



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Efectos del vino tinto sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el
 CrO_3 en el ratón *in vivo*

T E S I S

que para obtener el título de Biólogo presenta:

Rodrigo Anibal Mateos Nava

Director de Tesis:

Dra. María del Carmen García Rodríguez



Abril 2007

México, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN). FES Zaragoza, UNAM.

DEDICATORIA:

A mis padres, Lázaro y Petra, por todo el amor y el apoyo que me brindan día con día, y que en ésta tesis se ven reflejados.

A Lulú, Lety, Misa, Lili, Omar, Mari, Sandy y Lore, por su apoyo incondicional para poder concluir esta etapa de mi vida.

A la memoria de Augusto, quien con sus palabras me motivó a continuar con mis estudios y se que en donde quiera que te encuentres me sigues ayudando.

A Carmen, por todo el apoyo que me brindó en la realización de éste trabajo.

A Crist, Jacqueline y Nadia quienes compartieron ésta parte de mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1. Antecedentes.....	2
2. Vino tinto y sus componentes antioxidantes.....	3
2.1 <i>Flavonoides</i>	5
2.2 <i>Protección de daño genotóxico y carcinógeno</i>	7
2.3 <i>Mecanismos de protección</i>	8
3. Agentes inductores de daño al ADN.....	10
3.1 <i>Cromo</i>	11
3.2 <i>Mecanismo de inducción de daño al ADN por parte del cromo</i>	12
3.3 <i>Daño carcinógeno y genotóxico del cromo</i>	13
4. Ensayos para evaluar el daño al ADN.....	13
4.1 <i>Micronúcleos</i>	14
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
III. HIPÓTESIS.....	15
IV. OBJETIVOS.....	15
1. General.....	15
2. Particulares.....	16
V. MATERIAL Y MÉTODO.....	16
1. Reactivos.....	16
2. Animales.....	17
3. Preparación de láminas.....	17
4. Tratamientos.....	17
5. Análisis de micronúcleos.....	19
6. Análisis estadístico.....	20

VI. RESULTADOS.....	21
1. Efecto del vino tinto sobre el daño genotóxico.....	21
2. Efecto de la quercetina sobre el daño genotóxico.....	30
3. Efecto del vino tinto y la quercetina sobre el daño genotóxico inducido por el CrO ₃	32
4. Efecto citotóxico del vino tinto y la quercetina.....	37
VII. DISCUSIÓN.....	43
VIII. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES.....	50
IX. REFERENCIAS.....	51
X. ANEXOS.....	57

Abreviaturas

AC	Aberraciones cromosómicas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANDEVA	Análisis de varianza
CrO ₃	Trióxido de cromo
MN	Micronúcleos
pH	potencial de Hidrógeno
EPC	Eritrocitos Policromáticos
MN-EPC	Eritrocitos Policromáticos Micronucleados
ENC	Eritrocitos Normocromáticos
DIF	Frecuencia Diferencial de Inducción de Micronúcleos
NIF	Frecuencia de la Inducción Neta de Micronúcleos
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
FDA	Food and Drug Administration U. S.
IARC	International Agency for Research on Cancer

RESUMEN

Dado que los flavonoides del vino tinto constituyen una fuente rica de antioxidantes, se ha propuesto su uso en la protección de enfermedades crónicas originadas por estrés oxidativo, entre las que se puede incluir las relacionadas con daño al ADN. En éste estudio se evaluaron los efectos del vino tinto (con y sin etanol) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducidos por el trióxido de cromo (CrO_3). Para lo cual, se cuantificó el incremento de la frecuencia de micronúcleos (MN) y la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) con respecto a los normocromáticos (ENC) en sangre de ratón *in vivo*. Se administraron por vía oral tratamientos agudos y subcrónicos de vino tinto con y sin etanol, y se aplicó por vía i.p. uno de los principales flavonoides presentes en el vino tinto (la quercetina). Como inductor de daño genotóxico se les aplicó por vía i.p. el CrO_3 . Cuando se administró el tratamiento agudo de vino tinto con etanol (concentrado) se incrementó de manera marginal la frecuencia de MN a las 24 horas. Al diluir el vino tinto con agua, ya no se observó aumento en el número de MN. Estos resultados hicieron suponer que el incremento en la frecuencia de MN se debe a la concentración de etanol y no a los flavonoides que contiene el vino. Para apoyar esta idea se repitió el protocolo empleando vino tinto sin etanol (concentrado) y al igual que en el protocolo anterior ya no se observaron efectos en la inducción de MN, ni al administrar el tratamiento subcrónico del vino tinto. Cuando se combinaron los tratamientos administrando el vino tinto previamente a la aplicación del CrO_3 no disminuyó la inducción de MN inducidos por el CrO_3 , ni cuando se aplicó la quercetina. En cuanto a la citotoxicidad, sólo en el tratamiento subcrónico se observó una disminución en la frecuencia de EPC.

I. INTRODUCCIÓN

Se ha propuesto que el consumo de vino tinto puede prevenir o contrarrestar algunos de los efectos originados por el estrés oxidativo entre los que se pueden incluir las enfermedades relacionadas con el daño al ADN entre las que se encuentra el cáncer, esto debido a que el vino tinto contiene diversos compuestos con propiedades antioxidantes (Bruce y Walzen, 2000; Greenrod *et al.*, 2005). Dentro de los principales compuestos con propiedades antioxidantes del vino tinto se encuentran los flavonoides como la quercetina, las catequinas y el resveratrol, los cuales han mostrado efectos protectores en el tratamiento del cáncer de mama, hígado y estomago. Además de que en algunos ensayos de prueba se ha observado que son capaces de proteger del daño genotóxico, ya que disminuyen la inducción de aberraciones cromosómicas inducidas por agentes como los benzo(a)pirenos y las aminas heterocíclicas (Damianaki *et al.*, 2000).

Por su parte, se ha observado que el etanol (el cual también es un componente del vino tinto) en concentraciones bajas (< 10 g/día) presenta propiedades benéficas como la prevención de enfermedades cardiovasculares y la absorción intestinal de lípidos, mientras que, en altas concentraciones (> 120 g/día) puede inducir daño genotóxico mediante el incremento en el número de micronúcleos (MN) y aberraciones cromosómicas (AC) (Longnecker, 1995; Maffei *et al.*, 2000 y 2002).

1. Antecedentes

Se ha descrito que el consumo de frutas y verduras está asociado a un bajo riesgo de contraer enfermedades como el cáncer, debido a que contienen sustancias con propiedades anticancerígenas o antimutágenas (Steinmetz y Potter, 1996; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2001; Edenharder *et al.*, 2002; Lako *et al.*, 2006). En el cuadro 1 se muestran algunos compuestos presentes en frutas y verduras que han

En el vino tinto se pueden encontrar compuestos con propiedades antioxidantes, por lo que al vino tinto se le ha descrito con efectos benéficos para la salud como la prevención de enfermedades cardiovasculares, el incremento de la absorción intestinal de lípidos, ayuda a la disolución de cálculos, es un diurético y ayuda a controlar la diabetes en algunos casos (diabetes tipo II) (Tomera, 1999; Bruce y Walzen, 2000; Tedesco *et al.*, 2000).

En el cuadro 2 se muestra una lista de los principales antioxidantes que están presentes en el vino tinto, entre los más ampliamente estudiados se encuentran las catequinas, la quercetina, el resveratrol y la apigenina, los que han mostrado que pueden inhibir el crecimiento celular de líneas tumorales y ayudar en la captura de radicales libres. Los ácidos caféico y gálico también han mostrado capacidad antioxidante contra la propagación de radicales peróxidos, generados en la fase lipofílica de las lipoproteínas de baja densidad (Rice-Evans *et al.*, 1996; Valko *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Antioxidantes presentes en el vino (Pomés-Aguirre y Leighton, 1998)

- Ácidos fenólicos (Ácido Gálico)
- Ácidos cinámicos (Ácido Caféico)
- Derivados de tirosina (Ácido Tiroso)
- Estilbenos (Resveratrol)
- Flavonoides: Flavonas (Apigenina)
 Flavonoles (Miricetina, Quercetina)
 Flavanoles (Catequina)
 Antocianidinas (Malvidina)
- Taninos condensados (Procianidinas)

2.1 Flavonoides

De los compuestos polifenólicos que están presentes en el vino tinto los flavonoides son los que se encuentran en mayor concentración. En el cuadro 3 se muestran los principales constituyentes fenólicos presentes en el vino tinto de los cuales aunque las catequinas son las que se presentan en mayor concentración se ha descrito que la quercetina es la que tiene un mayor

potencial antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Cuadro 3. Constituyentes fenólicos presentes en el vino tinto (Rice-Evans *et al.*, 1996)

Compuesto fenólico	mg/l
Catequina	191
Epicatequina	82
Ácido gálico	95
Cianidina	3
Malvidin-3-glucósido	24
Rutin	9
Quercetina	8
Miricetin	9
Ácido cafeíco	7.1
Resveratrol	1.5

Los flavonoides constituyen un grupo importante de polifenoles que se encuentran naturalmente en las plantas, por lo que representan una parte integral de la dieta humana. Se estima que la ingesta diaria de flavonoides es aproximadamente de 1 g (dependiendo de la dieta). La quercetina es el flavonoide más abundante en la dieta, se estima que su consumo oscila entre los 4 y 68 mg por día (Hollman y Katan, 1999; Valko *et al.*, 2006).

En la figura 1 se muestran las diferentes familias de flavonoides que se encuentran en la dieta. La quercetina y el kaempferol pertenecen al grupo de los flavonoles, las catequinas a los proantocianidinas, la apigenina y la luteolina a las flavonas y la miricetina, la naringina y la naringenina a las flavanonas (Skibola y Smith, 2000).

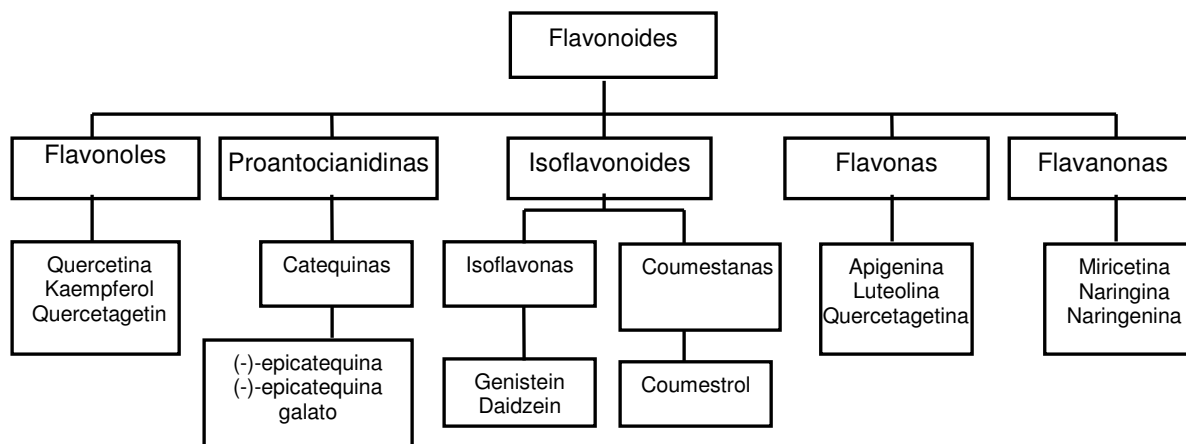


Figura 1. Familias de flavonoides que se encuentran en la dieta (modificado de Skibola y Smith, 2000)

La estructura básica de los flavonoides (figura 2) es una molécula difenilo unida por tres átomos de carbono los cuales están en forma heterocíclica unidos por un grupo oxi. La molécula contiene grupos funcionales, principalmente hidroxilos, unidos a los anillos, los que dependiendo de su posición le dan el nombre al compuesto y posiblemente le confieren su capacidad antioxidante donando electrones o átomos de hidrogeno para poder estabilizar a los radicales libres, quelan metales, inhiben la proliferación celular, interfieren con la oxidación de lípidos y otras moléculas (Rice-Evans *et al.*, 1996; Oak *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2006).

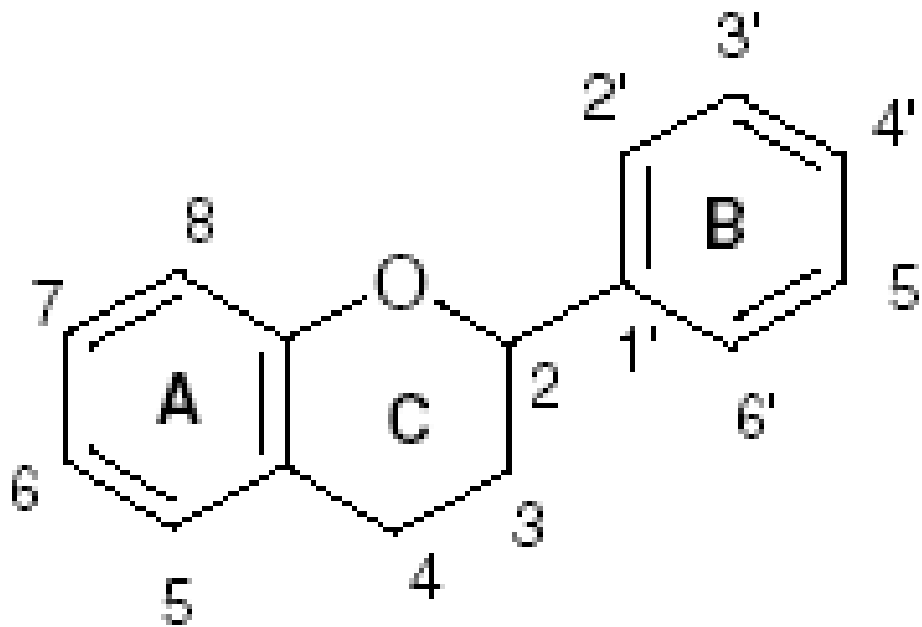


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides (Valko et al., 2006)

La absorción así como la distribución, metabolismo y excreción de los flavonoides en humanos ha sido poco estudiada. Se sabe que los flavonoides que están presentes en los alimentos están unidos a una molécula de azúcar como b-glucósidos, con excepción de las catequinas, y que estos flavonoides glucósidos son mayormente absorbidos por la pared del estomago e intestino a diferencia de aquellos que no contienen la molécula de azúcar, conocidos como agliconas. En un estudio en personas que se les había practicado una ileostomía, observaron que la absorción de la quercetina sin la molécula de azúcar fue del 24%, mientras que la absorción de la quercetina glucósido fue del 52%, concluyendo que la mitad de azúcar de la quercetina glucósilada es un determinante en su absorción (Hollman y Katan, 1999).

2.2 Protección de daño genotóxico y carcinógeno

Entre los efectos biológicos que pueden tener los flavonoides esta el de la protección del daño genotóxico, ya que se ha observado que estos son capaces de disminuir la

frecuencia de MN y AC inducidos por diversos agentes como pueden ser los benzo(a)pirenos y las aminas heterocíclicas, también se ha observado en estudios *in vitro* que pueden proteger del estrés oxidativo mediado por el *tert*-butil hidroperóxido y por el H₂O₂ (Damianaki *et al.*, 2000; Edenharder *et al.*, 2003; Alía *et al.*, 2006).

El potencial antioxidante de los flavonoides como la quercetina puede estar relacionado con posibles propiedades anticancerígenas entre las que se incluyen la inhibición del crecimiento de líneas celulares derivadas de cánceres humanos como son las de estómago, colon, próstata y mama. Así mismo se ha observado que se puede suprimir el crecimiento y desarrollo de cáncer cérvico-uterino, melanomas y tumores intestinales en el ratón (Soleas *et al.*, 2002). De igual manera en diversos estudios se ha observado que la quercetina, las catequinas y el resveratrol, pueden inhibir la proliferación celular en líneas de tumores de mama e hígado *in vitro*, y que en roedores protegen y disminuyen el desarrollo de cáncer en hígado, piel y estómago, entre otros (Yang *et al.*, 2001; Wilms *et al.*, 2005). En estudios clínicos la quercetina inhibió la actividad de la tirosin quinasa en linfocitos de pacientes que llegaban a presentar el desarrollo de un cáncer, sin embargo algunos pacientes llegaron a desarrollar cierto grado de nefrotóxicidad (Ferry *et al.*, 1996).

Si bien en estudios de laboratorio se ha llegado a demostrar la inhibición de la carcinogénesis por parte de los polifenoles, no obstante, estos resultados deben de ser usados con precaución en aquellos ensayos donde se pretendan utilizar a los polifenoles en la reducción de cáncer humano ya que puede generar el desarrollo de otros padecimientos (Ferry *et al.*, 1996; Skibola y Smith, 2000).

2.3 Mecanismos de protección

El mecanismo de protección de los flavonoides está relacionado con su potencial antioxidante, siendo los grupos funcionales de sus anillos los que juegan un papel importante en esta actividad. En la figura 3 se muestran los grupos estructurales de los flavonoides que actúan en la captura de radicales libres, se puede observar que el

grado y posición de los grupos hidroxilos en el anillo B, da como resultado una alta actividad y estabilidad a la molécula cuando se deslocaliza un electrón o actuando como un sitio preferido para los metales traza, como se muestra en el inciso A. También el doble enlace entre los carbonos 2 y 3, junto con el grupo 4-oxo en el anillo C amplían la capacidad de captura de radicales por parte de los flavonoides y éste doble enlace combinado con un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C, aumenta la actividad en la capacidad de captura de radicales, y la sustitución del hidroxilo en ésta posición disminuye está actividad (inciso B). Así mismo, se ha observado que grupos hidroxilos en la posición 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, han demostrado una actividad en la captura de radicales (inciso C) (Soobrattee *et al.*, 2005; Balasundram *et al.*, 2006).

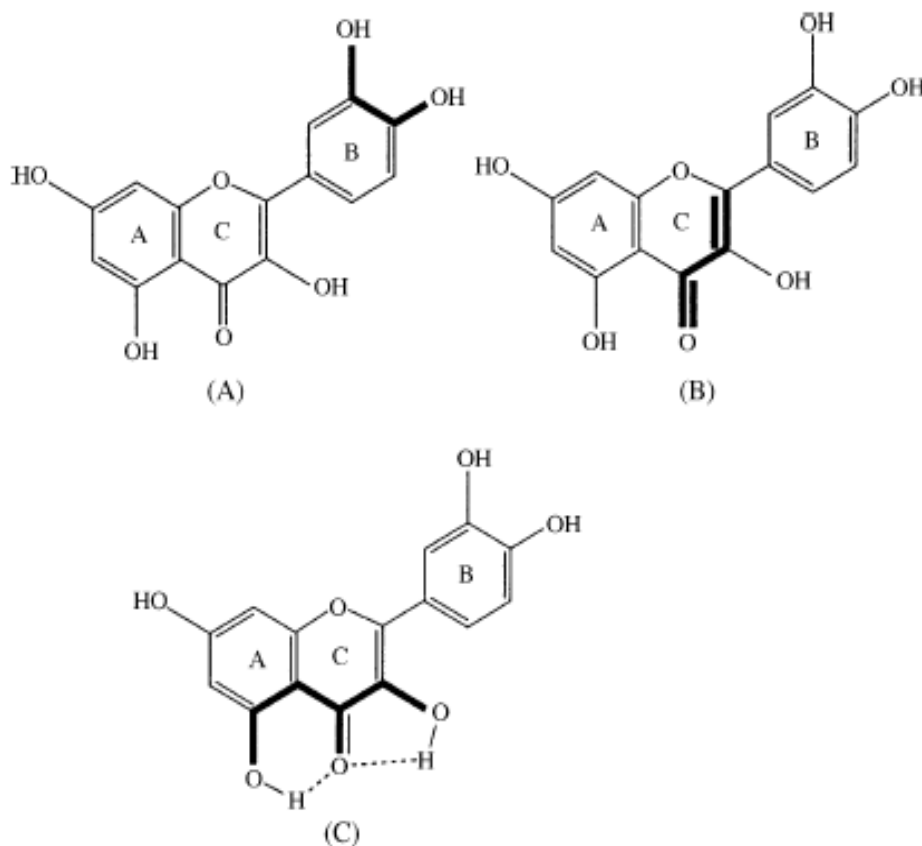


Figura 3. Grupos estructurales para la captura de radicales libres (Soobrattee *et al.*, 2005)

A pesar de los efectos benéficos que tienen en la salud los flavonoides, estudios recientes han demostrado que si se les consume en grandes cantidades pueden llegar a presentar bajo ciertas condiciones una actividad pro-oxidante, como con la presencia de metales de transición o peroxidasas y un pH alto, lo que lleva a la formación de especies reactivas de oxígeno y radicales fenoxilo los cuales dañan al ADN, a los lípidos y a otras moléculas biológicas (Paolini *et al.*, 2003; Galati y O'Brien, 2004; Valko *et al.*, 2006).

3. Agentes inductores de daño al ADN

Se ha propuesto que el daño al ADN puede ser originado por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, los cuales pueden ser generados por fuentes endógenas, por ejemplo, los procesos normales fisiológicos dentro de los cuales se encuentra el metabolismo de respiración de la mitocondria, o por fuentes exógenas, como las interacciones xenobióticas con algunos agentes tales como los metales y la radiación, entre otros. Cuando el mecanismo de control antioxidante es rebasado por los radicales libres, el potencial redox de la célula cambia a un estado de estrés oxidativo, creando un incremento de daño potencial hacia el ADN celular, los lípidos y las proteínas (Klaunig y Kamendulis, 2004).

En el cuadro 4 se muestran las principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno las cuales son el superóxido $\cdot\text{O}_2$, el peróxido H_2O_2 , el óxido nítrico $\cdot\text{NO}$, y uno de los más reactivos que es el radical hidróxilo $\cdot\text{OH}$, así como el lugar de donde proceden estas especies reactivas. También, se muestran los antioxidantes celulares que ayudan en los mecanismos de protección celular, los antioxidantes enzimáticos (la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa), los cuales reaccionan con los radicales $\cdot\text{O}_2$ y H_2O_2 transformándolos en H_2O ; de igual manera se tienen a los antioxidantes no enzimáticos que proceden de la dieta como son la vitamina E, la vitamina C y las catequinas, los cuales neutralizan la acción reactiva de los radicales libres (Bagchi *et al.*, 2000; Klaunig y Kamendulis, 2004; Valko *et al.*, 2004). Cuando el ADN es dañado y no es reparado

ocurre una mutación, la cual podría contribuir al proceso de carcinogénesis (Klaunig y Kamendulis, 2004).

Cuadro 4. Generación y eliminación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en la célula (Klaunig y Kamendulis, 2004)

Oxidantes Celulares	Origen	Especies Oxidativas
Endógenos	Mitocondria	$\cdot\text{O}_2$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$
	Citocromo P450	$\cdot\text{O}_2$, H_2O_2
	Macrófagos	$\cdot\text{O}_2$, H_2O_2 , $\cdot\text{NO}$, OCl^-
	Peroxisomas	H_2O_2
Exógenos	Compuestos cíclicos redox	$\cdot\text{O}_2$
	Metales (reacción de Fenton)	$\cdot\text{OH}$
	Radiación	$\cdot\text{OH}$
Antioxidantes Celulares.		
Enzimáticos		No enzimáticos
Superóxido dismutasa		Vitamina E
Catalasa		Glutation
Glutation peróxidasa		Vitamina C
Glutaredoxin		Catequinas
Thioredoxin		
Oxidante > Antioxidantes → Daño Oxidativo (DNA, RNA, lípidos, proteínas)		

3.1 Cromo

Se sabe que los metales pesados, como el cromo, cuando se van reduciendo generan radicales libres que pueden interaccionar con las moléculas del organismo y provocando un posible daño genotóxico. Particularmente, los compuestos de cromo (VI) son potencialmente tóxicos y carcinogénicos, porque atraviesan la membrana celular y se reducen hasta formar compuestos estables de Cr (III), en presencia de reductantes celulares, generando así radicales hidroxilo y peróxido que causan una amplia variedad de daños al ADN, principalmente aductos ADN-Cr, muerte celular apoptótica, y altera la expresión de genes (García-Rodríguez *et al.*, 2001; Bagchi *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006).

El cromo se encuentra de manera natural en el ambiente en dos estados de valencia, cromo trivalente Cr (III) y hexavalente Cr (VI). El Cr (III) es esencial en el

funcionamiento de la insulina y es requerido en el metabolismo normal de proteínas, grasas y carbohidratos, es fácil encontrarlo en forma de sales en suplementos dietéticos como micronutrimiento, sin embargo el consumo crónico de estas sales puede provocar nefrotóxicidad (Bagchi *et al.*, 2002).

3.2 Mecanismo de inducción de daño al ADN por parte del cromo

El Cr en su estado hexavalente tiene muy poca actividad biológica pero dentro de la célula puede llevar una rápida reducción metabólica por el ácido ascórbico y tioles de bajo peso molecular como el glutatión reducido y la cisteína, así como el ácido lipoíco, NAD(P)H, fructosa, ribosa, H₂O₂, entre otros, siendo el ácido ascórbico y los tioles los más importantes reductores del Cr (VI). En la Figura 4, se muestra la reducción del Cr (VI) bajo condiciones fisiológicas se puede dar de dos maneras principalmente: primero con una serie de reducciones de un electrón produciendo estados intermedios tales como Cr (V), Cr (IV) y finalmente Cr (III); segundo, cuando existe una concentración alta de reductantes celulares, el paso inicial envuelve la reducción de dos electrones seguida por la reducción de un electrón (O'Brien *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006).

La reducción del Cr (VI) produce radicales libres, principalmente el hidroxilo, radical altamente reactivo con el ADN, provocando aductos Cr-ADN, intercambios ADN-ADN, ADN-proteínas y daño oxidativo (Valko *et al.*, 2006).

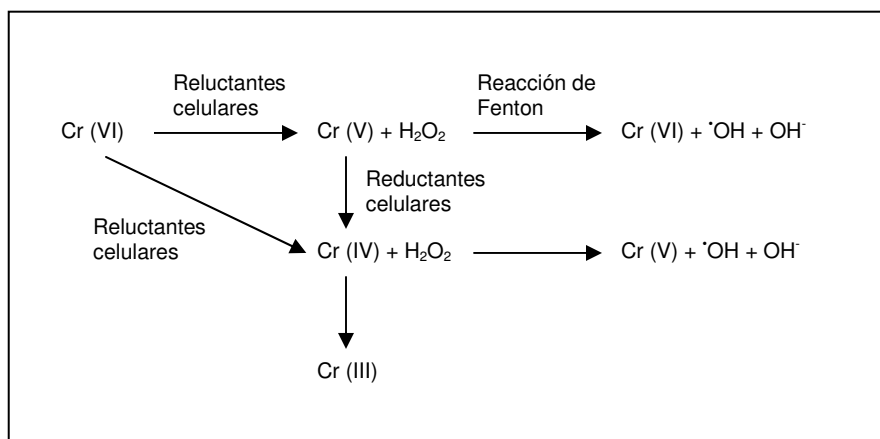


Figura 4. Reducción biológica del Cr (VI) (dentro de la célula)(Valko *et al.*, 2006)

3.3 Daño carcinógeno y genotóxico del cromo

Los efectos biológicos de exposición al Cr están asociados con la forma en la cual se encuentra el compuesto. Las formas metálicas trivalentes al parecer no inducen efectos tóxicos directos, debido a que estas formas no son capaces de atravesar la membrana celular *in vivo*. Sin embargo, se ha demostrado que los compuestos del Cr (VI) sí son capaces de atravesarla y producir daño al ADN. Diversos estudios han reportado el daño genotóxico de los compuestos del Cr (VI) mediante el incremento de la frecuencia de AC, de MN y de mutaciones puntuales. También se ha observado inducción de intercambio de cromátidas hermanas y de transformación celular, así como de alteraciones en el ciclo de duplicación del ADN. Cabe mencionar que algunas de estas pruebas fueron evaluadas durante el desarrollo embrionario y fetal, por lo que se planteó que el Cr (VI) tiene la habilidad de atravesar la placenta (García-Rodríguez *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2003; García-Rodríguez, 2006; Valko *et al.*, 2006; Wise *et al.*, 2006).

Particularmente se ha descrito que el trióxido de cromo (CrO₃) es uno de los compuestos de Cr (VI) con mayor peligrosidad, ya que es capaz de inducir rompimientos de cadena sencilla y doble del ADN además de que se ha confirmado su actividad como inductor de cáncer (Singh *et al.*, 1998; Danadevi *et al.*, 2004).

4. Ensayos para evaluar el daño al ADN

Existen varias pruebas para evaluar daño genotóxico como son: a) ensayos para evaluar mutaciones (bacterias; prueba de AMES), b) ensayos *in vitro*, para evaluar daño cromosómico (células de mamífero; frecuencia de AC) y c) ensayos *in vivo* (médula ósea o sangre; frecuencia de MN) (García-Rodríguez, 2006).

4.1 Micronúcleos

El ensayo de MN tanto *in vivo* como *in vitro* es ampliamente usado para evaluar compuestos químicos que producen daño clastogénico y aneugénico. Es una prueba sencilla y rápida de realizar y no requiere de mucha experiencia por parte del evaluador para realizarla como sucede en otras pruebas, como en el intercambio de cromátidas hermanas (ICH's), además de que ésta prueba está bien aceptada por parte de la FDA, EPA e IARC, para la evaluación de daño genotóxico (Kim *et al.*, 2000).

Los MN son cuerpos que están en el citoplasma y que contienen ya sea un cromosoma o parte de un cromosoma que durante la división celular no se une al núcleo de la célula hija. Estos MN se tiñen de forma diferente a la célula. El estudio se puede realizar en cualquier tejido que esté en proliferación, puede ser en médula ósea o en eritrocitos de sangre (Schmid y Ledebur, 1973; Hayashi *et al.*, 1990; FDA, 2000).

Los eritrocitos de sangre se presentan como: eritrocitos jóvenes que conservan un poco de ARN ribosomal, a ellos se les llama eritrocitos policromáticos (EPC), estos se tiñen de forma diferente a los maduros o normocromáticos (ENC), los cuales no tienen ribosomas. El nivel de la producción de las células micronucleadas depende de la persistencia o toxicidad del agente y/o de la lesión que sufre el ADN. En la mayoría de los casos la frecuencia máxima de los EPC-MN ocurre entre las 24 y 60 horas después del tratamiento (Schmid y Ledebur, 1973; Mavournin *et al.*, 1990).

En éste estudio se utilizó el ensayo de MN en eritrocitos de sangre con tinción de naranja de acridina, ya que ésta prueba permite estudiar el comportamiento del fármaco empleado sin necesidad de sacrificar al animal, además de ser una prueba sencilla y económica, tiene la ventaja de que las características de los MN están bien definidas reduciendo así el tiempo de observación, además de que se puede contabilizar una mayor cantidad de células en el mismo intervalo de tiempo, lo cual aumenta la confiabilidad del análisis estadístico de la prueba.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el vino tinto se han encontrado diversos compuestos que presentan una alta capacidad antioxidante como los flavonoides, estos le confieren ciertas propiedades benéficas como lo es la protección de enfermedades crónicas originadas por estrés oxidativo, entre las que se puede incluir las relacionadas con daño al ADN. Particularmente la quercetina ha mostrado en algunos estudios que es capaz de proteger del daño genotóxico originado por agentes como los benzo(a)pirenos y las aminas heterocíclicas. Así entonces, resulta interesante observar si el consumo de vino tinto puede proteger de daño al ADN inducido por agentes a los que estamos expuestos y que generan radicales libres como son los metales pesados, particularmente algunos compuestos del Cr.

III. HIPÓTESIS

Se ha encontrado que el vino tinto contiene una alta concentración de flavonoides los cuales tienen propiedades antioxidantes y que algunos como la quercetina han demostrado proteger del daño genotóxico originado por radicales libres entonces si se administrara vino tinto en un tratamiento agudo y la quercetina a ratones tratados con CrO_3 , el cual es un agente inductor de radicales libres, se esperaría que se disminuya la inducción de MN.

IV. OBJETIVOS

1. General

Estudiar los efectos del vino tinto y de la quercetina sobre el daño genotóxico inducido por el CrO_3 mediante la evaluación de MN en sangre de ratón.

2. Particulares

- Obtener la dosis máxima del vino tinto con y sin alcohol que no induzca daño genotóxico en el ratón mediante la cinética de inducción de MN, administrando diferentes dosis de vino.
- Evaluar el efecto del vino tinto con y sin alcohol sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO_3 por medio de la evaluación de MN y la frecuencia de EPC en sangre de ratón.
- Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de la quercetina mediante la evaluación de MN y la frecuencia de EPC en sangre de ratón.
- Evaluar el efecto de la quercetina sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO_3 mediante la evaluación de MN y la frecuencia de EPC en sangre de ratón.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Reactivos

Se utilizó: el colorante naranja de acridina, CAS No. 10127-02-3; quercetina dihidratada, CAS No. 117-39-5 y trióxido de cromo (CrO_3), CAS No. 1333-82-0, de la marca Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). También se utilizaron los vinos tintos: XA Premium Cabernet Sauvignon, cosecha 2003 de la marca Pedro Domecq, que contiene el 12.6% de etanol; y Free Premium, cosecha 2003, de la marca Sutter Home Winery, el cual contiene menos del 0.5% de etanol.

2. Animales

Se emplearon ratones machos jóvenes (CD-1), de dos a tres meses de edad, y de un peso de 35 a 40g que se obtuvieron del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Estos se mantuvieron en cajas de plástico y con alimentación de nutricubos Harlan para roedores, en condiciones estériles a una temperatura y humedad relativa controlada, con un fotoperíodo controlado (12horas luz-12 horas oscuridad).

3. Preparación de láminas

En una mezcla de etanol-cloroformo [9:1], se colocaron los portaobjetos por 24 horas y se secaron con un paño limpio. Se preparó una solución de naranja de acridina 1mg/ml, de la cual se colocaron 10 μ l en un portaobjetos precalentado (70°C), se distribuyó uniformemente el colorante en la laminilla y se dejó secar a temperatura ambiente y se almacenaron en una caja hasta su uso.

4. Tratamientos

Grupos de 5 ratones cada uno fueron divididos en: a) grupo testigo, a los que se les administró agua *ad libitum*, b) grupos tratados con vino tinto (12.6% y <0.5% de etanol), tratados por vía oral *ad libitum*, también se realizó un tratamiento subcrónico utilizando el mismo grupo de vino con 12.6% de etanol, en el cual se administró sólo vino por dos semanas más dejando entre ellas un período de descanso de tres días en donde se les permitió el consumo de agua *ad libitum*, c) grupo tratado con quercetina, a estos se les aplicaron tratamientos de 625 mg/kg de peso corporal por vía i.p y d) grupo CrO₃, a este último se le aplicó por vía i.p. 20 mg/kg de peso corporal, e) grupo vino tinto tratado por vía oral *ad libitum* más la aplicación de CrO₃ (20 mg/kg de peso corporal por vía i.p.), f) grupo tratado con quercetina (625 mg/kg de peso corporal por vía i.p) más CrO₃ (20 mg/kg de peso corporal por vía i.p.) (Figura 5). Todos los ratones se mantuvieron separados individualmente y se registró la cantidad consumida tanto de agua como de vino por cada organismo y se obtuvo el promedio diario.

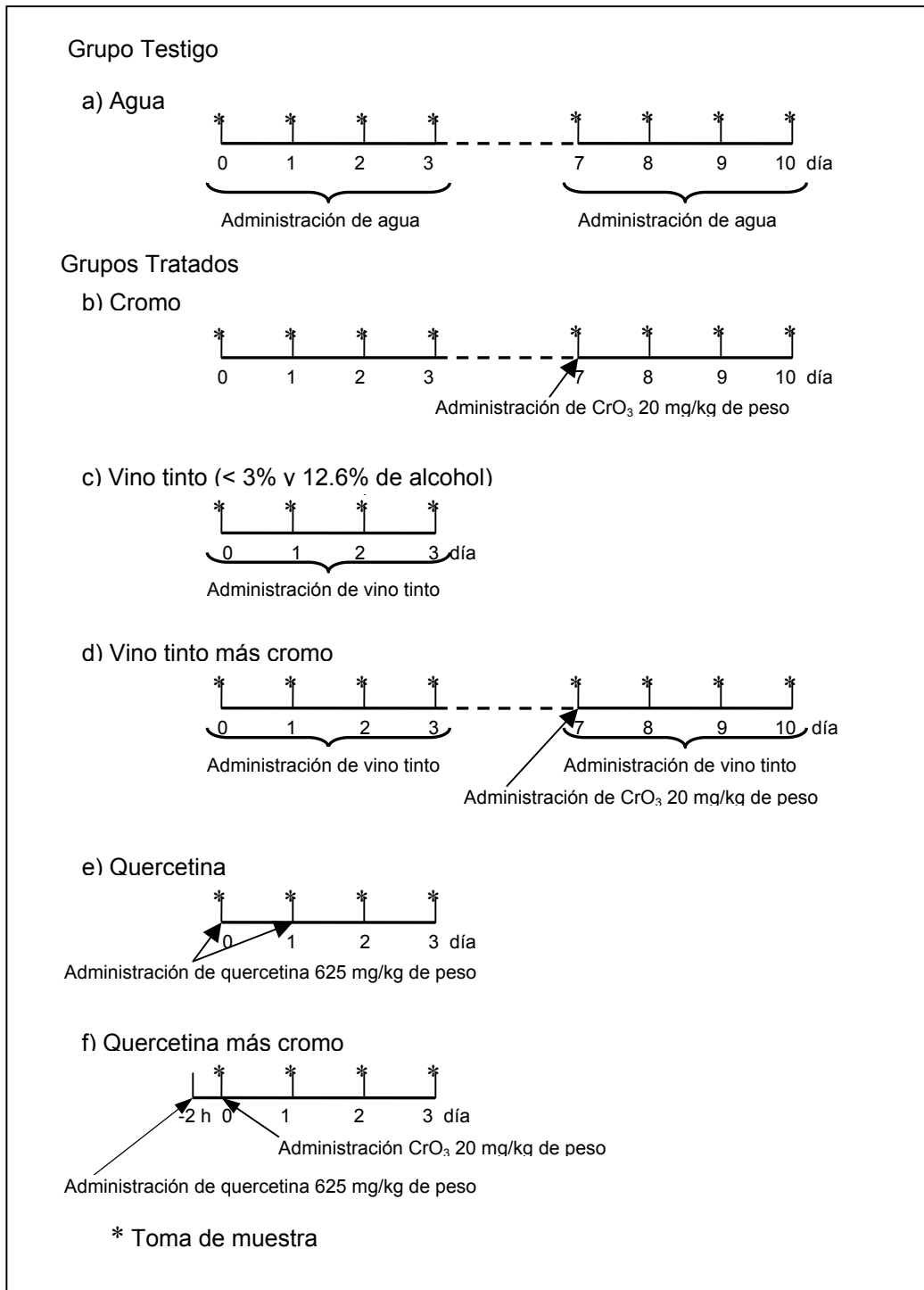


Figura 5. Protocolos utilizados para observar los efectos del vino tinto y quercetina sobre la inducción de daño al ADN del CrO_3

5. Análisis de micronúcleos

A los portaobjetos preparados con el colorante se les agregó una gota de sangre en el centro, está se cubrió con un cubreobjetos y se guardaron en refrigeración por 24 horas, posteriormente se observaron en microscopio de fluorescencia.

Se cuantificaron los eritrocitos policromáticos con formación de MN (MN-EPC) que hay en 2000 eritrocitos policromáticos (EPC) por ratón, así como la frecuencia de eritrocitos policromáticos que se encuentren en 2000 eritrocitos totales (EPC + ENC) (Figura 6).

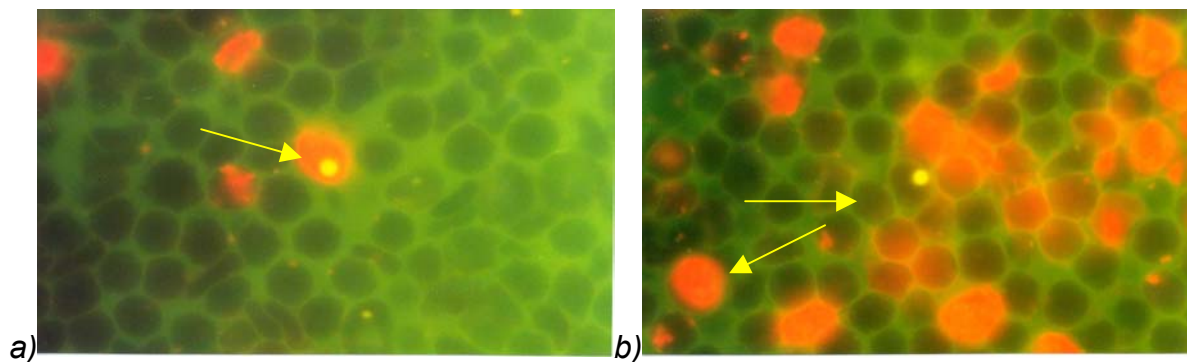


Figura 6. Microfotografía de eritrocitos de sangre teñidos con Naranja de Acridina: a) micronúcleo en eritrocito policromático; b) eritrocito normocromático (negro) y eritrocito policromático (naranja)

Para evaluar el daño genotóxico se tomó en cuenta la frecuencia de MN-EPC en 1000 EPC; para conocer el daño citotóxico se consideró la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) que hay en 1000 eritrocitos (tanto policromáticos como normocromáticos).

A la inducción de MN se les determinó la Frecuencia de Inducción Neta de Micronúcleos (NIF por sus siglas en inglés), ésta nos sirve para descartar la inducción espontánea que haya tenido el grupo a la hora 0 ya que no se la ha aplicado ningún

tratamiento (García-Rodríguez *et al.*, 2001; García-Rodríguez, 2006), y se determina de la siguiente manera:

$$\text{NIF} = x_i - x_0$$

donde:

x_i = valor de la media a la hora i

x_0 = valor de la media a la hora 0

También se determinó la Frecuencia Diferencial de Inducción de Micronúcleos (DIF por sus siglas en inglés), la cuál descarta la posibilidad de que el efecto observado sea producto de la manipulación ya que en ella se descuenta la inducción que hay en el grupo testigo (García-Rodríguez, 2006), se realiza como sigue:

$$\text{DIF} = X_v - X_t$$

donde:

X_v = valor de la media de cada hora del grupo tratado

X_t = valor de la media de cada hora del grupo testigo (respectivamente)

6. Análisis estadístico

En todos los protocolos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey, para los datos obtenidos utilizando el paquete estadístico de computadora SPSS/PC V11™, y utilizando la prueba Ji cuadrada (χ^2) con corrección de Yates para las frecuencias en el paquete estadístico para computadora STATISTICA 6.0™. A todos los datos se les consideró un nivel de significancia $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS

El consumo promedio diario tanto de vino tinto como de agua de los diferentes ensayos se muestra en el cuadro 5, en donde se observa que en el tratamiento agudo el grupo tratado con vino tinto (12.6% de alcohol) consumió menos que el grupo al cual se le dio agua, esto fue similar en el tratamiento subcrónico, sin embargo en el ensayo con vino tinto con menos del 0.5% de alcohol el grupo tratado consumió mayor cantidad que el grupo testigo.

Cuadro 5. Consumo promedio diario de los ensayos con vino tinto (ml)

Tratamiento	Testigo	Tratado (vino 12.6% de etanol)	Testigo	Tratado (vino diluido al 75%)	Testigo	Tratado (vino con <0.5% etanol)
agudo dosis única	6.36	5.29	7.90	5.07	11.67	12.67
subcrónico						
1a dosis	6.36	5.29	–	–	–	–
2a dosis	8.53	4.70	–	–	–	–
3a dosis	7.58	4.53	–	–	–	–
– No determinado						

1. Efecto del vino tinto sobre el daño genotóxico

En el cuadro 6, se muestran los promedios de la frecuencia de MN cuando se administró de manera aguda el vino tinto (12.6% de alcohol), se puede observar que aumentó el número de MN en las muestras tomadas un día después de iniciado el tratamiento, el cual resultó estadísticamente significativo, en las muestras tomadas en los siguientes días el incremento no resultó estadísticamente significativo.

Cuadro 6. Frecuencia de MN en 1000 EPC del tratamiento con vino tinto con 12.6% de alcohol (media \pm desviación estándar)

Día	Testigo	Tratado
0	0.90 \pm 0.65	1.20 \pm 0.57
1	1.00 \pm 0.41	2.40 \pm 0.65 *
2	0.63 \pm 0.25	1.60 \pm 0.74
3	0.75 \pm 0.29	1.70 \pm 0.84

*: $p < 0.05$

A los datos obtenidos del tratamiento agudo se les calculó el NIF (Figura 7) (García-Rodríguez, 2006), en donde se ratificó el comportamiento observado en el cuadro anterior ya que el incremento de la inducción de MN se presentó en el primer día. También a estos datos se les calculó el DIF (García-Rodríguez, 2006), corroborándose también dicho comportamiento (Figura 8).

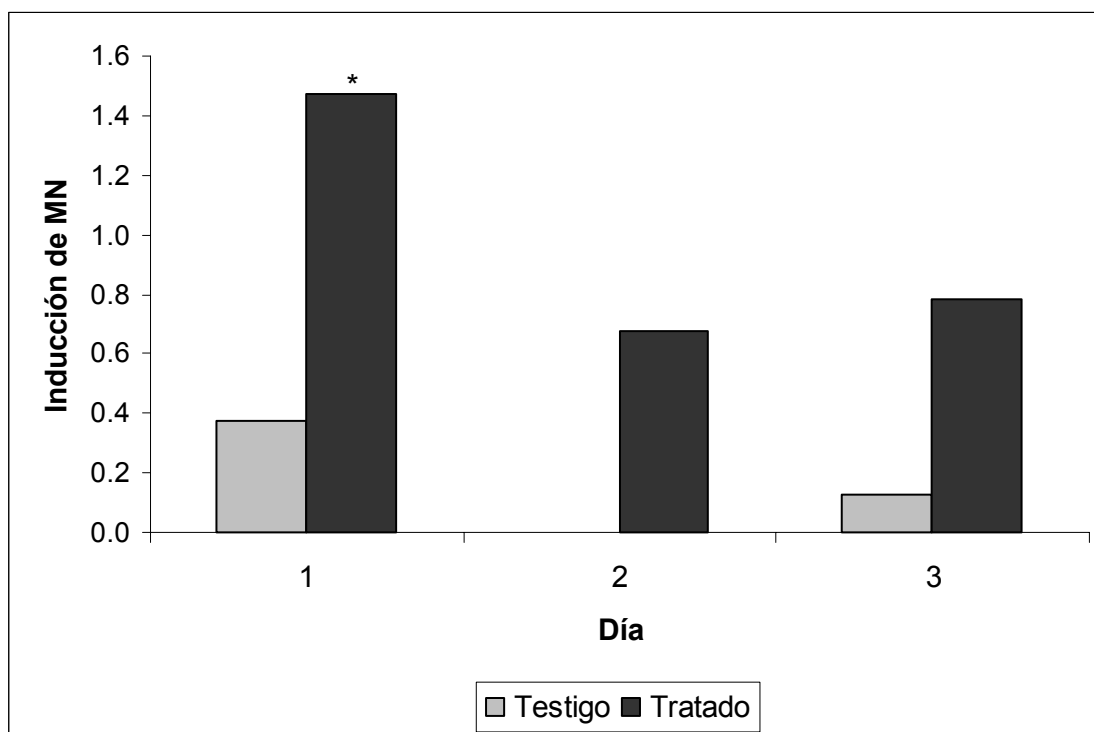


Figura 7. NIF del tratamiento con vino tinto con 12.6% de alcohol con respecto a su grupo testigo (* $p < 0.05$)

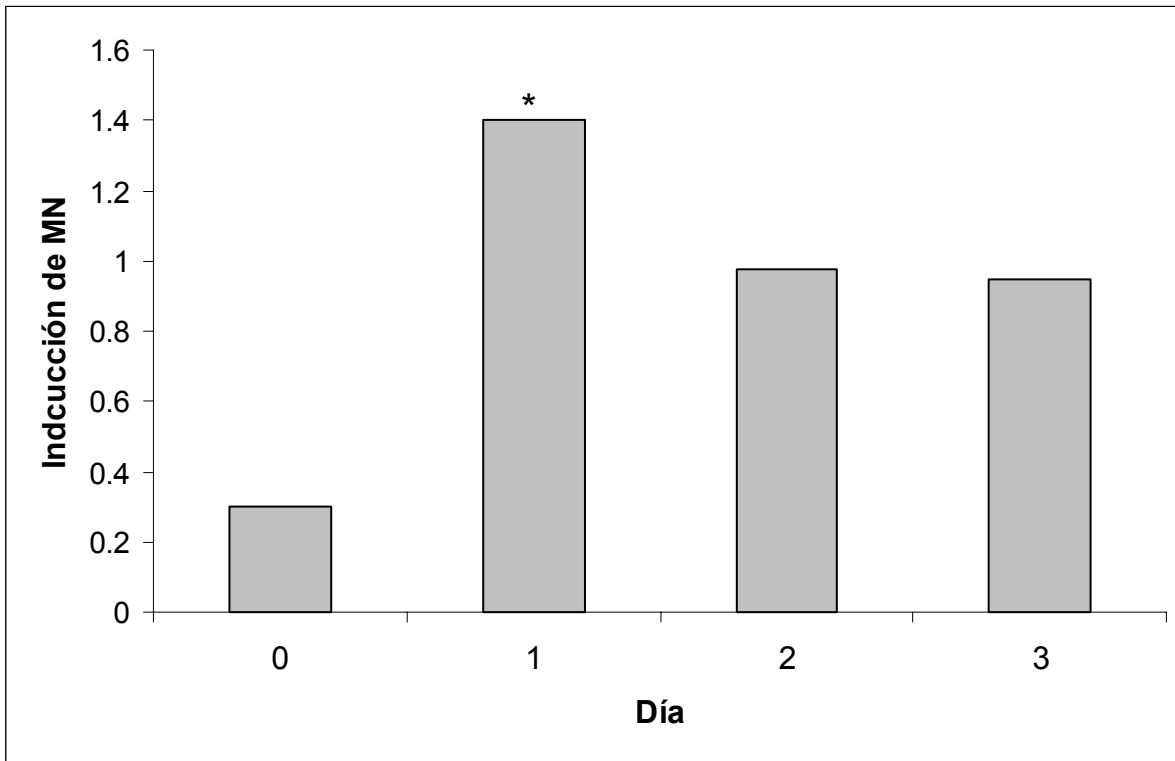


Figura 8. DIF del tratamiento con vino tinto con 12.6% de alcohol sobre su grupo testigo (* $p < 0.05$)

A los grupos anteriores se les utilizó para evaluar el tratamiento subcrónico de vino tinto, sus promedios de las frecuencias de MN se muestran en el cuadro 7, en donde si bien se observa un aumento en el número de MN que sólo es estadísticamente significativo en el primer día, en las muestras de los siguientes días éste aumento no es estadísticamente significativo. Cuando se obtuvo el NIF y DIF (Figuras 9 y 10) de éste tratamiento se ratificó lo observado anteriormente.

Cuadro 7. Frecuencia de MN en 1000 EPC del tratamiento subcrónico con vino tinto (12.6% de alcohol), (media \pm desviación estándar)

	Día	Testigo	Tratado
1er dosis	0	0.90 \pm 0.65	1.20 \pm 0.57
	1	1.00 \pm 0.41	2.40 \pm 0.65*
	2	0.63 \pm 0.25	1.60 \pm 0.74
	3	0.75 \pm 0.29	1.70 \pm 0.84
	7	0.80 \pm 0.27	1.10 \pm 0.65
2a dosis	8	0.80 \pm 0.27	1.00 \pm 0.50
	9	0.60 \pm 0.42	0.90 \pm 0.55
	10	0.80 \pm 0.45	1.00 \pm 0.35
	14	0.90 \pm 0.55	0.80 \pm 6.95
3er dosis	15	0.70 \pm 0.45	0.90 \pm 4.95
	16	0.90 \pm 0.22	0.80 \pm 2.22
	17	0.80 \pm 0.45	1.00 \pm 4.78

*: $p < 0.05$

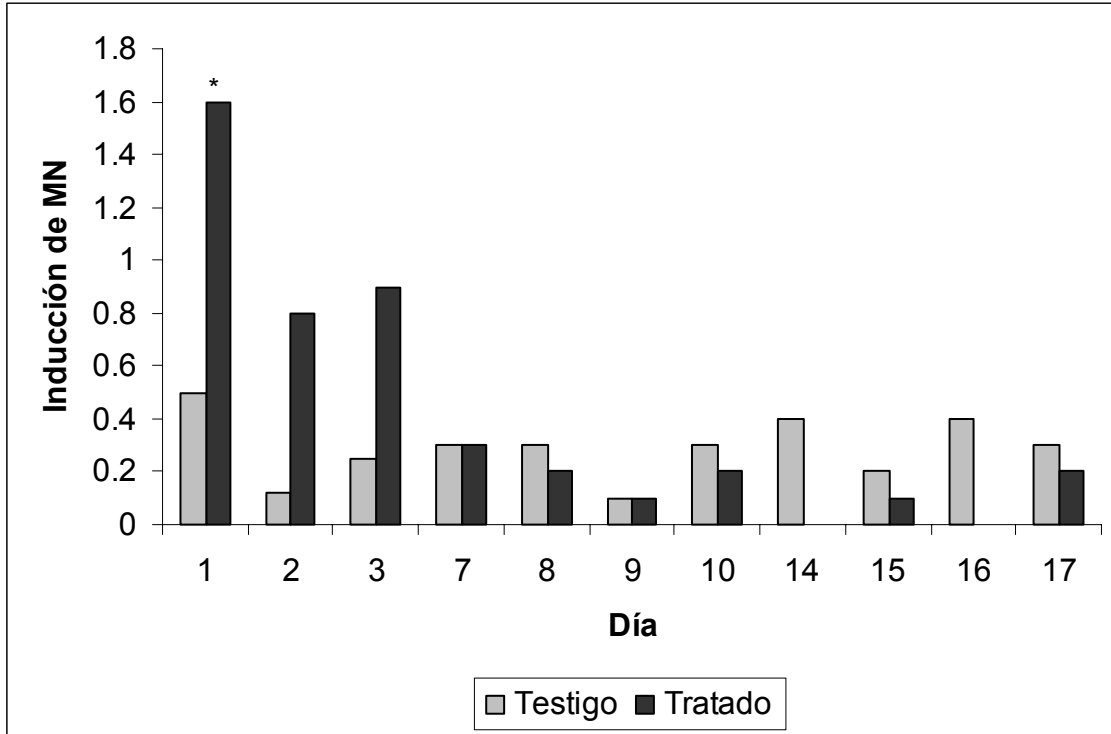


Figura 9. NIF del tratamiento subcrónico con vino tinto con 12.6% de alcohol con respecto al grupo testigo (* $p < 0.05$)

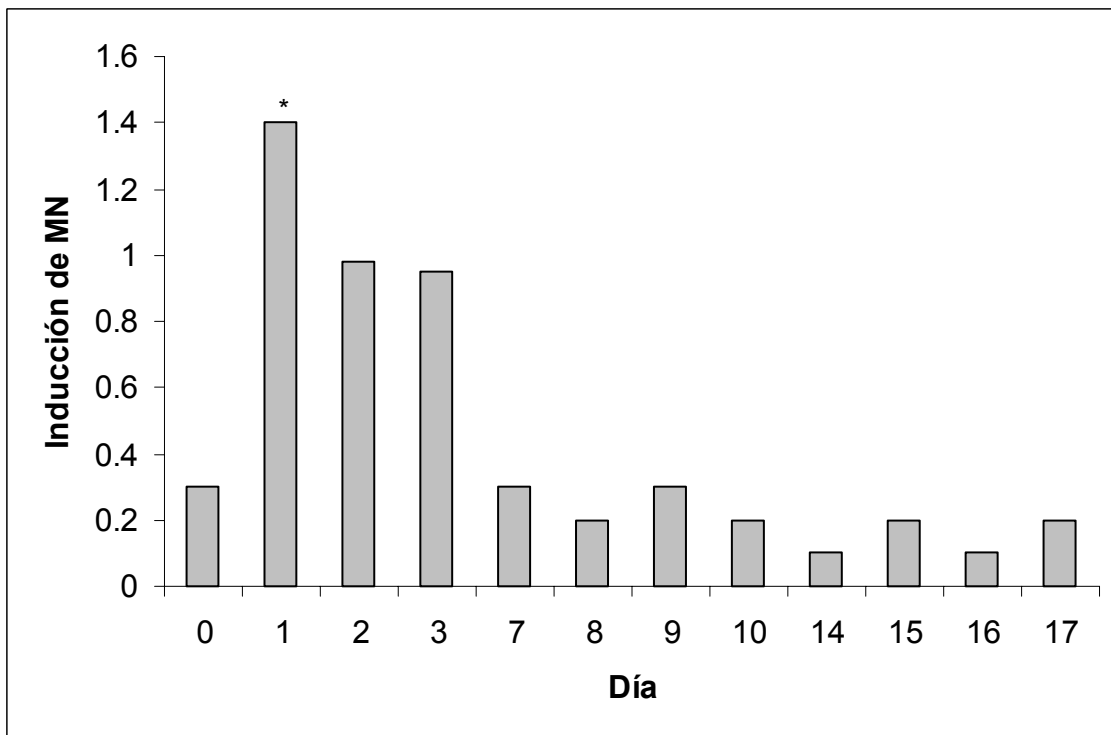


Figura 10. DIF del tratamiento subcrónico con vino tinto con 12.6% de alcohol sobre su grupo testigo (* $p < 0.05$)

Al observar el aumento en el número de MN en las muestras del primer día del tratamiento anterior, se procedió a diluir el vino tinto a una concentración 3:1 con agua potable. En el cuadro 8 se muestran los promedios de las frecuencias de MN del tratamiento agudo usando éste vino, en donde se puede observar que no existe algún incremento en la frecuencia de MN estadísticamente significativo.

Cuadro 8. Frecuencia de MN en 1000 EPC del tratamiento con vino tinto diluido a un 75% (media \pm desviación estándar)

Día	Testigo	Tratado
0	0.7 \pm 0.57	0.9 \pm 0.74
1	0.7 \pm 0.45	0.8 \pm 0.27
2	0.4 \pm 0.42	0.9 \pm 0.42
3	0.8 \pm 0.27	0.8 \pm 0.57

En las Figuras 11 y 12 se muestran el NIF y DIF de éste tratamiento en donde se observa que la inducción de MN no presenta algún incremento que resulte ser estadísticamente significativo.

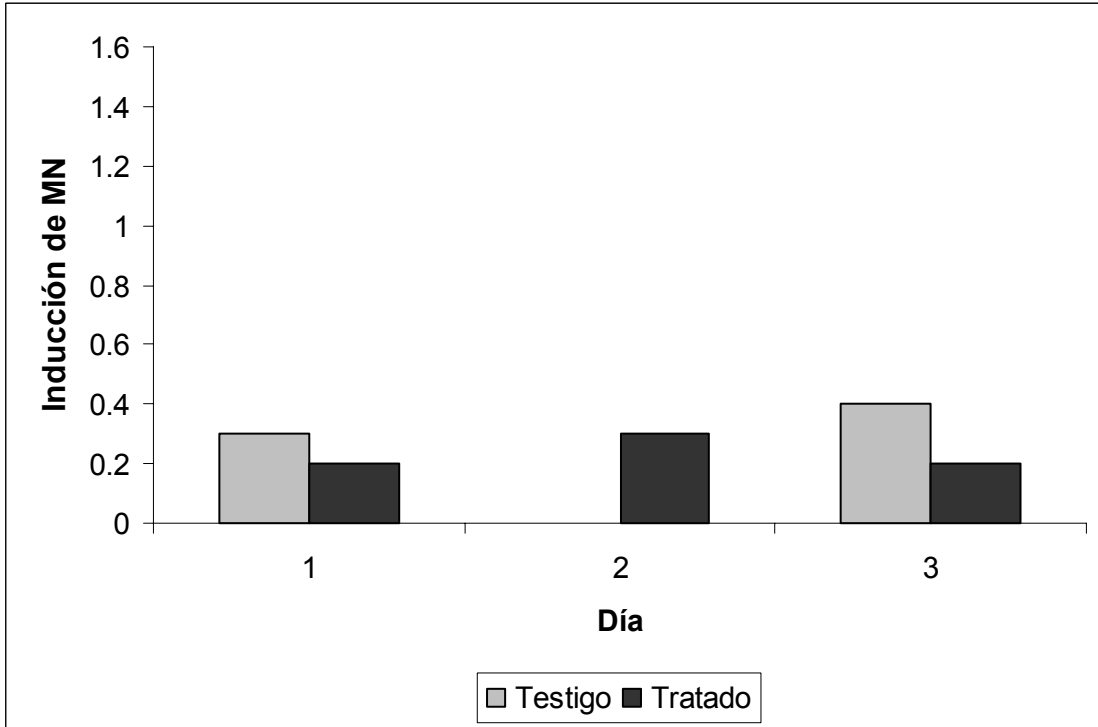


Figura 11. NIF del tratamiento con vino tinto con 12.6% de alcohol (diluido al 75%) y su grupo testigo

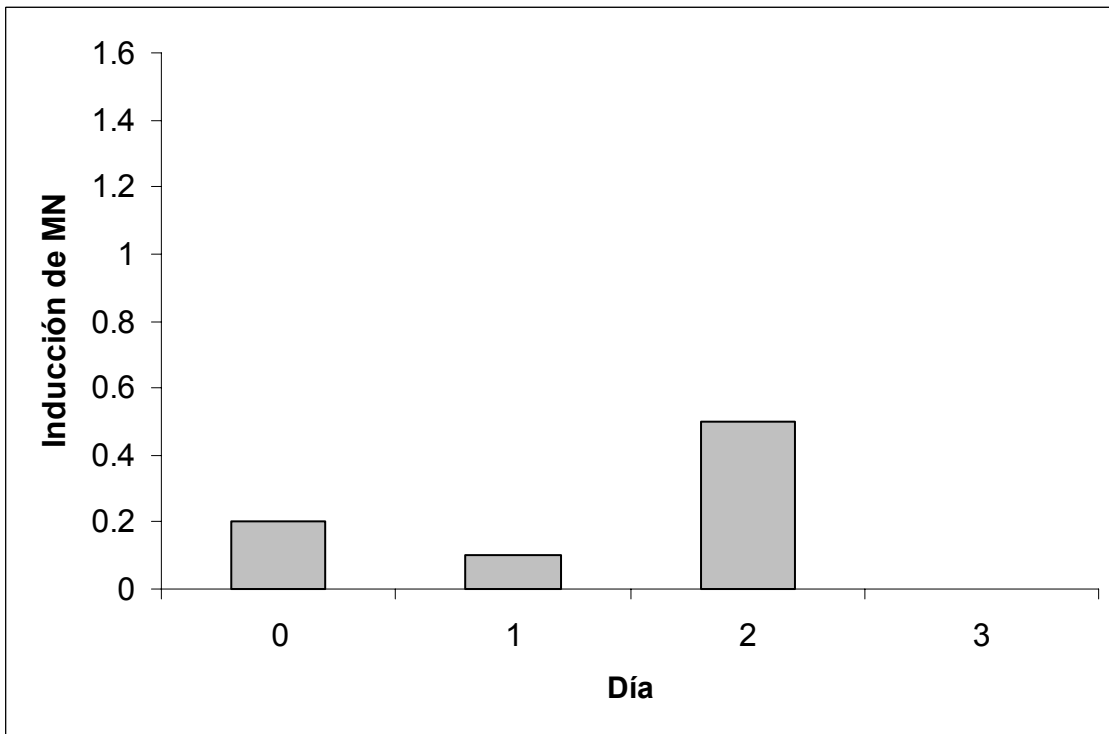


Figura 12. DIF del tratamiento con vino tinto con 12.6% de alcohol (diluido al 75%) sobre su grupo testigo

También se administró de manera aguda el vino tinto que contiene menos del 0.5% de alcohol y en el cuadro 9 se muestran los promedios de la frecuencia de MN, en donde no se observó algún aumento en el número de MN que fuera estadísticamente significativo.

Cuadro 9. Frecuencia de MN en 1000 EPC del tratamiento de vino tinto con <0.5% de alcohol (media \pm desviación estándar)

Día	Testigo	Tratado
0	0.6 \pm 0.42	0.6 \pm 0.22
1	1.1 \pm 0.42	1.1 \pm 0.55
2	1.0 \pm 0.35	1.1 \pm 0.42
3	0.9 \pm 0.42	0.9 \pm 0.22

Al igual que los tratamientos anteriores a los datos obtenidos se les calculó el NIF y DIF (Figuras 13 y 14), en donde se puede observar que no existe algún incremento en la inducción de MN que resulte ser estadísticamente significativo.

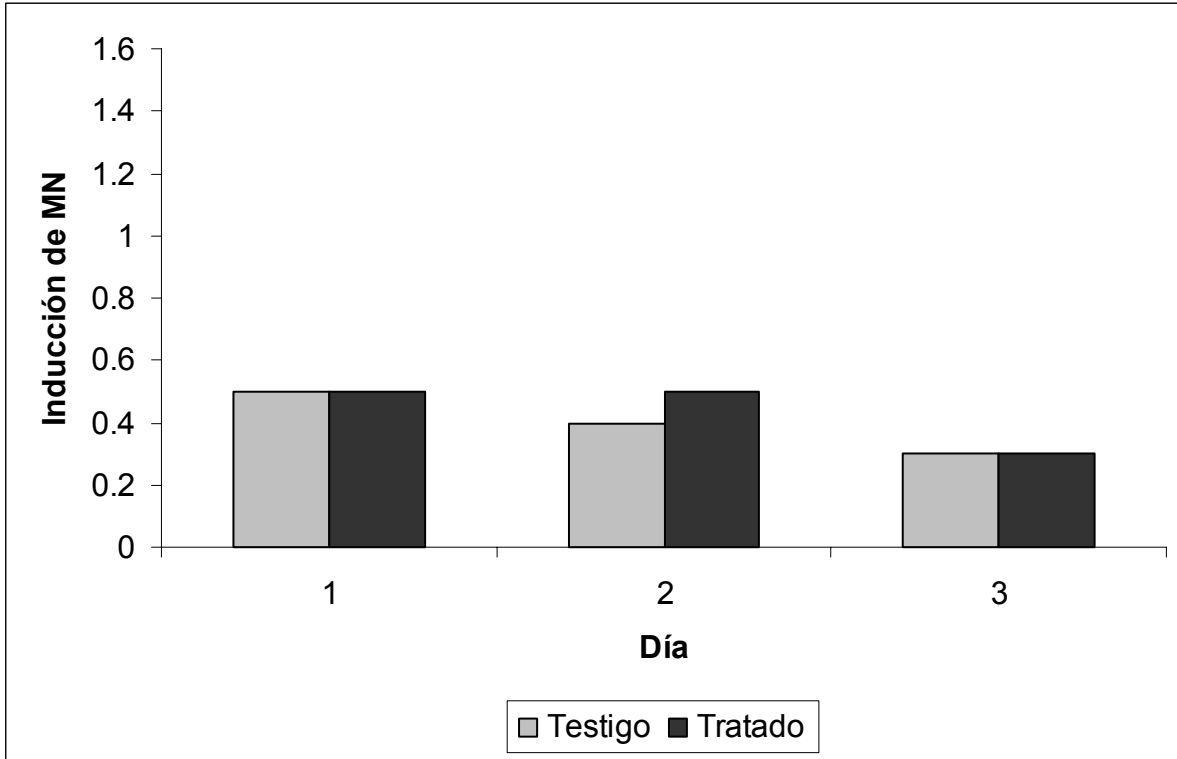


Figura 13. NIF del tratamiento con vino tinto con <0.5% de alcohol y su grupo testigo

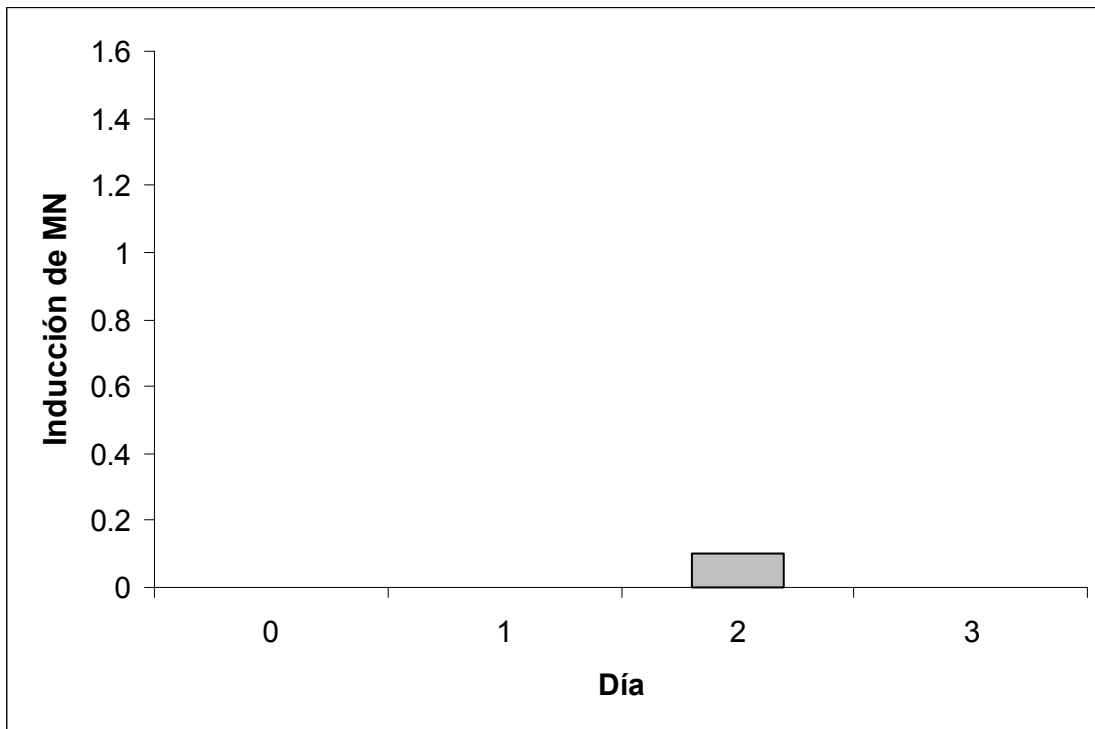


Figura 14. DIF del tratamiento con vino tinto con <0.5% de alcohol

2. Efecto de la quercetina sobre el daño genotóxico

Cuando se administró la quercetina se observó un aumento en el número de MN en las muestras del grupo tratado el cual no resultó estadísticamente significativo, como se muestra en el cuadro 10.

Cuadro 10. Frecuencia de MN en 1000 eritrocitos del tratamiento con quercetina (media \pm desviación estándar)

Día	Testigo	Tratado
0	1.0 \pm 0.61	0.5 \pm 0.61
1	1.0 \pm 0.94	1.3 \pm 0.97
2	1.0 \pm 0.35	1.7 \pm 0.57
3	1.3 \pm 0.27	1.7 \pm 0.67

Sin embargo, cuando se realizó el NIF (Figura 15) a éste ensayo, se observó un aumento en la inducción de MN en las muestras del segundo y tercer día el cual es estadísticamente significativo. No obstante, al momento de realizar el DIF (Figura 16), si bien se observa un incremento en la inducción de MN éste no resultó estadísticamente significativo.

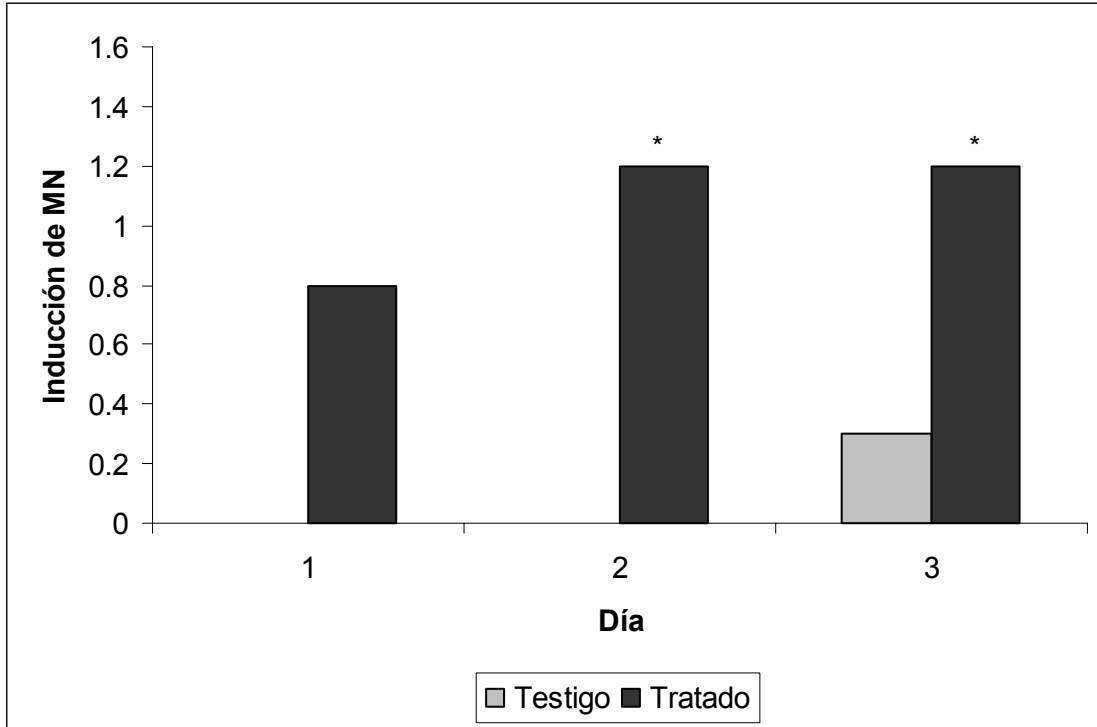


Figura 15. NIF del tratamiento con quercetina con respecto a su grupo testigo (* $p < 0.05$)

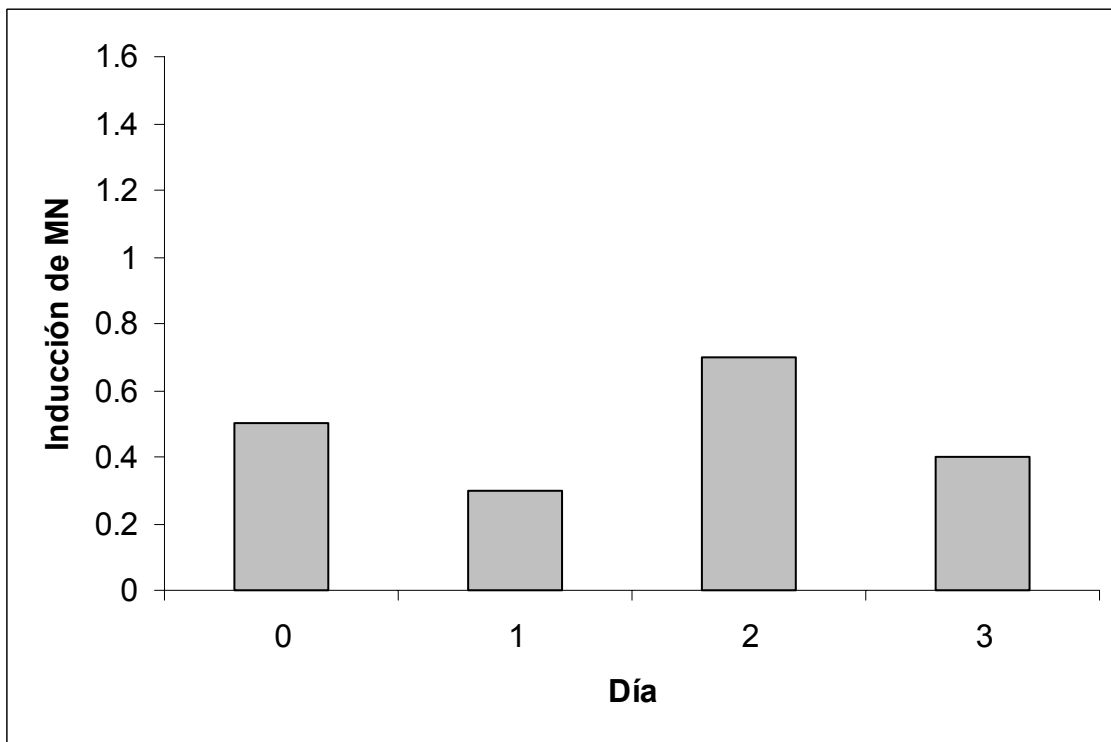


Figura 16. DIF del tratamiento con quercetina sobre su grupo testigo

Con los resultados anteriores se realizó una comparación de los promedios de la inducción de MN, el cual se muestra en la Figura 17, y como se observó anteriormente el vino tinto (12.6% de alcohol) administrado de manera aguda es el que presenta un mayor aumento en la inducción de MN.

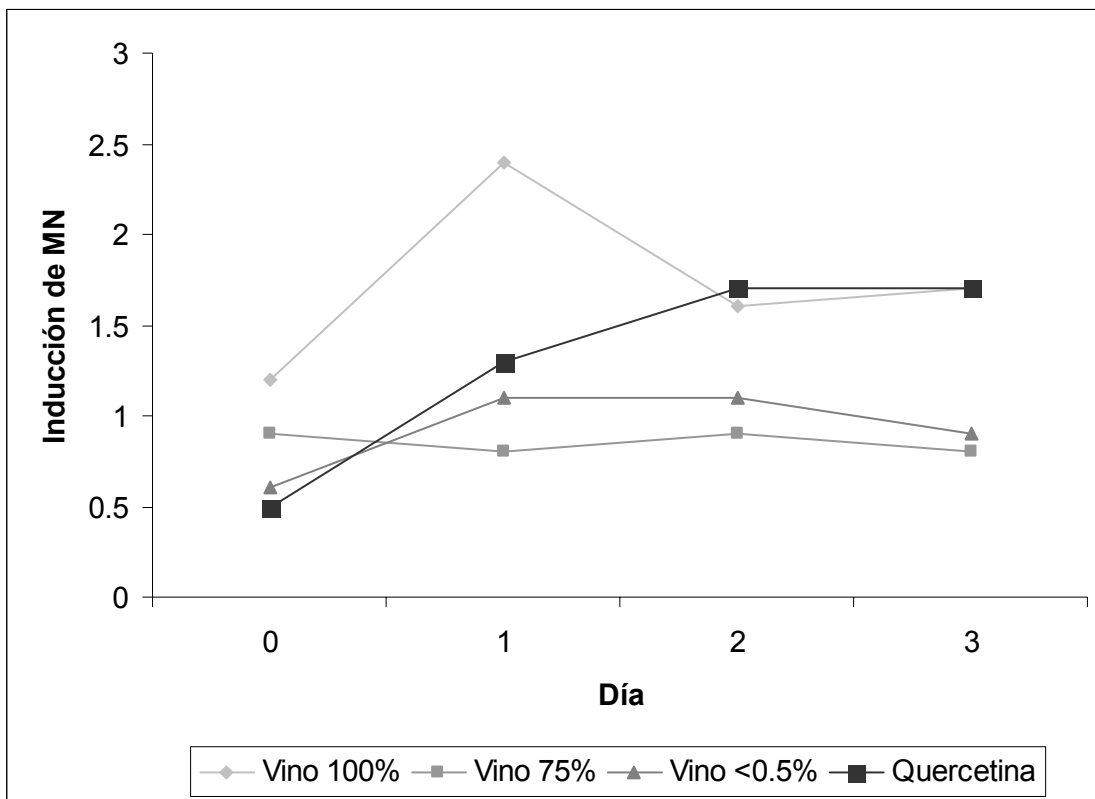


Figura 17. Comparación de los promedios de Inducción de MN de los tratamientos con vino tinto y quercetina

3. Efecto del vino tinto y la quercetina sobre el daño genotóxico inducido por el CrO_3

En la evaluación del efecto del vino tinto sobre el daño genotóxico inducido por el CrO_3 se utilizó el vino diluido 3:1. En el cuadro 11 se muestran los promedios de las frecuencias de MN de éste tratamiento, en donde se puede observar que en las

muestras del grupo tratado con Cr, el cual se administró en el séptimo día, existe un aumento en el número de MN que resulta estadísticamente significativo en el noveno y décimo día. También se puede observar que en el grupo tratado con vino y después con Cr existe un incremento en el número de MN que en las muestras del noveno día es estadísticamente significativo. Cuando se realizó el NIF (Figura 18) a los datos de éste ensayo, se ratificó el comportamiento observado en el cuadro 11, ya que el incremento de la inducción de MN se presentó en el noveno y décimo día del grupo tratado con Cr y en el noveno día del grupo vino-Cr.

Cuadro 11. Frecuencia de MN del tratamiento de vino tinto diluido al 75% sobre el daño genotóxico del cromo (media \pm desviación estándar)

Día	Testigo	Cromo	Vino tinto	Vino-cromo
0	0.67 \pm 0.41	0.92 \pm 0.58	0.86 \pm 0.38	0.71 \pm 0.49
1	1.00 \pm 0.32	0.92 \pm 0.49	1.14 \pm 0.48	1.07 \pm 0.45
2	1.08 \pm 0.49	1.08 \pm 0.38	1.07 \pm 0.45	1.14 \pm 0.24
3	1.08 \pm 0.58	1.17 \pm 0.41	1.21 \pm 0.39	1.07 \pm 0.53
7	1.17 \pm 0.26	→1.08 \pm 0.58	0.93 \pm 0.45	→1.00 \pm 0.50
8	1.08 \pm 0.49	1.50 \pm 0.77	1.21 \pm 0.49	1.50 \pm 0.29
9	1.25 \pm 0.27	4.25 \pm 1.44*	1.07 \pm 0.67	2.64 \pm 0.80*
10	1.50 \pm 0.45	3.25 \pm 0.61*	1.50 \pm 0.41	1.86 \pm 0.56

*: $p < 0.05$ →: administración de CrO₃

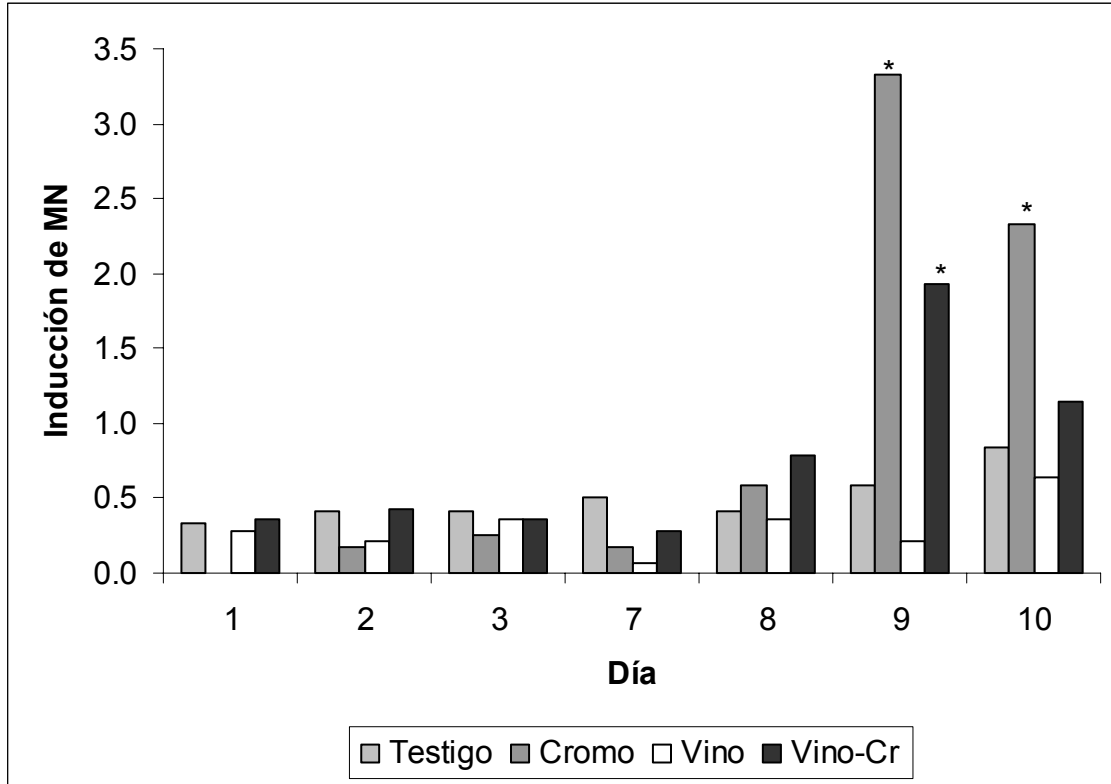


Figura 18. NIF del protocolo de vino tinto con 12.6% de alcohol (a una concentración del 75%) y cromo (* $p < 0.05$)

En el cuadro 12 se muestran los promedios de las frecuencias de MN del efecto del vino tinto con menos del 0.5% de alcohol sobre el daño genotóxico inducido por el CrO_3 , si bien se observa que la administración de vino tinto no induce un aumento en el número de MN que resulte estadísticamente significativo, no obstante cuando se le administró la dosis de Cr en el séptimo día a un grupo tratado con vino se observó un incremento en el número de MN que resulta estadísticamente significativo en las muestras del noveno y décimo día.

Cuadro 12. Frecuencia de MN del efecto de vino tinto (<0.5% de alcohol) sobre el daño genotóxico del cromo (media \pm desviación estándar)

Día	Testigo	Cromo	Vino	Vino-cromo
0	1.00 \pm 0.35	0.92 \pm 0.58	0.60 \pm 0.22	1.10 \pm 0.42
1	0.90 \pm 0.42	0.92 \pm 0.49	1.10 \pm 0.55	1.00 \pm 0.35
2	0.90 \pm 0.22	1.08 \pm 0.38	1.10 \pm 0.42	1.00 \pm 0.61
3	1.30 \pm 0.57	1.17 \pm 0.41	0.90 \pm 0.22	1.30 \pm 1.04
7	1.00 \pm 0.00	→1.08 \pm 0.58	0.70 \pm 0.27	→1.20 \pm 0.27
8	1.20 \pm 0.57	1.50 \pm 0.77	1.10 \pm 0.74	1.80 \pm 0.91
9	1.10 \pm 0.22	4.25 \pm 1.44*	1.10 \pm 0.22	3.00 \pm 1.41*
10	1.00 \pm 0.00	3.25 \pm 0.61*	1.10 \pm 0.55	2.10 \pm 0.42*

*: $p < 0.05$ →: administración de CrO_3

En la Figura 19 se muestra el NIF de éste ensayo, en donde se corrobora las observaciones hechas sobre el cuadro anterior, debido a que el incremento de la inducción de MN se presentó en el noveno y décimo día de los grupos tratados con cromo y con vino y cromo.

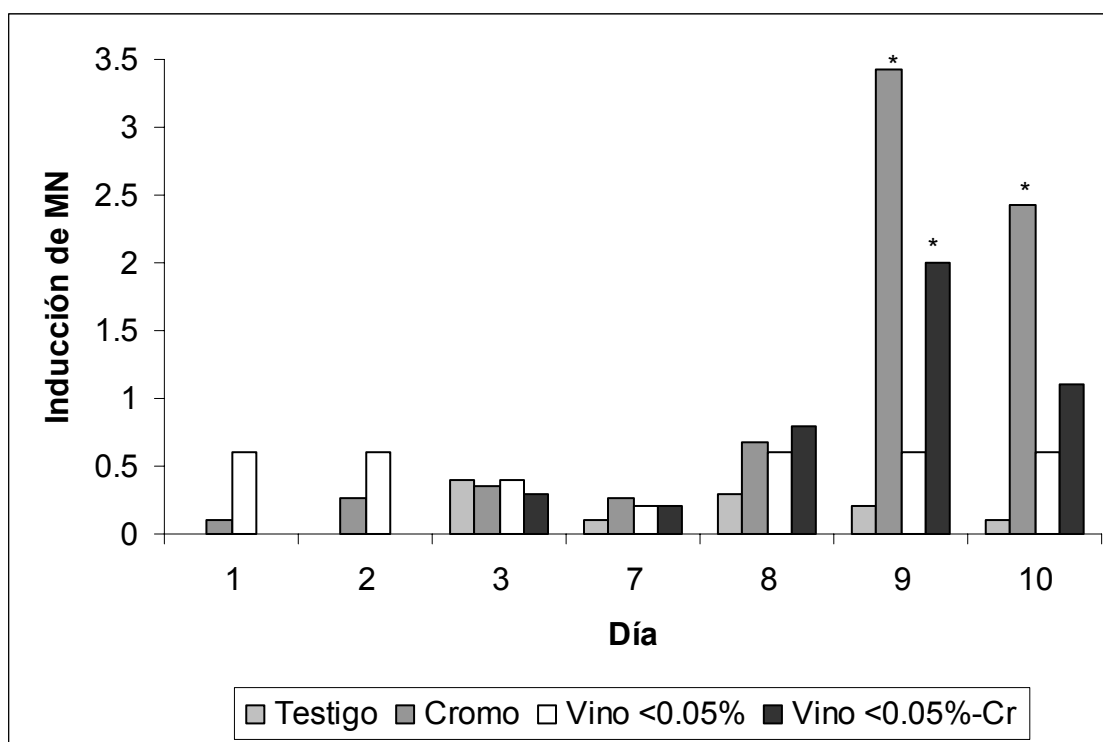


Figura 19. NIF del tratamiento con vino tinto con menos del 0.5% de alcohol y cromo (* $p < 0.05$)

En el cuadro 13 se muestran los promedios de las frecuencias de MN obtenidas en el ensayo de quercetina y Cr en donde se puede observar un aumento en el número de MN que es estadísticamente significativo en las muestras del segundo y tercer día del grupo tratado con Cr y para el segundo día del grupo tratado con quercetina y Cr, también se observó que si bien en el grupo tratado sólo con quercetina existe un incremento en el número de MN, éste no resulta ser estadísticamente significativo.

Cuadro 13. Frecuencia de MN del efecto de la quercetina sobre el daño genotóxico del cromo (media \pm desviación estándar)

Día	Testigo	Cromo	Quercetina	Quercetina-cromo
0	0.50 \pm 0.35	1.08 \pm 0.58	0.50 \pm 0.58	0.83 \pm 0.41
1	0.80 \pm 0.27	1.50 \pm 0.77	1.21 \pm 0.81	1.25 \pm 0.76
2	1.20 \pm 0.57	4.25 \pm 1.44*	1.50 \pm 0.65	3.00 \pm 1.67*
3	1.30 \pm 0.45	3.25 \pm 0.61*	1.50 \pm 0.71	2.40 \pm 0.65

*: $p < 0.05$

A los datos obtenidos de éste tratamiento también se les calculó el NIF, que se muestra en la Figura 20 y se puede observar que persisten los incrementos de la inducción de MN observados en el segundo y tercer día del grupo tratado con Cr y en el segundo día del grupo tratado con quercetina y Cr, los cuales resultan ser estadísticamente significativos.

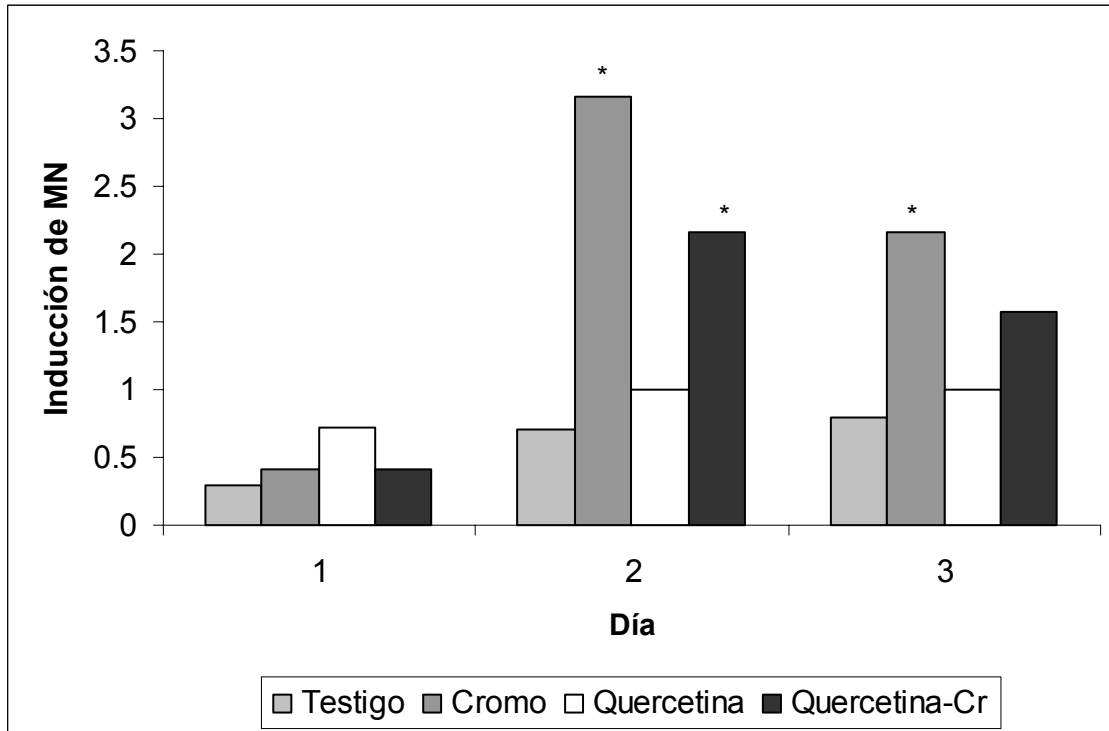


Figura 20. NIF del tratamiento de quercetina y cromo (* $p < 0.05$)

4. Efecto citotóxico del vino tinto y la quercetina

En la Figura 21 se muestran los promedios de la frecuencia de EPC sobre ENC del ensayo con vino tinto (12.6% de alcohol) administrado de manera aguda, en donde el grupo testigo tiene una disminución en la frecuencia con respecto al grupo tratado; no obstante, ésta disminución no resulta ser estadísticamente significativa.

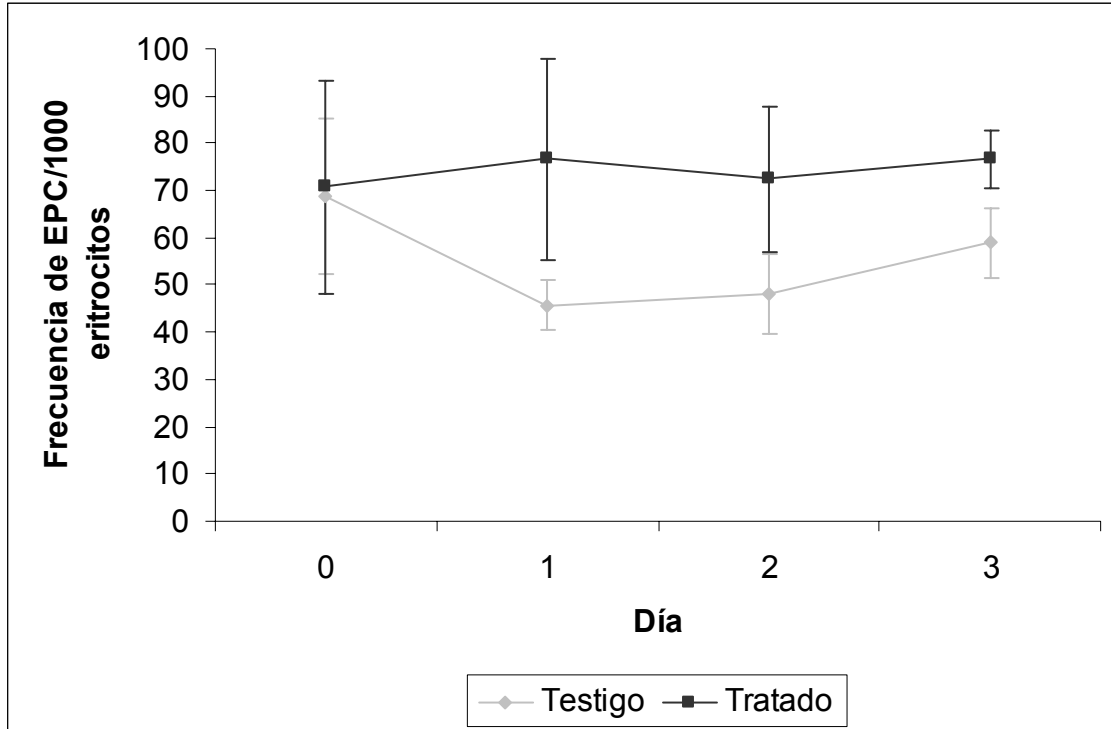


Figura 21. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos del tratamiento con vino tinto (12.6% de alcohol), (media \pm desviación estándar)

En la Figura 22 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC del tratamiento subcrónico de vino tinto, en donde se puede observar que en el grupo tratado con vino existe una disminución que resulta estadísticamente significativa en las muestras de los días 15 y 17. El grupo testigo si bien presentó una disminución en el primer día de tratamiento ésta no fue estadísticamente significativa.

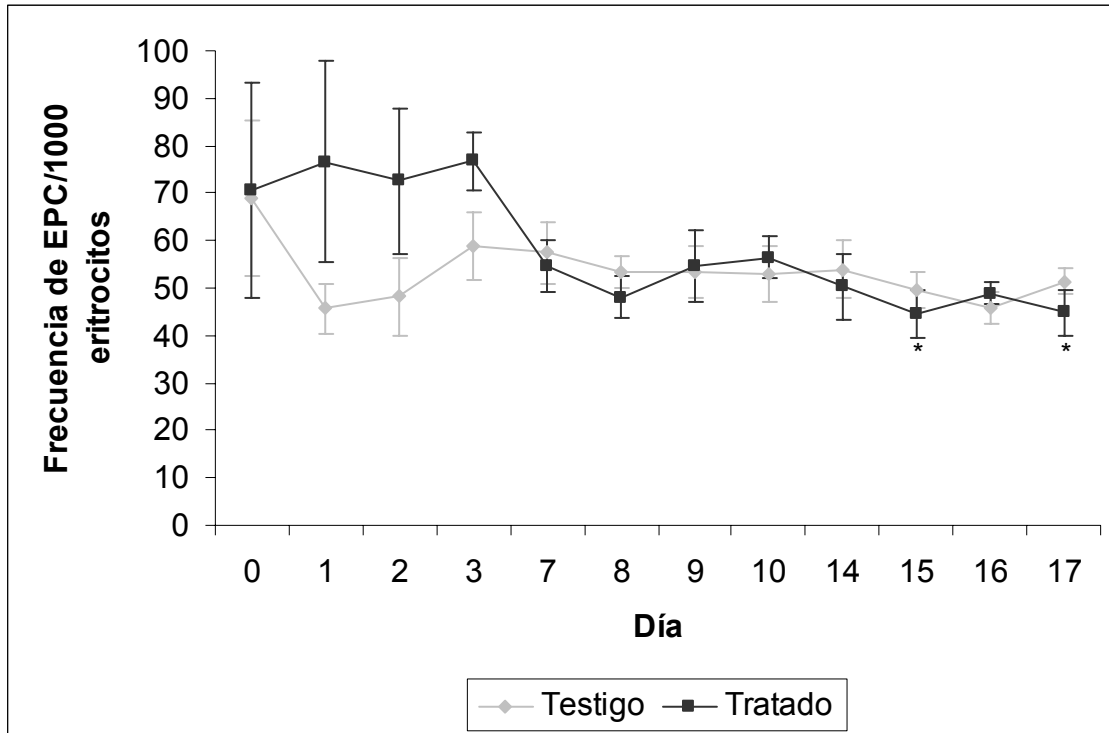


Figura 22. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos del tratamiento subcrónico con vino tinto (12.6% de alcohol), (media ± desviación estándar) (* $p < 0.05$)

Con respecto a la frecuencia de EPC sobre ENC de los ensayos con vino tinto diluido al 75%, de vino con menos del 0.5% de alcohol y de la quercetina, que se muestran de las Figuras 23, 24, y 25 respectivamente, no presentan alguna variación en las muestras que fueran estadísticamente significativas. De igual manera, cuando se realizó la evaluación de la frecuencia de EPC sobre ENC en los ensayos donde se combina vino y Cr (Figuras 26 y 27), y también quercetina y Cr (Figura 28) no se observa que exista alguna variación en las muestras que resulten ser estadísticamente significativas.

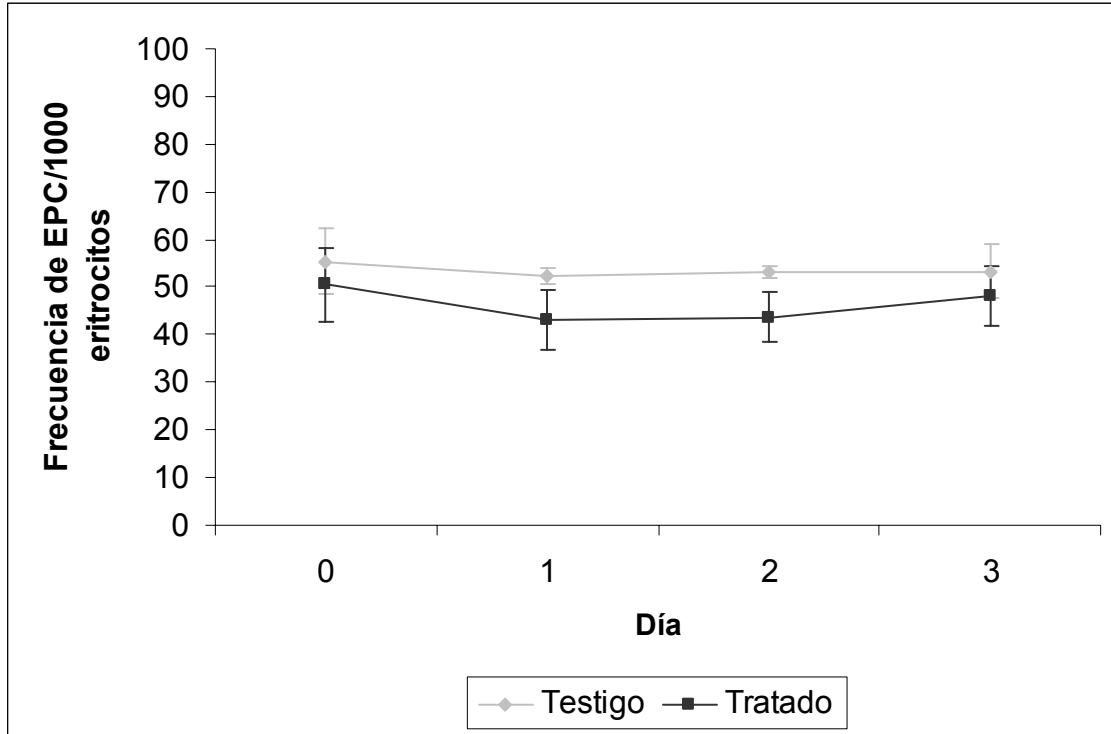


Figura 23. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos del tratamiento de vino tinto (12.6% de alcohol) concentrado al 75%, (media \pm desviación estándar)

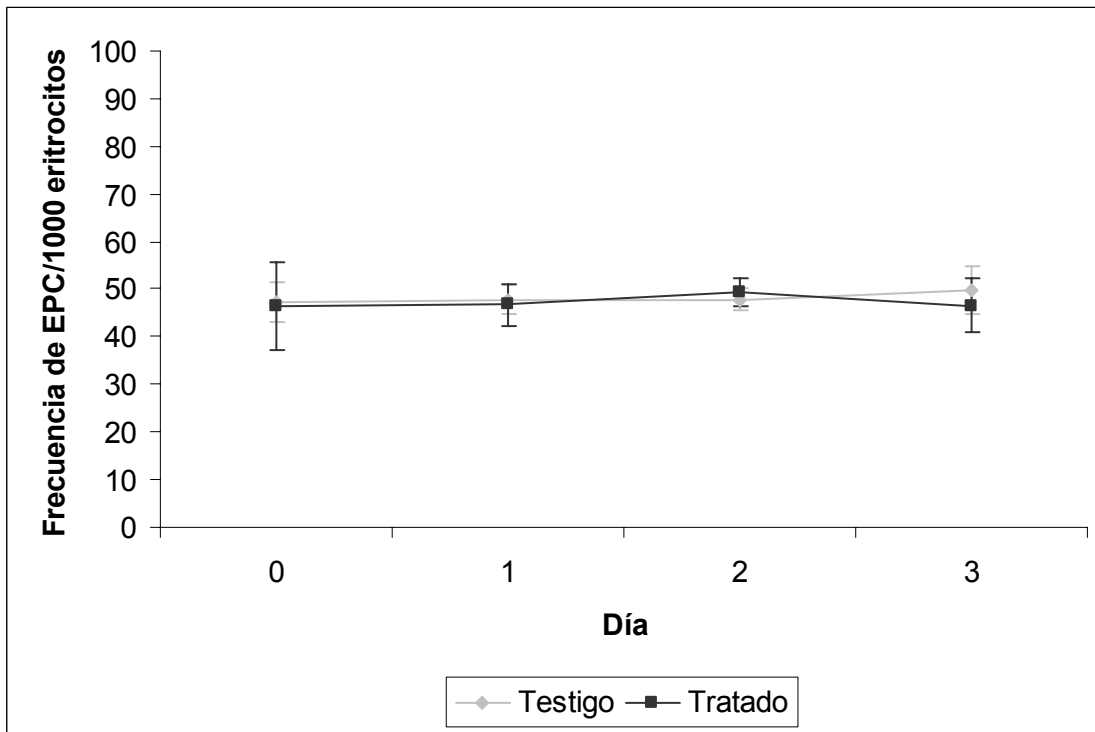


Figura 24. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos del tratamiento de vino tinto (<0.5% de alcohol), (media \pm desviación estándar)

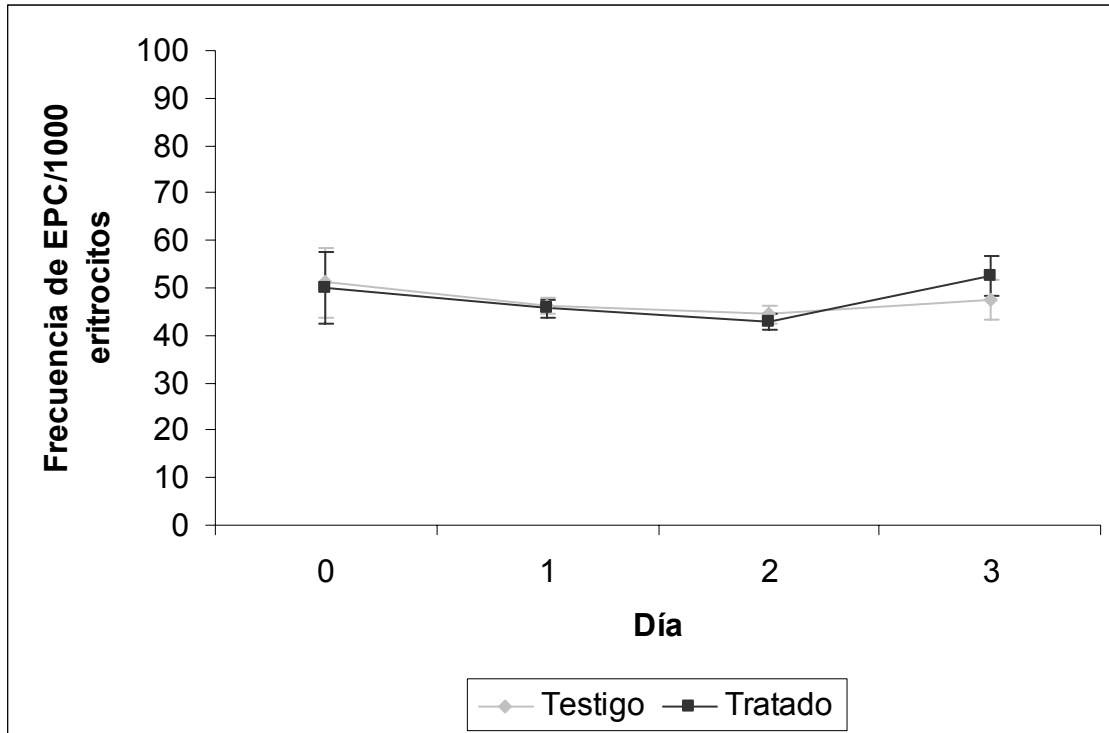


Figura 25. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos del tratamiento con quercetina (media \pm desviación estándar)

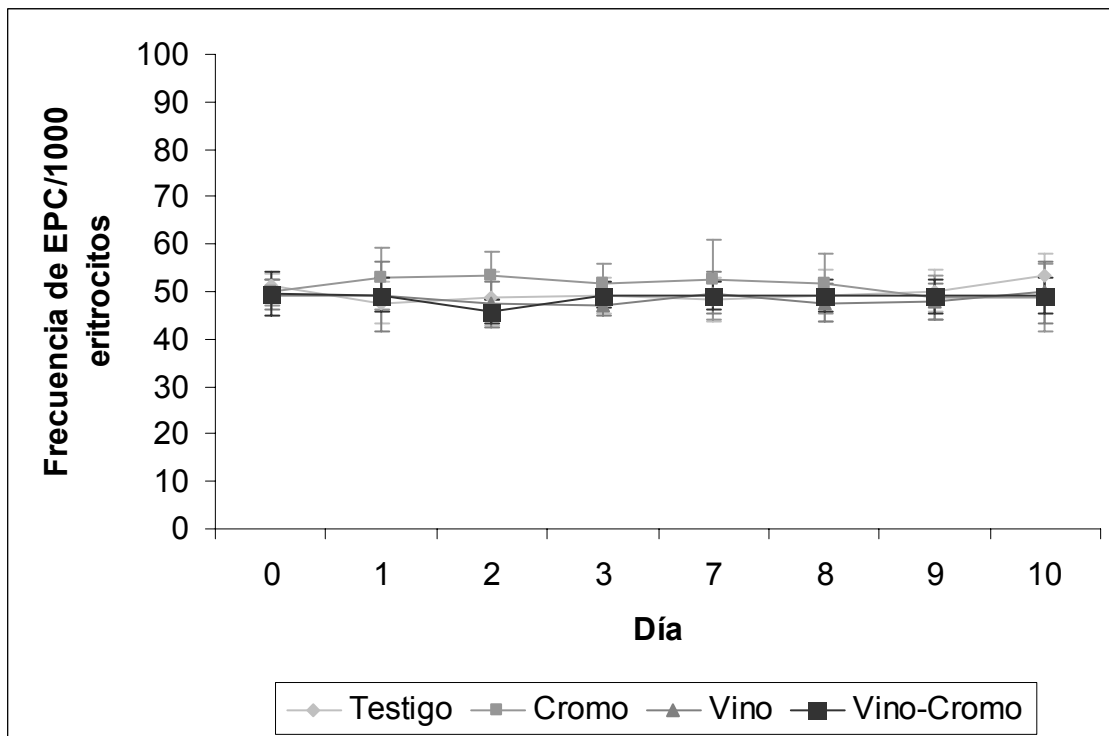


Figura 26. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos del efecto del vino tinto diluido al 75% sobre el CrO_3 (media \pm desviación estándar)

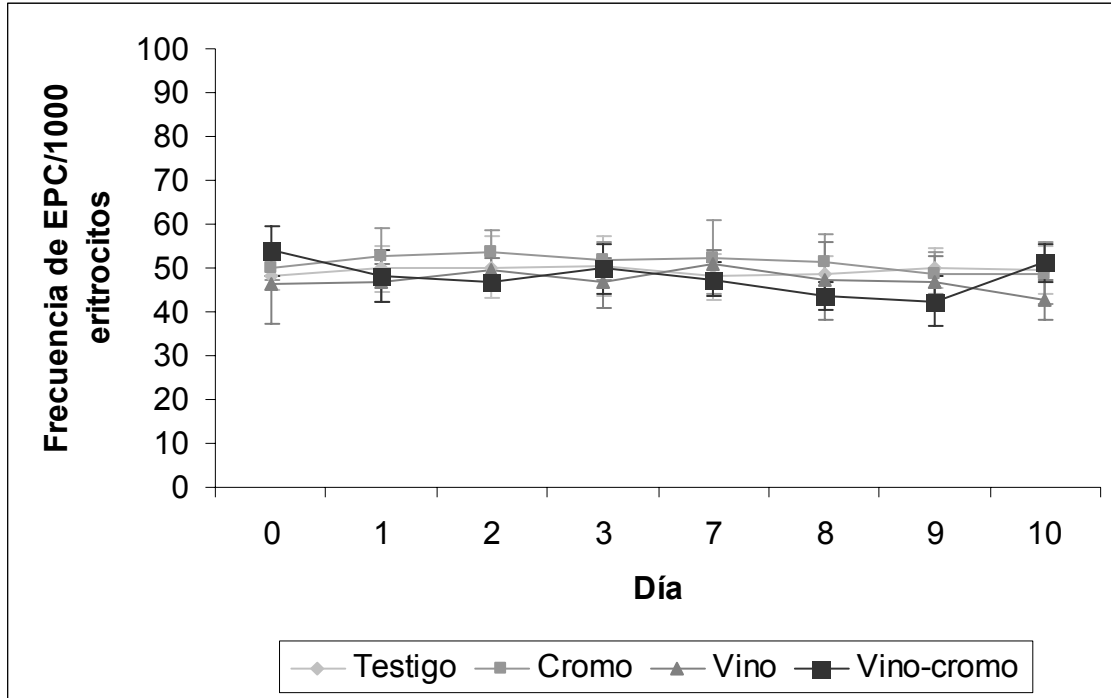


Figura 27. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos del efecto de vino tinto (<0.5% de alcohol) sobre el CrO₃ (media ± desviación estándar)

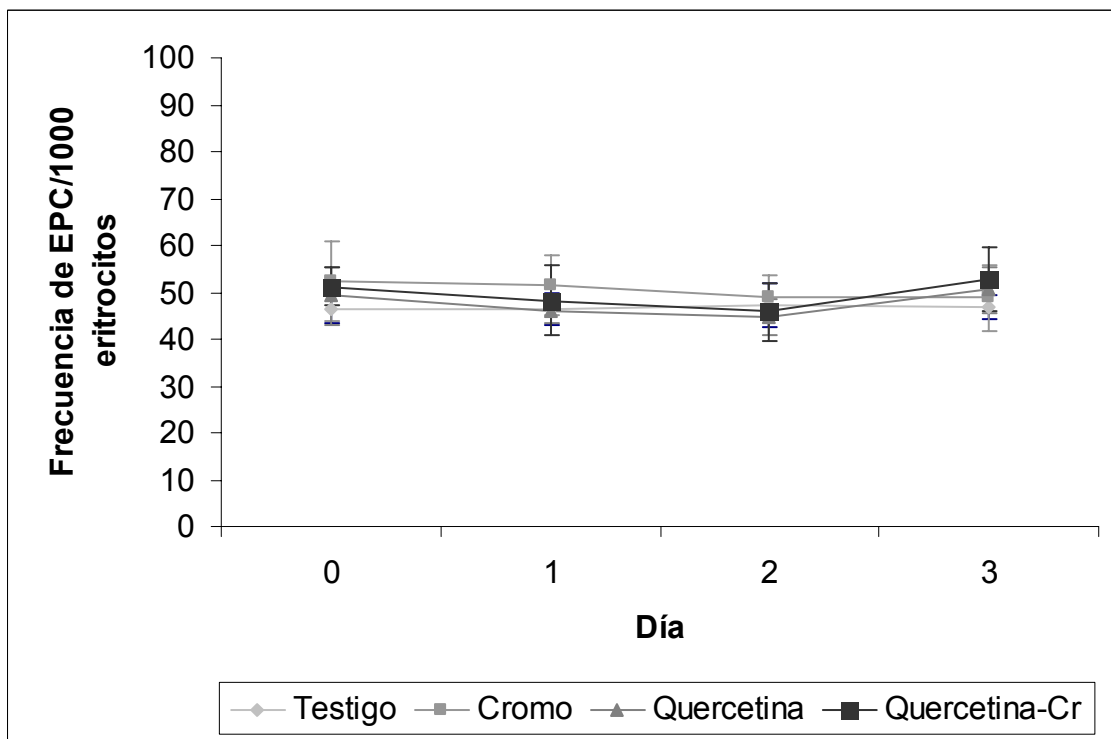


Figura 28. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos del tratamiento con quercetina y cromo (media ± desviación estándar)

VII. DISCUSIÓN

En los resultados de éste trabajo se observó que la administración aguda de vino tinto a ratones machos incrementa la frecuencia de MN, la cual resultó estadísticamente significativa. El incremento observado ya no se presentó cuando se diluyó el vino al 75%, ni cuando se administró el vino tinto sin alcohol. De igual manera, cuando se aplicó por vía i.p. uno de los principales flavonoides que están presentes en el vino tinto Cabernet Sauvignon (la quercetina), tampoco hubo un aumento en la frecuencia de MN. Cuando se combinó el tratamiento el vino tinto (diluido al 75% y, con < 0.5% de etanol) y un agente genotóxico como el CrO₃, no se disminuyó el número de MN inducidos por el CrO₃, ni cuando se aplicó con el flavonoide. Al evaluar la frecuencia de EPC con respecto a los ENC, lo cual nos da un indicio de la citotoxicidad, sólo se observó que disminuyó la frecuencia de EPC (estadísticamente significativa) en el tratamiento subcrónico.

Como se mencionó anteriormente, la administración de vino tinto concentrado (con 12.6% de alcohol) a los ratones durante una semana como única fuente de líquidos, presentó efectos sobre la frecuencia de MN. Sin embargo éste incremento sólo fue de alrededor de un MN y sólo se presentó en las muestras obtenidas a las 24 horas. Organizaciones como la OECD y la FDA han propuesto que sean considerados como agentes genotóxicos claros sólo aquellos compuestos que incrementen la frecuencia de MN en un 0.4% (4 MN en 1000 EPC) con respecto a su grupo testigo, por lo cual se puede considerar que los resultados obtenidos en éste estudio (bajo nuestras condiciones de trabajo) no clasificarían al vino tinto que empleamos como un agente genotóxico claro. Posiblemente el efecto observado en la frecuencia de MN se deba a tres posibles causas: 1) *la concentración de etanol presente en el vino tinto*, esta propuesta se puede basar en estudios ya realizados en donde se han empleado linfocitos humanos obtenidos de bebedores crónicos (120 g/día de etanol) y se ha observado un incremento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales así como la de MN (Maffei *et al.*, 2000 y 2002). También, la IARC ha considerado al

etanol como un agente genotóxico del grupo 1 que puede ser cancerígeno para los humanos (IARC, 1988).

2) *El protocolo desarrollado*; está hipótesis puede estar relacionada con el hecho de que sólo se administró vino tinto concentrado como única fuente de líquidos (directo de la botella) lo que pudo haber afectado a los animales ya que el sabor del vino pudo provocar que los animales consumieran menos líquido que los que consumían agua además de que cuando se realizó el tratamiento subcrónico, en la segunda y tercer semana disminuyó el consumo lo que pudo causarles estrés, etc. El protocolo se planteó con base a lo que propone la FDA y la OECD que consiste en que para el desarrollo de un ensayo de genotoxicidad en animales, el agente a estudiar se debe de administrar por la misma vía por la que los humanos estamos expuestos. De igual manera, cuando se inicia un estudio se debe determinar la dosis máxima tolerable, empleando un rango de dosis que van desde la más alta (que induce toxicidad) hasta una dosis moderada (que ya no induzca) (OECD, 1997; FDA, 2000). Aunado a esto, en estudios preliminares se observó que el administrar períodos combinados de tiempo, vino y después agua, los animales se abstenían de consumir el vino lo que dió pauta para que se administrara vino como única fuente de líquidos.

3) *Un efecto tóxico que indujo indirectamente MN*; está hipótesis puede estar relacionada con la anterior ya que al haber administrado sólo vino tinto como fuente de líquidos se pudo haber presentado una toxicidad, lo que a su vez indujo de manera indirecta los MN, ya que se ha propuesto que la administración de agentes físicos o químicos pueden alterar la homeostasis de las funciones fisiológicas del organismo y generar daño al ADN (Scialli, 1992), que puede haber una inducción indirecta debido a factores ajenos al agente, como es el propio manejo del animal, la edad del animal o factores ambientales, ocasionando un estado estresivo que llegue a generar daño al ADN, observado en la inducción de MN (Gad, 1992; Dass *et al.*, 1997).

A partir de la hipótesis de que el etanol contenido en el vino tinto posiblemente era el que estaba induciendo los MN, se administró el vino diluido al 75% con agua, en donde

ya no se aumentó la frecuencia de MN, lo que apoya la hipótesis de que en efecto era el etanol el que estaba induciendo el daño marginal. De igual manera, cuando se administró de forma aguda el vino tinto sin alcohol, tampoco se observó un aumento en el número de MN, apoyando también la idea de que el efecto observado fue por la concentración de etanol contenida en el vino la que inducía los MN y no por los otros compuestos del vino. De hecho existen estudios en los que la administración de dosis bajas de etanol (10 g/día) pueden proteger de los radicales libres originados por la oxidación de las lipoproteínas, los cuales contribuyen con el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas (Galati y O'Brien, 2004). Cabe mencionar que el vino sin alcohol utilizado en éste estudio no es de la misma marca que la del vino tinto con alcohol (XA Premium, Cabernet Sauvignon, Pedro Domecq), por lo que los resultados deben ser tomados con cierta consideración ya que el proceso de elaboración para cada uno (dependiendo de la casa) es diferente y por lo tanto la concentración de los compuestos fenólicos puede variar (Aleixandre, 1997), además de que el vino libre de alcohol (Fre Premium Red, Sutter Home Winery) es elaborado a partir de la variedad de uva Red Premium mientras que el vino con alcohol utiliza la uva Cabernet Sauvignon, como una de las que contiene mayor cantidad de flavonoides (Rice Evans *et al.*, 1996).

Cuando se administró el vino tinto concentrado (12.6% de alcohol) a los ratones en un tratamiento subcrónico sólo se incrementó el número de MN en las muestras obtenidas en la primera semana, no así en la segunda y la tercera. El hecho de que en las siguientes semanas no se presentara aumento en el número de MN, tal vez se debió a la disminución del consumo del vino, ya que como se muestra en nuestros resultados en la primera semana los ratones consumieron un promedio de 5.3 ml al día, mientras que en la segunda y tercera semana el consumo fue de 4.6 ml por día, lo cual podría estar relacionado con el protocolo donde se diluyó el vino con alcohol al 75%, es decir, que cuando disminuye el consumo de vino también está disminuyendo la concentración de etanol ingerida por los ratones. Así mismo, cabe la posibilidad de que haya ocurrido una adaptación de los ratones al consumo de vino mediada por el metabolismo del etanol dentro del organismo, ayudando a tener una mejor desintoxicación (Tuma y

Casey, 2003). En la literatura no existen reportes de estudios en donde se haya administrado a ratones, vino tinto por períodos prolongados para evaluar daño genotóxico.

Al administrar la dosis máxima de vino tinto que no indujo MN en los ratones, con un agente inductor de daño genotóxico como los compuestos de Cr (VI), se observó que la administración de CrO₃ por sí sólo incrementa de forma estadísticamente significativa, la frecuencia de MN a las 48 y 72 horas después de haber aplicado el tratamiento. Estos datos son similares a lo observado en otros estudios donde se administraron las mismas dosis de CrO₃ a ratones y se incrementaron las frecuencias de MN en sangre periférica (García-Rodríguez *et al.*, 2001; García-Rodríguez, 2006). Por su parte, el tratamiento sólo de vino tinto no indujo MN al igual que en nuestros datos mencionados anteriormente. En el grupo donde se combinaron los tratamientos del CrO₃ y el vino tinto (diluido al 75% y sin alcohol) no se observó en ninguno de los casos una disminución en los MN con respecto al grupo tratado únicamente con CrO₃. Estos datos no concuerdan con estudios en los que se ha descrito que el consumo agudo moderado de vino tinto con alcohol y de vino tinto que desalcoholizaron disminuye el número de MN inducidos por radiación gama. Cabe aclarar que estos estudios fueron realizados en linfocitos humanos obtenidos de personas que consumieron vino tinto en una sola dosis (450 ml) y una hora después se colectó su sangre, es decir, es un estudio *ex vivo* (Greenrod *et al.*, 2005), mientras que el nuestro es *in vivo*. En otros estudios también realizados *ex vivo* en los cuales se ha administrado jugo de uva morada a humanos por un período de ocho semanas, se observó que se incrementaba la capacidad antioxidante en el plasma (Park *et al.*, 2003).

Si bien se ha descrito que los compuestos de Cr (VI) cuando son reducidos dentro de la célula, por reductantes celulares como el glutathion reductasa, o la catalasa, etc., generan radicales libres particularmente el radical hidroxilo, los cuales dañan al ADN (O'Brien *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006), y que el vino tinto es capaz de capturar este tipo de radicales ya sea donando átomos de hidrogeno o electrones (Rice-Evans *et al.*, 1996). En éste estudio no se observó una disminución del daño genotóxico inducido por

el CrO_3 , lo cual nos hace suponer que el efecto del Cr sobre el ADN es por otra vía, o que la dosis de vino no es la suficiente para disminuir el daño al ADN inducido por el CrO_3 (O'Brien *et al.*, 2003). Por lo que, a estas observaciones se sugiere que se desarrollen otros protocolos para ampliar la información.

Uno de los principales flavonoides presentes en el vino tinto es la quercetina, esta se aplicó directamente en los ratones en dos dosis de 625 mg/kg de peso corporal y no se observó un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de MN. Esto concuerda con lo observado por da Silva *et al.* (2002), quienes administraron a ratones las mismas dosis que nosotros empleamos y no observaron un incremento de MN en células de la médula ósea. Sin embargo, cuando se calculó el NIF a nuestros datos si resultó estadísticamente significativo, esto se debe a que al calcular el NIF se está considerando que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que al restarle éste valor a las demás horas se asume que se obtiene la inducción neta de MN, lo cual hace más sensible a la prueba de MN. Cabe mencionar que las dosis empleadas en nuestro estudio están muy por encima de lo que un humano puede llegar a ingerir de éste flavonoide dentro de su dieta diaria, ya que se ha estimado que dentro de la dieta occidental el consumo promedio diario de quercetina es de 16 mg/día (Hollman y Katan, 1999).

Una vez obtenida la dosis de quercetina que no induce MN se combinó con el CrO_3 y al igual que cuando se administró a los ratones vino tinto no se observó una disminución en la frecuencia de MN inducidos por el CrO_3 . En estudios realizados en ratones a los cuales se les administró una dosis de benzo(a)pireno, el cual genera radicales libres e induce un incremento en el número de MN, la quercetina disminuyó el número de MN en un 73%; sin embargo, cuando se administró una dosis mayor de quercetina (100 mg/kg) a los ratones tratados con el benzo(a)pireno, éste efecto es revertido dado que se incrementa el número de MN en un 16% (Edenharder *et al.*, 2003), esto podría estar relacionado con nuestros datos ya que tal vez la dosis de quercetina que se empleó es muy alta y no pueda proteger del daño al ADN inducido por el CrO_3 , por lo que se sugiere el desarrollo de otros protocolos en donde se

disminuya la concentración de quercetina y se administre después de la dosis de CrO_3 . También es posible que el mecanismo de protección de la quercetina sea antagónico a los mecanismos de inducción del daño genotóxico por parte del CrO_3 . Se ha demostrado que la quercetina incrementa el nivel de la enzima glutatión reductasa, la cual tiene la capacidad de capturar radicales libres (Rodgers y Grant, 1998), sin embargo, la glutatión reductasa puede comportarse como un reductante celular del Cr (VI) dando como producto radicales libres que pueden generar daño al ADN (O'Brien *et al.*, 2003) por lo que posiblemente se estén incrementando los niveles del glutatión, acelerando la reducción del CrO_3 generando radicales libres los cuales están induciendo daño al ADN y la quercetina no pueda ser capaz de disminuir éste daño. Por su parte, en estudios *in vitro* se ha observado que la quercetina aplicada en linfocitos humanos en concentraciones de $10 \mu\text{M}$ protege del daño al ADN, evaluado con el ensayo Cometa, cuando son expuestos a H_2O_2 (Duthie *et al.*, 1997) y que en eritrocitos que han sido tratados con vino tinto se aumenta la capacidad antioxidante ya que se disminuyen los efectos inducidos por las especies reactivas de oxígeno en los lípidos de la membrana celular generados por el H_2O_2 (Damianaki *et al.*, 2000; Tedesco *et al.*, 2000). Por lo tanto, la quercetina así como el vino tinto presentan una actividad antioxidante capaz de capturar radicales libres dando como resultado una disminución en el daño al ADN.

Si bien en éste estudio sólo se probó a la quercetina, cabe mencionar que no sólo se ha descrito a ésta como el único flavonoide presente en el vino tinto con capacidad antioxidante, sino también a otros flavonoides tales como la miricetina la cual al ser probada en linfocitos humanos disminuye el daño al ADN inducido por el H_2O_2 (Duthie *et al.*, 1997); o las catequinas, las cuales pueden disminuir la inducción de MN en células V-79 generados por H_2O_2 (Roy *et al.*, 2003) y presentan efectos inhibitorios en el crecimiento de líneas celulares de tumores de pulmón, induciendo también el proceso de apoptosis (Yang *et al.*, 1998). De igual manera, dentro de los componentes del vino existen otras sustancias como las vitaminas C y E, así como betacarotenos, entre otras, las cuales tienen propiedades antioxidantes (Bruce y Walzen, 2000; García-Rodríguez y

Altamirano-Lozano, 2001). Es recomendable realizar otros estudios en los que se empleen distintos componentes del vino tinto, para probar su posible protección al ADN.

En cuanto al efecto citotóxico, determinado por la reducción de la frecuencia de EPC con respecto a los ENC (Vallarino-Kelly y Morales-Ramírez 2001), sólo se observó en el tratamiento subcrónico de vino tinto una disminución en la frecuencia de EPC, que resultó estadísticamente significativo en las muestras obtenidas en la última semana de tratamiento. Los datos obtenidos concuerdan con lo reportado por García-Rodríguez *et al.*, (2001) y García-Rodríguez (2006), quienes tampoco observaron cambios en la relación entre EPC y ENC cuando sólo administraron Cr (VI) y con los datos de Edenharter *et al.* (2002 y 2003) quienes administraron vino tinto y quercetina a ratones y no observaron efectos en la frecuencia de EPC. En cuanto al efecto observado en el tratamiento subcrónico cabe mencionar que se ha sugerido tomar con reserva este tipo de datos para considerar la citotoxicidad, ya que cuando se presenta toxicidad en la eritropoyesis, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarse el efecto (Hayashi *et al.*, 2000).

VIII. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

1. La administración del tratamiento agudo de vino tinto (con etanol al 12.6%) a ratones machos de la cepa CD-1, incrementa la frecuencia de MN de manera dosis-dependiente, ya que cuando se administró el vino tinto diluido al 75% dicho efecto ya no se observa. De igual forma, la administración aguda de vino tinto sin etanol (<0.5%) tampoco aumenta el número de MN, por lo que se puede suponer que el efecto observado es inducido por el etanol más que por los otros compuestos del vino tinto.
2. La aplicación de 625 mg/kg de peso de quercetina a ratones de la cepa CD-1 (uno de los principales flavonoides del vino tinto) no incrementa el número de MN, aunque cuando se aplicaron las mismas dosis y tratamientos empleados en otros estudios en los que no habían observado daño genotóxico (dos dosis de 625 mg/kg de peso corporal) sí se observó un incremento marginal cuando se calculó el NIF.
3. El administrar de manera aguda el vino tinto (con y sin etanol) a los ratones previamente a la aplicación del CrO_3 , no se disminuyó la frecuencia de MN inducida por el CrO_3 . De igual manera la aplicación de una sola dosis de quercetina antes de la inyección del CrO_3 , tampoco disminuyó el número de MN inducidos por el CrO_3 .
4. De todas las evaluaciones de la frecuencia de EPC con respecto a los ENC, sólo la administración subcrónica de vino tinto (con etanol al 12.6%) concentrado disminuyó la frecuencia de los EPC, lo cual podría ser un indicativo de citotoxicidad, sin embargo, hay que tomarlo de manera reservada ya que esta no es una de las pruebas recomendadas para evaluar daño citotóxico.

IX. REFERENCIAS

- Aleixandre, J. (1997). La cultura del vino, cata y degustación. Universidad Politécnica de Valencia. España. pp. 361.
- Alía, M., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A. B., Bravo, L., Goya, L. (2006). Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharm.* 212:110-118.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D. C., Kuszynski, A., Joshi, S.S., Pruess, H. G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicol.* 148:187-197.
- Bagchi, D., Stohs, S. J., Downs, B. W., Bagchi, M., Pruess, H. G. (2002). Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicol.* 180:5-22.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99:191-203.
- Bruce, G. J., y Walzen, R. L. (2000). The Health Benefits of Wine. *Annu. Rev. Ilustr.* 20:561-93.
- da Silva, J., Herrmann, S. M., Heuser, V., Peres, W., Possa-Marroni, N., González-Gallego, J., Erdtmann, B. (2002). Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem. Tox.* 40:941-947.
- Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hatzoglou, A., Panagiotou, S., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P., Castanas, E. (2000). Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 78:429-441.
- Danadevi, K., Rozati, R., Banu, B. S., Grover, P. (2004) Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the comet and micronucleus assays. *Mutagenesis.* 19:35-41.
- Dass, S. B., Ali, S. F., Heflich, R. H., Casciano, D. A., (1997). Frequency of spontaneous and induced micronuclei in the peripheral blood of aging mice. *Mutat. Res.* 381:105-110.

- Duthie, S. J., Collins, A. R., Duthie, G. G., Dobson, V. L. (1997). Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 393:223-231.
- Edenharder, R., Sager, J. W., Glatt, H., Muckel, E., Platt, K. L. (2002). Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PnIP) in metabolically competent V79 cells. *Mutat. Res.* 521:57-72.
- Edenharder, R., Krieg, H., Köttgen, V., Platt, K. L. (2003). Inhibition of clastogenicity of benzo[*a*]pyrene and of its *trans*-7,8-dihydrodiol in mice *in vivo* by fruits, vegetables, and flavonoides. *Mutat. Res.* 537:169-181.
- FDA. U. S. Food and Drug Administration. (2000). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Redbook.
- Ferry, D. R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D. W., Takats, P. G., Anderson, D., Baker, J., Kerr, D. J. (1996). Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: Pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. *Clinic. Cancer Res.* 2:659-668.
- Gad, S. C. (1992). Susceptibility factors, en *Animal models in toxicology*. Editores, Gad, S. C. y Chengelis, C. P., editorial Marcel Dekker, Inc. Estados Unidos. pp. 884.
- Galati, G., y O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Rad. Biomed.* 37(3):287-303.
- García-Rodríguez, M. C. (2006). Estudio de los efectos de la clorofilina sobre la acción genotóxica y teratógena del Cr (VI). Tesis Doctoral. México, D. F. pp. 129.
- García-Rodríguez, M. C., y Altamirano-Lozano, M. (2001). Sales de sodio y cobre de la clorofila: usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígena. *TIP.* 4(2):77-86.
- García-Rodríguez, M. C., López, V., Altamirano-Lozano, M. (2001). Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in Mouse peripheral blood. *Mutat. Res.* 496:145-151.

- Greenrod, W., Stockley, C. S., Burcham, P., Abbey, M., Fenech, M. (2005). Moderate acute intake of de-alcoholised red wine, but not alcohol, is protective against radiation-induced DNA damage *ex vivo*-Results of a comparative *in vivo* intervention study in younger men. *Mutat. Res.* 591:290-301.
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slide. *Mutat. Res.* 245:245-249.
- Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., Sutuo, S. (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Env. Mol. Mutagen.* 35:234-252.
- Hollman, P. C. H., y Katan, M. B. (1999) Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food. Chem. Toxicol.* 37:937-942.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. (1988) Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human, Alcohol drinking. 44:35-41.
- Kim, B. S., Cho, M. H., Kim, H. J. (2000). Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay. *Mutat. Res.* 469:233-241.
- Klaunig, J., y Kamendulis, L. M. (2004). The role oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:239-267.
- Lako, J., Trenerry, V. C., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon, N., Sotheeswaran, S., Premier, R. (2006). Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chem.* en prensa.
- Longnecker, M. (1995). Alcohol consumption and the risk of cancer. *Alcohol* 12:87-96.
- Maffei, F., Fignornari, C., Forti, G. C., Castelli, E., Stefanini, G. F., Hrelia, P. (2000). Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis in micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. *Mutagenesis* vol. 15 no. 6:517-523.
- Maffei, F., Forti, G. C., Castelli, E., Stefanini, G. F., Mattioli, S., Hrelia, P. (2002). Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 514:49-58.

- Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C. M., Salamone F., Heddle, J. A. (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 239:29-80.
- Oak, M., El Bedoui, J., Schini-Kerth, V. B. (2005). Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J. Nutr. Biochem.* 16:1-8.
- O'Brien, T. J., Ceryak, S., Patierno, S. R. (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat. Res.* 533:3-36.
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. (1997). Guideline for the testing of chemicals. Mammalian erythrocyte micronucleus test. 474:1-10
- Paolini, M., Sapone, A., Valgimigli, L. (2003). Avoidance of bioflavonoid supplements during pregnancy: a pathway to infant leukemia? *Mutat. Res.* 527: 99-101.
- Park, Y. K., Park, E., Kim, J., Kang, M. (2003). Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat. Res.* 529:77-86.
- Pomés-Aguirre, A., y Leighton, F. (1998). Antioxidantes presentes en el vino. *Boletín de Ciencia Vino y Salud.* 2 (3):1-8.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio. Med.* 20(7):933-956.
- Rodgers, E. H., y Grant, M. H. (1998). The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* 116:213-228.
- Roy, M., Chakrabarty, S., Sinha, D., Bhattacharya, R. K., Siddiqi, M. (2003). Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutat. Res.* 523-524:33-41.
- Schmid, W., y Ledebur, V. (1973). The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutat. Res.* 19:109-117.
- Scialli, A. R. (1992). A clinical guide to reproductive and developmental toxicology. CRC Press, Inc. Estados Unidos. pp. 284.

- Singh, J., Carlisle, D. L., Pritchard, D. E., Patierno, S. R. (1998). Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: Relationship to chromium carcinogenesis. *Oncol. Rep.* 5:1307-1318.
- Skibola, C. F., y Smith, M. T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Bio. Med.* 29:375-383.
- Soleas, G. J., Grass, L., Josephy, P. D., Goldberg, D. M., Diamandis, E. P. (2002). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin. Biochem.* 35:119-124.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res.* 579:200-213.
- Steinmetz, K., y Potter, J. D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 96:1027-1039.
- Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, G., Russo, G. L., Carraturo, A., Faruolo, C., Moio, L., Palumbo, R. (2000). Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *J. Nutr. Biochem.* 11:114-119.
- Tomera, J. F. (1999). Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption. *Food Sci. Technol.* 10:129-138.
- Tuma, D. J. y Casey, C. A. (2003). Dangerous byproducts of alcohol breakdown-focus on adduct. *Alcohol. Res. Health.* 27(4):285-290.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes C. J., Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266:37-56.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Bio. Interact.* 160:1-40.
- Vallarino-Kelly, T. y Morales-Ramírez, P. (2001). Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast *in vivo*. *Mutat. Res.* 495:51-59
- Wilms, L. C., Hollman, P. C. H., Boots, A. W., Kleinjans, J. C. S. (2005). Protection by quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 582:155-162.

- Wise, S. S., Holmes, A. L., Wise, J. P. (2006). Particulate and soluble hexavalent chromium are cytotoxic and genotoxic to human lung epithelial cells. *Mutat. Res.* 610:2-7.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M., Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 21:381-406.
- Yang, G., Liao, J., Kim, K., Yurkow, E. J., Yang, C. S. (1998). Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis.* 19(4):611-616.

X. ANEXOS

El presente trabajo fue presentado de manera parcial o total en los siguientes eventos académicos:

Evento: XXII Foro de Investigación en Salidas Terminales, FES Zaragoza, UNAM. Iztapalapa, D. F. del 16 al 17 de febrerote 2006

Título de la ponencia: EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO AGUDO DEL VINO TINTO SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO EN EL RATÓN *IN VIVO*.

Autores: García-Rodríguez, M. C., Mateos-Nava, R. A.

Evento: II Congreso de Química Medica dedicado a investigación en cáncer y diabetes, Querétaro, Qro. Del 4 al 8 de septiembre de 2006

Título de la ponencia: EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS DEL VINO TINTO CON Y SIN ALCOHOL, AL SER ADMINISTRADO DE MANERA AGUDA Y SUB-AGUDA EN RATONES CD-1 *in vivo*.

Autores: García-Rodríguez, M. C., Mateos-Nava, R. A. y Altamirano-Lozano, M.

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO AGUDO DEL VINO TINTO SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO EN EL RATÓN *IN VIVO*.

Autor: Rodrigo Anibal Mateos Nava

Asesor: M. en C. María del Carmen García Rodríguez

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, UNIGEN, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

El vino es una bebida alcohólica producto de la vid que desde tiempos remotos es fabricada y consumida por la humanidad. Al vino se le atribuyen propiedades benéficas para la salud como lo es: la prevención de enfermedades cardiovasculares, el incremento de la absorción intestinal de lípidos y la disolución de cálculos entre otras. Dado que los flavonoides del vino tinto constituyen una fuente rica de antioxidantes, se ha planteado que estos pueden ayudar a la protección de enfermedades crónicas originadas por estrés oxidativo, entre las que se incluye el cáncer. En este estudio se evaluó si el vino tinto induce daño genotóxico al ser administrado de forma aguda, para lo cual, se evaluó la frecuencia de micronúcleos (MN) en sangre periférica de ratón. Se emplearon ratones machos jóvenes de la cepa CD-1, los cuales se mantuvieron bajo condiciones controladas y alimentación normal. Los ratones fueron divididos en tres grupos: 1) Testigo (administración de agua), 2) Tratado A (administración 100% vino) y 3) Tratado B (administración 75% vino). Los ratones fueron tratados por vía oral. Los resultados muestran que la administración diaria de vino al 100% durante una semana, incrementa marginalmente la frecuencia de MN, sin embargo, al ser disminuida la concentración del vino a un 75%, esta ya no incrementó la frecuencia de MN. En ambas dosis no se observaron efectos citotóxicos. A partir de estos resultados se planteó que el incremento observado de MN, se debe a la concentración de etanol y no a los flavonoides que contiene el vino.

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS DEL VINO TINTO CON Y SIN ALCOHOL, AL SER ADMINISTRADO DE MANERA AGUDA Y SUB-AGUDA EN RATONES CD-1 *in vivo*.

*García-Rodríguez, M. C. *, Mateos-Nava, R. A. y Altamirano-Lozano, M.*

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. *maricar_67@yahoo.com

Dado que los flavonoides del vino tinto constituyen una fuente rica de antioxidantes, recientemente se ha planteado su uso en la protección de enfermedades crónicas originadas por estrés oxidativo, entre las que se puede incluir las relacionadas con daño al ADN como el cáncer. En éste estudio se evaluaron los efectos genotóxicos y citotóxicos del vino tinto con y sin alcohol. Para lo cual, se cuantificó el incremento de la frecuencia de micronúcleos (MN) y la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) con respecto a los normocromáticos (ENC) en sangre de ratón *in vivo*. Se administraron por vía oral tratamientos agudos y sub-agudos de vino con y sin alcohol. Cuando se administró el tratamiento agudo de vino tinto con alcohol (100%) se incrementó de manera marginal la frecuencia de MN a las 24 horas. Al disminuir la concentración de vino con alcohol (75%) ya no se observaron aumentos en el número de MN. Estos resultados hicieron suponer que el incremento en la frecuencia de MN se debe a la concentración de etanol y no a los flavonoides que contiene el vino. Para apoyar esta idea se repitió el protocolo empleando vino sin alcohol (100%) y al igual que en el protocolo anterior ya no se observaron efectos en la inducción de MN. En cuanto a la citotoxicidad, en ninguno de los tratamientos se observaron cambios en la frecuencia de EPC. A partir de estos resultados se plantea realizar estudios para probar los efectos del vino tinto sobre el daño genotóxico.

Palabras clave: vino tinto, micronúcleos, antioxidantes.