíticos, si es posible, de los contaminantes.

- Pasaje (repique): La transferencia o trasplante de células, con o sin dilución, de un recipiente de cultivo a otro. Se entiende que siempre que las células se transfieren de un recipiente a otro, una cierta porción de éstas se pierde y que por lo tanto, se produce la dilución de las células de forma deliberada o no. Este término es sinónimo del término subcultivo.
- Pasaje número (repique número): El número de veces que las células en cultivo han sido subcultivadas. En la descripción de este proceso debe establecerse la relación o dilución de las células a fin de determinar la edad relativa del cultivo.

3.5.2 Evolución de los cultivos celulares

El cultivo de células tuvo su origen en el siglo XIX. Sin embargo, fue la utilización de bloques de agar con plasma coagulado (soporte y alimento) el inicio del cultivo de células *in vitro* (Freshney, 1987).

El desarrollo del cultivo de células de vertebrados se inició con las observaciones de Roux, 1885, en cultivos de células de embrión de pollo; posteriormente Harrison, 1907, considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales, empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, cultivando tejido nervioso de rana.

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows, 1910, empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Posteriormente se realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero. Carrel, 1912, demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión.

Rous *et al.*, 1916 emplearon por primera vez extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describieron para el establecimiento de los cultivos celulares fue la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que aún hoy día se utilizan.

Una serie de innovaciones como el desarrollo de medios de cultivo (Eagle, 1955), el uso de antibióticos (Hayflick *et al.*, 1961), las técnicas de tripsinización para el pasaje de células (Moscona *et al.*, 1952) y la suplementación del medio con suero fetal bovino, permitieron el desarrollo y aplicabilidad de los cultivos de células de origen vertebrado.

El empleo de técnicas de fusión celular (Littlefield, 1964) estableció las bases de la genética de células somáticas para el análisis de especies animales (incluyendo al hombre); igualmente la técnica de anticuerpos monoclonales (Kohler *et al.*, 1975) ha permitido estudios en inmunología y su aplicación a nivel terapéutico.

En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes. Inicialmente, el objetivo principal era el estudio de las propias células, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuándo dejan de crecer; sin embargo, este tipo de estudios tiene hoy un gran interés científico, por ejemplo, en relación con investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética. Otra área de gran interés se centra en la biología del desarrollo; los esfuerzos para explicar cómo el gran número de células presentes en un organismo maduro derivan de una sola célula a partir de la fertilización, han llevado a la búsqueda de modelos experimentales.

El cultivo celular es muy adecuado como modelo para el estudio del desarrollo y la diferenciación, por lo que las líneas celulares que conservan la capacidad de diferenciarse *in vitro* son objeto de un intenso estudio. Por último, hay cierto tipo de investigaciones que no pueden realizarse sin el cultivo de células, por ejemplo, el trabajo con animales transgénicos. Dicho trabajo conduce a que organismos maduros expresen genes nuevos. Por lo que se basa totalmente en las técnicas de cultivo celular para la inserción de genes extraños en las células receptoras. Así mismo, la tecnología de la fusión celular y los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular que, en cierto modo, han sido diseñadas para sustituir a la metodología *in vivo* (Cohen, 1995).

3.5.3 Comportamiento de las líneas celulares

En el proceso de establecimiento de un cultivo celular se seleccionan las células que crecerán según numerosos criterios. Así solo formarán el cultivo aquellas células que sean por

una parte capaces de superar el proceso de disgregación, y por otra capaces de adherirse al sustrato y proliferar en forma de monocapa o en suspensión.

Una de las formas de crecimiento *in vitro* más habitual es el cultivo en monocapa (Hayflick *et al.*, 1961; Michikawa *et al.*, 1991). Cuando las células requieren la adhesión a un sustrato para crecer y dividirse, el crecimiento se realiza en una única capa celular (monocapa). Esta monocapa crecerá hasta alcanzar cerca del 100% de confluencia (máxima capacidad de cubrimiento de superficie); pasada esta etapa, el crecimiento se detiene por inhibición por contacto y las células pueden comenzar a degenerar, despegarse y morir. No obstante, algunas variantes de células tumorales son capaces de “apilarse” y dar lugar a multicapas.

El crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato.

Cuando se mantiene el cultivo se establece una nueva selección, es decir, aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento. En el momento en que se alcanza la confluencia las células, en general, detienen su crecimiento. Se ha de entender el cultivo como un ente dinámico en el que las proporciones relativas de los diferentes elementos que lo forman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a la que estén sometidos.

Una vez se alcanza la confluencia en el cultivo es cuando muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Es en este estado, cuando el parecido morfológico y fisiológico es mayor al modelo celular de origen. También es el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario dividir o replaquear las células.

Es una observación generalizada que después del tercer replaqueo el cultivo se estabiliza y homogeneiza, es decir, el tipo celular de mayor tasa de crecimiento ha ocupado completamente el cultivo desplazando a los otros tipos celulares.

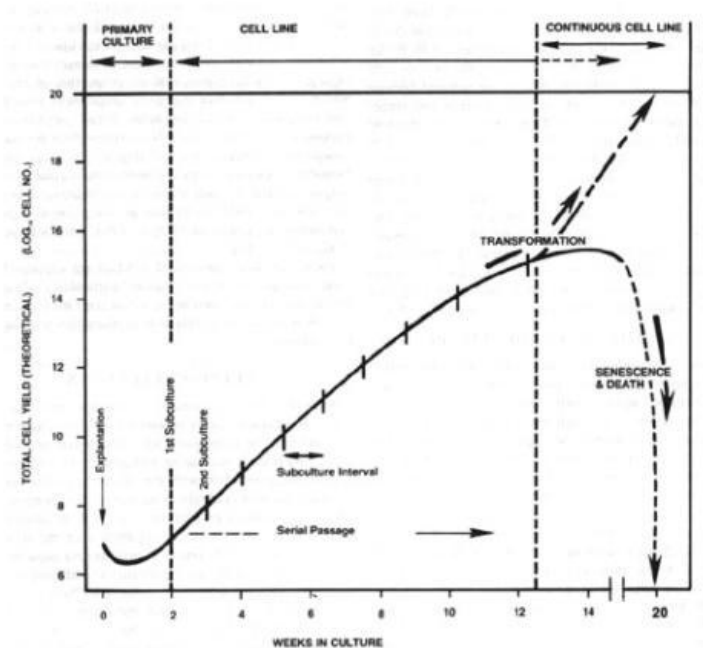


Figura 1: Evolución de una línea celular hipotética. Comportamiento a lo largo de las semanas

Cuando las células comienzan a dividirse en la placa su número se incrementa, hasta ocupar toda la superficie disponible. En ese momento es necesario tomar algunas y resembrar en una nueva placa. En el caso de células en cultivo primario el factor de dilución de un pase al siguiente suele ser de 1/2 a 1/5 pero no superior. En el caso de líneas celulares establecidas la dilución puede ser tan elevada como 1/100 o 1/1000, siendo la habitual 1/10.

El crecimiento de las células en cultivo primario prosigue a lo largo de una serie de generaciones o pases característicos de cada tipo celular y condiciones de cultivo. Solo ocasionalmente un cultivo primario se mantiene durante más generaciones de las esperadas, debido a la aparición en el cultivo de células inmortales. Estas células forman líneas estables o cultivos celulares permanentes. La razón de la inmortalización de estas células es en la mayor parte de los casos desconocida pero se incrementa la frecuencia de inmortalidad mediante infecciones virales, tratamientos con mutágenos, etc, por lo que deben estar relacionadas con la pérdida, espontánea o inducida por el tratamiento, de las vías de control celular. Se especula con que la capacidad de un cultivo celular primario para establecerse como línea estable está relacionada directamente con su variabilidad genética.

El cultivo de células no sólo presenta dificultades en función del tipo de célula de la que se trate, también hay grandes diferencias que se relacionan fundamentalmente con el grado de diferenciación. En general, se puede establecer que una línea celular será más fácil de establecer o cultivar cuanto más indiferenciada sea, con las excepciones de las líneas tumorales de células diferenciadas.

Por lo general, los cultivos primarios de muchos tipos de células son posibles porque éstas pierden ciertas características diferenciadoras, como la incapacidad de dividirse, y se convierten en células que mantienen tan sólo algunas de las propiedades que las caracterizaban. Esta pérdida puede producirse por una desdiferenciación o desadaptación. La desdiferenciación implica una pérdida irreversible de una propiedad diferencial del tipo celular, mientras que la desadaptación implica que la característica especializada perdida no es irreversible sino consecuencia de la pérdida de la señal y que basta con recuperarla para que se reexpresen (Michalopoulos et al., 1975; Sattler et al., 1978).

Uno de los métodos de preservación por tiempo indefinido de células es por medio de la congelación en nitrógeno líquido. Los pasos cruciales dependen de adecuadas velocidades de congelación y descongelación de las células. Para congelar las células los protocolos más exitosos bajan la temperatura lentamente hasta los $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ evitando de esta manera la formación de cristales intracelulares que pudieran dañar a las células. Cuando la temperatura se baja bruscamente la velocidad de formación de cristales intracelulares se incrementa y la viabilidad decae de forma considerable. En la preparación se incluye, además, un agente que limita la cristalización, como el dimetil sulfóxido (DMSO). Para el descongelado en cambio, se incrementa abruptamente la temperatura para evitar que las células sufran grandes cambios de volumen y estallen.

3.5.4 Justificación de los ensayos con líneas celulares *in vitro*

Las principales razones que justifican el empleo de líneas celulares son:

- Morales y éticas, ya que no se somete a estrés ni sufrimiento a seres vivos. Se consideran crueles los ensayos *in vivo* para detectar la capacidad irritativa dérmica y ocular (test de Draize) y los de toxicidad aguda para calcular la dosis letal media.

- Económicas, debido a que el coste de los ensayos de toxicidad con animales es muy alto y por lo tanto supone un obstáculo para el desarrollo de muchos medicamentos y compuestos químicos. El coste de la evaluación toxicológica completa de un producto oscila entre 56.000 y 3.000.000 de euros (Repetto *et al.*, 2009).
- Científicas, ya que la experimentación tradicional con animales es fundamentalmente empírica; muchos de los efectos están originados en procesos complejos, que no son suficientemente conocidos o entendidos. Por el contrario, las experiencias con células o fracciones celulares permite limitar o fraccionar los procesos fisiopatológicos, lo que favorece el entendimiento de las fases, incluso de la interacción molecular, y la medición en términos cuantitativos de acciones y efectos, lo que a su vez hace posible la comparación objetiva de unas sustancias con otras. La implantación de las sistemáticas de evaluación de la toxicidad de compuestos químicos en animales, han producido importantes errores en los resultados que han obligado a la implantación de los códigos de Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Logísticas, ya que, aunque los ensayos con animales fueran capaces de predecir correctamente el riesgo que los productos suponen para el hombre, sólo tendríamos de suficiente número de animales, laboratorios, técnicos y toxicólogos para evaluar una mínima parte de los más de 1.000 nuevos compuestos que se introducen cada año.
- Socio-políticas, debidas a la presión de diferentes grupos sociales que exigen la abolición de la experimentación animal, apoyándose en motivos éticos.
- Legales, la legislación europea y española establece que “no deberá realizarse un experimento si se dispone de otro método científicamente satisfactorio y contrastado que permita obtener las mismas conclusiones, sin implicar la utilización de animales” (Directiva del Consejo 86/609/CEE; R.D. 1201/2005, del 21 de octubre).

3.5.5 Ventajas e inconvenientes del cultivo celular *in vitro*

Las principales ventajas de los métodos de experimentación toxicológica *in vitro* (Repetto *et al.*, 2005) con líneas celulares son las siguientes:

VENTAJAS

INCONVENIENTES

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">▪ Ética y moralmente más aceptables▪ Número reducido de animales▪ Posibilidad de uso de material humano▪ Mayor precisión▪ Control absoluto de la duración del periodo de contacto▪ Menores cantidades de productos ensayados▪ Control del medio fisicoquímico▪ Mayor reproducibilidad en los resultados, sin interferencias▪ Fácilmente objetivables y cuantificables▪ Facilitan el estudio de los mecanismos de acción tóxica▪ Ahorro de tiempo al facilitar los resultados▪ Menor coste (instalaciones menos complejas)▪ Evitar interferencias con otros órganos | <ul style="list-style-type: none">▪ Necesidad de utilizar más de un sistema de ensayo▪ Limitada duración de la actividad fisiológica (detección toxicidades crónicas)▪ Ausencia de ciertos fenómenos toxicocinéticos▪ Mayores dificultades para ensayar sustancias poco solubles, volátiles, gaseosas, y fácilmente degradables▪ Posibilidad de obtener resultados erróneos, debido a ensayos en condiciones no adecuadas▪ Complejidad para la extrapolación a ensayos <i>in vivo</i>▪ Técnica sensible, ya que el crecimiento de las células se tiene que realizar en estrictas condiciones de asepsia |
|--|---|

3.5.6 Validación y aceptación de los métodos *in vitro* con cultivos celulares

La comunidad científica admite sin reservas la utilidad y los resultados obtenidos por procedimientos *in vitro* en la investigación básica de los mecanismos farmacológicos, tóxico-dinámicos y de los procesos tóxico-cinéticos.

A principios de los años ochenta se reconoció que la validación (proceso por el que se establece la exactitud y aplicabilidad de este procedimiento para un determinado propósito) de los métodos alternativos es el proceso clave de la metodología *in vitro*. Hasta la implantación de los códigos de Buenas Prácticas de Laboratorio, nadie se había planteado la necesidad de validar los procedimientos de experimentación animal (Repetto, 1988), que fueron

introduciéndose en la legislación de acuerdo con consideraciones empíricas, pero sin que se hubiera valorado previamente la capacidad predictiva real de la toxicidad sobre el hombre. Ciertamente, la validación parece ser más difícil que el propio desarrollo del método.

Una vez comprobada científicamente la validez del nuevo método, se precisa que las autoridades reguladoras lo aprueben e introduzcan en la legislación como un ensayo complementario o sustitutivo a los vigentes con animales. En la práctica, esta aceptación legal es la parte más compleja y difícil.

Para fomentar el proceso validatorio de nuevos métodos *in vitro*, se han desarrollado varios programas multicéntricos tanto internacionales como nacionales. El programa MEIC (Multicenter Evaluation of *in vitro* Cytotoxicity), iniciado en 1989 por la Sociedad Escandinava de Toxicología Celular, persigue valorar la capacidad de diversos ensayos de citotoxicidad para predecir la toxicidad humana, empleando una lista común de productos de ensayo.

La creación de una base de datos de procedimientos *in vitro*, denominada INVITTOX, permite a los investigadores estar al día de los resultados obtenidos por cada método y de la fase en que se encuentra en el proceso de validación. También existen programas nacionales en USA, Alemania, Francia, y propuestas para España (Repetto, 1992).

3.5.7 Células tumorales de colon. Línea celular HT-29

Las líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal han proporcionado una herramienta muy útil para el estudio de genes reguladores de la diferenciación intestinal y su implicación en el cáncer, en gran parte debido a la dificultad de obtener cultivos primarios a partir de células epiteliales normales de intestino.

En particular, algunas líneas celulares colorrectales tienen conservadas partes del programa de diferenciación epitelial del intestino, expresando muchos de los genes característicos de las células del epitelio colónico diferenciado (por ejemplo de células absortivas o mucosecretoras), y mantienen la capacidad de formar monocapas de células polarizadas una vez que han alcanzado la confluencia en cultivos *in vitro*.

Por otra parte, muchas de estas líneas celulares presentan mutaciones genéticas, así como inestabilidad cromosómica y de microsatélites similares a lo que ocurre en tumores colorrectales, lo cual es muy interesante a la hora de estudiar la conservación o pérdida de mecanismos de diferenciación celular durante la progresión tumoral. En consecuencia, estas líneas celulares son muy útiles como modelos de diferenciación celular, normal y tumoral.

La línea celular HT-29 fue establecida en 1975, derivada de células de adenocarcinoma de colon humano (Fogh, 1975).

A nivel morfológico, los cultivos de esta línea celular son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diversa capacidad de diferenciación. Así pues, en condiciones estándar de cultivo, la población HT-29 contiene más de un 95% de células morfológicamente indiferenciadas. Durante el crecimiento hacia postconfluencia, las células se van apilando y no se polarizan, formando multicapas, y no expresan marcadores de diferenciación característicos de células del epitelio intestinal adultas. Sin embargo, el 5-10% restante de la población total desarrolla características diferenciadas, expresan enzimas como la aminopeptidasa N (APN), dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), antígeno carcinoembrionario (CEA), la glicoproteína membranal MUC1 así como otras mucinas (Lesuffleur *et al.*, 1990).

A nivel genético, las células HT-29 presentan alteraciones típicas de tumores colorrectales, como son mutaciones en APC (aminopeptidasa C) y Tp53 (gen clave del ciclo celular) con la consiguiente pérdida de sus funciones, la amplificación de *cmyc* (Corzo *et al.*, 2003), así como un fenotipo de inestabilidad cromosómica y aneuploidía.

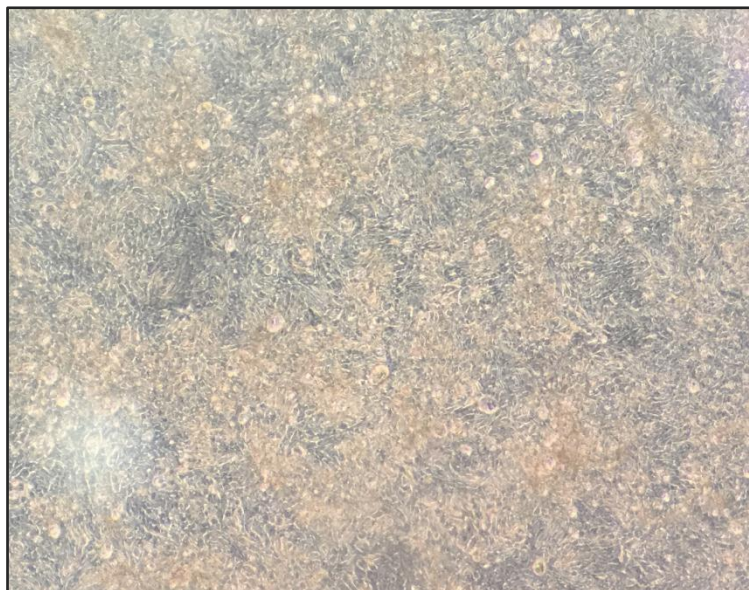


Figura 3.5.7: Línea celular HT-29 en cultivo en monocapa

3.5.8 Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado (Repetto, 2002). Diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas.

Dentro de la batería de ensayos *in vitro* como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular.

3.5.9 Medida de la viabilidad celular

Hay diversas técnicas para medir la viabilidad celular, las más destacadas son:

▪ **MTT:** Se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Es un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul, sensible y cuantitativo. Se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto denominado formazán, debido a una reacción que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. (Mosmann, 1983; Berridge *et al.*, 1996).

- **MTS**: Es un método muy similar al MTT, diferenciándose en que el formazán que se produce con el MTS es soluble en medio y por tanto no requiere su solubilización posterior, de forma que las células no tienen que ser lisadas quedando viables para ser utilizadas con posterioridad. Se basa en la reducción metabólica del 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio.

- **XTT**: Este método es menos tóxico que el MTT y proporciona la ventaja de poder liberar el reactivo sin la necesidad de lisar las células con DMSO antes de la medida, lo que permite la posibilidad de poder utilizar las células posteriormente. Los resultados que se consiguen con XTT son similares a los conseguidos con MTT pero es necesaria la presencia de menadiona ya que la biorreducción es menos eficaz. El metabolismo de las sales de tetrazolio está directamente relacionado con el número de células y refleja la actividad de las enzimas mitocondriales. El uso de esta sal está menos extendido debido a su inestabilidad y a su alto coste en comparación con el MTT.

- **ROJO NEUTRO**: Esta prueba es una medida de la toxicidad de un compuesto determinado por la liberación de un colorante (rojo neutro) debido a la pérdida de la viabilidad celular. El rojo neutro (3-amino-7-dimethylamino-2 metil-fenazina-hidrocloruro) es un colorante catiónico débil que se incorpora en células viables. Es captado por las células y en la medida que la célula pierda viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa se libera al medio el colorante pues solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior. Seguidamente se determina la cantidad de rojo neutro que permanece después de la exposición dentro de la célula (Norton, 2000). El rojo neutro tiende a precipitar irreversiblemente formando cristales, lo que podría causar interferencias.

- **ENLAZAMIENTO AL AZUL DE KENACID**: Mediante este ensayo es medido el cambio en el contenido de proteínas totales, lo cual constituye un reflejo de la proliferación celular. Al encontrarse afectado el crecimiento celular debe reducirse el número de células presentes en el cultivo tratado con respecto al control, por lo que la medida de la concentración de proteínas presentes en el cultivo constituye un índice de toxicidad (Lodish *et al.*, 2007). Por lo general se exponen las células al producto, se retira y se exponen las células al colorante, el cual enlaza a las proteínas celulares. Por

último se determina la cantidad de azul de kenacid retenido por las células y se cuantifica el porcentaje de inhibición del crecimiento celular. (Arencibia *et al.*, 2003).

▪ AZUL DE ALAMAR (AB): El ingrediente activo de AB es la resazurina, un compuesto no tóxico, permeable a las células y de color azul. Al entrar en las células, resazurina (azul, no fluorescente) se reduce a resorufina (rosado, altamente fluorescente), por oxidoreductasas. Las células viables realizan esta reacción, generando así una medida cuantitativa de la viabilidad o citotoxicidad. Esta técnica correlaciona la proliferación celular con la magnitud del potencial REDOX de la reacción del colorante (Ahmed *et al.*, 1994; Goegan *et al.*, 1995; Nociari *et al.*, 1998).

▪ SULFORRODAMINA B (SRB): Ensayo colorimétrico, no radiactivo de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la unión electrostática de la SRB a los aminoácidos básicos fijados con ácido tricloroacético (TCA). Es una técnica sensible, rápida y sencilla.

3.5.10 ELECCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL MÉTODO UTILIZADO

Comúnmente, en los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, se emplean diferentes métodos, la mayoría de éstos son de punto final, al usarse de forma destructiva, lo cual imposibilita seguir el comportamiento de las células después de ser sometidas a un tratamiento traumático.

Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe ser:

- ✓ Simple
- ✓ Rápida
- ✓ Eficiente
- ✓ Económica
- ✓ Reproducible
- ✓ Sensible
- ✓ Segura
- ✓ Efectiva en la medida de la población celular viable

- ✓ No mostrar interferencia con el compuesto a evaluar.

La técnica colorimétrica de medida de viabilidad celular elegida para la realización de los ensayos de citotoxicidad fue la del MTT.

La reducción metabólica de MTT es uno de los métodos más empleados para medir supervivencia y proliferación celular. Fue desarrollado por Mosmann, 1983, siendo modificado por Denizot *et al.*, 1986. Dicha reducción es llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa obteniéndose un compuesto de color azul oscuro (formazán). El formazán se acumula en la célula ya que no puede pasar a través de la membrana plasmática, lo que genera la necesidad de lisar las células para liberarlo. Los cristales que se forman debidos a que el MTT se transforma metabólicamente en formazán son insolubles en agua y por tanto quedan atrapados en el interior de la célula. Dichos cristales deben ser solubilizados con disolventes orgánicos, entre los que se encuentran el DMSO, isopropanol-HCl y etanol; siendo el DMSO el de uso más generalizado y por ello el empleado en este proyecto.

La cantidad de células vivas es directamente proporcional a la cantidad de formazán producido y se cuantifica por colorimetría.

Este método es simple, preciso y rápido. Es una de las técnicas más utilizadas, siendo muy empleada para medir viabilidad, proliferación y activación celular. También presenta la ventaja de que permite procesar gran cantidad de muestras y con gran precisión al poder realizar los ensayos en placas de 96 pocillos, y además es más económico que la mayoría de los métodos anteriormente descritos.

3.6 EXPRESIÓN GÉNICA Y ENZIMÁTICA

El proceso de apoptosis tiene una regulación compleja. La pérdida de integridad de las uniones intercelulares, hormonas y factores de crecimiento, los impactos ambientales como agentes químicos, radiaciones ionizantes e isquemia y el sistema inmune, son algunos de los desencadenantes extracelulares de apoptosis. Estos agentes actúan a través de receptores de membrana, receptores intracelulares o produciendo un daño directo nuclear, dando lugar a la

liberación o inhibición de reacciones intracelulares que conducen a la fragmentación del material genético y a la muerte celular (Raff, 1992).

La apoptosis es un mecanismo clave detectado en las líneas celulares cancerosas cuando los cultivos se exponen a digestatos de tomate. Palozza et al, (2009) identificaron la activación de la cadena de caspasas como un mecanismo iniciador de la apoptosis tras la exposición de células de cáncer de colon HT-29 a digestatos de tomate. Las caspasas son una familia de proteasas que median la muerte celular programada por apoptosis. La caspasa 3 es una de las enzimas críticas de la apoptosis, una proteína efectora que es la más estudiada en mamíferos. Puede procesar procaspasas 2, 6, 7 y 9 y específicamente escindir la mayor parte de sustratos relacionados conocidos, incluyendo muchas proteínas clave tales como la enzima nuclear poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), el inhibidor de la desoxirribonucleasa activada por caspasas (ICAD), y gelsolina y fodrina, que son proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis. Esta escisión es parte del mecanismo que conduce a la muerte celular. Además, la caspasa 3 desempeña un papel fundamental en la regulación de la apoptosis, incluyendo la condensación de la cromatina condensación y la fragmentación del ADN, así como la gemación y otros cambios morfológicos asociados. La actividad de la caspasa 3 es específica de tejido y tipo celular.

En el trabajo mencionado (Palozza et al, 2009), se detectó que los digestatos de tomate activaban la vía de la cascada de caspasas por la disminución de la expresión de los genes supresores de tumor de la familia Bcl-2, y el aumento de la expresión de genes pro-apoptóticos como BAX, y la regulación negativa de la expresión de genes del ciclo celular tales como ciclina D1.

Según, Pereira et al., 2014, el análisis de citómetro de flujo revela que el licopeno promueve hasta el doble aumento de la apoptosis en células PCa en comparación con el grupo control. Utilizando el ensayo de PCR en tiempo real, encontramos que el licopeno promueve una regulación positiva del gen Bax y una regulación negativa del gen Bcl-2 en las células PCa. Este estudio apoya la propuesta de que el licopeno puede tener un efecto protector sobre el cáncer de próstata.

La secuenciación directa y el análisis de la disgregación de anticuerpos químicos del ADNc de p53 utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en estas líneas celulares mostraron que todas las líneas celulares que expresaban altos niveles de p53 sintetizaban

mRNAs que codificaban proteínas p53 mutantes. Por lo tanto, concluimos que la sobreexpresión de p53 es sinónimo de mutación, pero algunas mutaciones no se detectó por un simple análisis inmunohistoquímico (Rodrigues et al., 1990).

El supresor de tumores p53 actúa para integrar múltiples señales de estrés en una serie de diversas respuestas antiproliferativas. Una de las funciones p53 más importantes es su capacidad para activar la apoptosis, y la interrupción de este proceso puede promover la progresión del tumor y la quimiorresistencia. p53 aparentemente promueve la apoptosis a través de la transcripción dependientes y dependientes de los mecanismos que actúan en concierto para garantizar que el programa de muerte celular prosigue de manera eficiente. Además, la actividad apoptótica de p53 está estrechamente controlada, y está influenciada por una serie de eventos cuantitativos y cualitativos que influyen en el resultado de la activación de p53. Curiosamente, otros miembros de la familia p53 también pueden promover la apoptosis, ya sea en paralelo o en concierto con p53. Aunque incompleta, nuestra comprensión actual de p53 ilustra cómo la apoptosis puede ser integrado en una red supresora de tumores más grande controlada por diferentes señales, factores ambientales y tipo de células. La comprensión de esta red en más detalle proporcionará ideas sobre el cáncer y otras enfermedades, e identificará estrategias para mejorar su tratamiento terapéutico (Friedman et al., 2003).

❖ Gen p53

Se trata de un gen supresor que codifica una proteína nuclear. La función del p53 en estado normal es la de regulación del ciclo celular ante un daño de ADN. Cuando se daña el ADN, el p53 se acumula en el núcleo, y es capaz de detener el ciclo celular antes que se duplique el ADN e iniciar su reparación. P53 va a inducir la síntesis de proteínas inhibidoras de los complejos ciclina, bloqueando en ciclo celular. Si se repara la lesión el ciclo continúa, pero si no se repara se induce la apoptosis de la célula mediante la expresión de genes como Bax. La alteración de la proteína p53 produce inestabilidad genómica, siendo las células incapaces de evitar la proliferación o activar la apoptosis, cuando está comprometida la integridad del ADN, de manera que son capaces de acumular las mutaciones para completar las carcinogénesis.

Las mutaciones de p53 se encuentran en aproximadamente la mitad de los tumores malignos. Son fundamentalmente mutaciones por sustitución, en las que se cambia un aminoácido. La mutación del gen p53 es uno de los cambios genéticos más comunes en el

desarrollo del cáncer colorrectal humano (Rodríguez *et al.*, 1990), seguido de los carcinomas de pulmón y el de los carcinomas de mama.

❖ Gen Bax

La proteína codificada por este gen pertenece a la familia de proteínas BCL2. Los miembros de la familia BCL2 forman hetero- o homodímeros y actúan como reguladores anti o pro-apoptóticos que están implicados en una amplia variedad de actividades celulares. Esta proteína forma un heterodímero con BCL2, y funciona como un activador apoptótico. Se informa que esta proteína interactúa con el canal aniónico dependiente del voltaje mitocondrial (VDAC), y aumenta la apertura del mismo, lo que conduce a la pérdida de potencial de membrana ya la liberación de citocromo c. La expresión de este gen está regulada por el supresor tumoral P53 y se ha demostrado que está implicada en la apoptosis mediada por P53. Se han reportado múltiples variantes de transcripción empalmadas, que codifican diferentes isoformas, para este gen.

Se ha demostrado claramente que el gen p53 es el oncogén mutado más comúnmente en una amplia variedad de cánceres humanos, incluyendo los adenocarcinomas más frecuentes. El p53 de tipo salvaje integra una red compleja de respuestas antiproliferativas, incluyendo apoptosis, detención del ciclo celular y senescencia (Friedman *et al.*, 2003). Sin embargo, aunque la pérdida de funcionalidad normal es casi universal, p53 podría no ser realmente un gen supresor de tumores, pero un efecto negativo dominante está involucrado en la mayoría de las mutaciones (Liu *et al.*, 2006).

La red antiproliferativa p53 es controlada por diferentes señales, incluyendo factores ambientales, tales como biomoléculas dietéticas activas y sus metabolitos. Hasta donde sabemos, a partir de micronutrientes de tomate sólo licopeno se ha citado como activador de p53 para inducir la vía intrínseca de la apoptosis en las células cancerosas, pero diferentes líneas de HT-29 (Palozza *et al.* 2010, Pereira *et al.*, 2014).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MUESTRAS

En el desarrollo de este proyecto se analizaron muestras de gazpacho tanto pasteurizado como casero, así como algunas hortalizas comunes en nuestra dieta, concretamente tomate redondo var. Racimo (*Solanum lycopersicum* L.) y pimiento dulce var. Palermo (*Capsicum annuum* L.). Las muestras que han sido utilizadas presentan las condiciones adecuadas para su consumo. Éstas fueron utilizadas para la determinación de color, y otros parámetros, así como para la realización de los ensayos de viabilidad celular, tanto en fresco como digeridos in vitro.

En principio este trabajo se inició con un gazpacho pasteurizado de una marca comercial, con el cual realizamos análisis y caracterización de la viabilidad celular, pero seguido de estos análisis se utilizó el mismo gazpacho de la misma marca comercial en crudo, y posteriormente llegamos a utilizar un gazpacho casero, realizado en el laboratorio. Se utilizó una receta casera tradicional normalizada de gazpacho. El tomate y el pimiento dulce usados en la receta del gazpacho fueron probados para la acción anti-proliferativa contra crecimiento de las células. Las proporciones en la receta del gazpacho fueron: 385 g / l de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), 58 g / l de pepino corto (*Cucumis sativus* L.), 3 g / l de pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.), 2 g / l de ajo (*Allium sativum* L.), 3,3% (v / v) de aceite de oliva virgen extra (CarbonellTM, España) % De agua (v / v) y vinagre de 0,16% (v / v) (BorgesTM, España). La composición del aceite de oliva se caracterizó por 88% de ácido oleico y 0,2 ° de acidez, y la acidez del vinagre fue de 6°. Estos ingredientes se molieron durante 60 segundos a temperatura ambiente para convertirse en una sopa semilíquida, con una batidora doméstica (tipo BLP30, KenwoodTM, China).

4.2 CULTIVOS CELULARES

4.2.1 Instrumentación

- Baño de agua termostatzado (P Selecta)
- Cabina de flujo laminar (Telstar BioUltra)
- Cámara de recuento celular (Neubauer)
- Centrífuga refrigerada (Digiten 20-R)
- Congelador de -80°C (Giralt)
- Congelador de -20°C

- Contenedor de nitrógeno líquido
- Microscopio invertido de contraste de fase (Olympus CKX 41)
- Frascos Falcon de cultivo estériles de 25 cm² (Sarstedt)
- Micropipetas de 100 y 1000 µL (Gilson)
- Pipetas serológicas estériles de 2, 5 y 10 mL (Sarstedt)
- Pipetas Pasteur estériles (Deltalab)
- Criotubos estériles de 1,5 mL (Sarstedt)
- Tubos universales estériles de 15 y 50 mL (Sarstedt)
- Puntas de micropipeta de 100 y 1000 µL (Daslab)
- Recipientes Stericup estériles para filtración (Millipore)
- Tubos eppendorf estériles de 2 mL (Sarstedt)
- Incubadora de CO₂ (Sanyo)
- Balanza de precisión (Gibertini)
- Balanza (Denver)
- Autoclave Selecta (Autotester)

4.2.2 Medios y reactivos

- Medio RPMI_1640 con rojo fenol
- Medio RPMI_1640 sin rojo fenol
- Tripsina- EDTA
- Glutamina (200mM)
- Penicilina (10000 uds) y estreptomicina (10mg/mL)
- Anfotericina B (250µg/mL)
- Piruvato Sódico (100mM)
- Tampón PBS (Phosphate Buffered Saline Solution) 10mM
- Suero fetal bovino (FBS)
- Azul tripán
- Dimetil sulfóxido (DMSO)

4.2.3 Descongelación- Congelación

4.2.3.1 Procedimiento de descongelación

- Preparar un baño de agua termostatzado a 37⁰C y esperar hasta que alcance la temperatura.

- Extraer el criotubo del depósito de nitrógeno líquido (figura 4.2 3) e introducir rápidamente en el baño durante unos minutos agitándolo suavemente hasta la completa descongelación.
- Verter el contenido del criotubo en un tubo tipo universal de 15 mL, agitándolo previamente.
- Añadir 9 mL de medio de cultivo (RPMI-1640) al tubo universal. Así diluimos el DMSO el cual es altamente tóxico para las células a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 100xg durante 10 minutos.
- Retirar el sobrante para eliminar el DMSO.
- Resuspender el sedimento celular en 1-2 mL de medio de cultivo celular con rojo fenol y realizar el conteo para calcular la viabilidad de las células tras la congelación.
- Ajustar la concentración de células (de 10000 a 30000 células/frasco) y sembrar en un frasco falcon de 25 cm² con 5 mL de medio con rojo fenol.
- Rotular el frasco falcon indicando la línea celular y la fecha de extracción del criotubo.
- Llevar el frasco a la incubadora de CO₂.
- Tras varios días, una vez que se han adherido las células, eliminar el medio con las células muertas y añadir medio fresco lavando previamente con 2mL aproximadamente de PBS.



Figura 4.2.3: Depósito de nitrógeno líquido.

4.2.3.2 Procedimiento de congelación

Para conservar las líneas celulares durante un largo período de tiempo, se congelan las células en un depósito de nitrógeno líquido.

El proceso consiste:

- Realizar el pase a un cultivo que se encuentre entre un 80-90 % de confluencia.
- Retirar el medio de cultivo que contiene la línea celular.
- Lavar con aproximadamente 2mL de PBS dos veces hasta eliminar todas las impurezas.
- Añadir 2 mL aproximadamente de una solución de Tripsina-EDTA.
- Dejar incubar entre 5 y 15 minutos a 37°C en la estufa de cultivo golpeando el frasco suavemente cada 5 minutos para facilitar la tripsinización.
- Añadir 8 mL de medio RPMI_1640 sin rojo fenol.
- Hacer contaje celular
- Centrifugar las células a 100xg en frascos universales durante 10 minutos.
- Eliminar el medio RPMI_1640 sin rojo fenol
- Resuspenderlas en suero fetal bovino enriquecido con un crioprotector como DMSO (dimetil-sulfóxido) al 10 %.
- Distribuir en criotubos de 2 mL (en cada uno de ellos debe haber aproximadamente un millón de células).
- Traspasar al congelador de -80°C inmediatamente, ya que el DMSO puede dañar las membranas celulares a temperatura ambiente.
- A las 24-48 horas se introducen en nitrógeno líquido para conservarlas por tiempo indefinido.

El dimetil sulfóxido es un solvente bipolar, hidrosoluble, de bajo peso molecular. Su acción crioprotectora se atribuye a que previene la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular. Se han sugerido interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos lo cual parece ser crítico para la crioprotección de la membrana y por esta razón es considerado tóxico a temperatura ambiente.

4.2.4 Cultivo en monocapa

4.2.4.1 Procedimiento del cultivo en monocapa

Se ha usado una línea celular: HT-29 (células cancerígenas de colon). El manejo de la línea celular se realiza en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (figura 4.2.4), usando material y soluciones estériles.



Figura 4.2.4: Cabina de flujo laminar

La línea celular ha sido cultivada en medio RPMI_1640 con rojo fenol, suplementado con glutamina y Piruvato 2mM, 500mg/mL Penicilina-Estreptomicina, 40 mg/mL Amphotericina y un 10% suero bovino fetal.

El suero bovino fetal añadido, previamente se descomplementa manteniéndolo a 56⁰C durante 30 minutos.

Para el cultivo se utilizarán frascos falcon de 25 cm² estériles y la incubación se lleva a cabo en una incubadora (figura 4.2.5) a una temperatura de 37⁰C, con una humedad del 90 % y una atmósfera con un 5 % de CO₂.



Figura 4.2.5: Incubadora de cultivo.

Para realizar los diferentes cambios de medio durante el crecimiento de las células se realizan los siguientes pasos:

- Cambiar el medio de acuerdo con su acidificación cada 48-72 horas, lavando previamente con PBS.
- Añadir unos mililitros (aproximadamente 2 mL) de PBS agitando suavemente y posteriormente se desechan. El lavado se puede repetir si es necesario, hasta eliminar las posibles impurezas, células muertas y/o células no adheridas al frasco.
- Añadir medio de cultivo nuevo (calentado previamente a 37⁰C para evitar cambios bruscos de temperatura).

Al alcanzar un 80 % de confluencia aproximadamente (saturación en el frasco de cultivo) se procede a realizar un pase (resiembra de las células en nuevos frascos de cultivo a una concentración baja para obtener más masa celular).

Para realizar el pase de las células adheridas a la pared del frasco de cultivo:

- Retirar el medio de cultivo que contiene la línea celular.
- Lavar con PBS dos veces para eliminar todas las impurezas.
- Añadir 2 mL aproximadamente de una solución de Tripsina-EDTA (previamente calentada a 37⁰C para evitar cambios bruscos de temperatura)

- Dejar incubar entre 5 y 15 minutos a 37⁰C golpeando el frasco suavemente para facilitar la tripsinización.

Las células se despegan debido a que la tripsina tiene una actividad enzimática que rompe la unión entre células y a que el EDTA es un agente quelante de calcio que desorganiza las uniones intercelulares y permite así que las células se despeguen del frasco de cultivo.

- Comprobar al microscopio óptico que se han despegado las células del frasco de cultivo.
- Añadir 8 mL de medio rojo fenol para rebajar el EDTA.
- Pasar la suspensión celular a frascos universales estériles de 15 mL.
- Centrifugar a 100 xg durante 20 minutos.
- Coger una alícuota de 100 μ L y realizar el conteo celular con el método de azul tripán para calcular la viabilidad celular.
- Desechar el sobrenadante del tubo centrifugado y el sedimento de células se resuspende en medio de cultivo nuevo.
- Pasar posteriormente a uno o más frascos de cultivo el resuspendido en función de la concentración que queramos en cada frasco (unas 30000 células/mL en el caso de las HT-29) y la obtenida en el recuento.
- Por último, anotar en el frasco falcon el nombre de la línea celular, número de pase o subcultivo, fecha y número de células sembradas.

Cuando el frasco se satura de células se vuelve a realizar el procedimiento anterior.

4.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

4.3.1 Obtención de extractos

Se han realizado dos extractos de distinta polaridad: un extracto etanol-agua (1:1 v/v) y otro extracto de éter de petróleo. Estos extractos han sido probados en tomate, pimiento y gazpacho. La mezcla entre la biomasa y los disolventes se efectuó en una proporción masa/volumen de 1/9.

Los tomates que se han utilizado son tomates de racimo Ramyle y tomates de racimo Delyca. El pimiento rojo Palermo, ambas hortalizas se han utilizado en un estado de madurez

óptimo para asegurar un alto contenido en carotenoides. El gazpacho utilizado es gazpacho ecológico.

4.3.1.1 Instrumentación

- Balanza (Denver)
- Balanza de precisión (Gibertini)
- Baño con agitador
- Cabina de flujo laminar
- Molinillo
- Rotavapor (Buchi)
- Estufa
- Pipetas Pasteur
- Tubos universales de 15 mL y de 50mL
- Jeringa 10mL
- Filtro de celulosa para jeringa 25 mm, 0,22 μ m
- Micropipetas de 100 y 1000 μ L
- Liofilizador (LyoQuest Telstar)
- Congelador -20⁰C
- Matraz Erlenmeyer de vidrio de 250 mL
- Papel de filtro
- Bomba de vacío (Buchi)
- Embudo Buchner

4.3.1.2 Medios y reactivos

- Etanol
- Agua destilada
- Éter de petróleo
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Pepsina porcina
- Bicarbonato sódico (NaHCO₃)
- Pancreatina
- Extracto de bilis
- Hidróxido sódico (NaOH)

4.3.1.3 Procedimiento de realización del extracto etanol-agua

- Lavar y secar los tomates y pimientos a utilizar, para eliminar las posibles impurezas.
- Cortar los tomates y pimientos en trozos pequeños y el gazpacho lo ponemos en frascos una cierta cantidad.
- Liofilizar las muestras durante 48 horas para eliminar el contenido de agua y así poder asegurar que el extracto queda libre de agua.
- Moler los trozos con un molinillo para el caso del tomate y el pimiento para favorecer la mezcla con los disolventes.
- Preparamos una disolución de etanol- agua al 50 % y realizamos la mezcla con las muestras de tomate, pimiento y gazpacho cada una por separado (1 parte de la muestra y 9 partes de etanol-agua).
- Dejar las mezclas durante unos 7 días en oscuridad y a temperatura ambiente para evitar que las muestras pierdan sus propiedades.
- Tras los 7 días, filtrar la disolución a vacío y evaporar el extracto con el rotavapor.
- Una vez evaporado podemos hacer las diluciones necesarias utilizando como disolvente etanol- agua (tener en cuenta que las diluciones para que no sean tóxicas para las células deben contener como máximo el 1% de etanol).
- Conservar el extracto a una temperatura de -20°C hasta la realización del ensayo de viabilidad celular.

Las concentraciones ensayadas para el extracto de etanol-agua han sido: 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.3.1.4 Procedimiento de realización del extracto etéreo

- Lavar y secarlos bien los tomates y los pimientos a utilizar, para eliminar las posibles impurezas.
- Cortar los tomates y pimientos en trozos pequeños y el gazpacho lo ponemos en frascos una cierta cantidad.
- Liofilizar (figura 4.3.1) las muestras durante 48 horas para eliminar el contenido de agua y así poder asegurar que el extracto queda libre de agua.



Figura 4.3.1: Liofilizador

- Moler los trozos con un molinillo para el caso del tomate y el pimiento para favorecer la mezcla con los disolventes.
- Añadir el éter de petróleo a las muestras liofilizadas de tomate, pimiento y gazpacho cada una por separado (1 parte de la muestra y 9 partes de éter de petróleo).
- Dejar las mezclas durante unos 7 días en oscuridad y a temperatura ambiente para evitar que las muestras pierdan sus propiedades.
- Tras los 7 días, filtrar la disolución a vacío y evaporar el extracto con el rotavapor.
- Una vez evaporado podemos hacer las diluciones necesarias utilizando como disolvente DMSO (tener en cuenta que las diluciones para que no sean tóxicas para las células deben contener como máximo el 0,1% de DMSO).
- Conservar el extracto a una temperatura de -20°C hasta la realización del ensayo de viabilidad celular.

Las concentraciones ensayadas para el extracto de éter de petróleo han sido: 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$.

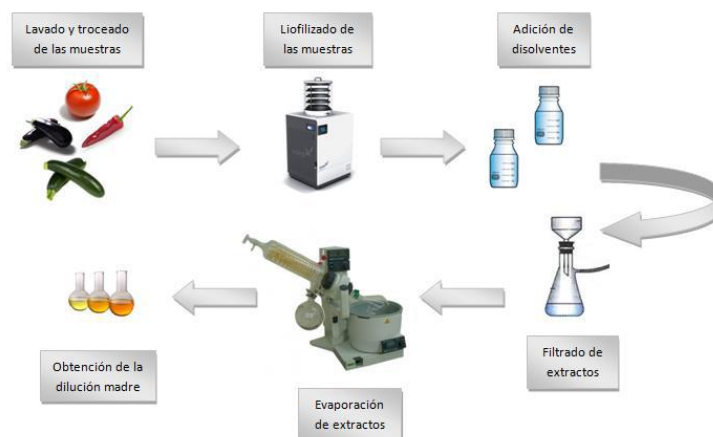


Figura 4.3.2.1: Esquema general de la preparación de extractos.

4.3.1.5 Procedimiento de realización del extracto en fresco de tomate, pimiento dulce y gazpacho

- Lavar los tomates y pimientos y secarlos bien para eliminar las posibles impurezas.
- Triturar los tomates y los pimientos por separado con ayuda de un mortero y filtrar todo el contenido líquido de las muestras por medio de una filtración a vacío, el gazpacho ya está triturado, por lo que solo lo tenemos que filtrar.
- Una vez filtrado el líquido añadir a cada pocillo de la placa la cantidad correspondiente para obtener las diferentes concentraciones deseadas.

Las concentraciones diluciones utilizadas para las muestras en fresco han sido: 5, 10 y 20% (como cada pocillo contiene 200 μ L las concentraciones equivalen a 10, 20 y 40 μ L por pocillo).

4.3.2 Digestión *in vitro* del tomate, pimiento dulce y gazpacho

Se ha realizado una digestión gástrica e intestinal según el método de Garrett et al. (1999).

Se realizan dichas digestiones para comprobar el efecto preventivo del tomate, pimiento y gazpacho ecológico, frente a la línea tumoral, simulando el proceso tal y como ocurre en el interior del cuerpo humano.

4.3.2.1 Procedimiento de realización de los extractos digeridos de tomate, pimiento dulce y gazpacho.

- Lavar los tomates y los pimientos y secarlos bien para eliminar las posibles impurezas.

- Triturar las muestras con ayuda de un mortero.
- Pesar 4 gramos del triturado, en el caso del gazpacho tal cual viene y mezclarlo con 32 mL de disolución salina.
- Homogenizar la mezcla
- Acidificar la mezcla (pH=2) con la adición de 1M de ácido clorhídrico (HCl).
- Añadir 2 mL de disolución de pepsina porcina (40mg/mL en 0,1 M de HCl).
- Transferir la mezcla homogénea a un bote topacio e incubar a 37⁰C en un baño con agitación a 95 rpm durante 1 hora.
- Ajustar el pH a 5,3 con la adición de 1 mL a 1,3 mL de disolución 0,9 M de bicarbonato sódico (NaHCO₃).
- Añadir 9 mL de una mezcla que contiene 2 mg/mL de pancreatina y 12mg/mL de extracto de bilis en 100 mmol/L de una disolución de bicarbonato sódico al 0,1 M.
- Ajustar el pH a 7,5 con la adición de hidróxido sódico 1 N (200 mg de NaOH en 5 mL de agua)
- Adición de nitrógeno (N₂) para crear una atmósfera inerte en el frasco.
- Incubar en el frasco topacio cerrado en un baño de agua a 37⁰C y con agitación de 95rpm durante 2 horas.
- Trascurrido las dos horas de incubación se filtra la digestión y se añade la cantidad correspondiente en cada pocillo.

Las diluciones ensayadas para el gazpacho digerido han sido: 5, 10 y 20 % (como cada pocillo contiene 200 μ L las concentraciones equivalen a 10, 20 y 40 μ L por pocillo).

4.4 ENSAYOS DE VIABILIDAD

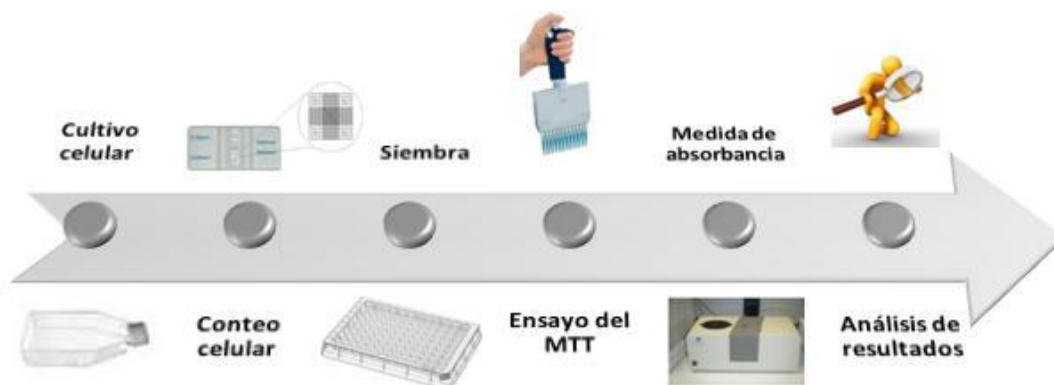


Figura 4.4.: Esquema general de un ensayo de viabilidad celular.

4.4.1 Contaje por el método del azul tripán

4.4.1.1 Instrumentación

- Cámara de recuento celular (Neubauer)
- Microscopio invertido de contraste de fase
- Micropipeta
- Tubos eppendorf de 1,5 mL
- Puntas de micropipeta de 100 μ L

4.4.1.2 Medios y reactivos

- Disolución de azul tripán

4.4.1.3 Procedimiento del método del azul tripán

- Agitar bien la suspensión de células con ayuda de una micropipeta.
- Tomar 100 μ L de la suspensión y depositarlos en un tubo eppendorf.
- Tomar 50 μ L de la suspensión celular y añadir igual volumen de azul tripán al 0,4 % (repipetear para mezclar bien). Las células inviables se verán posteriormente al microscopio óptico de color azul.
- Llenar la cámara del portaobjetos de Neubauer (figura 4.4.1) con la mezcla de la suspensión celular y azul tripán.
- Colocar el portaobjetos en el microscopio óptico y contar el número de células viables en cada una de las cuatro cuadrículas laterales en el caso de las HT-29.
- Calcular el número de células por ml:

$$N^0 \text{ de células/ml} = (n^0 \text{ células}/n^0 \text{ cuadrantes}) * 10000 * \text{factor de dilución}$$

Se multiplica por 10000 ya que el volumen correspondiente a la región contada en la cámara de de Neubauer es de 0,1 mm³.

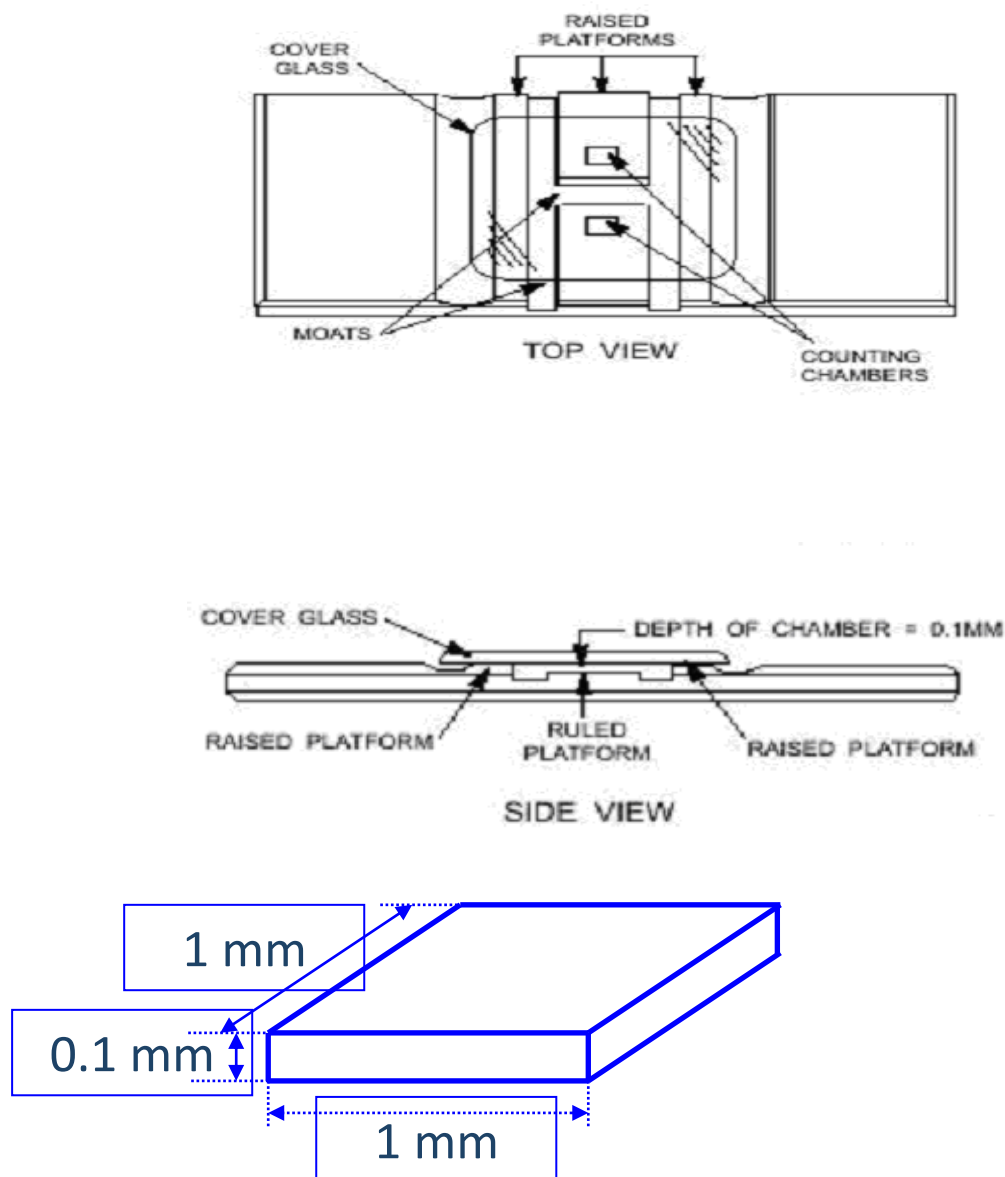


Figura 4.4.1: Cámara de recuento celular (Neubauer)

4.4.2 Técnicas espectrofotométricas

4.4.2.1 MTT

El ensayo MTT es un método colorimétrico sensible y cuantitativo que se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) llevada a cabo por la enzima deshidrogenasa mitocondrial en un compuesto coloreado de color azul oscuro (formazano), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

Este producto se acumula en la célula ya que no puede pasar a través de la membrana plasmática, lo que genera la necesidad de solubilizar las células para liberarlo.

Este método ha sido muy utilizado para medir viabilidad, proliferación y activación celular.

La cantidad de células vivas es directamente proporcional a la cantidad de formazano producido y se cuantifica por colorimetría.

Este método tiene la ventaja de que permite procesar gran cantidad de muestras y con gran precisión al poder realizar los ensayos en placas de 96 pocillos.

Los cristales que se forman debidos a que el MTT se metaboliza a formazano son insolubles en agua y por tanto quedan atrapados en el interior de la célula.

Dichos cristales deben ser solubilizados con disolventes orgánicos, entre los que se encuentran el DMSO (dimetil sulfóxido), isopropanol-HPLC y etanol. En nuestro caso hemos utilizado el DMSO que es el que más ampliamente se ha utilizado.

A. Instrumentación

- Autoclave
- Baño
- Cabina de flujo laminar
- Cámara de recuento celular
- Centrífuga refrigerada
- Microscopio invertido de contraste de fase
- Estufa de cultivo
- Lector de ELISA
- Micropipetas
- Micropipeta multicanal
- Placas de cultivo 96 pocillos
- Puntas de micropipeta de 100 y 1000 μL
- Stericup
- Recipientes para reactivos 8 compartimentos

B. Medios y reactivos

- Medio RPMI_1640 con rojo fenol y sin rojo fenol
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)
- Paclitaxel from Taxus Brevifolia (Taxol)

C. Procedimiento MTT

Para la preparación de la disolución MTT:

- Calentar medio de cultivo sin rojo fenol a 37°C
- Añadir la cantidad necesaria de MTT para obtener una disolución de 5mg/ml.
- Filtrar la disolución de MTT para esterilizar y eliminar los residuos insolubles.
- Guardar a 4°C y protegido de la luz en un tubo de 15 ml.

4.5 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON LAS DISTINTAS MUESTRAS

4.5.1 Instrumentación

- Autoclave (Selecta, Autotester)
- Balanza (Denver)
- Balanza de precisión (Gibertini)
- Baño de agua termostatzado (P Selecta)
- Cabina de flujo laminar (telstar BioUltra)
- Cámara Neubauer de recuento celular
- Centrífuga refrigerada (Digiten 20-R)
- Microscopio invertido de contraste de fase (Olympus CKX 41)
- Incubadora de CO₂ (Sanyo)
- Frascos Falcon de cultivo esteriles de 25 cm² (Sarstedt)
- Micropipetas de 100 y 1000 µL (Gilson)
- Pipetas Pasteur estériles (Deltalab)
- Tubos eppendorf estériles de 2 mL (Sarstedt)
- Tubos universales estériles de 15 y 50 mL (Sarstedt)
- Puntas de micropipeta estériles de 100 y 1000 µL (Daslab)
- Recipientes Stericup estériles para filtración (Milipore)

- Jeringa estéril de 10 mL (BD Discardit II)
- Filtro de celulosa estéril para jeringa 25 mm, 0,22 μm (Sartorius)
- Lector de ELISA (Biotek, Power-Wave XS, Izasa)
- Micropipeta multicanal de 300 μL (Thermo)
- Placas de cultivo de 96 pocillos estériles (Sarstedt)
- Recipientes estériles para reactivos de ocho compartimentos

4.5.2 Medios y reactivos

- Medio RPMI_1640 sin rojo fenol
- Tripsina
- Glutamina (2,1mM)
- Penicilina y estreptomina (100mg/mL)
- Anfotericina B (0,125 mg/mL)
- Piruvato sódico (1mM)
- Tampón PBS (Phosphate Buffered Saline Solution) 10mM
- Azul Tripán
- Suero fetal bovino (FBS)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)

4.5.3 Procedimiento

Los ensayos realizados en este trabajo fueron con las muestras de digestiones de gazpacho pasteurizado y casero, tomate, pimiento dulce y los distintos extractos de etanol y éter de petróleo. La cantidad de disolvente utilizado en los ensayos no resultaba tóxico para las células. Los pasos realizados son los que se explican a continuación.

4.5.3.1 Ensayo de viabilidad celular día 1: SIEMBRA

- Selección del frasco de cultivo con un 80-90% de confluencia, mediante observación al microscopio óptico, para la realización del ensayo.
- Retirada y desecho del medio de cultivo que contiene el frasco.
- Lavado con 2 mL de PBS varias veces hasta eliminar por completo las impurezas y restos del medio de cultivo.
- Adición de 2 mL de tripsina previamente termostatizada a 37°C

- Incubación en incubadora de CO₂ de 5 a 15 min a 37 °C, cada 5 minutos golpear suavemente para facilitar la separación así hasta un máximo de 15 minutos, a fin de levantar toda la monocapa celular.
- Adición de 8 mL de medio sin rojo fenol para diluir la tripsina y homogenizar la suspensión de células con ayuda de una micropipeta, pipeteando enérgicamente y reiteradamente con el fin de deshacer los acúmulos celulares.
- Traspaso de la suspensión celular a tubos de centrifuga de 15mL.
- Agitación del tubo para homogenizar la suspensión.
- Recogida de una alícuota de 100 µL en un tubo eppendorf y realización del conteo celular mediante el método del azul tripán.
- Centrifugación a 100xg durante 15 minutos de la suspensión contenida en el tubo de centrifuga.
- Eliminación del sobrenadante tras haber centrifugado el tubo y resuspensión del sedimento de células de 10mL de medio de cultivo sin rojo fenol.
- A partir del conteo celular realizado se preparó una suspensión de células en medio de cultivo sin rojo fenol a una concentración de 10000 células/pocillo.
- Siembra en placa ELISA de 96 pocillos: los pocillos del borde de la placa se rellenaron de 100 µL de PBS para minimizar el efecto de la evaporación; en las tres siguientes filas se añadieron 100 µL de la suspensión de células previamente preparada y las tres siguientes actuaron como blanco, por lo que se adicionaron 100 µL de medio de cultivo sin rojo fenol.
- Agitación suave para conseguir una distribución uniforme de las células en los pocillos.
- Incubación a 37°C, 90% de humedad y 5% de CO₂ durante 24 horas.

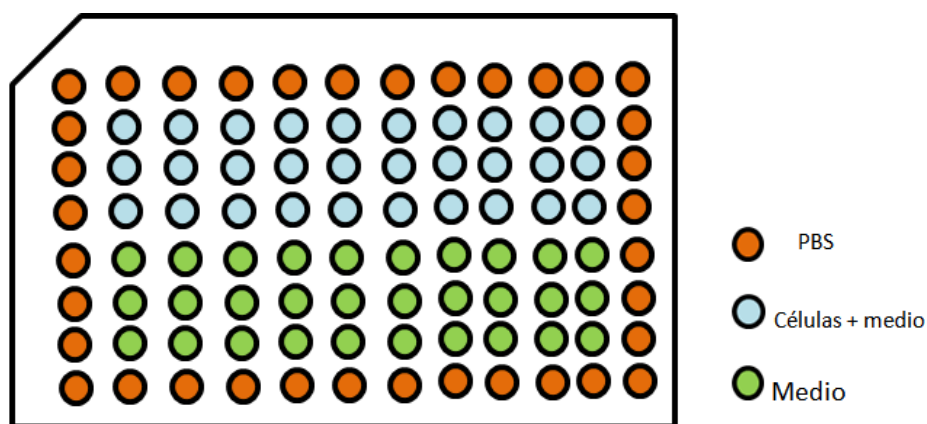


Figura 4.5.3: Placa ELISA ensayo de viabilidad celular día 1: siembra

4.5.3.2 Ensayo de viabilidad celular día 2: adición de extractos

- Preparación de las disoluciones de medio con el agente a ensayar. Se deben realizar las disoluciones doblemente concentradas, ya que hay que tener en cuenta que al añadir el agente se hace con 100 μ L de medio porque el pocillo ya contiene otros 100 μ L de la siembra de células previa; de esta forma se obtiene la concentración deseada.
- Adición de 100 μ L de los extractos a ensayar, en cada columna se ensayó una concentración distinta (1%, 5% y 10% con respecto a los 200 μ L por pocillo). Las dos últimas columnas actuaron como control, una como control negativo por lo que a diferencia del resto se le añadió 100 μ L más de medio en lugar del extracto motivo de ensayo y la otra para medir a las 24 horas mediante la técnica MTT, que a continuación se explica (ver figura 3.20).
- Agitación suave para facilitar la mezcla de las disoluciones.
- Incubación durante 24/48 h en la incubadora de CO₂ para permitir que la sustancia actúe sobre las células.

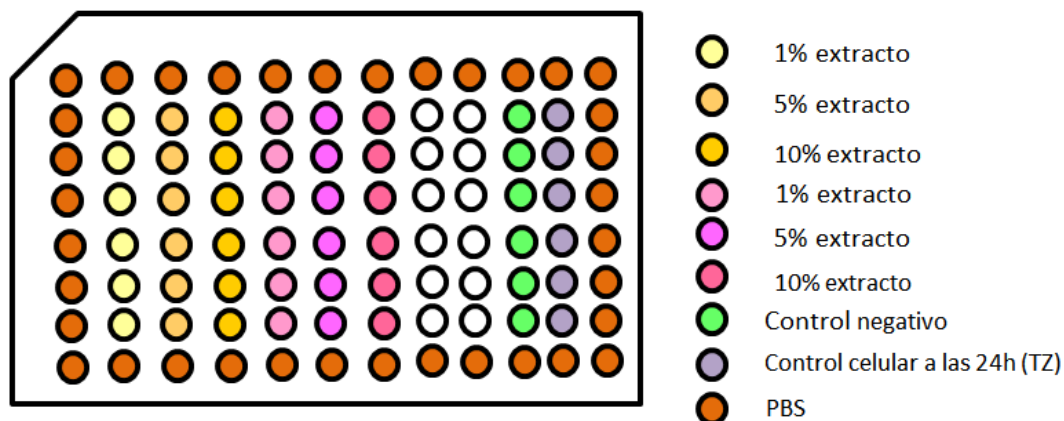


Figura 4.5.4: Ejemplo de placa Elisa en el día 2 de ensayo. Adición de extractos.

4.5.3.3 Ensayo de viabilidad celular día 3 (placa de 48h) y 4 (placa de 72h): técnica del MTT

- Calentamiento del medio de cultivo sin rojo fenol a 37 °C.
- Preparación de una disolución de MTT en medio de cultivo a una concentración de 5 mg/mL.
- Filtrado de la disolución de MTT para esterilizar y eliminar los residuos insolubles.
- Retirada con micropipeta de los 200 μ L del sobrenadante de cada pocillo tras 48 h en incubación y adición de otros 200 μ L de medio fresco sin rojo fenol.
- Adición de 20 μ L en cada pocillo (10 % de su contenido total) de la disolución de MTT. Es conveniente trabajar con la mayor oscuridad posible.
- Incubación en oscuridad entre 2 y 4 h en la incubadora para permitir la formación de cristales de formazán.
- Retirada del medio de cultivo para eliminar el MTT no metabolizado.
- Adición de 100 μ L de DMSO, este disolvente rompe la pared celular y disuelve el formazán contenido en el interior de las células, adquiriendo cada pocillo distinta coloración en función de la cantidad de formazán presente en cada uno de ellos. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional a la cantidad de células viables en el pocillo.
- Agitación de la placa para solubilizar el formazán.
- Medición de la absorbancia en un lector de placas ELISA (figura 4.5.5) a una longitud de onda de 570 nm. De forma opcional, también se puede utilizar 690

nm como longitud de onda de referencia asegurando que la medida se está efectuando correctamente.

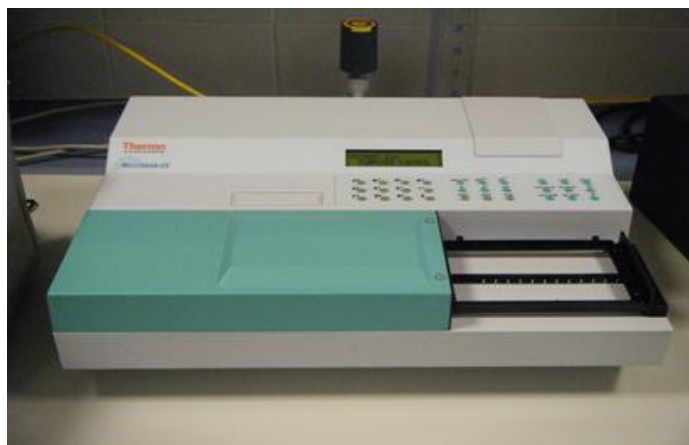


Figura 4.5.5: Lector de placas Elisa.

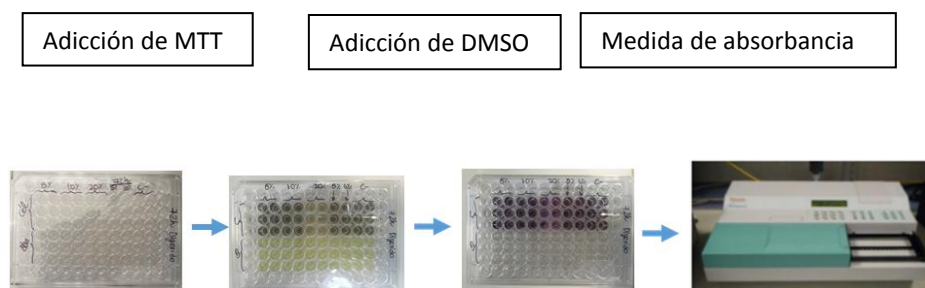


Figura 4.5.6: Esquema general de la técnica del MTT

4.6 ANÁLISIS MULTIPARAMÉTRICO DE APOPTOSIS

4.6.1 Instrumentación

- Autoclave (Selecta, Autotester)
- Balanza (Denver)
- Balanza de precisión (Gibertini)
- Baño de agua termostatzado (P Selecta)
- Cabina de flujo laminar (telstar BioUltra)
- Cámara Neubauer de recuento celular
- Centrífuga refrigerada (Digiten 20-R)
- Microscopio invertido de contraste de fase (Olympus CKX 41)
- Incubadora de CO₂ (Sanyo)
- Frascos Falcon de cultivo esteriles de 25 cm² (Sarstedt)

- Micropipetas de 100 y 1000 μ L (Gilson)
- Pipetas Pasteur estériles (Dentalab)
- Tubos eppendorf estériles de 2 mL (Sarstedt)
- Tubos universales estériles de 15 y 50 mL (Sarstedt)
- Puntas de micropipeta estériles de 100 y 1000 μ L (Daslab)
- Recipientes Stericup estériles para filtración (Milipore)
- Jeringa estéril de 10 mL (BD Discardit II)
- Micropipeta multicanal de 300 μ L (Thermo)
- Microplacas Corning® 96 Well Flat Clear Bottom Black Polystyrene TC-Treated
- Recipientes estériles para reactivos de ocho compartimentos
- Lector de placas Multimode de Enight™ (PerkinElmer, inc.).

4.6.2 Medios y reactivos

- Medio RPMI_1640 sin rojo fenol
- Tripsina
- Glutamina (2,1mM)
- Penicilina y estreptomicina (100mg/mL)
- Anfotericina B (0,125 mg/mL)
- Piruvato sódico (1mM)
- Tampón PBS (Phosphate Buffered Saline Solution) 10mM
- Suero fetal bovino (FBS)
- CellEvent Caspase 3/7 Green

4.6.3 Ensayo colorimétrico DEVD de la actividad caspasa 3/7 citoplasmática

Para determinar la actividad apoptótica de las células, se ha utilizado el reactivo de detección CellEvent Caspase 3/7 Green, este reactivo es intrínsecamente no fluorescente, ya que el péptido DEVD inhibe la capacidad del tinte de unirse al ADN. Sin embargo después de la activación de la Caspasa-3/7 en las células apoptóticas, el péptido DEVD se disocia, lo que permite que el tinte se una al ADN y produzca una respuesta fluorogénica brillante. La activación de la Caspasa-3 es una parte fundamental de la apoptosis, por lo tanto el reactivo está optimizado para el análisis de células apoptóticas.

4.6.3.1 Procedimiento

Los ensayos realizados en este trabajo fueron con las muestras de digestiones de gazpacho casero. Los pasos realizados para determinar la actividad son los dos primeros pasos de la viabilidad celular, punto 3.5.3.1 y 3.5.3.2 y el último paso lo explicamos a continuación. Determinación de las células apoptóticas día 3 (placa de 48h) y 4 (placa de 72h): adición de la caspasa-3/7:

- Calentamiento del medio de cultivo sin rojo fenol a 37 °C.
- Preparación de una disolución de Caspasa-3/7 en medio de cultivo a una concentración de 5µM.
- Retirada con micropipeta de los 200 µL del sobrenadante de cada pocillo tras 48/72 h en incubación y adición de otros 100 µL en cada pocillo, de la disolución de Caspasa-3/7 con medio fresco sin rojo fenol. Es conveniente trabajar con la mayor oscuridad posible.
- Incubación en oscuridad durante 30 minutos.
- Medición de la absorbancia a una longitud de onda de 502 nm de emisión y 530 nm de excitación. Esta medición se llevó a cabo en un lector de placas Multimode de EnSight™ (PerkinElmer, Inc.).

Las células apoptóticas con caspasa-3/7 activada tendrán núcleos verde brillante, mientras que las células sin caspasa-3/7 activada tendrán una señal de fluorescencia mínima.

4.6.4 Características del núcleo análisis de imágenes fluorescentes

Se usó solución de tinción Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, EE.UU.) como colorante de ácido nucleico para el conteo de núcleos y el ensayo de características. Este colorante es un colorante permeable a la membrana con baja citotoxicidad que mancha las células vivas y muertas y emite fluorescencia azul cuando se une al ADN.

4.6.4.1 Procedimiento

- La tinción Hoechst se preparó a 3X, con una adición de 50 µl a 100 µl de células teñidas con CellEvent™. La concentración final de colorante fue de 3,3 µg / ml.
- Las células se incubaron durante al menos 15 minutos a 37°C antes de la primera formación de imágenes.

- El canal se ajustó a excitación UV 385 nm. Esta medición se llevó a cabo en un lector de placas Multimode de EnSight™ (PerkinElmer, Inc.).

El número de núcleos totales y el área del núcleo mediano (μm^2) fueron determinados por este ensayo.

4.6.5 Actividad ATP por luminiscencia

ATP es un marcador de viabilidad celular, ya que está presente en todas las células metabólicamente activas y disminuye rápidamente cuando las células sufren necrosis o apoptosis.

Después de 2 horas de adición de manchas, se usó el ensayo de detección de luminiscencia ATP como marcador de viabilidad celular (ATPlite, PerkinElmer, Inc), para confirmar los resultados de las imágenes de cada pocillo. Después de la captura de buenas imágenes y ensayos de fluorescencia, todos los siguientes pasos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del kit.

4.6.5.1 Procedimiento

- Las células fueron lisadas y reactivadas de detección que contiene luciferase y luciferin se añadieron de acuerdo con las instrucciones del kit. Es decir, se retiraron 40 μl de solución de cada pocillo, se añadieron 40 μl de solución de ensayo de luminiscencia de ATPlite (PerkinElmer, EE.UU.).
- La luminiscencia se midió usando los ajustes predeterminados en el sistema EnSight. La conversión de luciferina dependiente de ATP es dada por este ensayo.
- El ensayo de ATPlite es destructivo y causa la muerte total de las células. Esta prueba se realizó sólo durante 48 horas de exposición.

4.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para el análisis de la expresión génica se han utilizado varios kit, y distintos métodos y sistemas para determinar de los ARNm de genes relacionados con la apoptosis y el ciclo celular (Bcl2, Bax, ciclina D1 y p53). La expresión génica estudiada es de las células ya

tratadas con gazpacho casero y con indometacina como control positivo de la inducción de apoptosis en células HT-29. El procedimiento siguiente se llevó a cabo en los Servicios Técnicos de la Universidad de Almería.

4.7.1 Procedimiento

- Procesamos las muestras en el FastPrep-24 5G (MP Biomedal) durante 45 segundos a una velocidad de 6 m / s.
- Siguiendo las instrucciones del fabricante, el ARN total de las células estudiadas se extrajo utilizando PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen)
- Determinamos mediante un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen, de Life Technologies) y el equipo de electroforesis automatizado, el sistema Bioanalyzer Agilent 2100, el rendimiento y la calidad del ARN
- A cantidades iguales (1 µg) de ARN las células se transcribieron inversamente con Kits de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, de ThermoFisher Scientific).
- El cDNA se usó como molde para la posterior reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). La RT-PCR cuantitativa se realizó en un sistema de PCR RealTime MyGo Pro® utilizando ensayos TaqMan™ (Applied Biosystems, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- El nivel de expresión de los ARNm de Bcl2, Bax, ciclina D1 y p53 se normalizó con el nivel de expresión de PGK1 humano (fosfoglicerato quinasa 1).
- La expresión relativa se determinó utilizando el método $\Delta\Delta CT$ con PGK1 rRNA como los genes de referencia.

4.8 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD EN HORTALIZAS

Existen una serie de parámetros para determinar la calidad en hortalizas, como son el contenido en sólidos solubles totales (°Brix), color, firmeza y acidez titulable.

4.8.1 Sólidos solubles

El contenido en sólidos solubles de la pulpa de los frutos se mide en grados Brix expresados en porcentaje de sacarosa. Este parámetro es determinado mediante un

refractómetro de mano (figura 4.8.1), utilizando el jugo fresco sin diluir de las diferentes muestras, de gazpacho, tomate y pimiento dulce.



Figura 4.8.1: Refractómetro de mano.

4.8.1.1 Instrumentación:

- Refractómetro de mano (ATAGO)
- Microfiltros de 0,22mm

4.8.1.2 Procedimiento:

- Obtención de unas gotas de pulpa de la muestra a analizar, para ello antes se ha filtrado
- Colocación del jugo en la parte del refractómetro con forma de cuna.
- Cierre de la tapa sobre la gota y observación por la mirilla orientando el refractómetro hacia un foco de luz. El lugar donde hay un cambio de color es la zona de lectura y muestra el porcentaje total de grados Brix de la muestra.
- Limpieza del refractómetro con unas gotas de agua destilada antes de realizar una nueva medida.

4.8.2 Acidez

Este parámetro se determina mediante una valoración ácido-base empleando una disolución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH) y fenolftaleína como indicador del punto final de la reacción. El resultado es expresado en relación al ácido mayoritario que existe en la muestra, en g de ácido cítrico anhidro/10 ml de triturado de la muestra.

4.8.2.1 Instrumentación y reactivos:

- Bureta de vidrio de 25 ml
- Matraz erlenmeyer de 250 ml

- Disolución acuosa de NaOH (0,1 N)
- Fenolftaleína
- Agua destilada

4.8.2.2 Procedimiento:

- Adición de 200 ml de agua destilada a 10 ml de muestra fresca triturada.
- Adición de unas gotas de fenolftaleína a la disolución de la muestra en agua.
- Valoración con NaOH 0,1 N.
- Calculo del contenido de ácido cítrico anhidro en g/10ml.

$$\text{Acidez (g/10ml)} = V \times N \times \text{Peq}$$

Dónde:

- V = volumen en ml de disolución de NaOH utilizada en la valoración.
- N = normalidad de la disolución de NaOH.
- Peq = u.m.a. del ácido de la muestra. (Ácido Cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) M = 192,124 gmol⁻¹)

4.8.3 Firmeza

La determinación de la firmeza de las muestras se realiza con el uso de un penetrómetro manual. El valor obtenido (Kg/cm²) de la firmeza de cada variedad para los diferentes días de muestreo fue resultado de una media aritmética de los valores de dos frutos de tomate. Para la obtención de un resultado más exacto las muestras fueron apoyadas en una superficie plana, y la medida se realizó en la parte ecuatorial de los frutos.

4.8.3.1 Procedimiento:

- Colocación de las muestras sobre una superficie plana.
- Cortar la piel del fruto en dos puntos opuestos de la parte ecuatorial del fruto
- Asegurar que la aguja indicadora de presión del aparato se encuentre marcando 0.
- Realización de la medida en la parte ecuatorial del fruto apretando suavemente el penetrómetro hasta su introducción.

4.8.4 Color

El color es la característica externa más importante para evaluar la madurez y la vida postcosecha de un producto. La introducción del sistema de color en 1931 por la CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) hizo posible expresar el color en términos cuantitativos y numéricos exactos. Una mejora de este sistema fue desarrollado en 1976 por CIELAB (sistema de espacio de color), que define un color más relacionado con la percepción humana y donde todos los colores imaginables pueden ubicarse dentro de la esfera de color definida por tres ejes perpendiculares, L^* , a^* y b^* (Camelo y Gómez, 2004). Los parámetros de color se determinaron en un espectrofotómetro (figura 4.8.4). Para obtener una mayor uniformidad en la medida, cada valor de $L^*a^*b^*$ recogido es un promedio de 2 mediciones consecutivas.

4.8.4.1 Instrumentación

- Espectrofotómetro (Konica Minolta)



Figura 4.8.4: Espectrofotómetro

4.8.4.2 Procedimiento

- Para determinar el color de los tomates y pimientos dulces lavarlos y secarlos bien antes de ponerlos sobre el espectrofotómetro.
- Ubicarlas muestras de gazpacho, y en el caso de los tomates y los pimientos dulces el fruto, sobre el orificio por donde este capta el color.
- Poner en marcha el espectrofotómetro mediante el software del ordenador y obtener los valores de L^* , a^* y b^* .
- Para obtener una mayor uniformidad, cada valor obtenido es el promedio de dos medidas realizadas en diferentes puntos de las muestras y frutos.

4.8.4.3 Identificación

Los resultados se expresaron en valores CIE (1976) para:

- (L*), 100 el blanco y 0 el negro.
- (a*) valores positivos para rojo y negativos para verde.
- (b*) valores positivos es amarillo y negativos azul.

4.9 DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES

Se llevó a cabo la extracción de los carotenoides presentes en tomate, pimiento y gazpacho para su posterior cuantificación utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC) (figura 4.9).



Figura 4.9: Equipo de HPLC

4.9.1 Instrumentación y reactivos

- Balanza (Denver)
- Balanza de precisión (Gibertini)
- Embudo de decantación
- Micropipetas de 100 y 1000 μL (Gilson)
- Liofilizador LyoQuest (Telstar)
- Rotavapor (Buchi)
- Congelador a -20°C

- Jeringa de 10 mL
- Filtro de celulosa de 0,22 μm (Sartorius)
- Viales de vidrio de 1,5 mL con cierre de rosca y tapones
- Equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC.
- Columna analítica de fase reversa C-30 250 x 4,6 mm, 5 μm de tamaño de partícula
- Éter dietílico
- Agua destilada
- Metanol calidad HPLC
- Metil-terbutil-éter (MTBE) calidad HPLC
- Solución acuosa de hidróxido potásico (KOH) al 85% (m/v)

4.9.2 Extracción de carotenoides

El procedimiento empleado para la extracción de carotenoides y su análisis por HPLC se realizó siguiendo el método descrito por Will et al., 1998, tal y como se explica a continuación:

- Obtención de 50 gramos de muestra fresca y triturada, o 5g de muestra liofilizada
- Adición de 100 mL de éter dietílico y manteniendo la mezcla durante 1 hora en oscuridad, agitándola cada 5 minutos durante 30 segundos.
- Separación del sobrenadante del sólido y repetición del proceso hasta extraer toda la coloración de la muestra (las siguientes extracciones tuvieron una duración de 30 minutos y el volumen de disolvente utilizado fue de 50mL).
- Saponificación, puesto que los carotenoides en frutas y hortalizas se encuentran esterificados con ácidos grasos, mezclando en extracto con 10 mL de una solución metanólica de hidróxido de potásico al 10% (m/v).
- Conservación de la mezcla durante 1 hora en oscuridad y a 4⁰C.
- Eliminación de los jabones formados realizando un lavado con agua y decantando la fase acuosa posteriormente mediante un embudo de decantación.
- Evaporación del disolvente en la fase etérea a vacío con rotavapor.
- Dilución del extracto seco una vez conocida su masa, en una mezcla de metanol: metil-terbutil-éter.
- Filtración del extracto obtenido.
- Conservación del extracto a una temperatura de -20⁰C hasta su posterior análisis.

4.9.3 Identificación de los carotenoides

El análisis HPLC fue llevado a cabo con un Finnigan Surveyor chromatograph (Thermo Electron, Cambridge, UK) equipado con un detector UV y con una columna de fase reversa (Hypersil Gold, 250 x 4.6 mm i.d, 5µm de tamaño de partícula; Thermo Electron, Cambridge, UK). Se utilizó un sistema binario de disolventes en elución isocrática (acetonitrilo: metanol, 85/15 v/v). el volumen de inyección usado fue de 5µL y el flujo de la fase móvil de 1mL/min. La temperatura de la columna fue de 32⁰C y para la detección se empleó una longitud de onda de 476 nm.

La identificación de los principales carotenoides en las muestras tuvo lugar en base a sus tiempos de retención características, establecidas mediante el análisis de los patrones.

4.10 DETERMINACIÓN DE TOCOFEROLES

Se llevó a cabo la extracción de tocoferoles, presente en las muestras de gazpacho fresco y digerido, para su posterior cuantificación utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, según fue descrito por la FAO en 1997.

4.10.1 Instrumentación y reactivos

- Balanza (Denver)
- Balanza de precisión (Gibertini)
- Baño de agua termostatzado
- Micropipetas de 100 y 1000 µL (Gilson)
- Embudo de decantación
- Rotavapor (Buchi)
- Jeringa de 10 mL
- Filtro de celulosa de 0,22 µm (Sartorius)
- Viales de vidrio de 1,5 mL con cierre de rosca y tapones
- Equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC.
- Columna analítica de fase reversa C-30 250 x 4,6 mm, 5µm de tamaño de partícula
- Agua destilada
- Etanol calidad HPLC
- Solución acuosa de hidróxido potásico (KOH) al 50% (m/v)
- Ácido ascórbico
- Hexano calidad HPLC

- BHT
- Metanol calidad HPLC

4.10.2 Procedimiento.

- Se pesan entre 2-5g de la muestra analizar, en nuestro caso gazpacho.
- Se añaden 50mL de etanol de calidad HPLC, 0,25g de ácido ascórbico y 5 ml de hidróxido potásico acuoso.
- Esta mezcla se coloca en un baño de agua caliente a 100°C durante 45 minutos.
- Una vez pasado el tiempo, se extraen los tocoferoles con n-hexano, de 3 a 4 veces con volúmenes de 50ml en cada extracción.
- Los extractos se lavan con agua de 2-4 veces, por decantación.
- Añadir los 2mg de BHT.
- Mediante vacío, con el rotavapor eliminamos el disolvente.
- El residuo se disolvió en metanol y se transfirió a los viales para analizarlos inmediatamente mediante HPLC.

4.10.3 Identificación de los tocoferoles.

La identificación del pico se basó en la comparación de los tiempos de retención de HPLC con los estándares químicos (α , β , γ -tocoferol), que se adquirieron de SIGMA.

El análisis de HPLC se llevó a cabo con un Cromatógrafo Finningan Surveyor (Thermo Electron, Cambridge, Reino Unido) equipado con un detector UV y una columna de fase inversa (Hypersil Gold, 250 x 4,6 mm id, 5 μ m, Thermo Electron, Cambridge, UK). Se utilizó un sistema disolvente binario en elución isocrática (metanol: agua, 98: 2 v / v), con 5 μ l de inyección y un caudal de 1 ml / min.

4.11 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

4.11.1 Instrumentación y reactivos

- Balanza de precisión (Gibertini)
- Baño sonicador de agua termostatzado
- Micropipetas de 100 y 1000 μ L (Gilson)
- Embudo de decantación

- Rotavapor
- Jeringa de 10 mL
- Filtro Whatman, número 5
- Agua destilada
- Etanol al 80%
- Matraz aforado
- Acetato potásico 1M
- Nitrato de aluminio al 10%
- Espectrofotómetro
- Cubetas

4.11.2 Procedimiento

La concentración de flavonoides totales se midió por método espectrofotométrico, de la siguiente forma:

- Se diluyeron 3 g de gazpacho liofilizado en 20 ml de etanol al 80%
- Se colocaron en un baño sonicador durante 5 ciclos de 6 minutos cada una de las muestras a 60 °C.
- Filtramos (filtro Whatman, nº 5), y recogemos la filtración en un matraz de 25mL enrasando con etanol al 80%.
- Después en un matraz de 10mL se cogieron 250 µL del extracto anterior, 200 µL de acetato de potasio 1 M y 200 µL de nitrato de aluminio al 10%, enrasando con etanol al 80% hasta un volumen final de 10 mL.
- Una vez pasados 40 minutos a temperatura ambiente, se lee la absorbancia a 415 nm.

4.11.3 Identificación de flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó usando una curva de calibración construida con quercetina (Sigma-Aldrich, Q4951) y expresada en mg de equivalente de quercetina (QE) por gramo de peso seco.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados experimentales se exponen divididos en siete apartados:

- Determinación de los parámetros de calidad
- Cuantificación de fitoquímicos
- Ensayos de viabilidad celular
- Análisis múltiparamétrico y enzimático
- Análisis de expresión génica

5.1 DETERMINACION DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD PARA LAS DISTINTAS MUESTRAS

Los resultados se presentan en tablas en función de la hortaliza y del parámetro analizado.

5.1.1 Color

Las medidas del color se realizaron sobre tres zonas distintas, del mismo fruto y en el caso del gazpacho de tres muestras del mismo gazpacho. Las tablas muestran un valor medio de las medidas realizadas. La luminosidad está representada por L * (0, negro a 100, blanco), a * representa la variación del verdor al enrojecimiento (-60 a 60) y b * indica la variación del color azul con el amarillamiento (-60 a 60). La relación a * / b * indica la etapa de maduración de los tomates.

PARÁMETROS DE COLOR							
	a* (D65)		b* (D65)		L* (D65)		a*/b*
	Media	σ	Media	σ	Media	σ	Media
TOMATE	15,035	0,262	19,665	0,615	35,345	0,106	0,765
PIMIENTO	24,545	0,177	11,055	0,361	30,645	0,290	2,220
GAZPACHO	22,925	0,021	25,335	0,007	54,115	0,021	0,905

Tabla 5.1 Medidas de color en las muestras.

5.1.2 °Brix

La escala Brix se utiliza para medir la cantidad aproximada de azúcares en frutas, vinos y líquidos procesados, que esta escala lo que determina es el contenido en sólidos solubles totales. La concentración de sólidos solubles se expresa en °Brix que originalmente es una medida de densidad (1°Brix es la densidad de una disolución de sacarosa al 1% peso y a esta le corresponde un índice de refracción, de esta manera se establece la correspondencia entre porcentaje de sólidos solubles y grados Brix).

Los resultados medios obtenidos de cada producto fueron:

	°Brix	
	Media	σ
TOMATE	5,0	0,0
PIMIENTO	6,5	0,0
GAZPACHO	4,8	0,0

Tabla 5.2 Concentración en sólidos solubles medida en °Brix, en las muestras ensayadas

5.1.3 Acidez

Los ácidos influyen en el sabor de los alimentos, el color, la estabilidad microbiana y en la calidad de conservación, y se determina por medio de una volumetría ácido-base usando como base NaOH 0,1 N y fenolftaleína como indicador. El resultado es expresado en relación al ácido mayoritario (ácido cítrico).

Por cada molécula de ácido cítrico se utiliza 3 moléculas de hidróxido sódico, por tanto, el peso equivalente del ácido es 3 eq/mol. El punto final de la valoración se produce con el viraje de color del indicador lo que corresponde al punto de equivalencia, es decir, el número de equivalentes de ácidos es igual al número de equivalentes de base.

Para el cálculo del contenido de ácido cítrico anhidro en g/10mL se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez (g/10mL)} = V * N * P_{\text{eq ácido}}$$

Donde,

- V=volumen (mL) de la disolución de NaOH utilizado
- N=normalidad de la disolución de NaOH (0,1N)
- Peq del ácido cítrico= 3 eq/mol ($PM_{\text{ácido}}=192,124\text{g/mol}$)

ACIDEZ								
	V1	V2						
	NaOH	NaOH	Acidez 1	Acidez 2	Media	σ	Media	σ
	mL	mL	g/10mL	g/10mL	g/10mL		g/L	
TOMATE	5,0	4,8	0,032	0,031	0,031	0,001	3,10	0,10
GAZPACHO	4,8	4,6	0,031	0,029	0,030	0,001	3,00	0,10

Tabla 5.3 Medidas de acidez titulable en las muestras ensayadas

5.1.4 Firmeza

La firmeza es un parámetro indicativo de la calidad de los tomates frescos relacionada con la estructura de la pared celular y con el estado de madurez, su determinación es fundamental para la aceptabilidad y almacenamiento.

Firmeza (Kg/cm^2)		
	Media	σ
Tomate	1,65	0,07

Tabla 5.4 Media de firmeza en los tomates empleados para la elaboración del gazpacho

5.2 CUANTIFICACIÓN DE FITOQUÍMICOS

Contenido en fitoquímicos clave en muestras de gazpacho casero, antes (crudo) y después de la digestión (digerido). Los resultados se expresan como valores medios y desviaciones estándar (σ) de tres muestras ($n = 3$).

❖ Valores de Licopeno, antes y después de digerir el gazpacho casero:

	Licopeno ($\mu\text{g g}^{-1}$)*	σ	Licopeno (μM)	σ
Gazpacho crudo	609	20	11,30	0,36
Gazpacho	97,1	3,3	1,57	0,05

digerido

*peso seco

❖ Valores de α -tocoferol, antes y después de digerir el gazpacho casero:

	α -tocoferol ($\mu\text{g g}^{-1}$)*	σ	α -tocoferol (μM)	σ
Gazpacho crudo	27,6	1,9	0,06	0,00
Gazpacho digerido	19,8	3,6	0,40	0,07

*peso seco

❖ Valor de flavonoides del gazpacho casero sin digerir, no se puede conseguir suficiente muestra para determinar el valor de flavonoides en gazpacho casero digerido:

	Flavonoides (mg QE g^{-1})*	σ	Flavonoides (mg QE l^{-1})†	σ
Gazpacho crudo	4,38	0,40	43,8	1,3
Gazpacho digerido	--	--	--	--

*peso seco, †peso fresco

5.3 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

5.3.1 Ensayos de extractos, de etanol-agua y de éter de petróleo

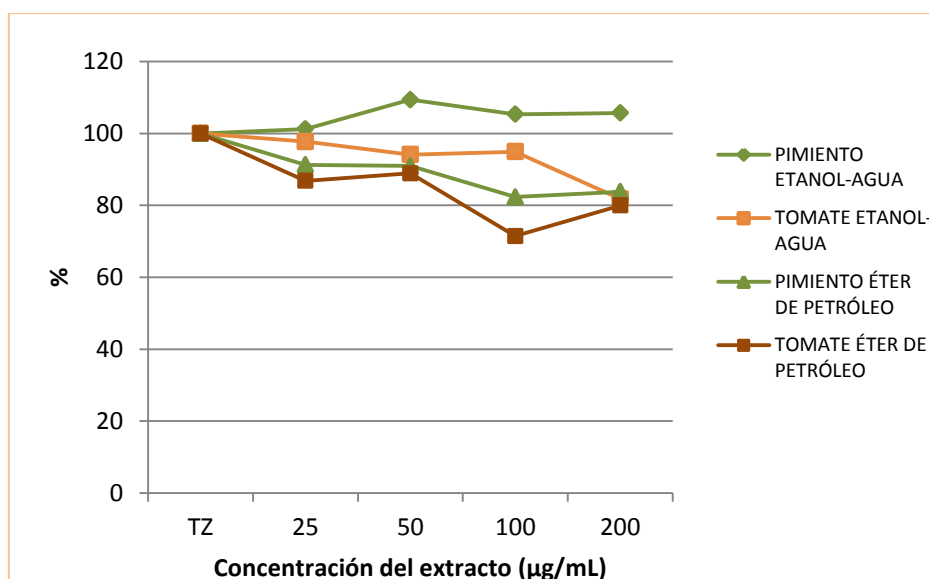


Figura 5.3.1. Viabilidad de células HT-29 frente a diferentes concentraciones de extracto de éter de petróleo y de etanol-agua de las hortalizas ensayadas en fresco (n=2)

Como primera aproximación para la citotoxicidad del gazpacho, las células HT-29 fueron expuestas durante 48 horas a concentraciones crecientes de extractos etéreos de las variedades de tomate y pimiento dulce, dichas hortalizas son empleadas en la mezcla de gazpacho (figura 5.3.1). Las fracciones de éter se seleccionaron suponiendo que la mayoría de las especies bioactivas de estos vegetales son compuestos lipofílicos, según estudios previos (Ramos-Bueno et al., 2016). Ambos extractos causaron inhibición dependiente de la dosis del crecimiento del cultivo. Sólo se observaron diferencias significativas entre el control y las concentraciones superiores a 100 µg ml⁻¹ de extracto de pimiento dulce, con GI50 por encima de la concentración más alta examinada (200 µg ml⁻¹). Se observó una mayor actividad con extractos de tomate, con diferencias significativas respecto al control por encima de sólo 25 µg ml⁻¹ ($p < 0,05$), alcanzando un valor de GI50 de 200 µg ml⁻¹. No se produjo actividad citotóxica neta en el intervalo de concentraciones ensayadas para ambos vegetales (25-200 µg ml⁻¹) (TGI > 200 µg ml⁻¹).

5.3.2 Ensayos de hortalizas y distintos gazpachos digeridos

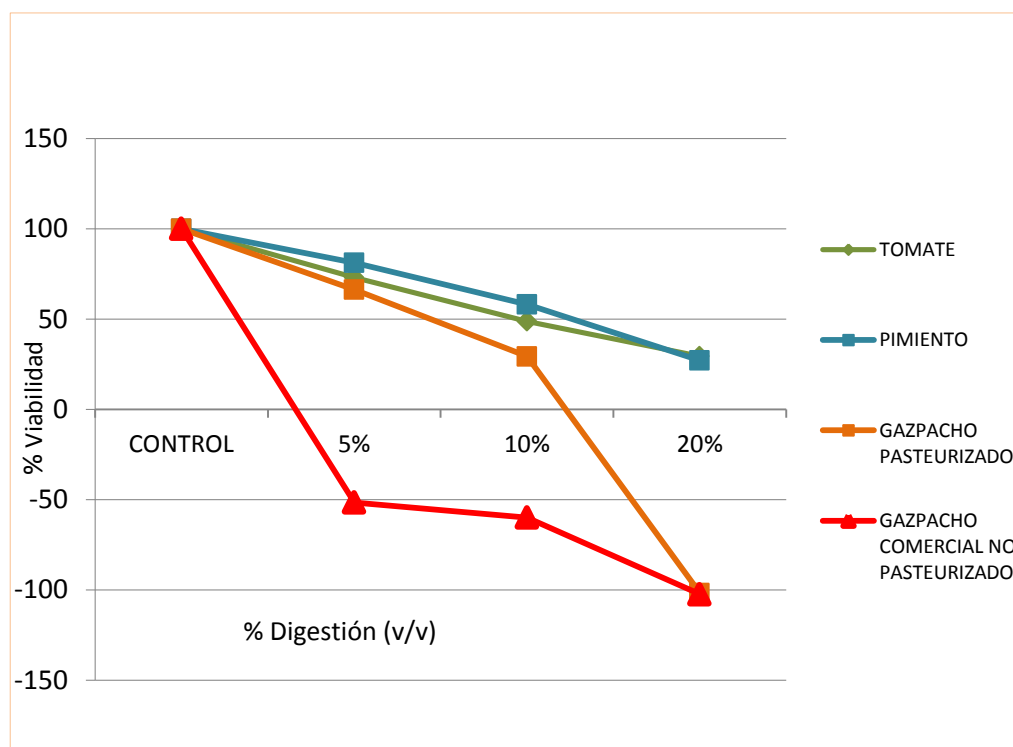


Figura 5.3.2. Ensayos de viabilidad de células HT-29 tras la exposición de muestras digeridas de tomate, pimiento, gazpacho comercial pasteurizado y gazpacho comercial no pasteurizado.

En la figura 5.3.2 podemos observar que la actividad antitumoral del gazpacho comercial, antes y después de su pasteurización, así como de dos componentes principales. Todas estas muestras fueron digeridas previamente in vitro. Puede verse que la actividad antiproliferativa se ve grandemente disminuida tras el procedimiento de pasteurización térmica habitual en el proceso de comercialización. El gazpacho comercial no pasteurizado muestra una citotoxicidad muy superior frente a la línea cancerígena HT-29, seguido de la misma muestra una vez pasteurizada. En la máxima concentración ensayada, 20% de digestión (v/v), ambas muestras producen la muerte total del cultivo, si bien pensamos que esos niveles no son habitualmente alcanzados. Al 5 y 10% de digestión (v/v) se observó una ligera actividad de tomate y pimiento, siendo mayor en el primero. Por ello, una vez constatado que obtenemos mejores resultados con el gazpacho comercial no pasteurizado en el presente proyecto decidimos continuar con el análisis de la actividad y mecanismo de acción trabajando con muestras no pasteurizadas de una receta estandarizada de gazpacho casero. Esta receta se describe en el punto material y métodos.

5.3.3 Ensayos del gazpacho pasteurizado y gazpacho casero.

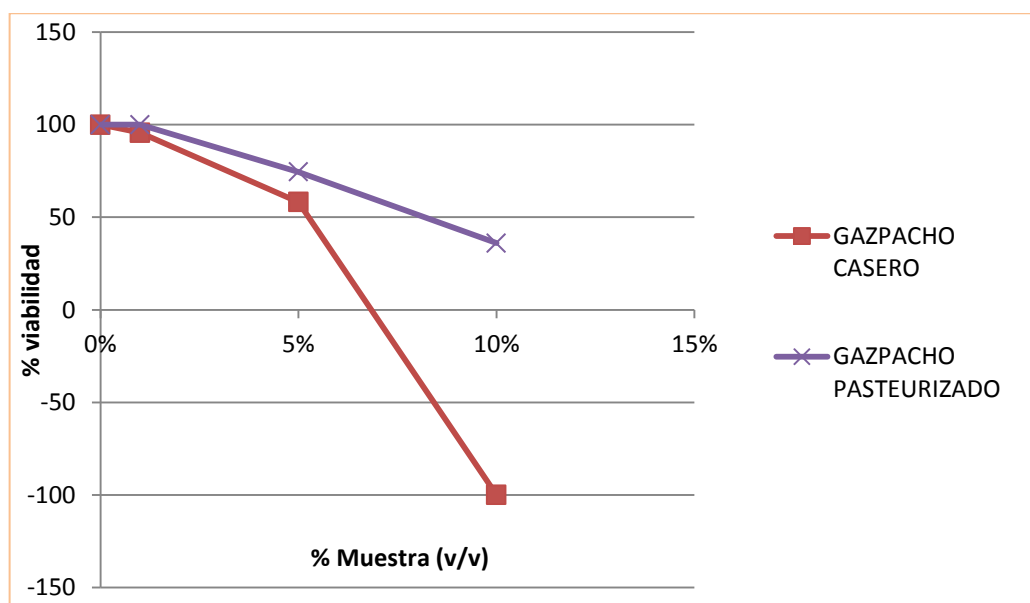


Figura 5.3.3. Ensayo de viabilidad de células HT-29 frente a muestras digeridas de gazpacho casero, y gazpacho comercial pasteurizado. Los valores son medios de seis experimentos independientes.

En la figura 5.3.3 puede comprobarse esta superior actividad del gazpacho casero frente al comercializado tras pasteurización. La citotoxicidad del gazpacho casero al 10% v/v frente a la línea tumoral HT-29 causó el 100% de mortandad por cultivo, mientras que en el gazpacho pasteurizado se produjo al 10% tan sólo una inhibición del crecimiento de menos del 36% del crecimiento control. Las muestras ensayadas con gazpacho sin digerir no mostraron una inhibición del crecimiento relevante.

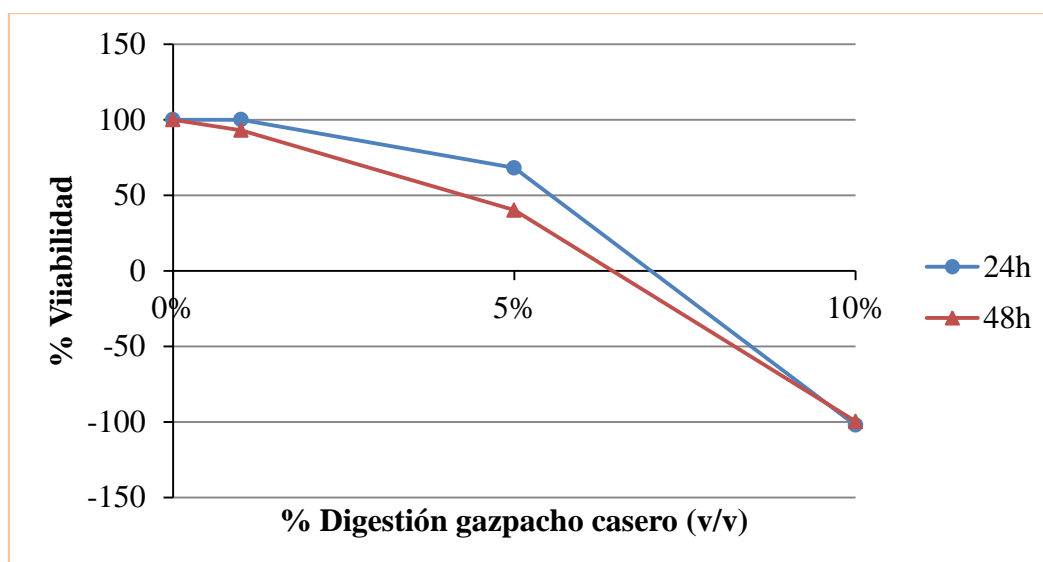


Figura 5.3.4. Ensayo de viabilidad celular HT-29 tras la exposición durante 24 y 48 horas a muestras de gazpacho casero digerido.

La inhibición del crecimiento del gazpacho también depende del tiempo, figura 5.3.4 con diferencias significativas entre la actividad de digestatos al 5%. El crecimiento de las células se redujo de casi un 70% en 24h a 40% después de 48h. Sin embargo, a las 24 h la citotoxicidad al 10% v/v también causó 100% de muerte por cultivo. Al 1% no se demostró acción antiproliferativa significativa en ambas ocasiones.

5.4 ANÁLISIS MULTIPARAMÉTRICO Y ENZIMÁTICO

Para analizar el mecanismo de acción antitumoral de los digestatos de gazpacho casero se llevó a cabo un análisis multiparamétrico de actividad frente a células HT-29 expuestas durante 24 y 48h a dos concentraciones de digestatos (5-10% v/v) y células control no tratadas. Este análisis se basó en imágenes de campo claro, fluorescencia de núcleos mediante Hoechst, y de actividad caspas mediante fluorescencia DEVD. Adicionalmente se midió la producción de ATP citoplasmático por luminiscencia. En la Figura 5.4.1 se muestran las imágenes resultantes de este análisis multiparamétrico y en la figura 5.4.2. los resultados cuantitativos.

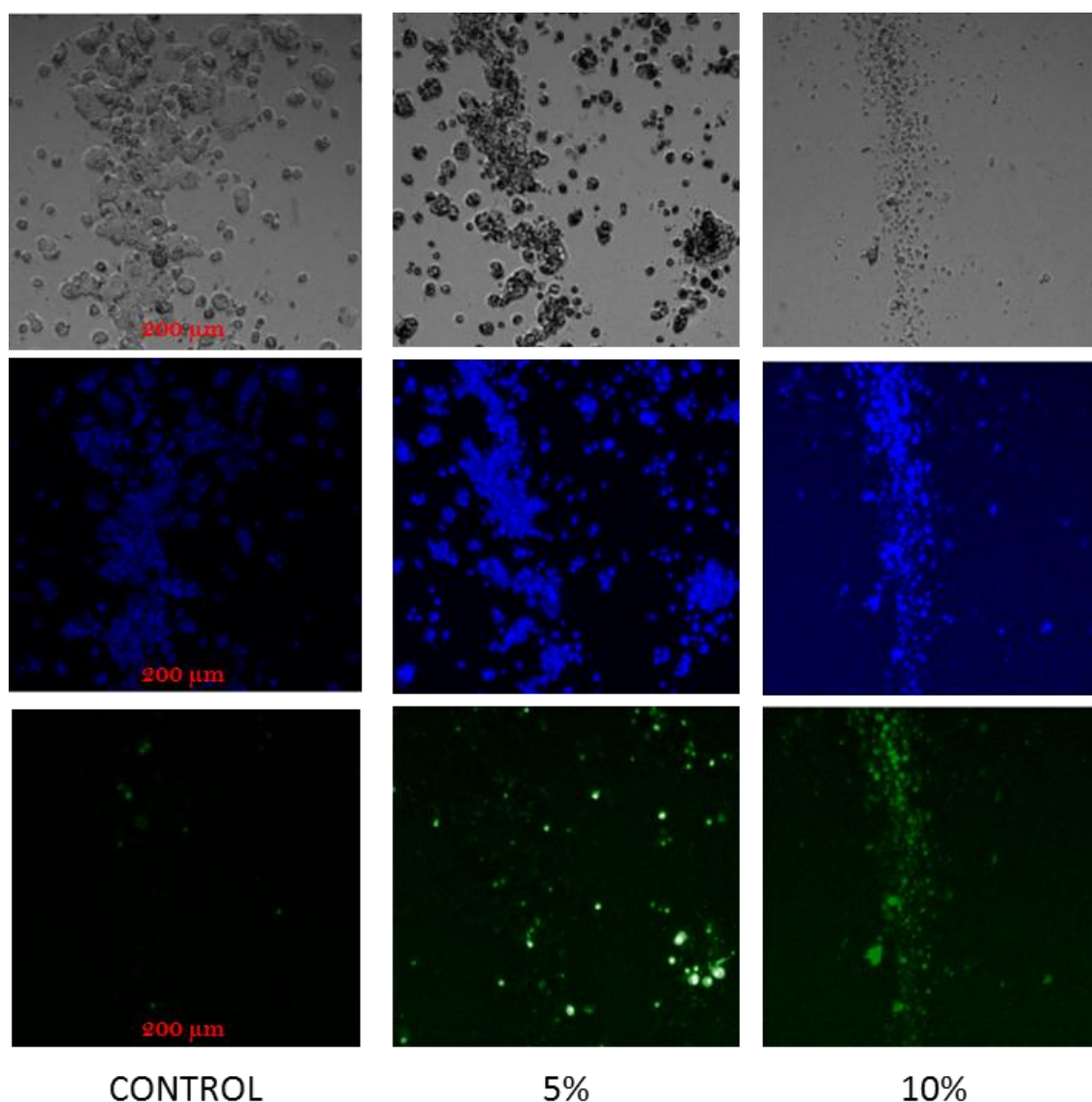


Figura 5.4.1: Análisis multiparamétrico de la citotoxicidad de digestos de gazpacho casero contra células HT-29 de cáncer de colon. Estas imágenes del análisis multiparamétrico de la citotoxicidad de digestos de gazpacho casero contra células HT-29 de cáncer de colon, con dos concentraciones de digestatos (5-10% v / v) y células control no tratadas. Las imágenes se tomaron en imágenes de campo claro (arriba, negro / blanco), azul Hoechst 3342 canal (medio) y verde canales DEVD (bajo). Amplificación 4X. Exposición durante 48h a las muestras.

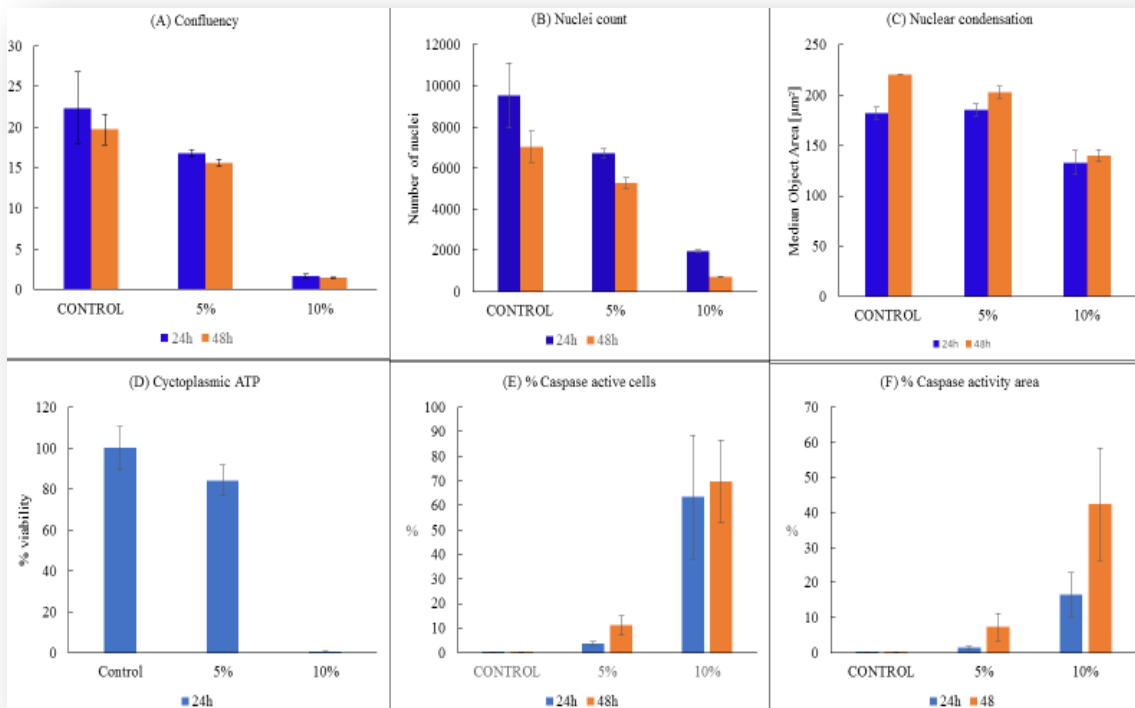


Figura 5.4.2: Resultados del análisis multimodal de la citotoxicidad después de la exposición de células HT-29 a concentraciones crecientes de digestos de gazpacho casero durante 24h y 48h. (Figura 5.4.2) (A) Confluencia por imagen de campo claro; Recuento de núcleos (B), y condensación nuclear (C) por tinción de Hoechst; (D) Prueba de ATP citoplasmática de luminiscencia después de 24h; Actividad de caspasa 3/7 medida como (E)% de células teñidas con DEVD y (F)% de área de tinción de DEVD; Valores entre 24 y 48h no son comparables cuando el control de crecimiento fue significativamente diferente entre los experimentos ($p < 0,05$) (Figuras 5.4.2 A-C). Los valores son medios de seis experimentos independientes y las barras denotan desviaciones estándar.

Las diferencias entre las células tratadas y no tratadas fueron claramente visibles a través de imágenes de canal de campo claro con cambios morfológicos asociados con el inicio de la apoptosis, con mayor rugosidad y oscurecimiento de las células después de la exposición al digestato al 5% . La muerte celular generalizada se observó con un 10% de concentración, de acuerdo con nuestros anteriores MTT ensayos (Figura 5.4.1, tercera columna). Otro indicador de apoptosis, la condensación nuclear, se detectó por tinción azul Hoechst (Figura 5.4.1, fila media). La activación de la cascada de caspasas, un paso clave en la vía apoptótica, se reveló mediante tinción verde de DEVD, mostrando una activación intensa de caspasas 3/7 de una manera dependiente de la dosis (Figura 5.4.1, fila baja).

El análisis numérico de estas imágenes se resume en la figura 5.4.2. Se detectaron diferencias significativas entre el control y los digestatos de 5% y 10% (prueba de Fisher, $p < 0,01$). Los efectos de la concentración del 1% (v / v) no fueron significativamente diferentes en el control de la forma en ninguno de los parámetros analizados ($p < 0,01$) (datos no mostrados). De acuerdo con nuestros ensayos anteriores de MTT, la viabilidad celular disminuyó con dosis crecientes de digestatos de gazpacho, como se muestra por una disminución en el porcentaje de confluencia de cultivo detectado por imagen de campo brillante (Figura 5.4.2 (A)). Esta actividad antiproliferativa fue confirmada por una disminución del ATP citoplasmático después de una exposición de 48 horas (figura 5.4.2 (D)), como indicador de la actividad mitocondrial deteriorada, con muerte celular total después de la exposición al digestato del 10% (v / v). El análisis de condensación nuclear (Figura 5.4.2 (C)), permitió la detección de la apoptosis, ya que la disminución en el área nuclear media es un cambio morfológico clave de la actividad programada. La intensidad de DEVD de fluorescencia y el aumento de área porcentual (Figura 5.4.2 (EF)) mostraron una intensificación de la actividad de la caspasa 3/7, con un claro patrón de activación de caspasa en función de la dosis y del tiempo y un fuerte aumento de% de células con La tinción de DEVD después de la exposición a digestatos al 10% (Figura 5.4.2) De este parámetro, podríamos estimar la actividad de la caspasa relacionada con el número de células totales, incluso si la población celular se reduce bruscamente por la citotoxicidad de los digestados. fue utilizado, incluso si pocas células sobre una alta proporción de fluorescencia se detectó, aumentando a 6 veces desde el control (Figura 5.4.2(E)).

En conclusión, el análisis de citotoxicidad multimodal permitió detectar y caracterizar la actividad antiproliferativa dosis-dependiente de los digestos de gazpacho, dando fuertes evidencias de que la activación de la apoptosis por la cascada de caspasas es un mecanismo clave de acción de digestiones de gazpacho contra el crecimiento de células HT29

5.5 EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión de ARNm en las células HT-29 de genes supresores de tumores (Bcl2, Bax y p53) y ciclina D1 del regulador del ciclo celular, después de la exposición de 24 horas de las células HT-29 a dos concentración de gazpacho casero digerido 5% y 10% v/v; Ind, indometacina a 0,2mM (control positivo). Los valores son medios de tres experimentos independientes y las barras indican desviaciones estándar.

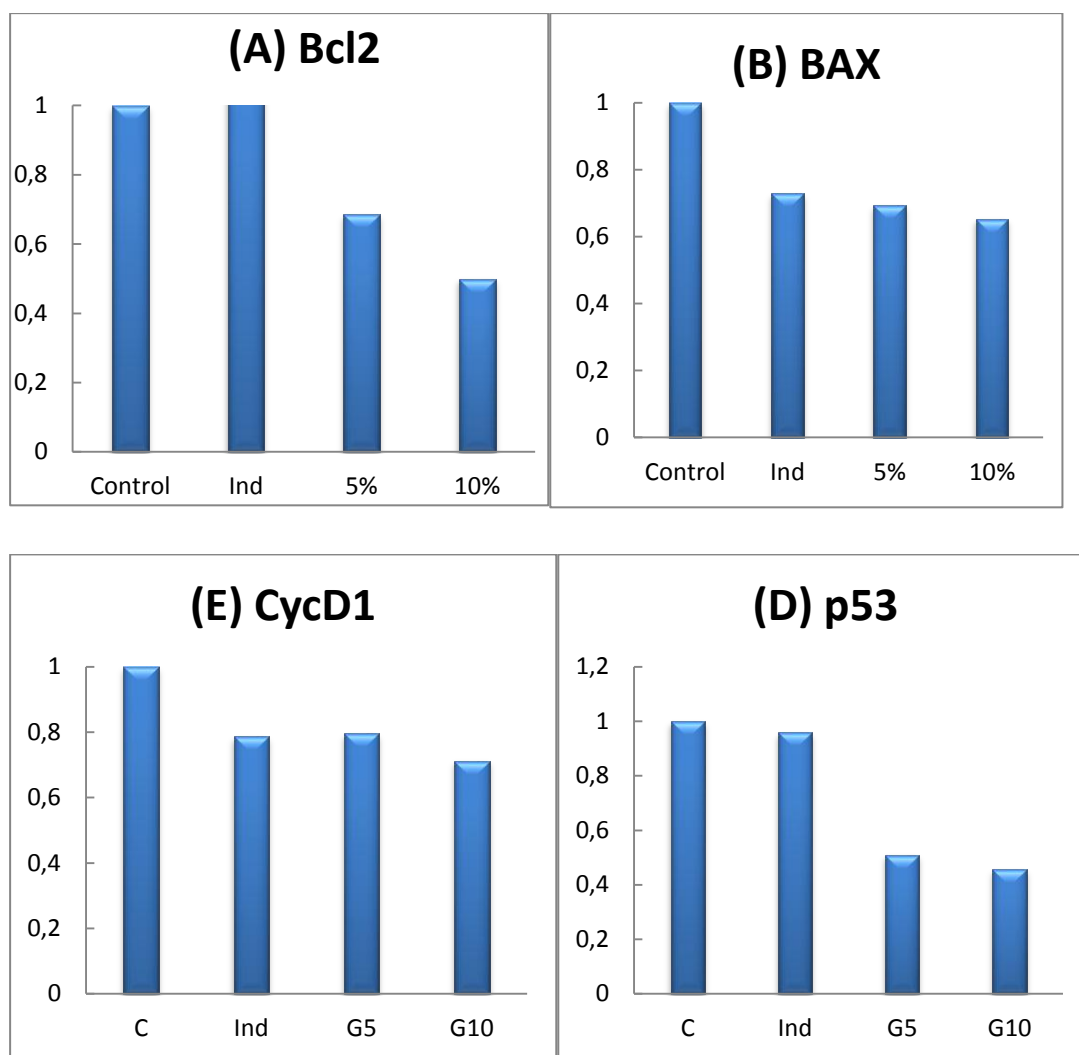


Figura 5.5.1. Expresión génica de los genes supresores de tumores.

En la figura 5.5.1 se presenta el análisis de la expresión génica diferencial de los genes reguladores de la apoptosis clave (Bcl2, BAX, p53 y ciclina D1), después de la exposición de las células HT-29 a niveles del 5-10% v / v de digesto gazpacho para 24h. Nuestro análisis de los cambios en la expresión de dos genes de la familia BCL2, anti-apoptóticos Bcl2 y pro-apoptótico BAX, destacan su importante papel en la modulación de la apoptosis después de la exposición a nuestras muestras. Se observó una regulación negativa significativa y dependiente de la dosificación de la expresión de Bcl2 (figura 5.5.1 (A)), descendiendo a aproximadamente el 50% de los niveles normales de expresión en células HT-29 de control no tratadas. Aunque BAX también mostró regulación negativa, hasta el nivel de 65% (Fig. 5.5.1 (B)), no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de la muestra, y los niveles de expresión de este gen por sí solos no parecen ser relevantes en la activación de la apoptosis. Esto está de acuerdo con el hallazgo con digestatos de tomate (Palozza et al

2007). Sin embargo, la reducción de la relación Bcl2 / BAX se ha sugerido como un mecanismo de inhibición del crecimiento por el licopeno en las células cancerosas (Palozza et al., 2009), el parámetro determinante para activar la apoptosis. Nuestros datos muestran una clara relación entre el aumento de la concentración de digestatos, y el aumento de esta relación. Cuando se expuso a una muestra al 10% (v / v), la proporción disminuyó a 76% del control. Esto es una evidencia de que el cambio en Bcl2 y Bax, más que su expresión separada, juega un papel clave en la activación de la apoptosis por gazpacho digestates. Otra expresión de oncogén clave estudiada fue la ciclina D1, responsable de promover la progresión del ciclo celular en la fase G1 / G0 en las células cancerosas. La ciclina D1 actúa como un sensor del factor de crecimiento en la fase G y se sobreexpresa en tumores de cáncer HT-29 (Mayo., et al 2009). Después de 24 horas de exposición a digestos de gazpacho, se detectó una disminución significativa y dependiente de la dosis de la expresión de ciclina D1, hasta un 71% del control, después de exposición al 10% v / v de digestato (Figura 5.5.1(C)). Esto sugiere que gazpacho digestato interfiere la progresión del ciclo celular por la regulación negativa de la progresión del ciclo celular en este nivel. Inesperadamente, la expresión del gen p53 disminuyó de forma dependiente de la dosis después de una exposición de 24 horas a los digestos de gazpacho, disminuyendo hasta el 45% de la expresión de control tras una exposición al digestato al 10% v / v (Figura 5.5.1 (D)) en la expresión de p53 y Bcl2, con regulación negativa observado en BAX y Cyclin D1.

5.6 DISCUSIÓN

Presentamos en este trabajo la primera evidencia experimental de la actividad antiproliferativa y citotóxica de gazpacho contra el crecimiento de líneas celulares de cáncer. Utilizando un ensayo in vitro acoplado de digestión/viabilidad de cultivo celular, hemos detectado una actividad de inhibición del crecimiento, dependiente de la dosis y del tiempo de exposición, de digestatos de nuestras muestras ensayadas a bajos niveles de concentración alcanzables in vivo.

El cóctel complejo de fitoquímicos presente en gazpacho casero es mucho más diverso que en un jugo de tomate simple, incluyendo varias familias de biomoléculas con actividad antitumoral conocida de otros componentes alimenticios, tales como carotenoides, polifenoles, compuestos de azufre y tocoferoles. Es posible que, cuando se consume regularmente, tal mezcla dietética pueda actuar de manera similar a la quimioterapia metronómica (Scharovsky et al., 2009). De esta manera, las biomoléculas alimentarias

actuarían de manera similar a la administración de dosis generalmente bajas de diversos fármacos quimioterapéuticos sin períodos prolongados de descanso, actuando sobre una diversidad de blancos moleculares en células cancerosas y, por tanto, potenciando su actividad antiproliferativa. En segundo lugar, la presencia de aceite de oliva en la mezcla de gazpacho mejora el proceso de micelización durante el proceso de molienda del puré de gazpacho, aumentando la biodisponibilidad y biodisponibilidad de fitoquímicos hidrófobos, como carotenoides (Van het hof et al., 2000) y polifenoles (Faila et al., 2005, Palmero et al., 2014). Dicho procesamiento destruye los tejidos vegetales, aumenta el área superficial y mejora las interacciones de enzimas de digestión y emulsionantes con partículas de alimentos. Durante la digestión in vivo, el aceite de oliva ayuda a transferir micronutrientes lipófilos de la matriz alimenticia a gotitas de aceite y micelas, y estimula la secreción de sales biliares y lipasas pancreáticas necesarias para la formación de micelas e induciendo la síntesis de quilomicrones. El aceite de oliva es un ingrediente clave en las recetas de gazpacho, que oscilan entre 3-5% (v/v) en la mezcla final. La presencia de oleato de aceite de oliva en las micelas también ha mostrado un efecto positivo en la absorción de carotenoides (Hollander et al., 1978). Además de esta acción, el aceite de oliva tiene algunos compuestos bioactivos específicos, como los triterpenos, que han demostrado sus propias actividades biológicas (Sanchez-Quesada et al., 2013) y actividades antitumorales y pro-apoptóticas directas contra las células cancerosas que también podrían desempeñar un papel en la actividad del gazpacho (Allouche et al., 2011, Reyes-Zurita et al., 2009).

Una contribución metodológica de este trabajo es la evaluación de una metodología acoplada para caracterizar el potencial quimio-preventivo de las muestras de alimentos contra la proliferación de cultivos celulares de cáncer. Hemos evaluado el rendimiento de un método estandarizado de digestión *in vitro* estática, acoplado a un modelo celular de cáncer *in vitro*, y a un análisis multiparamétrico de citotoxicidad. El método de digestión *in vitro* de muestras vegetales (Garrett et al., 1999) ha demostrado ser un método válido para suministrar matrices de alimentos complejas a células cultivadas. A pesar de la disminución de las concentraciones de fitoquímicos después de la digestión, la actividad antiproliferativa de los digestatos fue significativa, y confirma que la bio-accesibilidad y la biodisponibilidad de las biomoléculas activas se ven reforzadas por el proceso de digestión (Fernandez-García, et al 2009). Los carotenoides son insolubles en medio acuoso, por lo que las grasas ingeridas diariamente y el aceite favorecen la solubilización de éstos, facilitando su dispersión y favoreciendo una mayor biodisponibilidad para las células (Nagao, 2009).

El contenido de licopeno se utilizó como referencia de los niveles de exposición a moléculas bioactivas probados *in vitro* en comparación con los esperados *in vivo*. Los niveles fisiológicos de licopeno en la sangre y los tejidos humanos varían con la ingesta y el tipo de tejido. Se ha establecido a partir de ensayos clínicos (Mayne, et al., 1999) un contenido medio de licopeno de 0,5 μM en sangre humana (entre 0,07 y 1,79). El licopeno en los niveles de tejidos humanos varía desde 0,001 μM de peso húmedo en el tejido adiposo hasta 0,02 μM de peso húmedo en suprarrenales y testículos (Stahl et al., 1996). En nuestras muestras de gazpacho casero, una concentración inicial en gazpacho crudo de 11,3 μM , se redujo en digestatos a 1,57 μM , con concentraciones finales resultantes de 0,06 μM para concentraciones del 5% v/v y 0,15 μM para muestras de 10% v/v, alrededor de 5 veces inferior a los valores plasmáticos medios, por tanto dentro del intervalo de niveles alcanzables *in vivo*.

La inhibición del crecimiento de las células cancerosas por los digestatos de tomate fue comparable a los valores anteriores informados. Utilizando el mismo método de digestión (Palozza et al., 2009) se observaron valores de crecimiento HT-29 del 45% del control después de 24 horas de exposición al 10% (v/v) de digestato, que no se modificó significativamente prolongando el tiempo de incubación hasta 72 h. Obtuvimos un valor muy similar del 48% después de 72 horas de exposición. Esta similitud es bastante notable, ya que las diferencias en las muestras de tomate y las condiciones experimentales pueden causar una variabilidad significativa entre los estudios. Otra novedad de este trabajo es la constatación de que la actividad antitumoral del tomate se mejora aún más cuando se mezcla en formulaciones enriquecidas con otras verduras frescas, como la receta de gazpacho. Nuestros datos apoyan las observaciones anteriores de que cuanto mayor es la variedad de especies moleculares en la matriz de alimentos, mayor es la acción anti-proliferativa.

Finalmente, hemos determinado que el mecanismo antitumoral se efectúa por vía apoptótica. Nuestros resultados de la actividad enzimática caspasa y análisis de expresión génica diferencial sugieren que la matriz de gazpacho casero contiene una rica combinación de especies naturales bioactivas capaz de activar la vía apoptótica en las células de cáncer de colon. Varios componentes del gazpacho, como los carotenoides en el tomate (Cenariu et al., 2015), y los compuestos fenólicos en el aceite de oliva (Llor et al., 2003, Gill et al., 2005), han mostrado actividad antiproliferativa *in vitro* contra el cáncer de colon (Rotelli et al., 2015). Aquí hemos detectado la activación de Caspasas 3 y 7 por los digestatos de gazpacho. El gazpacho puede ser considerado como un jugo de tomate fresco, enriquecido con otras

verduras y aceite de oliva. La activación de la apoptosis por digestatos de tomate ya había sido reportada en estudios previos. Los digestos de tomate activan las dianas apoptóticas induciendo caspasa-3 e inhiben la progresión G0/G1 del ciclo celular. También se había citado la disminución de la ciclina D1, Bcl-2 y Bcl-xL (Palozza et al., 2007, Palozza et al., 2009). Nuestros datos muestran que la apoptosis fue desencadenada por la digestión de gazpacho principalmente por la regulación negativa de anti-apoptosis gen Bcl-2. La inhibición de Bcl-2 parece ser determinante en la inducción de la apoptosis en nuestro caso. La actividad antiproliferativa también se ejerció mediante el paro del ciclo celular asociado a una disminución de la expresión de ciclina D1. La ciclina D1 es uno de los principales moduladores del ciclo celular, a través de quinasas dependientes de ciclina, y su inhibición por digestatos de tomate (Palozza et al., 2007, Palozza et al., 2009) y licopeno (Nahum et al., 2006) ha sido descrita previamente.

Una de las líneas futuras de investigación más interesantes es el papel de la regulación negativa de p53 en la actividad antitumoral observada. Se ha demostrado claramente que el gen p53 es el oncogén mutado más comúnmente en una amplia variedad de cánceres humanos, incluyendo los adenocarcinomas más frecuentes. El p53 de tipo salvaje integra una red compleja de respuestas antiproliferativas, incluyendo apoptosis, detención del ciclo celular y senescencia (Fridman et al., 2003). Sin embargo, aunque la pérdida de funcionalidad normal es casi universal, p53 podría no ser realmente un gen supresor de tumores, si bien un efecto negativo dominante está involucrado en la mayoría de las mutaciones (Liu et al., 2006). En nuestro caso, dado que las células HT-29 no contienen proteína p53 de tipo salvaje (Rodrigues et al., 1990), el mecanismo de apoptosis inducido por el digestato de gazpacho detectado aquí, a través de la activación de caspasa a través de la disminución de la relación Bcl2 / BAX, es probablemente independiente de la proteína p53 en esta línea celular. Esto coincide con una ausencia similar de cambio significativo de expresión de p53 en HT-29 después de la exposición a indometacina en nuestra prueba de control positivo de citotoxicidad. También coincide con la ausencia de efectos sobre los niveles de p53 en HT-29 observados tras la exposición a digestos de tomate (Palozza et al., 2007, Palozza et al., 2009). La red antiproliferativa del p53 es controlada por diferentes señales, incluyendo factores ambientales, tales como biomoléculas dietéticas activas y sus metabolitos. Hasta donde sabemos, a partir de micronutrientes de tomate sólo el licopeno se ha citado como activador de p53 para inducir la vía intrínseca de la apoptosis en las células cancerosas, si bien en líneas celulares diferentes a HT-29 (Palozza et al., 2010, Pereira et al., 2014). Poco se sabe sobre el

papel del mutante p53 en el fenotipo carcinógeno HT-29, y por lo tanto, por ahora queda por investigar el vínculo entre la regulación negativa p53 y la inhibición del crecimiento por gazpacho digestatos.

La principal desventaja del “whole food approach” implementado en este trabajo es el débil establecimiento y aislamiento de nexos causales directos entre la actividad global de la matriz que aquí se caracteriza y biomoléculas específicas de actividad aislada conocida (Jacobs et al., 2007). La identificación detallada de estas moléculas, su papel relativo y las interacciones y sinergias responsables de la actividad antitumoral descrita aquí necesitan de investigaciones exhaustivas fuera del alcance de nuestra evaluación. Muchos trabajos se han hecho para evaluar la actividad antitumoral de biomoléculas aisladas, pero pocos trabajos describen sinergias apareadas entre componentes mixtos como los presentes en la receta de gazpacho, como tocoferoles y carotenoides de tomate y pimiento dulce (Le Grandois et al., 2017), ajo y tomate (Bhuvaneshwari et al., 2004), aceite de oliva y tomate (Ramos-Bueno et al., 2017). Creemos que nuestra aproximación basada en la evaluación de la actividad global de matrices alimentarias complejas ofrece una visión necesaria, complementaria a estos estudios reduccionistas, para la evaluación del potencial quimio-preventivo global de estas especies moleculares cuando se mezclan en el contexto de sus matrices naturales de alimentos.

Las conclusiones sobre el potencial anticancerígeno de nuestro estudio se limitan al sistema y modelo utilizado, y a los digestatos de alimentos ensayados. Nuestro modelo sólo puede simular en parte la secuencia completa de la transformación digestiva de los alimentos, y el desarrollo final de la actividad biológica dentro de las células cancerosas. Futuros desarrollos deberían incluir una interfaz de absorción intestinal para una simulación más realista de la biodisponibilidad de micronutrientes clave. De todos modos, pensamos que las pruebas de viabilidad de células de digestión acopladas, tales como la metodología utilizada aquí, son una herramienta valiosa para la evaluación preclínica de la actividad antiproliferativa potencial de matrices complejas de alimentos ricos en biomoléculas activas y para el diseño de experimentos controlados para dilucidar sus mecanismos moleculares de acción.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- ❖ Hemos optimizado una metodología *in vitro* para la evaluación de la actividad antitumoral de alimentos basada en la determinación de la actividad antiproliferativa del crecimiento de tumores cultivados frente a la exposición a muestras alimentarias digeridas previamente *in vitro*.
- ❖ Además de confirmar la actividad antitumoral de digestatos de tomate, hemos podido constatar que se ve intensificada sustancialmente en la mezcla de vegetales frescos que componen la receta del gazpacho andaluz. Es decir, hemos obtenido evidencias de que el consumo de tomate es mucho más quimiopreventivo frente al crecimiento de células cancerígenas cuando se encuentra mezclado con otras hortalizas y aceite de oliva en recetas tradicionales como la del gazpacho, en especial cuando son destinadas para el consumo en fresco.
- ❖ El proceso habitual de pasteurización térmica empleado en la comercialización de gazpachos comerciales destruye en parte la actividad antitumoral del gazpacho, con un potencial anticancerígeno mucho mayor cuando se consume en recetas caseras no pasteurizadas.
- ❖ Los resultados del análisis de la actividad enzimática y el análisis de expresión génica nos indica que la matriz del gazpacho casero contiene una rica combinación de especies naturales bioactivas capaces de activar la vía apoptótica de muerte celular programada en las células de cáncer de colon.

Como conclusión final de este trabajo, se ha mostrado el potencial anticancerígeno que podría tener el consumo habitual de gazpacho, como medio quimiopreventivo frente a la progresión del cáncer de colon, así como la importancia de revalorizar el consumo de vegetales frescos en la prevención de la incidencia de enfermedades cancerígenas.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdelwahab S. (2012) Cucurbitacin L 2-O- β -Glucoside Demonstrates Apoptogenesis in Colon Adenocarcinoma Cells (HT-29): Involvement of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Regulation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012, 1-8.

Ahmed SA, Gogal RMJr, Walsh JE. (1994) A new rapid and simple nonradioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods* 170, 211-224.

Allouche Y, Warleta F, Campos, M et al. (2011) Antioxidant, Antiproliferative, and Proapoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage. *J Agric Food Chem* 59, 121-130.

Arencibia DF, Rosario LA, Curveco DL. (2003) Principal assays that to determine the cytotoxicity of a substance, some considerations and their utility. *RETEL: Revista de Toxicología en Línea*, 40-52.

Asano T & Mcleod RS. (2002) Dietary fiber for the prevention of colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

BELIVEAU R & GINGRAS D. (2007) Role of nutrition in preventing cancer. *Canadian Family Physician* 53, 1905-1911.

Béliveau R & Gingras D. (2007) Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician* 53, 1905-1911.

Berridge M, TAN A, McCoy K et al. (1996) The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemical*, 4, 14-19.

Bertram L, Hiltunen M, Parkinson M et al. (2005) Family-based association between Alzheimer's disease and variants in UBQLN1. *The New England Journal of Medicine* 352, 884- 894.

Bevan M, Shufflebottom D, Edwards K et al. (1989) Tissue- and cell- specific activity of a phenylalanine ammonia-lipase promoter in transgenic plants. *EMBO Journal* 8, 1899-1906.

Bhuvaneswari V, Rao KS & Nagini S. (2004) Altered expression of anti and proapoptotic proteins during chemoprevention of hamster buccal pouch carcinogenesis by tomato and garlic combination. *Clin Chim Acta.* 350, 65-72.

Boivin D, Lamy S, Lord-Dufour S et al. (2009) Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chem* 112, 374-380.

Burns J, Fraser PD & Bramley PM. (2003) Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry* 62, 939-947.

Burrows MT. (1910) *Journal of the American Veterinary Medical Association* 55, 20-57.

Carrel A. (1912). On the permanent life of tissues outside of the organism. *The Journal of Experimental Medicine* 15, 516-528.

Cartaya O & Reynaldo I. (2001) Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales* 22, 5-14.

Cenariu D, Fischer-Fodor E, Virag P et al. (2015) In vitro Antitumour Activity of Tomato-Extracted Carotenoids on Human Colorectal Carcinoma. *Not Bot Horti Agrobo* 43, 293-301.

Che Man YB & Tan CP. (2003) *Lipids for functional foods and nutraceuticals*, Oily Press, Bridgwater 25-52.

Cilla A, Alegría A, Barberá R et al. (2013) Foods or Bioactive Constituents of Foods as Chemopreventives in Cell Lines After Simulated Gastrointestinal Digestion: A Review. In *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants* [JA Morales-González, editor] ISBN 978-953-51-1123-8. Rijeka, Croatia. DOI: 10.5772/51504

Clinton SK. (1998). Lycopene: Chemistry, Biology, and Implications for Human Health and Disease. *Nutrition Reviews*, 35-51.

Cohen BL. (1995). Test of the Linear no-threshold theory of radiation carcinogenesis for inhaled radon decay products. *Health Physics* 68, 157-174.

Cooper DA. (2004) Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *Journal of Nutrition* 134, 221S-224S.

Cooper DA. (2004) Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *Journal of Nutrition* 134, 221S-224S.

Corzo C, Petzold M, Mayol X et al (2003). RxFISH karyotype and MYC amplification in the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 36, 425-426.

Cuarta edición.

Daood HG, Kapitany J, Biacs P et al. (2006) Drying temperature, endogenous antioxidants and capsaicinoids affect carotenoid stability in paprika (red pepper spice). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2450-2457.

Dávalos A, Fernández-Hernando C, Cerrato F et al. (2006) Red Grape Juice Polyphenols Alter Cholesterol Homeostasis and Increase LDL Receptor Activity in Human Cells In Vitro. *Journal of Nutrition* 136, 1766-1773.

De la Garza RI, Gregory JF & Hanson AD. (2007) Folate biofortification of tomato fruit. *Plant Biology* 104 4218-4222.

Delgado-Vargas F & Paredes-López O. (2003) Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC Press 327.

Denizot F & Lang R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 89, 271-277.

Desiere F. (2004) Towards a systems biology understanding of human health.

Doll R & Peto R. (1981) The causes of cancer. Oxford: Oxford University Press.

FDA. FOOD LABELING GUIDE. (2008) Qualified Health Claims: Letter Regarding Tomatoes and Prostate, Ovarian, Gastric and Pancreatic Cancers (American Longevity Petition), (Docket No. 2004Q-0201).

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M et al. (2013) Cancer Incidence and Mortality. IARC CancerBase 1.

Fernández-García E, Carvajal-Lérida I & Pérez-Gálvez A. (2009) In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr Res* 29, 751-760.

- Fogh J. (1975). Human tumor cells in vitro. New York and London: Plenum Press, 115-159.
- Formica JV & Regelson W. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food and Chemical Toxicology 33, 1061-1080.
- Freshney RI & Alan RL. (1987) Culture of animal cells. A manual of basic techniques. ISBN 0-8451-4241-0.
- Fridman J & Scott W. (2003) Control of apoptosis by p53. Oncogene. 22,9030-9040.
- Friedman M, Levin CE, Lee SU et al. (2009) Tomatine-Containing Green Tomato Extracts Inhibit Growth of Human Breast, Colon, Liver, and Stomach cancer Cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 5727-5733.
- Garrett D, Failla M & Sarama R. (1999) Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. J Agric Food Chem 47,4301-4309.
- Gill CI, Boyd A, McDermott E et al. (2005) Potential anticancer effects of virgin olive oil phenols on colorectal carcinogenesis models in vitro. Int J Cancer 117, 1-7.
- Giovannucci E, Rimm E, Liu Y et al. (2002) A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. J Natl Cancer Inst 94, 391-398.
- Giovannucci E. (2002) A Review of Epidemiologic Studies of Tomatoes, Lycopene, and Prostate Cancer. Experimental Biology and Medicine 227, 852–859.
- Goegan P, Johnson G, Vincent R. (1995) Effects of serum protein and colloid on AB assay in cell cultures. In Vitro Toxicity 9, 257-266.
- Guil-Guerrero JL, Martínez-Guirado C, Reboloso-Fuentes MM et al. (2006) Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. European Food Research and Technology 224, 1-9.
- Harrison RG. (1907) Experiments in transplanting limbs and their bearing on the problems of the development of nerves. Journal of Experimental Zoology 4, 239-281.

Haslam E. (1989) Plant polyphenols: Vegetable tannins revisited. Cambridge University Press.

Hayflick L & Moorhead P. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25, 585-621.

Hayflick L & MOORHEAD P. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25, 585-621.

Heo BG, Chon SU, Park YJ et al. (2009) Antiproliferative activity of Korean wild vegetables on different human tumor cell lines. *Plant Foods Human Nutrition* 64, 257-263.

Hertog MGL, Hollman PCH & Van de Putte B. (1996) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1242-1246.

Hollander D & Ruble PE. (1978) beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. *Am J Physiol* 235, E686-E691.

Howard LR & Wildman REC. (2007) Isoflavones: source and metabolism. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. 165- 191.

Interplay between genotype, environment and nutrition. *Biotechnology Annual Review* 10, 51-84.

Jacobs S, Hunt R, Tarnow-Mordi W et al. (2007) Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*.

Jarret L, Berke T, Baldwin E et al. (2009) Variability for Free Sugars and Organic Acids in Capsicum Chinese. *Chemistry & Biodiversity* 6, 138-145.

Khor HT & Raajeswari R. (2001) Red palm oil, vitamin A, and the antioxidant enzymes. *Micronutrients and Health: Molecular Biological Mechanisms*. AOCS Press. Champaign, IL.

Kohler G & Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.

Krinsky NI. (2001) Carotenoids as antioxidants. *Journal of Nutrition* 17, 815-817.

Kuskoski ME, Asuero AG, Troncoso AM et al. (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia e Tecnología de Alimentos* 25, 726-732.

Lampe JW. (2003) Isoflavonoid and Lignan Phytoestrogens as Dietary Biomarkers. *Journal of Nutrition*, 133: 956S-964S.

Langner E & Rzeski W. (2012) Dietary derived compounds in cancer chemoprevention WSPOLCZESNA ONKOLOGIA-CONTEMPORARY ONCOLOGY *Contemp Oncol* 16, 394-400.

Le Grandois J, Guffond D, Hamon E et al. (2017) Combined microplate-ABTS and HPLC-ABTS analysis of tomato and pepper extracts reveals synergetic and antagonist effects of their lipophilic antioxidative components. *Food Chem* 223, 62-71.

Lenucci MS, Cadinu D, Taurino M, et al. (2006) Antioxidant Composition in Cherry and High-Pigment Tomato Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2606-2613.

Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E et al. (1990) Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Research* 50, 6334-6343.

Littlefield JW. (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145, 709-710.

Liu C, Russell RM & Wang XD. (2006) Lycopene supplementation prevents smoke-induced changes in p53, p53 phosphorylation, cell proliferation, and apoptosis in the gastric mucosa of ferrets. *J Nutr* 136, 106-111.

Llor X, Pons E, Roca A et al. (2003) The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clin Nutr* 22, 71-79.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P et al. (2008) *Biología Celular y Molecular*. 5° edición. Ed. Panamericana, Buenos Aires, 7.

Matsufuji H, Nakamura H, Chino M et al. (1998) Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3468-3472.

Mayne ST1, Cartmel B, Silva F et al. (1999) Plasma lycopene concentrations in humans are determined by lycopene intake, plasma cholesterol concentrations and selected demographic factors. *J Nutr* 129, 849-854.

Mayo C & Mayol X. (2009) Cyclin D1 negatively regulates the expression of differentiation genes in HT-29 M6 mucus-secreting colon cancer cells. *Cancer Lett.* 281, 183-187.

Medina-Remon A, Vallverdu-Queralt A, Arranz S et al. (2013) Gazpacho consumption is associated with lower blood pressure and reduced hypertension in a high cardiovascular risk cohort. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 23, 944-952.

Michalopoulos G & Pitot HR. (1975) "Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes". *Federation Proceedings* 34, 826.

Michaud DS, Spi-Egelman D, Clinton SK et al. (2000) Prospective study of dietary supplements, macronutrients, micronutrients, and risk of bladder cancer in US men. *American Journal of Epidemiology* 152, 1145-1153.

Michikawa M, Kobayashi T & Tsukagoshi H. (1991) Early events of chemical transmission of newly formed neuromuscular junctions in monolayers of human.

Miller EC, Giovannucci E, Erdman JW Jr et al. (2002) Tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Urologic Clinics of North America* 29, 83-93.

Milner JA. (2006) Preclinical perspectives on garlic and cancer. *Research Symposium on Significance of Garlic and Its Constituents in Cancer and Cardiovascular Disease. J Nutr* 136, 827S-831S

Montes AL. (1966) *Bromatologia*. Ed. Universitaria, Buenos Aires.

Moscona A & Moscona H. (1952) The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Journal of Anatomy*, 86, 287-301.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
musclecell co-cultured with fetal rat spinal cord explants. *Brain Research* 538, 79- 85.

Nagao A. (2009) Absorption and function of dietary carotenoids. *Karger Forum in Nutrition* 61, 55-63.

Nahum A, Zeller L, Danilenko M et al. (2006) Lycopene inhibition of IGF-induced cancer cell growth depends on the level of cyclin D1. *Eur J Nutr* 45, 275-282.

Nociari MM, Shalev A, Benias P et al. (1998) A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 213, 157-167.

Norton F. (2000) Dye exclusion viability assays using a hemacytometer. *Tech. Note. Nalge. Nunc. International Corporation* 3, 67-68.

Ong ASH & Choo YM. (1997) Carotenoids and tocopherols from palm oil. En *Natural Antioxidants*. AOCS Press Champaign Illinois USA 8, 133-149.

Ozgun M, Ozcan T, Akpinar-Bayazit A et al. (2011) Functional compounds and antioxidant properties of dried green and red peppers. *African Journal of Agricultural Research* 6, 5638-5644.

Palevitch D & Craker LE. (1995) Nutritional and medicinal importance of red pepper (*Capsicum* spp.). *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 3, 55-83.

Palozza P, Colangelo M, Simone R et al. (2010) Lycopene induces cell growth inhibition by altering mevalonate pathway and Ras signaling in cancer cell lines. *Carcinogenesis* 31, 1813-1821.

Palozza P, Serinil S, Boninsegna A et al. (2007) The growth-inhibitory effects of tomatoes digested in vitro in colon adenocarcinoma cells occur through down-regulation of cyclin D1, Bcl-2 and Bcl-XL. *J Nutr*, 98, 789-795.

Palozza P, Torelli C, Boninsegna A et al. (2009) Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Letters*. 83, 108-117.

Pampaloni B, Mavilia C, Fabbri S et al. (2014) In Vitro Effects of Extracts of Extra Virgin Olive Oil on Human Colon Cancer Cells. *Nutr Cancer* 66, 1228-1236.

Pereira NC, Teodoro AJ, Oliveira FL et al. (2014) Lycopene induce apoptosis in human prostate cells and alters the expression of Bax and Bcl-2 genes. *Food Sci Technol Int* 59, 1290-1297.

Raff MC. (1992) Social control on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400

Raffo A, Leonardi C, Fogliano V et al. (2002) Nutricional value of Cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentom* C.v. Naomi F1) harvested at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6550-6556.

Ramos-Bueno RP, Romero-Gonzalez R, Gonzalez-Fernandez MJ et al. (2017) Phytochemical composition and in vitro anti-tumour activities of selected tomato varieties. *J Sci Food Agric* 97, 488-496.

Repetto G. (1988) Las prácticas correctas de laboratorio y problemas en su implantación. *Critical Reviews in toxicology*, 5, 117-125.

Repetto M & Repetto G. (2009). *Toxicología fundamental*. Ediciones Díaz de Santos.

Repetto M, Camean A, Lopez-Artiguez M et al. (2005) *Toxicología avanzada*. Ediciones Díaz de Santos.

Repetto M. (1992). Propuesta de un proyecto nacional de validación de métodos de evaluación toxicológica in vitro. En *Actas de la I Jornada de validación de modelos alternativos in vitro*, Valencia, 47-54.

Reyes-Zurita FJ, Rufino-Palomares EE, Lupianez JA et al. (2009) Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Lett* 273, 44-54.

Rodrigues NR, A Rowan ME, Smith IB et al. (1990). p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7555-7559.

Rodríguez-Amaya DB. (1999) Latin American food sources of carotenoids. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 49, 74S-84S.

Rotelli MT, Bocale D, De Fazio M et al. (2015) IN-VITRO evidence for the protective properties of the main components of the Mediterranean diet against colorectal cancer: A systematic review. *Surg Oncol* 24, 145-152.

Rous P & Jones FS. (1916) A Method for Obtaining Suspensions of Living Cells from the Fixed Tissues, and for the Plating out of Individual Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 23, 549-555.

Roux W. 1885. Einleitung zu den Beiträgen zur Entwicklungsmechanik des Embryo. *Z Biol* 21, 411-428.

Sanchez-Quesada C, Lopez-Biedma A, Warleta F et al. (2013) Bioactive Properties of the Main Triterpenes Found in Olives, Virgin Olive Oil, and Leaves of *Olea europaea*. *J Agric Food Chem* 61, 12173-12182.

Sattler CA, Michalopoulos G, Sattler GC et al. (1978) Ultrastructure of adult rat hepatocytes cultured on floating collagen membranes. *Cancer Research* 38, 1539-1549.

Scharovsky LE & Mainetti VR. (2009) Rozados Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better O.G. *Curr Oncol* 16, 7-15.

Sies H. (1991) *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants*. Academic Press: London.

Soerjomataram I, Oomen D, Lemmens V et al. (2010) Increased consumption of fruit and vegetables and future cancer incidence in selected European countries. *European Journal of Cancer* 46, 2563-2580.

Stahl W & Sies H. (1996) Lycopene: a biologically important carotenoid for humans. *Arch Biochem Biophys* 336, 1-9.

Strack D. (1997) Phenolic metabolism. *Plant Biochemistry*. Academic Press, London 387-416.

Sukrasno N & Yeoman MM. (1993) Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits, *Phytochemistry* 32, 839-844.

Sun T, Xu Z, Wu CT et al. (2007) Antioxidant activities of different colored sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science* 72, S98-S102.

Talalay P & Fahey JW. (2001) Phytochemicals from Cruciferous Plants Protect against Cancer by Modulating Carcinogen Metabolism. American Institute for Cancer Research 11th Annual Research Conference on Diet, Nutrition and Cancer. *Journal of Nutrition* 131, 3027-3033.

Trock B, Lanza E & Greenwald P. (1990) Dietary fiber, vegetables, and colon cancer – Critical – review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *Journal of The National Cancer Institute* 82, 650-661.

USDA, 2004. Nutrient Data Bank. United States National Agriculture Library.

Van Der Meer IM, Spelt CE, Mol JNM et al. (1990) Promoter analysis of the chalcone synthase (*chsA*) gene of *Petunia hybrida*: a 67 bp promoter region directs flower-specific expression. *Plant Molecular Biology* 15, 95-109.

Villareal Y, Mejía DF, Osorio O et al. (2013) Efecto de pasteurización sobre características sensoriales y contenido de vitamina C en jugos de frutas. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 11, 66-75.

Vinson JA, Hao Y, Su X et al. (1998) Phenol antioxidant quantity and quality in food: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3630-3634.

Vinson JA, Su X, Zubik L et al. (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in food: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5315-5321.

Wachtel RE. (1999) Capsaicin. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 24, 361-363.

Wicki A & Hagmann J. (2011) Diet and cancer. *The European Journal of Medicinal Sciences* 141, 13250.