



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS VARIEDADES DE VINO TINTO; CABERNET SAUVIGNON, MERLOT, NEBBIOLO, CARMÉNÈRE Y DE LA QUERCETINA SOBRE EL DAÑO AL ADN, AL SER ADMINISTRADOS POR DIFERENTES VÍAS EN RATONES DE LA CEPA CD-1”.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A :  
GUERRERO PALOMO GABRIELA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2009.



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 realizó en el Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Proyecto PAPIIT-IN209309.**

Todo lo que necesitas es amor

---

# Agradecimientos

A todos aquellos quienes han formado mi educación ya sea de manera directa o indirecta, por enseñarme que existe quien me tire, pero que jamás se podrá crear a quien me deje en el suelo. A quienes dudaron e incluso aseguraron que no lo lograría. Hoy sigo de pie con ganas de luchar, triunfar y continuar en el camino del aprendizaje, por lo que seguiré siendo sincera y directa.

**Dra. Carmen García**, Gracias por su apoyo, dedicación y conocimientos para la realización de éste trabajo. Por reforzar la idea de separar lo profesional de lo personal.

A esas personas que dejan huella en el alma y en el corazón sin importar el tiempo que se queden contigo, sería muy fácil poner nombres y apellidos, sin embargo saben específicamente a quien esta dirigido... **con cariño para mis amigos.**

## **Dedico este trabajo a:**

**Martha, mamá:** Eres mi mejor inspiración, ejemplo de lucha, perseverancia y fortaleza. Gracias por el apoyo incondicional, por respetar mis decisiones incluso aquellas en las que sabías que fallaría, por que cuando me derrumbo tus brazos siempre están para consolarme, por ser soplo de aliento y vida. Aunque muchas veces no me entiendes se que siempre estarás para ayudarme. Este logro también es tuyo, simplemente por que TE AMO.

**A mi papá:** Por ser el ancla de la rebeldía, a veces inexistente... Por que aunque no somos idénticos, me heredaste un gran carácter, el cual me ayudo a salir adelante, cuando me sentía más vulnerable...

**A mi hermanito Fer:** Gracias por ser mi compañero de desvelos, por siempre intentar ayudarme aunque no tuvieras ni idea de como hacerlo, por los enojos, las peleas, los consejos, por todos los momentos compartidos, por existir... Te amo

**A mis tí@s y abuela:** Por todo su apoyo, sus consejos, sus regaños y enseñanzas, por estar en mi vida. Los quiero mucho. En especial quiero agradecerle a mi tía **Rosa** ya que al igual que mi madre, crees en mí a ojos cerrados, por no juzgarme, ni señalarme, por que la educación y los buenos modales que me inculcaste hoy me han hecho una mejor persona. Te voy a estar eternamente agradecida. Te quiero muchísimo.

**Diana:** Por ser compañera, amiga, confidente, prima, pero sobre todo mi hermana, siempre voy a estar para ti, para que sigamos compartiendo las ganas de vivir. Por todo lo que nos une, eso intangible que solamente nosotras entendemos. Gracias Te quiero mucho.

**Irvin:** Eres una parte esencial de mi vida, me enseñaste que las miradas y los silencios son más que cualquier palabra que se pueda decir o escribir, sabes exactamente lo que siento por ti. Gracias por hacerme ver que los defectos tienen un lado positivo. Y que en esta vida es todo o nada, por que perder no es una opción... ILY

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN .....	i
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	ii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Vino tinto .....	4
1.1.1. Variedades de vino tinto .....	6
a) Cabernet sauvignon .....	6
b) Merlot .....	6
c) Nebbiolo .....	6
d) Carménère .....	7
1.2. Polifenoles .....	8
1.3. Flavonoides .....	8
1.4. Quercetina .....	10
1.5. Mecanismos de protección de los flavonoides .....	11
1.6. Agentes inductores del daño al ADN .....	12
1.6.1. Etanol .....	12
1.7. Evaluación de daño al ADN .....	13
1.7.1. Micronúcleos .....	13
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>15</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
4.1. Objetivo General .....	16
4.2. Objetivos Particulares .....	16
<b>5. MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>17</b>
5.1. Animales .....	17
5.2. Reactivos .....	17
5.3. Tratamientos .....	18
5.4. Establecimiento de las dosis del vino tinto y quercetina .....	18
5.5. Tiempos de evaluación .....	19
5.5.1. Genotoxicidad y citotoxicidad .....	19
5.6. Evaluaciones .....	22
a) Preparación de laminillas .....	22
b) Toma de muestras .....	22
c) Evaluación de laminillas .....	22
5.7. Análisis estadístico .....	23



<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>6.1. Evaluación de MN en grupos tratados con vino tinto diluido al 75% administrado vía ad libitum</b> .....	<b>25</b>
<b>6.2. Evaluación de MN en grupos tratados con vino tinto sin diluir administrado vía sonda</b> .....	<b>33</b>
<b>6.3. Efecto citotóxico del vino tinto y la quercetina</b> .....	<b>42</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
<b>7.1. Efectos genotóxicos del vino tinto y de la quercetina</b> .....	<b>45</b>
<b>7.2. Efecto del vino tinto y la quercetina sobre la citotoxicidad</b> .....	<b>49</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>50</b>
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	<b>51</b>
<b>10. ANEXOS</b> .....	<b>58</b>

## RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado el estudio de sustancias con propiedades antioxidantes, con fines de buscar protección contra el daño al ADN. El vino tinto es una bebida obtenida de la uva tinta, dentro de sus componentes se han encontrado sustancias con propiedades antioxidantes tales como los polifenoles, los que han sido descritos como benéficos para la salud, ya que previenen de enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y del daño al ADN. Dentro de los polifenoles, ha llamado la atención la quercetina, por presentar un mayor potencial antioxidante comparado con los otros componentes del vino tinto. El objetivo de este estudio consistió en evaluar los efectos genotóxicos y citotóxicos de la administración de diferentes variedades de vino tinto Cabernet sauvignon, Merlot, Nebbiolo, Carménère y de la quercetina en el ratón *in vivo*. Se emplearon ratones hembra de la cepa CD-1 a las que se les trató, con vino tinto (75% y sin diluir) y quercetina (100 y 300 mg/kg). La ruta de administración del vino tinto fue vía oral (*ad libitum* o sonda), mientras que la quercetina por vía i.p. El efecto genotóxico fue evaluado con el análisis de las frecuencias de MN en sangre, así como el efecto citotóxico mediante la frecuencia de EPC respecto a ENC. En los resultados de este trabajo se observó que la administración por vía *ad libitum* de vino tinto diluido al 75% no incrementó la frecuencia de MN y que el vino tinto administrado por vía sonda sin diluir, tiene efecto marginal sobre la frecuencia de MN en los tratamientos donde el porcentaje de alcohol en el vino tinto era de 14.5%, lo que nos hacen suponer que, el daño al ADN observado es inducido por el tipo de tratamiento (agudo) y la vía de administración relacionado por la farmacocinética del contenido de etanol en el vino tinto. En la co-administración de vino tinto (*ad libitum* ó sonda) y 100 mg/kg de quercetina, se disminuyó la frecuencia de MN, excepto en los tratamientos con Cabernet sauvignon 2 y Merlot. La co-administración de dosis de 300 mg/kg de quercetina no incrementa la frecuencia de MN por lo que la quercetina presenta una dualidad mutágeno/antimutágeno, lo cual esta relacionado con las dosis. En cuanto a la citotoxicidad, la administración de vino tinto (75% y sin diluir) y de la quercetina (100 y 300 mg/kg) no modifican las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, lo cual podría ser indicativo de que bajo nuestras condiciones de trabajo los tratamientos administrados de las variedades de vino tinto Cabernet sauvignon, Merlot, Nebbiolo, Carménère y de la quercetina no presentan efectos citotóxicos.

## ÍNDICE DE ABREVIACIONES

<b>AC</b>	Aberraciones cromosómicas
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BaP</b>	Benzo(a)pirenos
<b>DIF</b>	Frecuencia diferencial de la inducción de MN
<b>EPA</b>	Enviromental Protection Agency
<b>EPC</b>	Eritrocitos policromáticos
<b>ENC</b>	Eritrocitos normocromáticos
<b>ERN</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ERO's</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>MN</b>	Micronúcleo (s)
<b>NA</b>	Naranja de acridina
<b>NIF</b>	Frecuencia neta de la inducción de MN
<b>OECD</b>	Organization for Economic Cooperation and Development

## 1. INTRODUCCIÓN

Las poblaciones humanas estamos expuestas a diferentes agentes genotóxicos, de ahí que recientemente se haya puesto especial atención en el estudio de los suplementos de la dieta, a partir de los estudios epidemiológicos donde se ha mostrado que existe una relación inversamente proporcional entre la incidencia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como lo son algunos tipos de cáncer y el consumo de vegetales (Peto *et al.*, 1981; Winn *et al.*, 1984; Ghosh *et al.*, 1991). En diversos estudios se han probado a los componentes de los vegetales y se ha podido observar que tienen propiedades antimutágenas y anticancerígenas, las cuales son conferidas principalmente por pigmentos como los beta-carotenos, los flavonoides, la clorofila y sus sales, así como por las vitaminas A, C, D y E (Steinmetz y Potter, 1996; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2001; Edenharder *et al.*, 2002; Lako *et al.*, 2006; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007). En el cuadro 1 se muestra un resumen de algunas sustancias componentes de la dieta humana, que han mostrado propiedades anticancerígenas y antimutágenas en diferentes ensayos de prueba.

Se ha observado en poblaciones humanas que cuando llevan una dieta rica en antioxidantes presentan bajas tasas de enfermedades cardiovasculares, baja inducción de cáncer, pocos casos de obesidad y tienen una alta esperanza de vida comparada con países que no llevan este tipo de dietas. De ahí que en el mediterráneo tengan un modelo distinto de mortalidad y morbilidad, ya que su dieta se caracteriza por la abundancia de verduras, hortalizas, frutas frescas, leguminosas y cereales; una cantidad variable, según la zona, de aceite de oliva, que es la principal grasa culinaria; un consumo moderado de vino tinto; algo de pescado; moderada ingesta de lácteos y baja de carnes. Los beneficios de la dieta mediterránea para la salud pueden ser consecuencia del óptimo balance entre los diferentes alimentos y componentes. Dicha dieta esta tradicionalmente basada en la “trilogía mediterránea”, formada por el trigo, el olivo y la vid (Carbajal y Ortega, 2001).

**Cuadro 1. Componentes de la dieta descritos como antimutágenos y anticancerígenos.  
(García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007)**

Sustancias protectoras de daños mutágeno ó cancerígeno	Principales fuentes alimenticias
o Vitamina A	Margarina, hígado
o Vitamina C	Cítricos
o Vitamina E	Aceites vegetales y harinas
o Flavonoides	Uva roja, vinos maduros
o Clorofila y sus Sales	Vegetales verdes
o Selenio	Carnes, huevos
o Organosulfuros	Ajo
o Antraquinona	Sábila
o Indol -3-carbinol	Crucíferáceas
o Capsaicina	Chile
o Fibra vegetal	Vegetales fibrosos (piña, melón, etc.)
o Beta carotenos	Vegetales rojos y amarillos (zanahoria, jitomate, etc.)

Diversos estudios epidemiológicos muestran que el consumo moderado de vino tinto tiene efectos benéficos en la salud humana. Serge Renaud presentó un estudio al que llamo “La paradoja francesa”, al analizar la dieta que tienen países como Francia y Estados Unidos (USA), él observó que a pesar de que los franceses consumían una cantidad de grasa parecida a los estadounidenses, el número de muertos a causa de enfermedades coronarias en Francia era 2.5 veces menor que en Estados Unidos, demostrando que la mortalidad provocada por enfermedades del corazón era inversamente proporcional al consumo de vino. Posteriormente, este hecho se corroboró al observar en otros países que al igual que en Francia tienen un consumo regular de vino tinto como Portugal, España e Italia, donde la incidencia de las enfermedades cardiacas son bajas en comparación con el Reino Unido o los países escandinavos, pero aún más con los países del resto del mundo que no acostumbraban en su dieta el vino tinto (Sandler y Pinder, 2003). Esto se debe a que el consumo de etanol (contenido alcohólico del vino tinto que oscila de 8% a 15% de etanol dependiendo de la variedad y la calidad), en concentraciones menores a

10g/día (una o dos copas diarias), licúa la sangre y reduce la tasa del colesterol perjudicial (LDL), además de incrementar la absorción intestinal de lípidos, favorece la disolución de cálculos renales e incluso puede ser utilizados como diurético (Longnecker, 1995; Aleixandre, 1997; German y Walzen, 2000; Maffei *et al.*, 2000 y 2002), por otra parte, se ha observado que impide la agregación de las plaquetas y con ello la formación de coágulos (Damianaki *et al.*, 2000; Rice-Evans y Packer, 2003; Dominé, 2004).

De igual manera, se ha observado que el consumo moderado de vino tinto mejora la función contráctil del ventrículo izquierdo y reduce la incidencia de trastornos de la conducción cardiaca. El proceso se limita al área isquémica, protegiendo la ultra estructura de las arterias coronarias, mejorando la circulación y previniendo la formación de trombos intravasculares, efectos antitrombóticos, disminución de las lesiones de reperfusión del miocardio, en el hígado inhibe la activación de las células estrelladas así como la producción de óxido nítrico, alterando vías de expresión de proteínas celulares (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

El vino tinto tiene un alto contenido de sustancias antioxidantes, las cuales evitan en gran medida la oxidación, particularmente en los vasos sanguíneos y en células del cerebro, de ahí que se le asocie con en el tratamiento del cáncer y Alzheimer, además de que se le ha propuesto que contribuye a la longevidad (Damianaki *et al.*, 2000; Rice-Evans y Packer, 2003; Dominé, 2004).

## 1.1. Vino tinto

El vino es una bebida alcohólica proveniente de diversas variedades de la uva del género *Vitis vinífera*. Existen diversos tipos de vino como lo son; el tinto, el blanco, el rosado y el espumoso (Aleixandre, 1997). A lo largo de la historia el vino tinto se ha utilizado como estimulante y medicamento, el desarrollo vinícola surge a la par de la civilización europea específicamente en la zona mediterránea hace más de 6000 ó 7000 años, elaborándolo a partir de uvas silvestre, que junto con el olivo y la higuera fueron de las primeras plantas en ser cultivadas y aprovechadas por el hombre (Rice-Evans y Packer, 2003; Dominé, 2004).

Se ha descrito que el vino tinto contiene más de mil sustancias; las vitaminas, los minerales, el azúcar y el agua proceden directamente de las uvas, mientras que, el etanol y la glicerina se forman durante la vinificación (Cuadro 2) (Dominé, 2004).

**Cuadro 2.-Componentes del Vino. (Modificado de German y Walzem, 2000).**

Componentes	Concentración (g/100 ml)
• Agua	80-90
• Carbohidratos	
Glucosa	0.05-0.1
Fructuosa	0.05-0.1
Pentosas	0.08-0.2
Pectina	Trazas
Inositol	0.03-0.050
Fucosa	0.0005
• Alcoholes	
Etílico	8.0-15.0
Otros	0.3-0.19
• Glicerol	0.30-1.40
• Aldehídos	0.001-0.050
• Ácidos orgánicos (tartárico, láctico, acético, cítrico, etc.)	0.3-1.10
• Compuestos Nitrogenados (amino, amida, amonio, etc.)	0.01-0.09
• Componentes Minerales (potasio, magnesio, calcio, sodio, etc.)	0.15-0.40
• Componentes Ácidos fenólicos y polifenoles (flavonoides)	0.09-0.25
• Vitaminas (A, B y algunos de sus complejos, C, E, etc.)	Trazas

Dentro de los componentes del vino tinto se encuentran los ácidos fenólicos y los polifenoles estos últimos han sido los más estudiados por su potencial antioxidante que les confieren propiedades anticancerígenas y antimutágenas (Damianaki *et al.*, 2000; German y Walzen, 2000; Tedesco *et al.*, 2000). Los polifenoles más estudiados son las catequinas, la quercetina, el resveratrol y la apigenina (Cuadro 3), ya que en diversos estudios se ha observado que inhiben el crecimiento celular de líneas tumorales, además de que capturan radicales libres (Rice-Evans *et al.*, 1996; Rice-Evans y Packer, 2003; Valko *et al.*, 2006).

**Cuadro 3. Ácidos fenólicos y polifenoles que se encuentran en el vino tinto y vino blanco. (Modificado de German y Walzem, 2000).**

Componentes	Concentración (mg/L)	
	Vino Tinto	Vino Blanco
Polifenoles	750-1060	25-30
Flavonoles	98(10-203)	Trazas
Quercetina	18.8 (5-53)	0
Miricetina	16.2 (2-45)	0
Camemferol	18	0
Rutina	6.8 (0.5-10.8)	0
Catequina	168 (48-440)	15-30
Epicatequina	89(27-191)	17.3 (3-35)
Procianidinas	57.3 (21.4-128)	13.6 (2,18.9,21)
Antocianinas	281(20-500)	0
Delfinidina 3-monoglucosido <sup>c,d</sup>	22	0
Cianidina 3-monoglucosido <sup>c,d</sup>	20(2.8,38)	0
Petunidina 3-monoglucosido <sup>c,d</sup>	18	0
Peonidina 3-monoglucosido <sup>c,d</sup>	32	0
Malvidina 3-monoglucosido <sup>c,d</sup>	93(24-170)	1
Ácidos fenólicos	240-500	160-260
Ácidos hidroxibenzoicos	0-260	0-100
ácido hidroxibenzoico <sup>d</sup>	20	-
ácido gálico	116(26-320)	1.4
Total de galatos	40(30-59)	7(6.8, 7.0)
ácido salicílico	-	-
ácido sinigico	5(4.2-5.9)	-
ácido protocatecúrico	88	-
Ácido hidroxicinámico	162(62-334)	130-154
cis/trans-cutárico	20(16-24)	1.8
cis/trans-caftárico	25(11-47)	5(5,3)
ácido caféico <sup>b</sup>	8.5(3-18)	2.8
ácido cumarico <sup>b</sup>	12.6(7.5-22)	1.5(1-2)
ácido ferúlico <sup>b</sup>	19	-
Estilbenes	12.3 (4-19)	1.8 (0.04-3.5)
Trans-resveratrol	1.0 (0.1-2.3)	0.22 (0.003-2)
Total de ácidos fenólicos y polifenoles	1200(900-2500)	200(190-290)

a. Los valores tabulados están en miligramos por litro con valores variados a partir de 45,54, 56,96, 103, 107, 125, 154, 160, 171-173, 185. No todos los autores reportan todos los compuestos o clases de compuestos, los valores fueron calculados en base los datos disponibles.

b. También presenta trazas de esteres.

c. Presencia de diésteres con acetato

d. presencia de diésteres con p-



### **1.1.1. Variedades de vino tinto**

La diversidad de vinos se debe a la gran variedad de tipos de uva que existen en el mundo, dentro de los que contienen más antioxidantes se encuentran las variedades:

#### **a) Cabernet sauvignon**

La Cabernet sauvignon es la variedad tinta con mayor éxito en el mundo, fue desarrollada en Burdeos y dada a conocer ha finales del siglo XVIII principios del XIX. Sus frutos son muy oscuros, pequeños y de piel gruesa. Produce vinos ásperos a causa de sus taninos densos y color rojo sombrío con una nota violácea profunda, brillante e intenso; sus complejos aromas frutales como moras y ciruelas, que se complementa con notas suaves de chocolates y vainilla (Dominé, 2004; Rolland, 2008).

#### **b) Merlot**

Merlot es una variedad de vid tinta, el racimo es cilíndrico, pequeño y poco denso de grano menudo, de piel bruñida, pulpa dulce y color negro azulado. Es originario de la región de Burdeos, donde es la variedad más cultivada con regularidad en la región de Médoc desde el siglo XIX. El nombre procede del diminutivo francés de mirlo probablemente por la similitud con su plumaje negro, se caracteriza por su finura y suavidad, sin dejar de ser aromático y carnoso, es de color rubí muy intenso, de graduación mediana y envejece rápidamente sin perder calidad (Dominé, 2004; Rolland, 2008).

#### **c) Nebbiolo**

La variedad de uva tinta clásica Nebbiolo, es originaria de los valles de Piamonte, al noroeste de Italia, donde se cultiva casi en exclusividad a excepción de unos pocos viñedos en Chile, Argentina y Australia. Sus bayas son oscuras, de maduración muy tardía, ovoides, con una piel bastante gruesa y una fuerte acidez, siendo el racimo alargado y no muy apretado. Los vinos obtenidos con esta variedad poseen un elevado grado alcohólico (superior al 13% de alcohol), contiene abundantes taninos,

marcada acidez, un color ladrillo. El nebbiolo joven posee aroma afrutado como de cereza y ciruelas, así como a violetas y cuando madura desarrolla aromas de alquitrán, aceite, trufas y humo (Dominé, 2004; Rolland, 2008).

#### **d) Carménère**

Es una variedad que se considera originaria de la región de Médoc en Burdeos, Francia, fue ampliamente cultivada a principios del siglo XIX. En el año 1860 los viñedos franceses fueron atacados por la filoxera, que es una plaga de la vid que afecta la raíz y las hojas. Esta plaga extinguió la variedad de todas las viñas francesas y europeas, las que paulatinamente comenzaron a reemplazarla por otras cepas menos sensibles como el Merlot (Boubals, 1993).

En el año 1994 la variedad Carménère es redescubierta en Chile, por el ampelógrafo francés Jean-Michel Boursiquot, quien señaló que algunas parras de Merlot tardaban más en madurar. Al realizar los estudios concluyeron que se trataba de la antigua variedad de *Bordeaux Carménère* que había sido introducida aproximadamente en 1850. Actualmente la mayor concentración territorial dedicada al cultivo de esta variedad se encuentra en los valles centrales de Chile. Con esta variedad se obtiene un vino de cuerpo medio se distingue por un color rojo profundo, aroma donde sobresalen notas verdes como el pimentón. En su sabor se encuentra el chocolate, frutas rojas, bayas y especias. Sus taninos son más amigables y suaves que los del Cabernet sauvignon. Sus notas vegetales lo hacen menos elegante que un Merlot (Campbell, 2005).

## 1.2. Polifenoles

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (Rice-Evans y Packer, 2003; Arts y Hollman, 2005). Los factores que modifican la calidad y concentración de los polifenoles en el vino dependen de la variedad de uva, tipo de vino, clima, área de producción, técnicas agrarias, cosecha (temprana o tardía), proceso de vinificación, etc. Entre las variedades de uvas con mayor contenido de antioxidantes flavonoides se encuentran: Cabernet sauvignon, Rioja, Merlot y Nebbiolo (Aleixandre, 1997; Leighton *et al.*, 1997; Zúñiga, 2005). Los componentes antioxidantes provienen principalmente de las uvas tintas, en particular de su piel u hollejo. Los polifenoles son generalmente subdivididos en taninos hidrolizables, que son ésteres de ácido gálico de glucosa y azúcares; y fenilpropanoides, como la lignina, flavonoides y taninos condensados (Rice-Evans y Packer, 2003; Arts y Hollman, 2005).

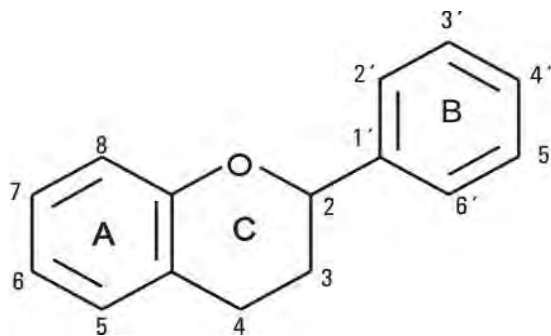
## 1.3. Flavonoides

Los flavonoides fueron descubiertos en 1930 por Sent-György cuando aisló la citrina de la cáscara de limón que regulaba la permeabilidad de los capilares (Singleton, 1981), son constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Actualmente se han identificado más de 5,000 flavonoides diferentes y el valor medio de ingesta debe ser de 1g/día (Hollman y Katan, 1999; Martínez-Flores *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006).

La capacidad antioxidante de los flavonoides se debe a su estructura química básica (Fig.1) que es una molécula difenilo unida por tres átomos de carbono heterocíclicos unidos por un grupo oxi, contiene un número variable de grupos hidroxilo fenólicos unidos a los anillos que dependiendo de su posición dan nombre a los diversos

subcompuestos de los flavonoides y son los que posiblemente le confieren su capacidad antioxidante mediante la donación de electrones o átomos de hidrogeno para estabilizar a los radicales libres. Los flavonoides cuentan con excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición (Rice-Evans *et al.*, 1996; Oak *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2006).

Durante el metabolismo de los flavonoides es excretada una parte importante por la orina, mientras que la parte restante es transformada en el hígado (por medio de acciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares) y en el colon (mediante reacciones de biotransformación de fase II) (Rimm *et al.*, 1996).



**Figura 1. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración (Valko *et al.*, 2006).**

En estudios realizados en médula ósea de ratón *in vivo*, se ha observado que la administración de extractos de flavonoides (0.5 ml) obtenidos de plantas naturales, disminuye la frecuencia de micronúcleos (MN) y de aberraciones cromosómicas (AC) inducidas mediante la administración de benzo(a)pirenos (BaP) (150 mg/kg). De igual manera, en estudios *in vitro* empleando cultivos celulares humanos se ha observado que pueden proteger del estrés oxidativo mediado por el *tert*-butil hidroperóxido y el peróxido (Damianaki *et al.*, 2000; Edenharder *et al.*, 2003; Alía *et al.*, 2006).

Particularmente, en estudios *in vitro* se ha observado que la quercetina, las catequinas y el resveratrol inhiben el crecimiento y el desarrollo de células tumorales del estomago, colon, próstata, glándulas mamarias y ovario (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Soleas *et al.*, 2002; Greenrod *et al.*, 2005; Zhanataev *et al.*, 2008). También en experimentos *in vivo* empleando ratones a los que se les indujo la formación de tumores mediante la administración de dimetil sulfoxido y acetona, se les trató con dosis de flavonoides en rangos de 1 a 25  $\mu$ moles durante 18 semanas y se observó que se presentaba una reducción del tamaño entre el 50 y el 90% de los tumores (Ferry *et al.*, 1996; Soleas *et al.*, 2002).

#### **1.4. Quercetina**

A pesar de que en el vino tinto las catequinas se presentan en mayor concentración que la quercetina, esta última es la que tiene un mayor potencial antioxidante (Hollman y Katan, 1999; Martínez-Flores *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006). En diversos estudios realizados con ratones tanto *in vitro* (células de hígado y células rectales), como *in vivo* (médula ósea y sangre periférica), se ha observado que la quercetina disminuye la frecuencia de AC inducidas por ciclofosfamida, además de que facilita la expresión de proteínas en el hígado (Tedesco *et al.*, 2000; Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Zhanataev *et al.*, 2008).

Particularmente, la quercetina se esta empleando en estudios clínicos, en los que inhibe la actividad de la tirosin-cinasa en linfocitos de pacientes que presentaban cáncer, sin embargo, algunos de los pacientes desarrollaron nefrotóxicidad después de la administración de quercetina por lo que aún está en estudios (Ferry *et al.*, 1996).

## 1.5. Mecanismo de protección de los flavonoides

El mecanismo de protección antimutágena y anticancerígena de los flavonoides está relacionado con su potencial antioxidante, debido a que los grupos funcionales de sus anillos juegan un papel fundamental en la actividad. Se puede observar que los grupos hidroxilos en la posición 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, muestran actividad en la captura de radicales (Fig.2 a). Cuando los grupos hidroxilos se colocan en el anillo B, resulta una elevada actividad y estabilidad a la molécula cuando actúa en un sitio preferido para los metales traza o al deslocalizar un electrón (Fig.2 b). Y el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 a la par del grupo 4-oxo en el anillo C amplía la capacidad de captura de radicales y al sustituir el hidroxilo en esta posición disminuye dicha actividad (Fig.2 c). (Soobrattee *et al.*, 2005 y Balasundram *et al.*, 2006).

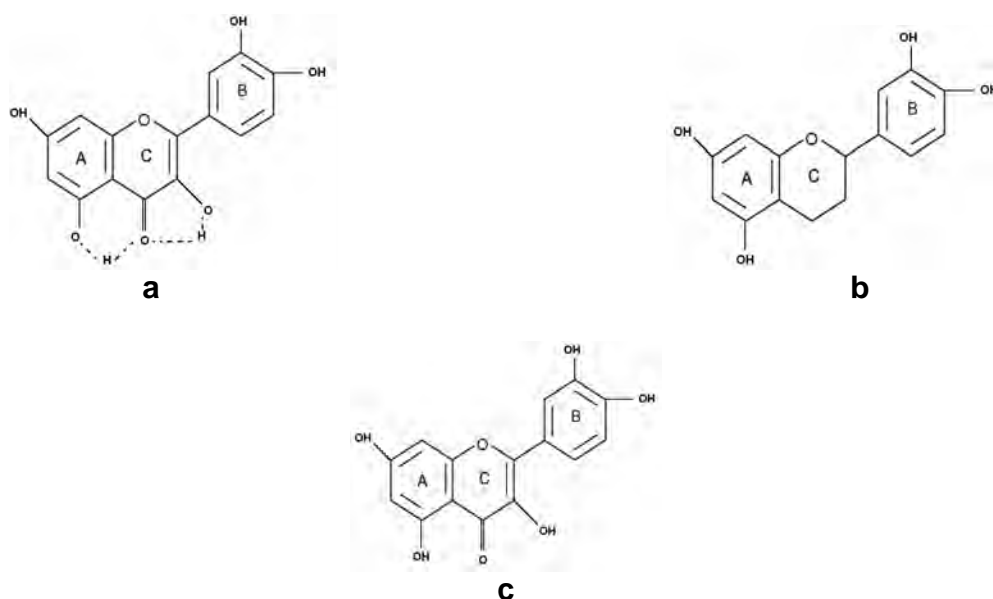


Figura 2. Grupos estructurales en la captura de radicales libres (Soobrattee *et al.*, 2005).

## **1.6. Agentes inductores del daño al ADN**

Se ha considerado que uno de los mecanismos del daño al ADN es a partir de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) y nitrógeno (ERN), el cual puede ser generado tanto por fuentes endógenas como exógenas. Cuando se rebasa el mecanismo de control antioxidante de los radicales libres y ERO's en la célula, el potencial redox cambia su estado de estrés oxidativo, lo que incrementa el daño potencial hacia el ADN, los lípidos y las proteínas (Klaunig y Kamendulis, 2004). Las principales especies reactivas son: superóxido, óxido nítrico, y el radical hidrófilo este último uno de los más reactivos (Bagchi *et al.*, 2002). Cuando el ADN es dañado y no es reparado ocurre una mutación, a la acumulación de mutaciones se le ha relacionado con la inducción de cáncer (Klaunig y Kamendulis, 2004).

### **1.6.1. Etanol**

Estudios científicos muestran que un exceso de bebidas alcohólicas puede ser perjudicial, además de que no todas actúan de forma tan positiva como el vino tinto en el cuerpo humano (Damianaki *et al.*, 2000; German y Walzen, 2000; Rice-Evans y Packer, 2003; Dominé, 2004; Greenrod *et al.*, 2005). El alcohol etílico en concentraciones mayores a 120g/día puede inducir daño genotóxico, por lo que el consumo excesivo de alcohol etílico puede inducir cáncer de estómago, pancreatitis, cirrosis hepática, anemia hemolítica, síndrome de Wernicke-Korsakoff, esclerosis, demencia alcohólica, ataques cerebro vasculares entre otras alteraciones (Longnecker, 1995; Aleixandre, 1997; German y Walzen, 2000; Maffei *et al.*, 2000 y 2002; Streissguth y Bonthius, 2005; Téllez y Cote, 2006; Chao *et al.*, 2008). Recientemente se ha demostrado que el abuso de alcohol puede ocasionar pérdida de cromosomas en humanos, mostrando un incremento significativo en la frecuencia de MN mediante pruebas de hibridación *in situ* con fluorescencia (Maffei *et al.*, 2000).

## **1.7. Evaluación del daño al ADN**

Los ensayos de prueba para detectar daño al ADN se agrupan con base al tipo de alteración (Bender, 1980; Cole y Skopek, 1994; Hemmink *et al.*, 1994). Para evaluar daño genotóxico se recomienda iniciar con ensayos de tamizaje como lo son los de mutaciones (bacterias; prueba de AMES); ensayos *in vitro* empleando células de mamíferos (frecuencia de AC) e *in vivo* empleando médula ósea o sangre periférica (frecuencia de MN) (Mavournin *et al.*, 1990; Müller *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2000).

### **1.7.1. Micronúcleos**

Dentro de los ensayos para evaluar el daño al ADN la técnica de MN ha sido recomendada por diversas agencias reguladoras tales como Environmental Protection Agency (EPA), International Agency for Research on Cancer (IARC) y Food and Drugs Administration (FDA) (Mavournin *et al.*, 1990; Müller *et al.*, 1999). La técnica de MN fue desarrollada por Schmid y Boller en 1970. Detecta daño citogenético asociado con la frecuencia de AC, ya que evalúa el daño en cromosomas enteros o en fragmentos, además de que puede ser auxiliar en la evaluación del daño citotóxico. Los MN son pequeños cuerpos de cromatina que se originan de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que no se incorporan dentro del núcleo después de la mitosis, identificándose en el citoplasma como pequeños núcleos adicionales (Von Ledebur y Schmid, 1973; Hayashi *et al.*, 2000).

Los MN se originan en alguno de los siguientes eventos: AC que conllevan a la formación de fragmentos acéntricos (daño clastógeno) ó daño a nivel de proteínas involucradas directa o indirectamente en la segregación de cromosomas, esto incluye inhibición en el ensamble o desensamble de microtubulos, remoción de cinetocoros, daños al centríolo, centrómero inactivado (daño aneuploidógeno) (Fenech y Crott, 2002; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).



Los MN pueden ser evaluados en diferentes tipos celulares como: mieloblastos, mielocitos, eritrocitos de médula ósea o en eritrocitos de sangre periférica de ratón, células de linfocitos binucleadas inducidas por citocalacina B, también en células uroteliales y exfoliadas de mucosa bucal y nasal (Von Ledebur y Schmid, 1973; Heddle *et al.*, 1983).

Los MN pueden ser fácilmente detectados, ya que son de forma redonda con un diámetro de alrededor de 1/20 a 1/5 de un eritrocito. Un incremento en la frecuencia de MN en animales tratados con agentes químicos, indica que estos agentes son inductores de daño cromosómico (Mavournin *et al.*, 1990; Hayashi *et al.*, 2000). En las células eritroides se distingue claramente a los eritrocitos jóvenes y maduros. Los eritrocitos policromáticos (EPC, eritrocito joven), todavía contienen ARN, son basófilos y el núcleo principal es expulsado, si un MN se ha formado permanece en el citoplasma anucleado. Los EPC con el tiempo pierden el ARN y se convierten en eritrocitos normocromáticos (ENC, eritrocito maduro), más pequeños que los EPC y son acidófilos (Von Ledebur y Schmid, 1973; Hayashi *et al.*, 1990).

La presencia de MN indica que hubo daño cromosómico, pero no de que tipo, ni que cromosomas estuvieron involucrados, por lo que es evidente que la información obtenida por la técnica de MN es menor que la lograda mediante el método tradicional de AC. A pesar de ello, la técnica de MN posee la ventaja de que las características de los MN están bien definidas, lo que reduce el tiempo de observación, ya que permite contabilizar mayor cantidad de células en el mismo intervalo de tiempo, aumentando la confiabilidad del análisis estadístico de la prueba. La técnica de MN esta sujeta a menor posibilidad de errores de manipulación comparada con la de AC, donde la cantidad de metafases de buena calidad limita su estudio y existe una correlación de alrededor del 88% entre los resultados obtenidos con AC y MN cuando se usan para analizar los mismos agentes genotóxicos.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a sus componentes (principalmente los flavonoides) el vino tinto presenta una alta capacidad antioxidante, que le confiere propiedades de protección contra enfermedades crónicas originadas por el estrés oxidativo, entre las que se pueden incluir las relacionadas con el daño al ADN. La quercetina es uno de los flavonoides que se presenta en mayor concentración en el vino tinto y ha mostrado un mayor potencial antioxidante, en diversos estudios se ha observado que protege del daño genotóxico inducido por BaP ya que disminuye la frecuencia de MN y AC, además de que es capaz de inhibir al crecimiento y desarrollo de células tumorales de algunos tipos de cáncer como el de estomago, colon, próstata, glándulas mamarias y ovario. Por lo anterior, resulta interesante estudiar los efectos de la administración de diferentes variedades de vino tinto con un alto contenido de flavonoides (vía oral; sonda y *ad libitum*) y de la quercetina.

### **3. HIPÓTESIS**

Si se ha encontrado que el vino tinto y la quercetina, uno de sus principales flavonoides que lo componen, tienen propiedades antioxidantes y protegen del daño genotóxico clastógeno originado por agentes como los BaP y las aminas heterocíclicas. Por otra parte, el vino tinto tiene un contenido de alcohol etílico (8-15%) el cual a dosis mayores de 120g/día induce daño genotóxico, entonces si se administran a ratones dosis menores a las reportadas como genotóxicas para el etanol de diferentes variedades de vino tinto con alto contenido de flavonoides por diferentes vías se espera que no induzca MN.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Estudiar los efectos genotóxicos y citotóxicos de las variedades Cabernet sauvignon, Merlot, Nebbiolo, Carménère de vino tinto y de la quercetina sobre el daño al ADN administrados por diferentes vías en ratones de la cepa CD-1

### 4.2. Objetivos Particulares

- ❖ Evaluar el efecto genotóxico de diferentes variedades de vino tinto (Cabernet sauvignon, Merlot, Nebbiolo y Carménère) administrados vía oral (sonda y *ad libitum*), mediante la evaluación de la frecuencia de MN en sangre periférica de ratón.
- ❖ Evaluar el efecto genotóxico de la co-administración de la quercetina administrada vía i.p. y de diferentes variedades de vino tinto (Cabernet sauvignon, Merlot, Nebbiolo y Carménère) administrados vía oral (sonda y *ad libitum*), mediante la evaluación de la frecuencia de MN en sangre periférica de ratón.
- ❖ Evaluar el efecto citotóxico de diferentes variedades de vino tinto (Cabernet sauvignon, Merlot, Nebbiolo y Carménère) administrado vía oral (sonda y *ad libitum*), mediante la evaluación de la frecuencia de EPC respecto a los ENC en sangre periférica de ratón.
- ❖ Evaluar el efecto citotóxico de la co-administración de la quercetina administrada vía i.p. y de diferentes variedades de vino tinto (Cabernet sauvignon, Merlot, Nebbiolo y Carménère) administrados por vía oral (sonda y *ad libitum*), mediante la evaluación de la frecuencia de EPC respecto a ENC en sangre periférica de ratón.

## **5. MATERIAL Y MÉTODO**

### **5.1. Animales**

Se emplearon ratones hembras de CD-1 de entre 45 y 60 días de edad, con un peso de 28 a 35 gramos, los cuales fueron obtenidos del Laboratorio Harlan de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), los cuales fueron aclimatados por dos semanas en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM), los cuales se mantuvieron en cajas de plástico y se alimentaron con nutrícubos (Purina), con libre acceso al agua y bajo condiciones ambientales de temperatura y circulación de aire controladas, así como períodos de luz-oscuridad 12-12 horas.

### **5.2. Reactivos**

Al menos que este indicado, todos los reactivos empleados en el estudio fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Colorante Naranja de Acridina (NA) [CAS No. 10127-02-3]; Quercetina dihidratada, [CAS No. 117-39-5]; Etanol: solución diluida al 14.5%.

Las variedades de vino tinto que se emplearon en el estudio son:

- 1.-Cabernet sauvignon. Cosecha 2006 obtenida del Valle de Calafía, Baja California.
- 2.-Cabernet sauvignon. Cosecha 2005 obtenida del Valle de Guadalupe, Baja California.
- 3.-Cabernet sauvignon y Nebbiolo. Cosecha 2005 obtenida del Valle de Calafía, Baja California.
- 4.-Merlot. Cosecha 2005 obtenida del Valle de Guadalupe, Baja California.
- 5.-Carménère. Cosecha 2007 obtenida del Valle de Rapel, Chile. Ésta última denominada como histórica debido a sus propiedades organolépticas.

### **5.3. Tratamientos**

Todos los tratamientos de quercetina se aplicaron vía intraperitoneal (i.p.), mientras que los de vino tinto se administraron por vía oral sonda y *ad libitum* (indicado en los protocolos), el etanol se administró por vía oral sonda. Los grupos testigos fueron tratados únicamente con el vehículo (agua potable embotellada) por vía sonda y vía *ad libitum*. Cada grupo fue conformado por 5 ratones hembras de acuerdo a los lineamientos para pruebas de genotoxicidad de la FDA, EPA y la IARC. La quercetina fue preparada en una solución de agua inyectable, una vez preparado el reactivo se administró inmediatamente en volúmenes de alrededor de 0.25 ml. El vino tinto que fue administrado por sonda fue sin diluir mientras que el administrado *ad libitum* fue diluido con agua potable embotellada (75%), la solución fue preparada en proporciones de 3:1.

### **5.4. Establecimiento de las dosis del vino tinto y quercetina**

Se realizaron estudios preliminares en los que se probaron diferentes dosis de vino tinto en cuanto al volumen y la concentración, así como la vía de administración. La dosis de quercetina que fue administrada (100 y 300 mg/kg de peso corporal) se basó en los resultados de estudios previos del laboratorio, donde se observó que la administración de quercetina en dosis de 625 mg/kg de peso corporal administrada por vía i.p. a ratones de la cepa CD-1, incrementaba de manera marginal la frecuencia de MN (Mateos Nava, 2007).

## 5.5. Tiempos de evaluación

### 5.5.1. Genotoxicidad y citotoxicidad

Una vez que fue establecida la dosis vino tinto y quercetina, así como las condiciones de trabajo, fue evaluado el daño genotóxico mediante la frecuencia de MN y la citotoxicidad mediante la frecuencia de EPC con respecto a la de ENC.

A los ratones se les administro 0.20 ml de vino tinto vía oral sonda en un tiempo considerado como hora 0 y a partir de ese momento se tomaron muestras cada 24 horas hasta la hora 72. En los tratamientos de vino tinto diluido al 75%, la administración se llevo acabo vía oral *ad libitum* y el vino fue sustituido cada 12 horas para evitar la oxidación (Fig. 3 Protocolo I).

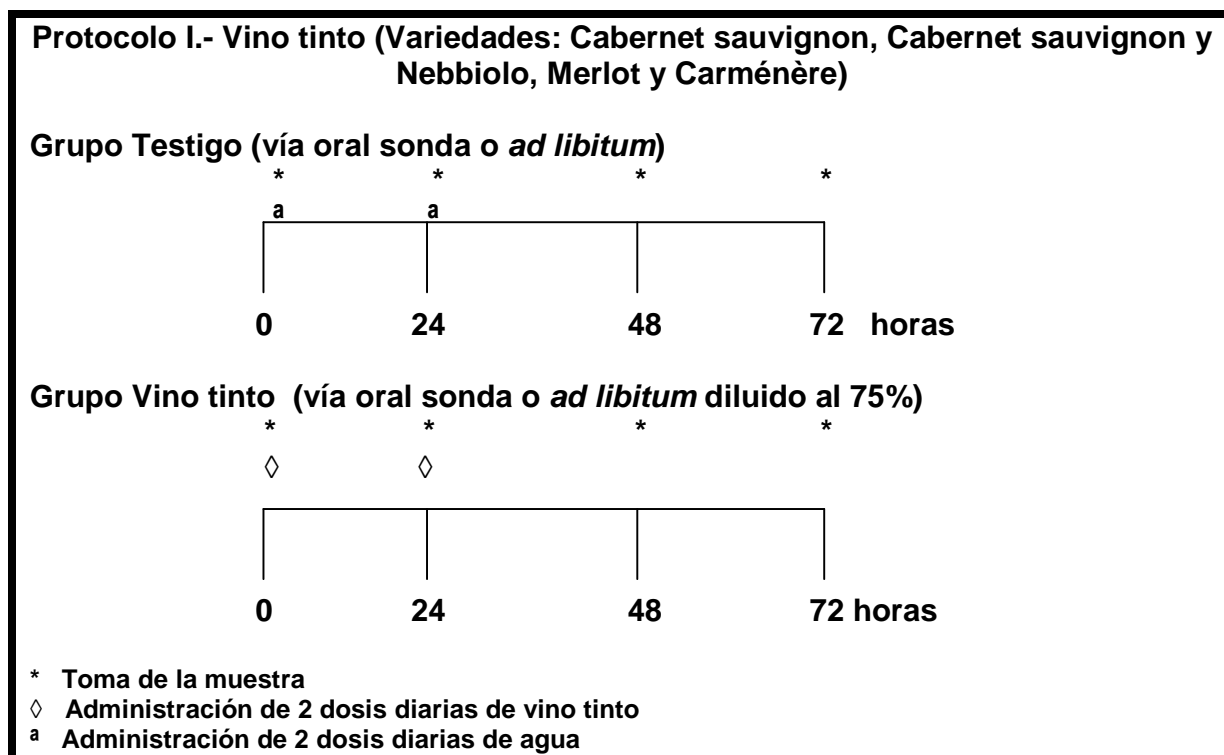


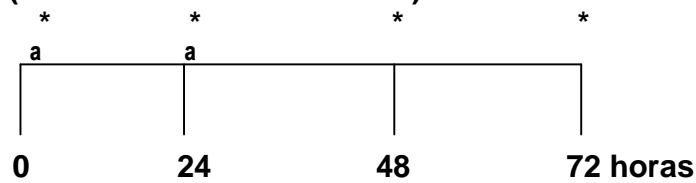
Figura 3. Protocolo para la administración de vino tinto vía sonda ó *ad libitum* diluido al 75%.

En los co-tratamientos de vino tinto y quercetina, la administración de vino tinto fue vía oral (sonda, 0.20 ml cada 12 horas hasta las 36 horas) y en la hora 48 después de iniciado el tratamiento con vino tinto fue administrada una sola dosis de quercetina vía i.p (100 mg/kg o 300 mg/kg). Para los grupos tratados con vino tinto *ad libitum*, el vino fue diluido al 75% con agua potable embotellada, al igual que en el anterior tratamiento la quercetina fue administrada en una sola dosis por vía i.p., en la hora 48 después de iniciado el tratamiento con vino tinto (Fig. 4 Protocolo II).

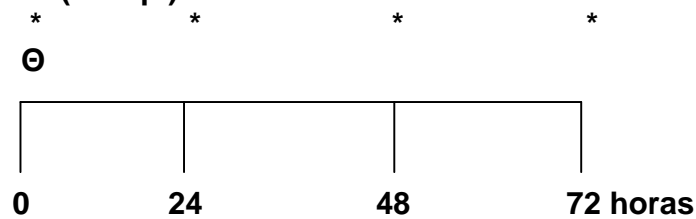


**Protocolo II.- Vino tinto (Variedades: Cabernet sauvignon, Cabernet sauvignon y Nebbiolo, Merlot y Carménère) más Quercetina**

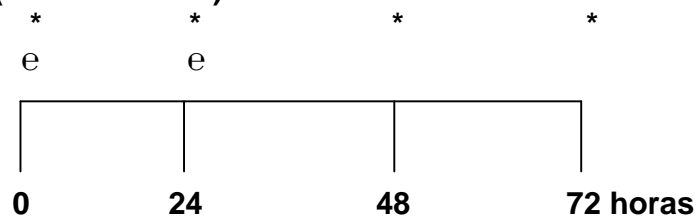
**Grupo Testigo (vía oral sonda o *ad libitum*)**



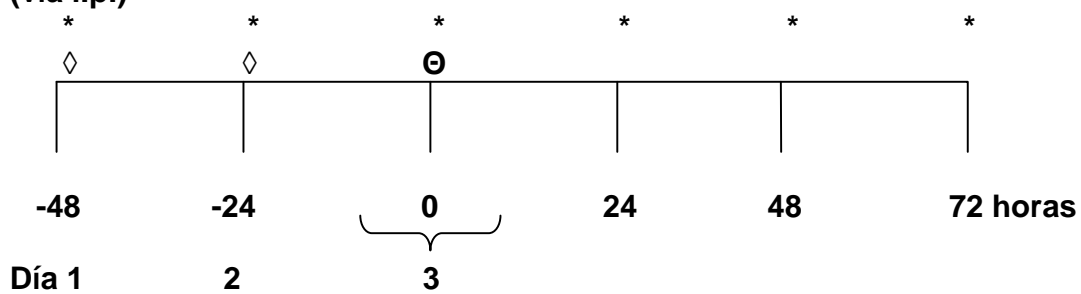
**Grupo Quercetina (vía i.p.)**



**Grupo Etanol (vía oral sonda)**



**Grupo Vino tinto (vía oral sonda o *ad libitum* diluido al 75%) más Quercetina (vía i.p.)**



- \* Toma de la muestra
- ◇ Administración de 2 dosis diarias de vino tinto
- <sup>a</sup> Administración de 2 dosis diarias de agua
- Θ Administración de 1 dosis Quercetina (100 mg/kg ó 300 mg/kg)
- <sup>e</sup> Administración de 2 dosis diarias de etanol 14.5%

**Figura 4. Protocolo para la administración de vino tinto vía sonda ó *ad libitum* diluido al 75% más quercetina.**

## **5.6. Evaluaciones**

### **a) Preparación de láminillas**

Se prepararon laminillas teñidas con NA, las cuales se realizaron previamente a la toma de las muestras. La solución de NA fue preparada en una solución con agua desionizada (1 mg/ml), de la cual se colocaron 10µl en un portaobjetos precalentado (70°C), se distribuyó uniformemente el colorante en la laminilla y se dejó secar a temperatura ambiente. Las laminillas se almacenaron en la oscuridad hasta su uso (Hayashi *et al.*, 1990).

### **b) Toma de muestras**

Para la evaluación del daño genotóxico y citotóxico se obtuvieron las muestras de sangre periférica de los ratones, realizando un pequeño corte en la punta de la cola con la ayuda de unas tijeras, se colocaron de 5 a 15µl de sangre (equivalentes de 1 a 3 gotas de sangre), al centro de las laminillas previamente preparadas con NA, de inmediato se colocó un cubreobjetos (24x50mm) y fueron selladas (Fig. 5). Las preparaciones fueron guardadas en cajas de plástico y en oscuridad, a una temperatura de 4°C. El análisis de las preparaciones se realizó después de 24 horas de haber sido preparadas, procurando no exceder de 8 días. En cada toma de muestras se realizaron dos laminillas por cada organismo.

La toma de muestras en todos los tratamientos se realizó cada 24 horas a partir de la hora 0 hasta llegar a la hora 72 después de la aplicación de cada uno de los tratamientos.

### **c) Evaluación de laminillas**

Las evaluaciones se realizaron en los eritrocitos de las muestras de sangre, en el microscopio de fluorescencia (luz azul) con filtro de luz amarilla (Nikon OPTIPHOT-2). La tinción que se obtuvo con la NA, permitió diferenciar a los ENC de los EPC, ya que estos últimos se tiñeron de color rojo debido al ARN-ribosomal. También con esta tinción se pudo identificar la presencia de MN ya que el ADN se teñía de color

amarillo fluorescente. Para la evaluación del daño citotóxico se cuantifico la frecuencia de EPC respecto a los ENC de 1000 eritrocitos totales. En la evaluación del daño genotóxico se cuantifico la frecuencia MN respecto de los EPC analizando 2000 eritrocitos totales (Hayashi *et al.*, 2000).

## **5.7. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de la frecuencia de MN y la frecuencia de EPC fueron analizados en el paquete estadístico SPSS/PC V13 <sup>TM</sup>. Los resultados se presentan en una media  $\pm$  desviación estándar, que fueron comparadas mediante un análisis de varianza de una sola dirección, seguida de una prueba de Tukey o Dunnett que dependía de la homogeneidad de varianzas.

Para la inducción de MN se calculo la Frecuencia de Inducción Neta de MN (NIF por sus siglas en inglés) para descartar la inducción espontánea que obtengan los grupos a la hora 0 ya que no se le había aplicado ningún tratamiento y la Frecuencia de inducción diferencial de MN (DIF por sus siglas en inglés) lo que permitió descartar la posibilidad de que el efecto a observar fuera producto de la manipulación, restando la inducción que hay en el grupo testigo. El NIF y DIF se analizaron con una Chi-cuadrada. En todos los casos se considero un nivel de significancia de  $p < 0.05$  (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001).

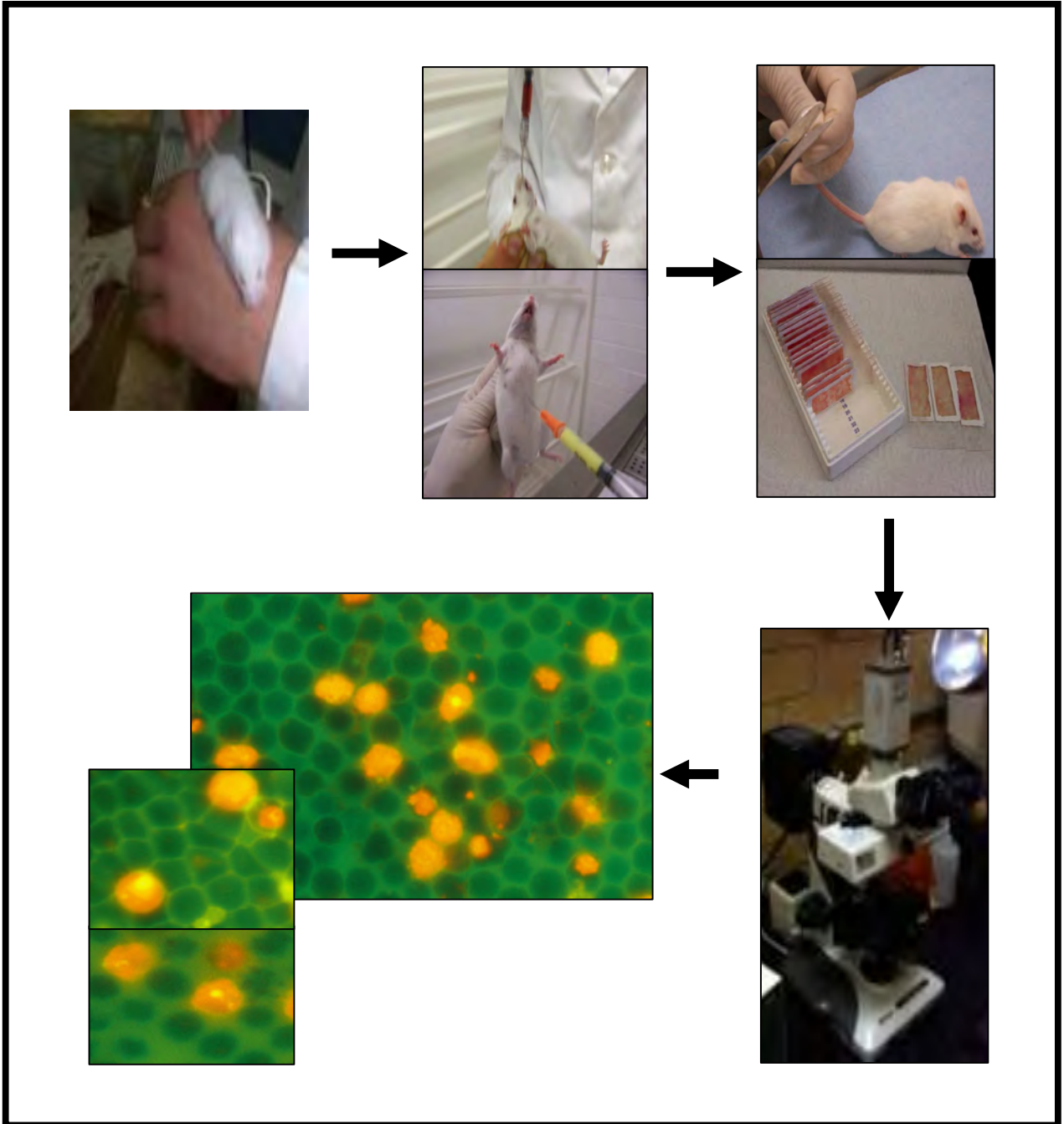


Figura 5. Administración de tratamientos, toma de muestras y evaluación de MN.

## 6. RESULTADOS

Antes de iniciar con las evaluaciones de genotoxicidad y citotoxicidad se realizó un estudio preliminar para evaluar en los organismos algunos signos de toxicidad general después de la administración del vino tinto. De igual manera, se cuantificó el consumo diario y el comportamiento de los ratones al “sabor” de las diferentes variedades del vino tinto. En el cuadro 4 se muestra los resultados del este estudio preliminar, en donde se puede observar que en cuanto a la apariencia, actividad y conducta en general no se presentaron cambios al comparar los grupos tratados con vino tinto con los testigos. En estas evaluaciones se consideraron aspectos como la apariencia del pelaje, la hidratación, el equilibrio, conducta, actividad y signos como vómito y diarrea. Con respecto a la apariencia de la orina y las heces, se observó que eran normales salvo que en los tratamientos con la variedad de vino Carménère y Merlot las heces se oscurecieron. En cuanto a la respuesta al consumo del vino, se observó que el promedio diario por grupo no se modifica significativamente con respecto al consumo de agua del grupo testigo, aunque los grupos tratados con las variedades Cabernet sauvignon 1, Merlot, Cabernet sauvignon y Nebbiolo presentaron desagrado al sabor del vino.

### 6.1. Evaluación de MN en grupos tratados con vino tinto diluido al 75% administrado vía *ad libitum*

Una vez evaluados los signos generales de toxicidad y cuantificado el consumo diario de vino tinto, se iniciaron los estudios de genotoxicidad administrando vía *ad libitum* las diferentes variedades del vino tinto diluido al 75% con agua potable estéril, para lo cual se evaluó el daño al ADN mediante la cuantificación de la frecuencia de MN. Los resultados de las muestras de sangre obtenidas durante 3 días (cada 24 horas) se observan en el cuadro 5, y se puede observar que no se incrementa la frecuencia de MN en ninguno de los tratamientos con vino.

**Cuadro 4. Consumo promedio diario por grupo de las diferentes variedades de vino tinto administrado vía *ad libitum* al 75%.**

	Testigo	Cabernet sauvignon 1	Cabernet sauvignon y Nebbiolo	Carménère	Cabernet sauvignon 2	Merlot
<b>Año de Cosecha</b>	---	2006	2005	2007	2005	2005
<b>Contenido de alcohol</b>	---	12.4%	13.0%	13.9%	14.5%	14.5%
<b>Región Vitícola</b>	---	Valle de Calafia, Baja California	Valle de Calafia, Baja California	Valle de Rapel, Chile	Valle de Guadalupe, Baja California	Valle de Guadalupe, Baja California
<b>Apariencia general</b>	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
<b>Actividad</b>	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
<b>Apariencia heces</b>	Normal	Normal	Normal	Oscura	Normal	Oscura
<b>Apariencia orina</b>	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
<b>Conducta general</b>	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
<b>Respuesta al consumo del vino</b>	Normal	Desagrado	Desagrado	Normal	Normal	Desagrado
<b>Promedio de Consumo por grupo/5 ratones (ml)</b>	33.00	28.00	28.75	31.88	30.25	29.12

**Cuadro 5. Frecuencia de la inducción de MN en los tratamientos administrados vía *ad libitum* de las diferentes variedades de vino tinto diluido al 75%.**

<b>Tratamiento (% alcohol)</b>	<b>n</b>	<b>hora</b>	<b>MN/1000 células (media±d.e.)</b>
<b>Testigo</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	0.20±0.27
		<b>24</b>	0.20±0.27
		<b>48</b>	0.00±0.00
		<b>72</b>	0.10±0.22
<b>Cabernet sauvignon 1 (12.4%)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	0.50±0.35
		<b>24</b>	0.80±0.45
		<b>48</b>	0.70±0.27
		<b>72</b>	0.40±0.41
<b>Cabernet sauvignon y Nebbiolo (13%)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	0.60±0.42
		<b>24</b>	0.60±0.42
		<b>48</b>	0.40±0.22
		<b>72</b>	0.30±0.27
<b>Carménère (13.9%)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	0.20±0.27
		<b>24</b>	0.60±0.65
		<b>48</b>	1.00±0.61
		<b>72</b>	0.40±0.42
<b>Cabernet sauvignon 2 (14.5%)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	0.70±0.27
		<b>24</b>	0.80±0.45
		<b>48</b>	0.50±0.35
		<b>72</b>	0.40±0.22
<b>Merlot (14.5%)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	0.00±0.00
		<b>24</b>	0.40±0.54
		<b>48</b>	0.40±0.54
		<b>72</b>	0.80±0.45

Al no observarse cambios en las frecuencias de MN de los grupos tratados con las diferentes variedades de vino tinto, se realizó un experimento en el cual se co-administró la quercetina (100 mg/kg) por vía i.p. a las 48 horas después de iniciado el tratamiento con vino para aumentar la concentración de antioxidantes en el vino. En el cuadro 6 se muestran los resultados de este experimento, donde se puede observar que en el grupo tratado únicamente con quercetina se incrementa alrededor de un MN, que resulta estadísticamente significativo en la hora 48 y 72 al comparar con el grupo testigo. De igual manera, el grupo tratado con la variedad de Merlot se incrementó un MN en la hora 24 y para el Cabernet sauvignon 2 y Merlot en la hora 48. En los otros tratamientos no se observaron efectos significativos en las frecuencias de MN.

Dado que en los resultados obtenidos en la administración de quercetina y la co-administración de vino tinto y quercetina solo se incrementó alrededor de un MN la frecuencia y resultó estadísticamente significativo, a los datos obtenidos se les calculó el NIF con la finalidad de re-analizar los datos considerando la inducción basal de cada grupo, es decir la frecuencia de MN que presentaban antes de la administración del tratamiento. El análisis consistió en restarle la frecuencia de MN evaluados en la hora 0 (inducción basal) a las siguientes frecuencias de MN obtenidas en las subsecuentes muestras tomadas en las siguientes horas (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

**NIF = |valor observado en el grupo “A” a la hora  $x_i$  – valor observado en el grupo “A” a la hora 0|**

**Donde:**

**A = grupo  $x_i$ ;  $x_i$  = tiempo de evaluación**



**Cuadro 6. Frecuencia de la inducción de MN en los tratamientos administrados vía *ad libitum* de las diferentes variedades de vino tinto diluido al 75% más quercetina.**

Tratamiento (% alcohol)	Dosis de Quercetina	n	hora	MN /1000 células (media±d.e.)
<b>Testigo</b>	---	5	0	0.20±0.27
			24	0.20±0.27
			48	0.00±0.00
			72	0.10±0.22
<b>Quercetina</b>	100 mg/kg	5	0	0.40±0.41
			24	1.60±0.65
			48	1.60±0.41 <sup>b</sup>
			72	1.20±0.27 <sup>c</sup>
<b>Cabernet sauvignon 1 (12.4%) más Quercetina</b>	100 mg/kg	5	0	0.90±0.42
			24	1.10±0.54
			48	1.00±0.35
			72	0.40±0.42
<b>Cabernet sauvignon y Nebbiolo (13%) más Quercetina</b>	100 mg/kg	5	0	0.80±0.27
			24	1.00±0.35
			48	0.90±0.41
			72	0.50±0.35
<b>Carménère (13.9%) más Quercetina</b>	100 mg/kg	5	0	0.50±0.00
			24	2.00±0.70
			48	1.40±0.65
			72	0.30±0.45
<b>Cabernet sauvignon 2 (14.5%) más Quercetina</b>	100 mg/kg	5	0	1.00±0.35
			24	1.40±0.54
			48	1.20±0.27 <sup>b</sup>
			72	0.30±0.27
<b>Merlot (14.5%) más Quercetina</b>	100 mg/kg	5	0	1.00±0.35
			24	1.60±0.22 <sup>a</sup>
			48	1.30±0.27 <sup>b</sup>
			72	0.60±0.22

<sup>a</sup>: p<0.05 vs Testigo h24

<sup>b</sup>: p<0.05 vs Testigo h48

<sup>c</sup>: p<0.05 vs Testigo h72

En la figura 6 se muestran los resultados con el cálculo del NIF, se puede observar que persiste el incremento de MN en la hora 24 en el grupo tratado con quercetina y en los tratados con quercetina y vino Cabernet sauvignon 2, Carménère y Merlot, mientras que en la hora 48 todos los grupos presentaron efecto significativo. A la hora 72 únicamente resultó estadísticamente significativo el grupo tratado con quercetina.

A los valores del incremento de la frecuencia de MN, también se les calculó el DIF para analizar los datos considerando los MN espontáneos e inducidos por el manejo de los ratones durante el estudio. Este análisis consistió en restarles los valores respectivos de cada hora del grupo testigo a cada hora de los grupos tratados.

**DIF = |valor observado en el grupo “A” en la hora<sub>i</sub> – valor observado en el grupo testigo a la hora<sub>i</sub> |**

**Donde:**

**i = tiempo de evaluación**

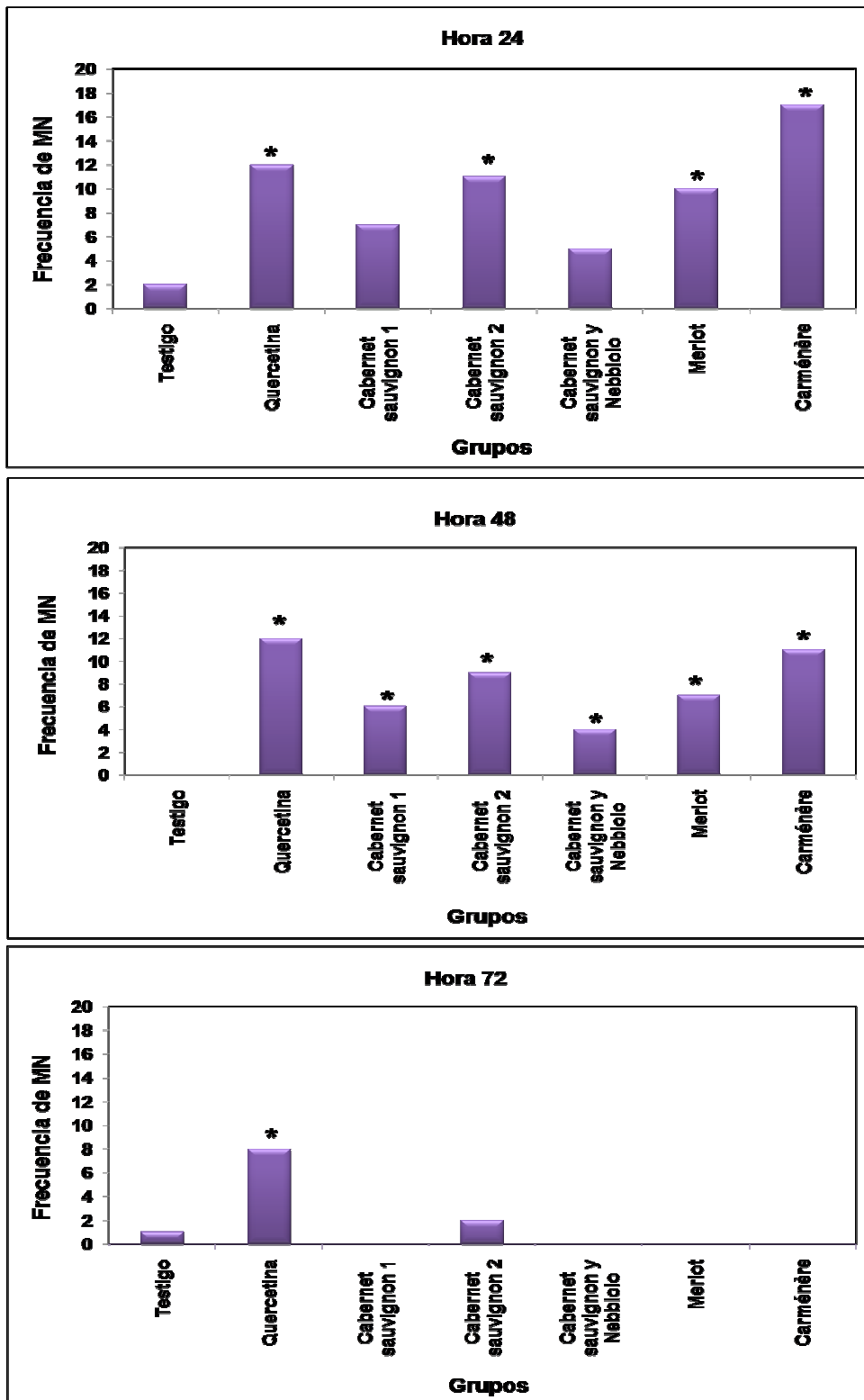


Figura 6. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró vía *ad libitum* el vino tinto diluido al 75% y 100 mg/kg de quercetina (\*: Estadísticamente significativos  $p < 0.05$ ).

En la figura 7 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN en los grupos tratados con quercetina sola y de la co-administración con vino. Al re-analizar los resultados mediante el cálculo del DIF, se observa que también persiste el efecto en el grupo tratado con quercetina en las muestras tomadas a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. Mientras que, en los grupos que se co-administró la quercetina con el vino solo se incrementó la frecuencia de MN en el grupo tratado con Carménère en la hora 24 y 48.

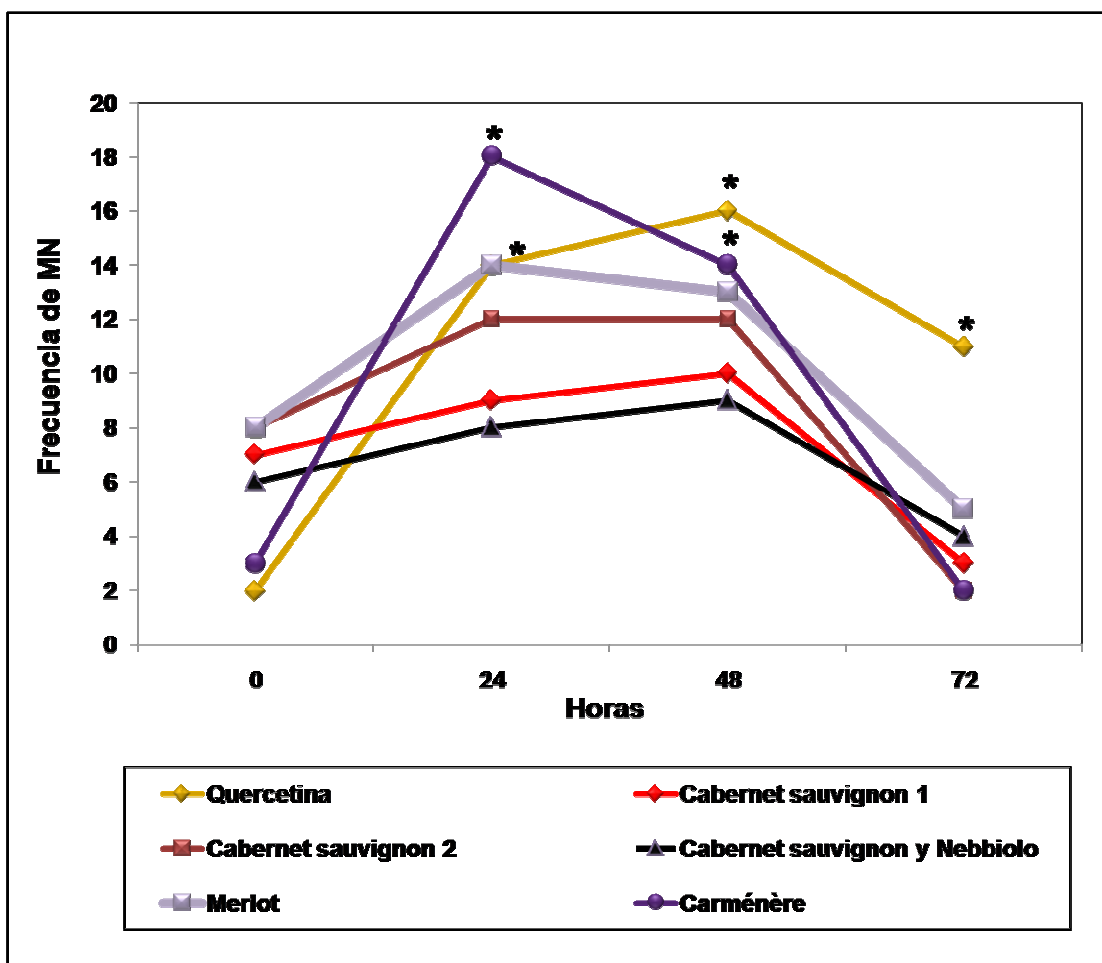


Figura 7. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN cuando se administró vía *ad libitum* el vino tinto diluido al 75% y la quercetina (\*: Estadísticamente significativos  $p < 0.05$ ).

## **6.2. Evaluación de MN en grupos tratados con vino tinto sin diluir administrado vía sonda**

Después de haber observado que la administración vía oral *ad libitum* de vino tinto diluido al 75% y quercetina, inducían un incremento de alrededor de un MN, el cual si bien es marginal y en comparación con agentes claramente identificados como genotóxicos (incremento de hasta 30) es “muy bajo”, al resultar estadísticamente significativo, se consideró que la vía de administración podría influir en estas evaluaciones, ya que era la única fuente de líquidos que consumían, por lo que se procedió a modificar la vía de administración.

Las dosis administradas por vía sonda fueron consideradas tomando como criterio dosis equivalentes a lo que consumían vía *ad libitum*, a los ratones se les permitió el libre acceso al agua. En el cuadro 7 se muestran los resultados de estas evaluaciones, donde se puede observar que al igual que cuando se administró el vino tinto vía *ad libitum* la frecuencia se incrementa alrededor de un MN, el cual solo resulta estadísticamente significativo en el grupo tratado con Cabernet sauvignon 2 al comparar con el grupo testigo a la hora 48. En este experimento también se puede observar que los grupos Cabernet sauvignon 1 y Merlot (Cuadro 7) resultaron estadísticamente significativos al comparar la frecuencia de MN observada antes de los tratamientos del vino con la evaluada en las muestras obtenidas a las 24 y 48 horas, por lo que a estos datos también se les calculó el NIF (Fig. 8), donde se puede observar que persisten dichos efectos descritos en el cuadro 7 para los grupos tratados con las variedades Cabernet sauvignon 1 en la hora 24 y 48, así como Merlot en la hora 48.

**Cuadro 7. Frecuencia de la inducción de MN en los tratamientos administrados vía sonda de las diferentes variedades de vino tinto sin diluir.**

<b>Tratamiento (% alcohol)</b>	<b>n</b>	<b>hora</b>	<b>MN/1000 células (media±d.e.)</b>
<b>Testigo</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	0.70±0.57
		<b>24</b>	1.00±0.35
		<b>48</b>	0.90±0.42
		<b>72</b>	1.00±0.50
<b>Cabernet sauvignon 1 (12.4%)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	0.00±0.00
		<b>24</b>	1.70±0.76 <sup>b</sup>
		<b>48</b>	1.40±0.42 <sup>b</sup>
		<b>72</b>	0.90±0.54
<b>Cabernet sauvignon y Nebbiolo (13%)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	1.10±0.41
		<b>24</b>	1.70±0.57
		<b>48</b>	1.20±0.57
		<b>72</b>	1.20±0.57
<b>Carménère (13.9%)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	0.90±0.41
		<b>24</b>	1.00±0.79
		<b>48</b>	1.60±0.82
		<b>72</b>	0.90±0.42
<b>Cabernet sauvignon 2 (14.5%)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	1.40±0.22
		<b>24</b>	1.70±0.57
		<b>48</b>	2.20±0.27 <sup>a</sup>
		<b>72</b>	1.80±0.27
<b>Merlot (14.5%)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	0.60±0.41
		<b>24</b>	1.00±0.35
		<b>48</b>	1.90±0.41 <sup>c</sup>
		<b>72</b>	1.00±0.35

<sup>a</sup>: p< 0.05 vs Testigo h48

<sup>b</sup>: p< 0.05 vs Cabernet sauvignon 1 h0

<sup>c</sup>: p<0.05 vs Merlot h0

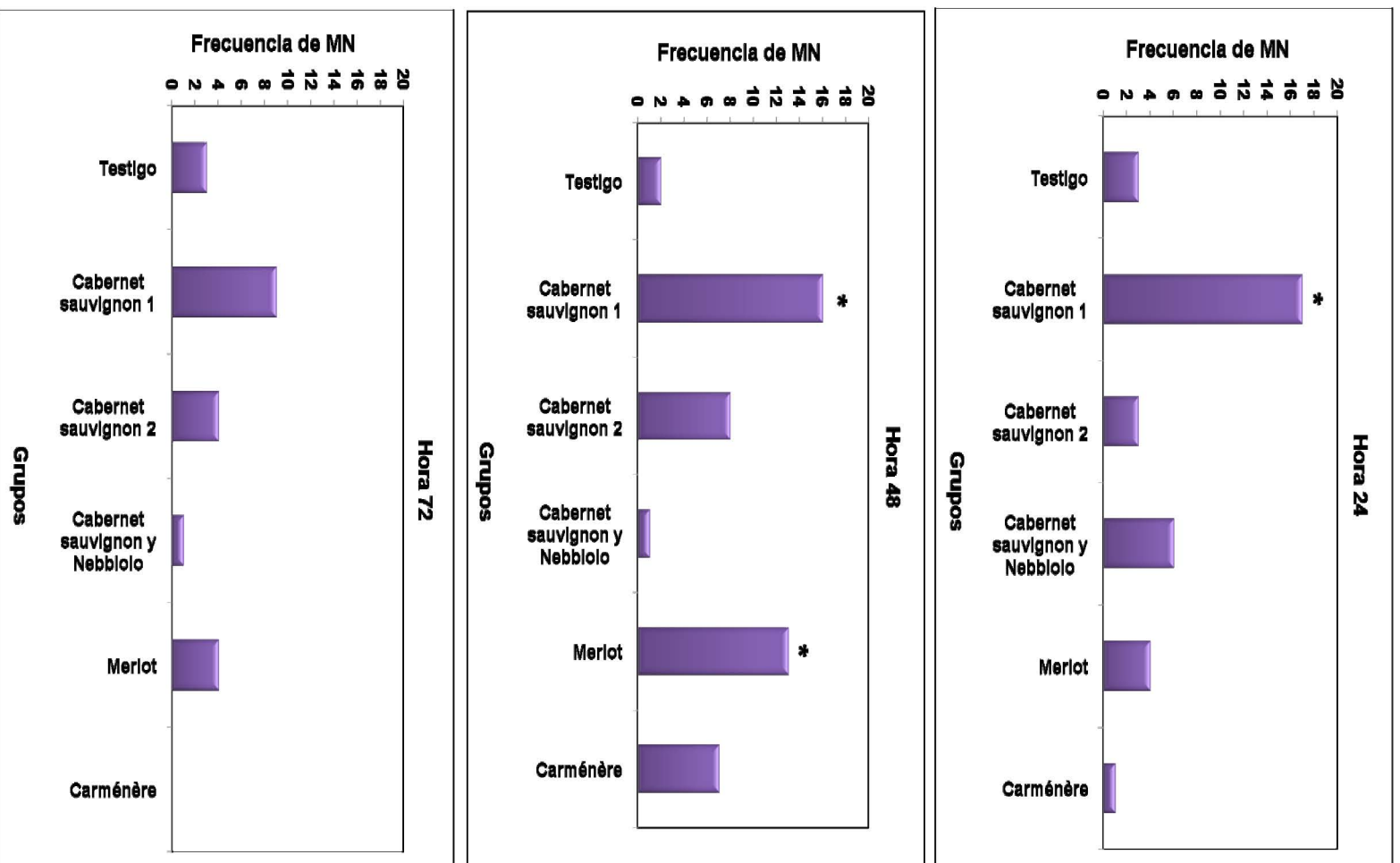


Figura 8. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró vía sonda el vino tinto sin diluir (\*: Estadísticamente significativos  $p < 0.05$ ).

En la figura 9 se muestra el análisis del DIF de las frecuencias de MN cuando se administraron vía sonda las variedades de vino tinto sin diluir, en esta gráfica se puede observar que a diferencia del NIF también resulta estadísticamente significativo el grupo tratado con Cabernet sauvignon y Nebbiolo en las 48 y 72 horas.

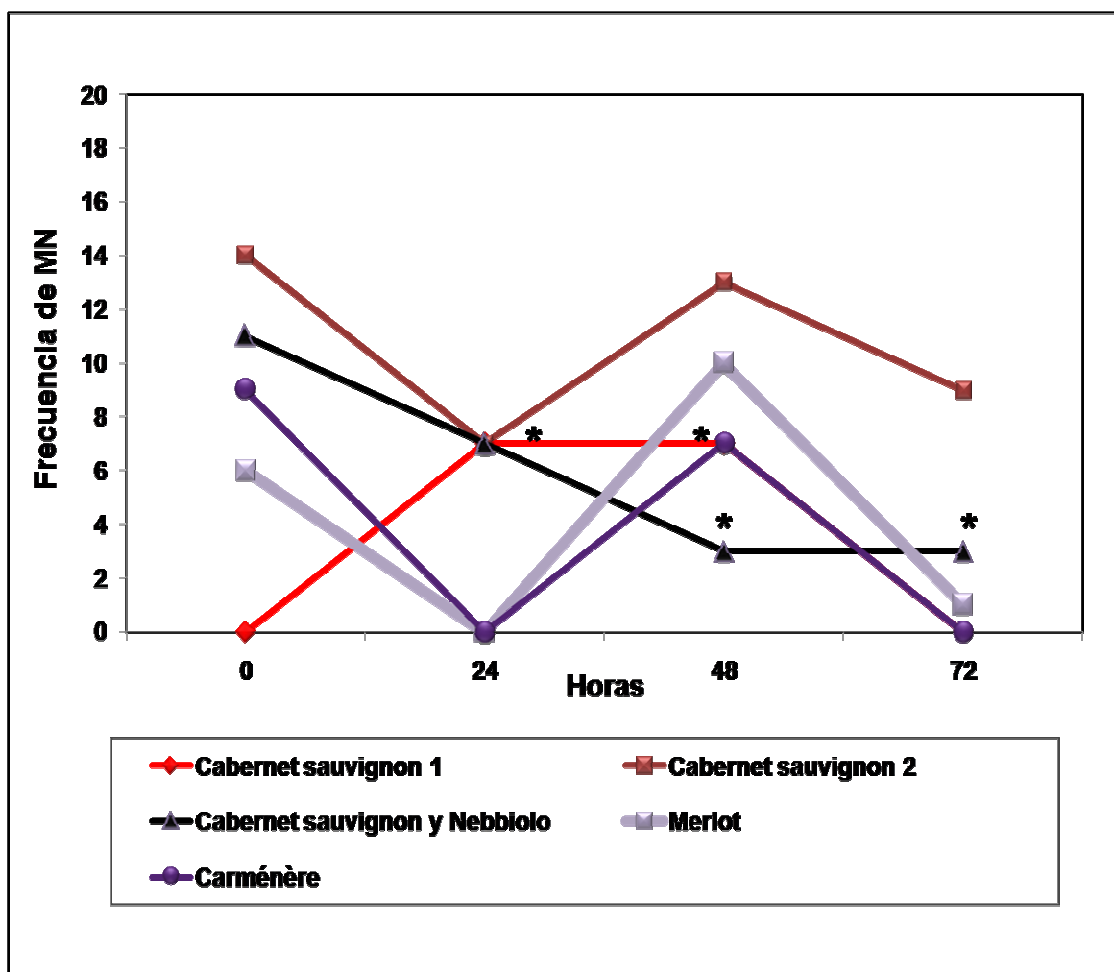


Figura 9. Análisis por tiempo y por grupos del DIF de MN cuando se administró vía sonda el vino tinto sin diluir (\*: Estadísticamente significativo  $p < 0.05$ ).



Al igual que con los tratamientos administrados vía *ad libitum*, también se realizaron evaluaciones de la co-administración con quercetina. En este experimento se incluyó un grupo tratado con la concentración más alta de etanol de los vinos probados en el estudio, ya que el comportamiento de las frecuencias de MN en los diferentes análisis que se realizaron permitían asociar estos efectos a la toxicidad causada por el contenido de etanol en el vino. En el cuadro 8 podemos observar que en el grupo que solo se le administró el etanol se incrementa la frecuencia de MN de manera similar a los incrementos observados en los grupos tratados con vino (alrededor de un MN). La dosis administrada de quercetina (100 mg/kg) no incrementa la frecuencia de MN y la co-administración con vino Carménère y Cabernet sauvignon 2 la incrementa un MN que resulta estadísticamente significativo al compararse con el testigo a la hora 24 y los tratamientos con Merlot y Cabernet sauvignon 2 en la hora 48.

**Cuadro 8. Frecuencia de la inducción de MN en los tratamientos administrados vía sonda de las diferentes variedades de vino tinto sin diluir más 100 mg/kg de quercetina.**

Tratamiento (% alcohol)	Dosis de Quercetina	n	hora	MN/1000 células (media±d.e.)
Testigo	---	5	0	0.70±0.57
			24	1.00±0.35
			48	0.90±0.42
			72	1.00±0.50
Etanol 14.5%	----	5	0	0.50±0.35
			24	1.50±0.50
			48	2.10 ±0.65 <sup>a,b</sup>
			72	1.10±0.65
Quercetina	100 mg/kg	5	0	0.40±0.41
			24	1.60±0.65
			48	1.60±0.41
			72	1.20±0.27
Cabernet sauvignon y Nebbiolo (13%) más Quercetina	100 mg/kg	5	0	1.40±0.42
			24	2.00±0.79
			48	1.83±1.25
			72	1.00±0.50
Carménère (13.9%) más Quercetina	100 mg/kg	5	0	1.30±0.44
			24	2.30±0.57 <sup>c</sup>
			48	1.80±0.57
			72	1.60±0.41
Cabernet sauvignon 2 (14.5%) más Quercetina	100 mg/kg	5	0	2.00±0.35
			24	2.80±0.27 <sup>c</sup>
			48	2.40±0.41 <sup>b</sup>
			72	2.10±0.41
Merlot (14.5%) más Quercetina	100 mg/kg	5	0	1.60±0.65
			24	1.30±0.75
			48	2.30±0.57 <sup>b</sup>
			72	1.30±0.44

<sup>a</sup>: p< 0.05 vs Etanol 14.5% h0

<sup>b</sup>: p< 0.05 vs Testigo h48

<sup>c</sup>: p<0.05 vs Testigo h24

En la figura 10 se muestra el NIF de las frecuencias de MN cuando se realizaron las administraciones de quercetina y vino tinto vía sonda. Se puede observar que persiste el efecto en el grupo tratado solo con etanol (incluso mayor que con los tratados con vino) y que a diferencia de cuando se realizó el análisis de varianza a los datos obtenidos en el grupo tratado con quercetina, con este análisis se observa un efecto estadísticamente significativo en las horas 24 y 48.

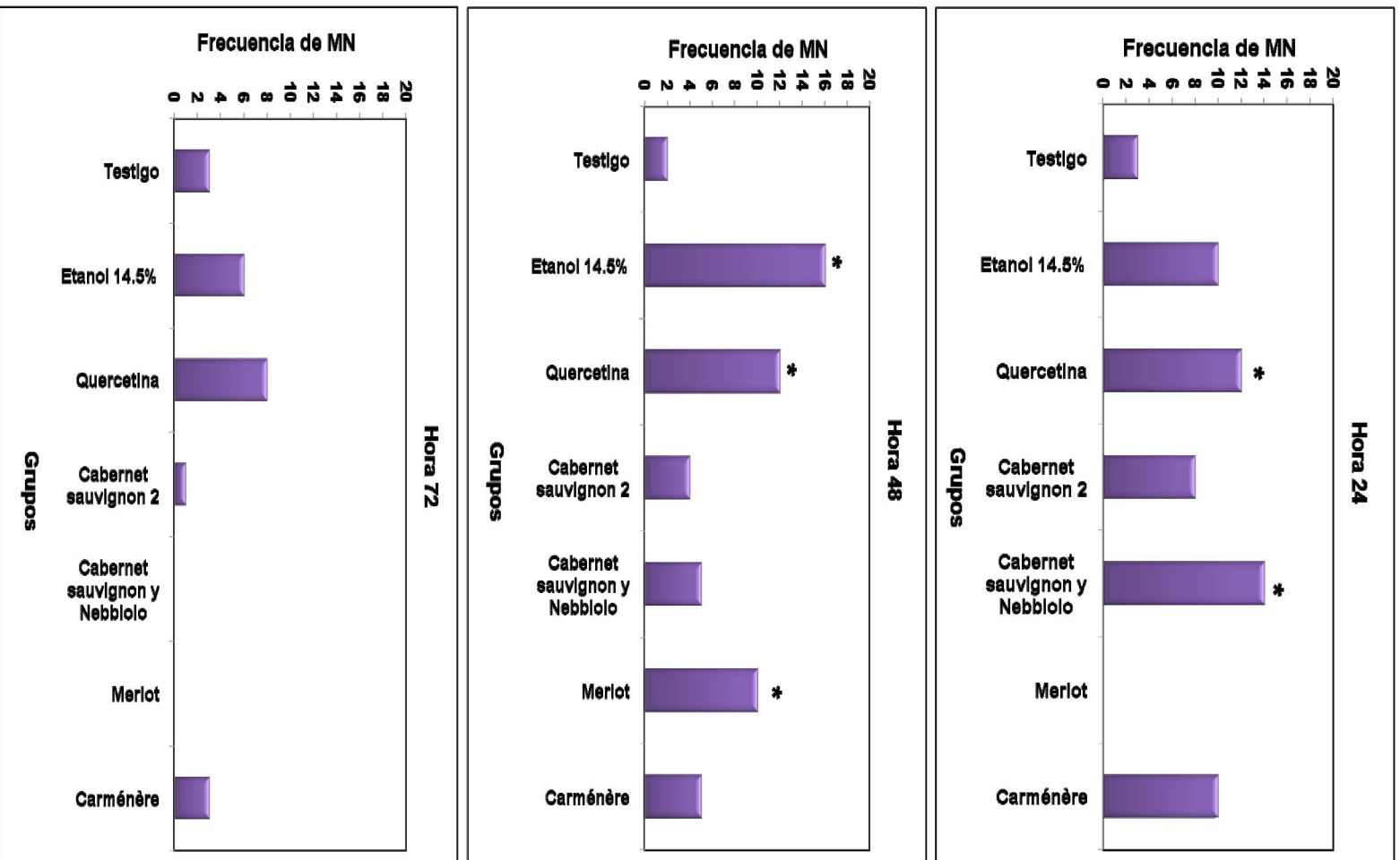


Figura 10. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró vía sonda el vino tinto sin diluir y 100 mg/kg de quercetina (\*: Estadísticamente significativos  $p < 0.05$ ).

En la figura 11 se muestra el cálculo del DIF de la frecuencia de MN cuando se administró vía sonda el vino tinto sin diluir y la quercetina, en la gráfica podemos observar que los efectos de la quercetina y etanol persisten. En los grupos tratados con vino se observa un efecto en el grupo tratado con la variedad Merlot a la hora 24, el cual es estadísticamente significativo.

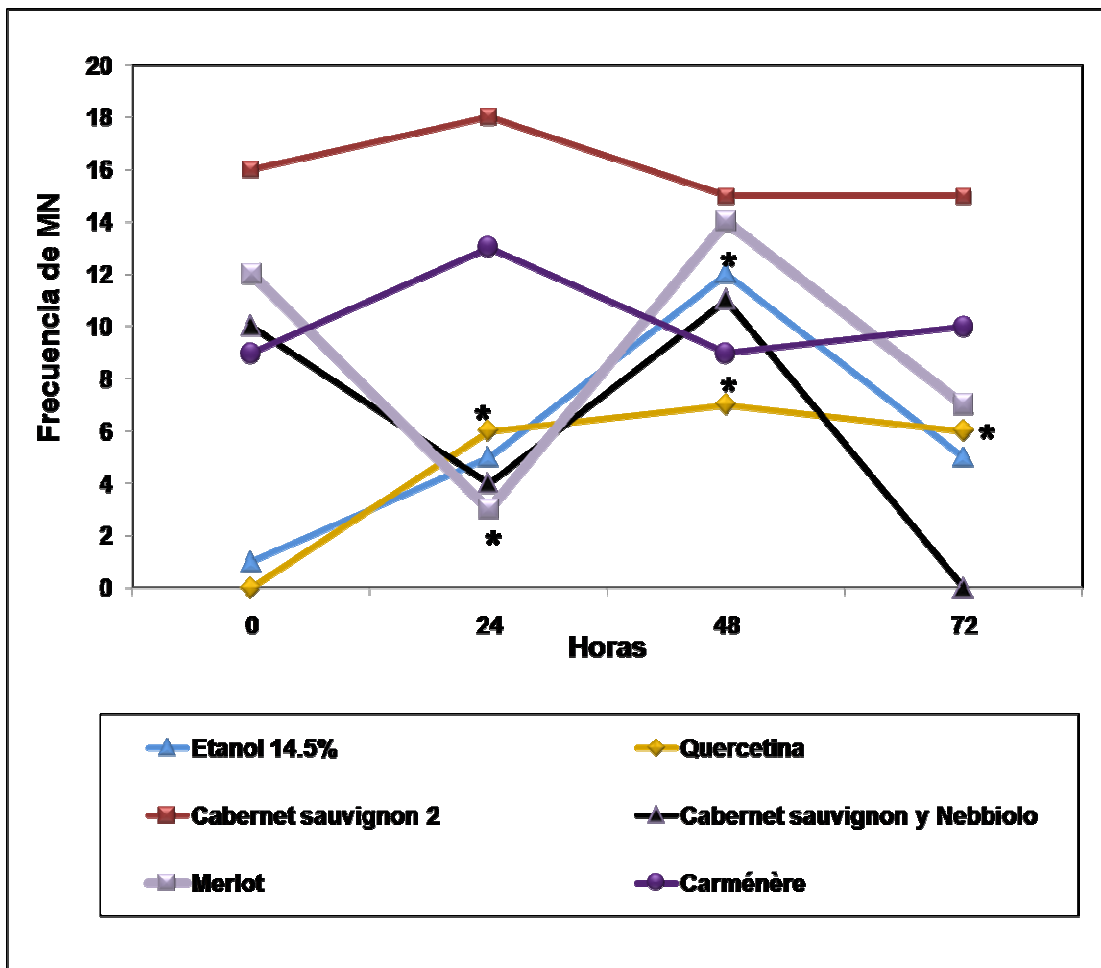


Figura 11. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN cuando se administró vía sonda el vino tinto sin diluir y 100 mg/kg de quercetina (\*: Estadísticamente significativo  $p < 0.05$ ).

A partir de los resultados obtenidos tanto de los tratamientos administrados vía *ad libitum* como sonda, se realizaron evaluaciones de la co-administración de quercetina y vino tinto de la variedad Cabernet sauvignon 1, en el cual se probó una dosis de 300 mg/kg de quercetina. En este experimento nuevamente se incluyó al grupo tratado con la concentración más alta de etanol de los vinos probados en el estudio. En el cuadro 9 se muestran los resultados de este estudio en donde se puede observar que la administración de esta dosis de quercetina no modifica significativamente la frecuencia de MN.

**Cuadro 9. Frecuencia de la inducción de MN en los tratamientos administrados vía sonda de las diferentes variedades de vino tinto sin diluir más 300 mg/kg de quercetina.**

Tratamiento (% alcohol)	Dosis de Quercetina	n	hora	MN/1000 células (media±d.e.)
Testigo	---	5	0	0.70±0.57
			24	1.00±0.35
			48	0.90±0.42
			72	1.00±0.50
Etanol (14.5%)	---	5	0	0.50±0.35
			24	1.50±0.50
			48	2.10 ±0.65 <sup>a,b</sup>
			72	1.10±0.65
Cabernet sauvignon 1 (12.4%) más Quercetina	300 mg/kg	5	0	0.00±0.0
			24	2.50±1.00
			48	2.40±1.40
			72	3.40±0.96

<sup>a</sup>: p< 0.05 vs Testigo h48

<sup>b</sup>: p< 0.05 vs etanol 14.5% h0

### 6.3. Efecto citotóxico del vino tinto y la quercetina

Al evaluar la frecuencia de EPC respecto a los ENC de los tratamientos administrados vía *ad libitum* y sonda de vino tinto y quercetina, no se observaron modificaciones significativas (cuadro 10 y 11), este parámetro nos permite hacer inferencias respecto al efecto citotóxico.

**Cuadro 10. Frecuencia de EPC en los tratamientos con diferentes variedades de vino tinto diluido al 75% y de la co-administración de 100 mg/kg de quercetina.**

Tratamiento (% alcohol)	n	hora	EPC/1000 células (media±d.e.)	
Testigo <i>ad libitum</i>	5	0	72.2±3.11	
		24	75.8±1.78	
		48	73.4±3.78	
		72	73.6±3.50	
Quercetina	5	0	75.4±2.70	
		24	75.2±4.96	
		48	75.8±2.58	
		72	74.6±2.70	
			Sin quercetina	Más quercetina
Cabernet sauvignon 1 (12.4%)	5	0	74.2±3.03	74.2±3.76
		24	73.4±2.07	72.4±2.30
		48	73.4±2.88	74.6±3.84
		72	72.6±3.20	75.8±4.94
Cabernet sauvignon y Nebbiolo (13%)	5	0	73.4±3.20	70.6±2.70
		24	73.2±3.03	72.6±3.36
		48	71.6±3.57	75.2±3.76
		72	73.8±3.03	73.2±4.08
Carménère (13.9%)	5	0	72.8±3.27	75.0±5.38
		24	71.8±5.97	74.6±3.64
		48	65.0±3.39	75.0±2.73
		72	74.4±4.50	74.8±3.34
Cabernet sauvignon 2 (14.5%)	5	0	73.0±2.54	71.2±1.92
		24	72.8±2.38	72.0±2.91
		48	71.6±4.56	71.8±3.42
		72	72.8±2.68	71.2±3.34
Merlot (14.5%)	5	0	72.0±2.91	71.4±3.50
		24	70.8±3.03	69.0±2.12
		48	69.2±1.92	74.8±3.03
		72	71.8±2.77	72.4±2.30

**Cuadro 11. Frecuencia de EPC en los tratamientos con diferentes variedades de vino tinto sin diluir y de la co-administración de 100 y 300 mg /kg de quercetina.**

Tratamiento (% alcohol)	n	hora	EPC /1000 células (media±d.e.)	
			Sin quercetina	Más quercetina
Testigo	5	0	72.0±8.45	
		24	77.8±3.76	
		48	77.2±5.80	
		72	75.6±3.78	
Etanol (14.5%)	5	0	78.8±3.03	
		24	76.4±2.70	
		48	74.6±2.70	
		72	73.4±3.36	
Quercetina	5	0	75.4±2.70	
		24	75.2±4.96	
		48	75.8±2.58	
		72	74.6±2.70	
Cabernet sauvignon 1 (12.4%)	5	0	91.4±12.73	75.2±7.98♦
		24	88.0±10.02	86.2±8.28
		48	91.2±13.59	73.8±22.6
		72	72.4±3.840	70.8±3.49
Cabernet sauvignon y Nebbiolo (13%)	5	0	80.6±7.98	75.2±7.25
		24	74.2±6.87	68.0±5.61
		48	68.0±4.18	67.0±7.54
		72	73.8±3.70	57.6±4.04
Carménère (13.9%)	5	0	74.0±4.63	74.8±3.27
		24	71.0±4.94	75.0±2.23
		48	60.4±2.70	72.6±2.40
		72	68.2±4.76	74.6±3.50
Cabernet sauvignon 2 (14.5%)	5	0	73.8±3.70	68.0±3.08
		24	70.6±3.84	68.6±2.30
		48	68.0±4.18	68.4±2.88
		72	64.0±2.73	69.6±3.20
Merlot (14.5%)	5	0	82.0±4.69	78.0±2.00
		24	79.6±3.84	74.0±1.58
		48	77.4±2.30	75.8±1.64
		72	74.6±2.07	76.8±1.92

♦ Administración de 300 mg/kg de quercetina

## 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó que al administrar diferentes variedades de vino tinto y quercetina, por diferentes vías a ratones de la cepa CD-1, se incrementa de manera marginal la frecuencia de MN y este incremento depende de la variedad de vino tinto (Cabernet sauvignon, Nebbiolo, Merlot, y Carménère), la concentración (sin diluir y diluido al 75%), así como de la vía de administración (*ad libitum* o sonda). La administración de la quercetina sola (uno de los flavonoides presentes en mayor concentración en el vino tinto con gran potencial antioxidante) y con vino también incrementa la frecuencia de MN, la cual también dependió de la variedad de vino tinto y de la vía de administración. En cuanto a los efectos de citotoxicidad, no se observaron modificaciones en las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, en ninguno de los tratamientos.

En el estudio preliminar que se realizó antes de iniciar las evaluaciones de genotoxicidad y citotoxicidad, se observó que la administración de vino tinto vía oral *ad libitum* diluido al 75% no presentó signos de toxicidad general, ya que no presentaban cambios en cuanto a la apariencia, actividad y conducta (Scialli, 1992), lo que concuerda con lo observado en estudios realizados en ratas a las que se les administraron dosis similares de vino tinto por vía sonda, ellos observaron que la administración de estas dosis no generan signos tóxicos sino por el contrario son capaces de proteger de enfermedades cardiovasculares, de aumentar la respuesta anti-inflamatoria, de agilizar la memoria y proteger de enfermedades neurodegenerativas (Dudley *et al.*, 2008). De igual manera, en un estudio realizado en humanos a los que se les administraron también dosis similares de vino tinto a las empleadas en nuestro estudio no reportan efectos tóxicos aparentes (Greenrod *et al.*, 2005).



### 7.1. Efectos genotóxicos del vino tinto y de la quercetina

La administración vía oral *ad libitum* de vino tinto diluido al 75% no incrementó la frecuencia de MN, esto concuerda con estudios previos realizados en el laboratorio (Mateos Nava, 2007), en los que se estudiaron los efectos de la variedad Cabernet sauvignon 1 (una de las probadas en este estudio) sobre la frecuencia de MN y se obtuvieron frecuencias de MN similares, al igual que los promedios del consumo por día y por grupo de vino tinto tanto en los grupos tratados como en los testigos. En otros estudios realizados *ex vivo* con humanos, a quienes se les administraron dosis similares de vino tinto a las que se emplearon en los ratones e incluso tratamientos con jugo de uvas moradas (480 ml/diarios, durante ocho semanas) tampoco se observaron modificaciones en las frecuencias de MN en muestras obtenidas de sangre periférica durante dos horas después del tratamiento (Park *et al.*, 2003; Greenrod *et al.*, 2005). Por lo que la administración vía oral *ad libitum* del vino tinto a estas concentraciones no inducen daño genotóxico. Se ha sugerido que los efectos benéficos del vino tinto se deben a que su administración aumenta la capacidad antioxidante y por lo tanto se pueden disminuir los efectos inducidos por las ERO's (Tedesco *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003).

La capacidad antioxidante del vino tinto se la confieren componentes como las vitaminas A, C, E y los compuestos polifenólicos como los flavonoides. En este estudio se observó que al co-administrar por vía i.p. 100 mg/kg de quercetina y las diferentes variedades de vino tinto por vía *ad libitum* (diluido al 75%), se incrementó la frecuencia de MN (alrededor de un MN) en el grupo que solo se trato con quercetina (24, 48 y 72 horas). La quercetina es uno de los flavonoides presentes en el vino tinto que han mostrado mayor potencial antioxidante, sin embargo, las concentraciones presentes en el vino tinto son menores a las que se han reportado como protectoras del daño al ADN (Hollman y Katan, 1999; German y Walzen, 2000; Skibola y Smith, 2000), por lo que en el estudio se co-administraron dosis de quercetina con vino tinto. Como se observa en los resultados las dosis empleadas (100 mg/kg) de quercetina inducen daño al ADN, lo que difiere con lo reportado por

Da Silva *et al.*, 2002 y Mateos Nava 2007, quienes al administrar dosis mayores (de hasta 625 mg/kg) de quercetina por vía i.p. a ratones, no observaron modificaciones en las frecuencias de MN en células de médula ósea y en sangre periférica, así como de AC en medula ósea, células de hígado y células rectales en estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (Zhanataev *et al.*, 2008). Si bien, el incremento observado es estadísticamente significativo, este incremento es solo de un MN lo cual no corresponde a un agente genotóxico, ya que organizaciones como la FDA (2000) y la OECD (1997) han propuesto que se consideren como agente genotóxico evidente sólo aquellos compuestos que incrementan más de cuatro la frecuencia de MN por cada 1000 EPC (0.4%), respecto de su grupo testigo, por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio no podrían clasificar la quercetina como un agente genotóxico. Por otra parte, se ha planteado que los efectos tóxicos pueden inducir indirectamente daño al ADN, ya que la sola administración de agentes físicos o químicos (manejo, estrés) pueden alterar la homeostasis de las funciones fisiológicas del organismo y generar daño al ADN indirectamente (Gad, 1992; Scialli, 1992; Dass *et al.*, 1997). Particularmente, la quercetina ha mostrado efectos tóxicos sistémicos ya que al administrarse dosis 100 mg/ml por vía intramuscular durante 21 días a pacientes con cáncer se observaron efectos nefrotóxicos (Ferry *et al.*, 1996). El incremento observado de MN con el tratamiento de quercetina puede estar relacionado con la dualidad que presenta la quercetina, ya que se ha descrito en diferentes estudios que puede actuar como antimutágeno o mutágeno dependiendo de la concentración y los protocolos usados, así como de la condición fisiológica del organismo. También, se ha observado en ratones que la quercetina presenta ambas propiedades cancerígenas y anticancerígenas (Skibola y Smith 2000; Zeiger, 2007).

Al administrar 300 mg/kg de quercetina por vía i.p. no se incrementó estadísticamente significativa la frecuencia de MN, por lo que se corroboró la dualidad mutágeno/antimutágeno relacionado con la dosis de quercetina, ya que las dosis administradas por vía i.p. (100 mg/kg) incrementan marginalmente la frecuencia de MN a diferencia de las dosis mayores probadas en este estudio y en estudios previos donde no se observó daño al ADN, sino por el contrario protección

(Da Silva *et al.*, 2002; Mateos Nava 2007) e incluso inhibición del crecimiento de líneas celulares tumorales en más del 90% en ratones, así como el incremento de la capacidad antioxidante e inhibición de ERO's generadas por radiación, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y *tert*-butil hidroperoxido en células cancerígenas MCF7, células HepG2, eritrocitos y linfocitos humanos (Rodgers y Grand, 1998; Tedesco *et al.*, 2000; Soleas *et al.*, 2002; Alía *et al.*, 2006; Benkovic *et al.*, 2008).

Sin embargo, en los grupos que se co-administró la quercetina con el vino tinto, solo persistió el efecto de la quercetina, en los grupos tratados con vino tinto Cabernet sauvignon 2 y Merlot (24 y 48 horas), lo que podría estar relacionado con una posible protección de los tratamientos del vino tinto (Cabernet sauvignon 1, Cabernet sauvignon y Nebbiolo, Carménère), ya que la quercetina por si sola a esta dosis debió incrementar las mismas frecuencias de MN observadas previamente.

La protección puede deberse a la concentración de antioxidantes en el vino la cual es diferente por variedad, a pesar de que la concentración aproximada de flavonoides y taninos en la variedad Cabernet sauvignon es de 4.55 g/l (Zúñiga, 2005), solamente se presentó el efecto en el incremento de la frecuencia de MN en el tratamiento con Cabernet sauvignon 2, posiblemente a que en este vino el contenido de alcohol era de 14.5% a diferencia del Cabernet sauvignon 1 (12.4%). En el grupo tratado con vino Cabernet sauvignon y Nebbiolo (1.91 g/l) la protección observada probablemente se debe a que la concentración de antioxidantes se incrementa por la mezcla que es aproximadamente de 6.46 g/l. Por otro lado a pesar de que en la variedad Carménère (3.54 g/l) la concentración de antioxidantes es menor que en Merlot (3.61 g/l), en este último se incrementó marginalmente la frecuencia de MN, probablemente por el porcentaje de alcohol, ya que era el mismo que en el tratamiento con Cabernet sauvignon 2.

La protección del vino tinto ha sido observada tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, en donde protege de la inducción de MN por BaP (en médula ósea de ratón) e inhiben el rompimiento de las cadenas de ADN inducido por 2-amino-1-metil-6-imidazo[4,5-*b*]piridin (PhIP) (en cultivos celulares) (Damianaki *et al.*, 2000; Tedesco

*et al.*, 2000; Edenharder *et al.*, 2002 y 2003). Los mecanismos de protección del vino tinto se han explicado en estudios *in vitro* y *ex vivo*, por el aumento de la capacidad antioxidante en el plasma sanguíneo y al disminuir los efectos ocasionados por ERO's generados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y radiación en eritrocitos y linfocitos (Damianaki *et al.*, 2000; Tedesco *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003; Greenrod *et al.*, 2005).

Dado que cuando se administraba el vino tinto vía *ad libitum* a los ratones este era su única fuente de consumo de líquidos, también se realizaron experimentos en los que se administró el vino tinto sin diluir por vía sonda y se les permitió libre acceso al agua, en los que se observó un incremento en la frecuencia de MN (alrededor de un MN) la cual resultó estadísticamente significativa en la hora 48 del grupo Cabernet sauvignon 2 al comparar contra la misma hora del grupo testigo, en los grupos Merlot y Cabernet sauvignon 1 también se incrementó alrededor de un MN que resultó estadísticamente significativo al comparar contra su propia hora 0, es decir en las evaluaciones realizadas antes de la administración de los tratamientos. El efecto observado puede estar relacionado con la cantidad de vino que se administraba en una sola toma (dos veces al día), ya que si hiciéramos la conversión a humanos estas corresponderían a 1.5 l de vino tinto por toma, por lo que el efecto observado dada la baja inducción de MN (alrededor de uno) puede estar relacionado con el efecto tóxico que por sí solo presenta la administración aguda de un agente, ya que no es lo mismo administrar una misma dosis de manera aguda o crónica, la primera se administra en un lapso corto de tiempo lo que puede alterar la farmacocinética del agente, ya que es más fácil para los organismos absorber, distribuir, biotransformar y eliminar un agente si su administración es continua durante 48 horas, que en cuatro dosis concentradas durante 48 horas (Wilson, 1979; Scialli, 1992). La concentración de etanol en una sola toma también pudo haber influido en los resultados observados, ya que el tratamiento que presentó el efecto era el del Cabernet sauvignon 2 y particularmente este tiene una mayor concentración de alcohol comparado con las otras variedades que se probaron en el estudio por esta misma vía. Para corroborar que el etanol era el que posiblemente estaba incrementando marginalmente los MN en los tratamientos de vino tinto administrados por vía sonda,

a un grupo de ratones se les administraron las mismas concentraciones y dosis de etanol que contenía el vino Cabernet sauvignon 2 (14.5%) por la misma vía, la frecuencia de MN se incrementó de manera similar que en los experimentos anteriores, lo cual podría estar relacionado con los estudios donde se ha mostrado que la administración de etanol presenta alteraciones en la salud incluido el daño al ADN (Maffei *et al.*, en 2000 y 2002; Greenrod *et al.*, 2005). Particularmente, en estudios realizados en linfocitos humanos obtenidos de bebedores crónicos y voluntarios quienes ingerían vino, cerveza y licores (120 g/día de etanol), así como tratamiento con solución de etanol al 13% (300 ml), se observó un incremento en la frecuencia de MN (alrededor de 5 MN) y de AC estructurales (Maffei *et al.*, en 2000 y 2002; Greenrod *et al.*, 2005). Por lo que se sugiere realizar otros estudios en los que se administren directamente los compuestos antioxidantes del vino tinto o vino tinto sin alcohol.

## **7.2. Efecto del vino tinto y la quercetina sobre la citotoxicidad**

Se ha descrito que el efecto citotóxico puede ser determinado por la reducción de la frecuencia de EPC con respecto a los ENC (Vallarino-Kelly y Morales-Ramírez, 2001) en todos los tratamientos no se observaron modificaciones en las frecuencias de EPC en las distintas horas de evaluación. Los datos obtenidos concuerdan con lo reportado por Edenharder *et al.* (2002 y 2003) y Mateos Nava (2007) quienes administraron vino tinto y quercetina a ratones y no observaron cambios en la relación entre EPC y ENC. Es importante 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, también se pueden activar los mecanismos de división celular enmascarando el efecto (Hayashi *et al.*, 2000).

## 8. CONCLUSIONES

- ❖ La administración de vino tinto diluido al 75% por vía *ad libitum* de las variedades Cabernet sauvignon, Merlot, Nebbiolo y Carménère a ratones de la cepa CD-1 no modifica la frecuencia de MN, por lo que se puede decir que la administración de estas variedades de vino tinto bajo nuestras condiciones de trabajo no presentan efectos genotóxicos.
- ❖ El incremento marginal observado en la frecuencia de MN cuando se administraron los tratamientos de vino tinto sin diluir por vía sonda de las variedades Cabernet sauvignon 1, Cabernet sauvignon 2 y Merlot, es debido a un efecto indirecto causado por la vía de administración y tipo de tratamiento (agudo), aunado el efecto genotóxico del etanol.
- ❖ La quercetina presenta una dualidad mutágeno/antimutágeno, lo cual esta relacionado con las dosis ya que la administración de 100 mg/kg de quercetina incrementó la frecuencia de MN (alrededor de uno), sin embargo la administración de 300 mg/kg de quercetina no incrementa la frecuencia de MN de forma estadísticamente significativa.
- ❖ La co-administración de vino tinto de las variedades Cabernet sauvignon1, Nebbiolo y Carménère con quercetina a ratones de la cepa CD-1 reduce la frecuencia de MN, por lo que se puede decir que la administración de estas variedades de vino tinto bajo nuestras condiciones protegen del daño genotóxico inducido por 100 mg/kg de quercetina.
- ❖ La administración de vino tinto y quercetina no modifican las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, por lo que no se presento un efecto citotóxico evaluado con este parámetro.

## 9. REFERENCIAS

- Adler, I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis. *Mutation Res.* 417:19-30.
- 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. and Goya, L. (2006). Quercetin protects human hematoma HepG2 against oxidative stress induced by Pert-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212:110-118.
- Arts, I.C. and Hollman, P.C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal Clinical Nutrition.* 81 (1 Suppl): pp. 317S-325S.
- Bagchi, D., Stohs, S. J., Downs, B. W., Bagchi, M. and Preuss, H. G. (2002). Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology.* 180:5-22.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99:191-203.
- Bender, M. (1980). Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production, in; Generoso, W., Shelby, F. and De Serres, F. DNA repair and mutagenesis in eukaryotes Plenum, New York. pp. 245-265.
- Benkovic, V., Kopjar, N., Knezevic, A., Dikic, D., Basic, I., Ramic, S., Viculin, T., Knezevic, F. and Orsolic, N. (2008). Evaluation of radioprotective effects of propolis and quercetin on human white blood cells *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* 31:1778-1785.
- Boubals, D. (1993). "Sur les attaques de Phylloxera des racines dans le monde". *Progres Agricole et Viticole*, Montpellier. 110:416-421.
- Campbell, C. (2005). The Botanist and the Vintner: How Wine Was Saved for the World. Algonquin Books. New York. pp. 360.

- Carbajal, A. y Ortega, R. (2001). La dieta mediterránea como modelo de dieta prudente y saludable. *Rev. Chil. Nutr.* 28/2:224-236.
- Chao, C., Slezal, J., Caan, B. and Quinn, V. (2008). Alcoholic beverage intake and risk of lung cancer: The California men's health study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention.* 17:10. pp. 2692-2699.
- Cole, J. and Skopek, T. (1994). International commission for protection against environmental mutagens and carcinogenesis, working paper 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population *in vivo.* *Mutation Res.* 304:33-106.
- Da Silva, J., Herrmann, S.M., Heuser, V., Peres, W., Possa Marroni, N., Gonzalez-Gallegos, J. and Erdtmann, B. (2002). Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.* 40:941-947.
- Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hatzoglou, A., Panagiotou, S., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P., and Castanas, E. (2000). Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 78:429-441.
- Dass, S. B., Ali, S. F., Heflich, R. H. and Casciano, D. A. (1997). Frequency of spontaneous and induced micronuclei in the peripheral blood of ageing mice. *Mutation Res.* 381:105-110.
- Dominé, A. (2004). El vino. Editorial Könnemann. pp. 928.
- Dudley, J., Lekli, I., Mukherjee, S., Das, M., Bertelli, A. and Das, D. (2008). Does white wine quality for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: resveratrol, tyrosol and hydroxytyrosol. *J. Agric. Food Chem.* 56:9362-9373.
- Edenharder, R., Sager, J. W., Glatt, H., Muckel, E. and Platt, K. L. (2002). Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoides against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4,5-b)pyridine (PnIP) in metabolically competent V79 cells. *Mutation Res.* 521:57-72.
- Edenharder, R., Krieg, H., Köttgen, V. and 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. *Mutation Res.* 537:169-181.



- Fenech, M. and Crott, J. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes, evidence for breakage, fusion, bridge cycles in the cytokinesis, block micronucleus assay. *Mutation Res.* 504:131-136.
- FDA. U.S. Food and Drugs administration. (2000). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Redbook. USA.
- Ferry, D. R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyte, D. W., Takats, P. G., Anderson, D., Baker, J. and Kerr, D. J. (1996). Phase I clinical trial of the flavonoide 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. and Chengelis, C.P. Editorial Marcel Dekker, Inc. USA. pp. 884.
- García-Rodríguez, M. C. y Altamirano-Lozano, M. (2001). Sales de sodio y cobre de la clorofila: usos aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígenas. *TIP.* 4(2):77-86.
- García-Rodríguez, M. C., López-Santiago, V. and Altamirano-Lozano, M. (2001). Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Res.* 46:145-151.
- García-Rodríguez, M. C. y Altamirano-Lozano, M. (2007). La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón *in vivo*. *Rev. Bioquímica.* vol. 32 (1):15-24.
- German, J.B. and Walzem, R.L. (2000). The health benefits of wine. *Annu. Rev. Ilutr.* 20:561-93.
- Ghosh, A.K., Sen, S., Palit, S., Ghosh, A., Sharma, A. and Talukder, G. (1991). Comparative efficacy of chlorophyllin in reducing cytotoxicity of some heavy metals. *Biol. Metals.* 4a:158-161. Citado en: Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Res.* 46:145-151.
- Greenrod, W., Stockley, C.S., Burcham, P., Abbey, M. and Fenech, M. (2005). Moderate acute intake of de-alcoholised red wine, but not alcohol, is protective against radiation-induce DNA damage ex vivo-Results of a comparative *in vivo* intervention study in younger men. *Mutation Res.* 591:290-301.

- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slide. *Mutation 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. and Sutuo, S. (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol desing including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:234-252.
- Heddle, A.J., Hite, M., Kirkhart, M.K. and Salome, F.M. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. Ed. Elsevier Science Publisher 83, 165-1110.
- Hemmink, K., Dipple, A., Shuker, D., Fadlubar, F., Segerback, D. and Bartsch, H. (1994). Adducts identification and biological significance. International Agency for Research on Cancer Lyons. IARC Scientific Publications 125: 478.
- Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. (1999). Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* 37:937-942.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.* 540:153-163.
- Klaunig, J. and 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. and 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.* 101:1727-1741.
- Leighton, F., Urquiaga, I. y Diez, M. (1997). Propiedades antioxidantes del vino y sus componentes. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. pp. 29.
- Longnecker, M. (1995). Alcohol consumption and the risk of cancer in humans: An overview. *Alcohol.* 12:87-96.

- Maffei, F., Fignornari, C., Forti, G. C., Castelli, E., Stefenini, G. F. and 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., Stefenini, G. F., Mattioli, S. and Hrelia, P. (2002). Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutation Res.* 514:49-58.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallegos, J. y Tuñón, M.J. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *J. Nutr. Hosp.* 6:271-278.
- Mateos Nava, R.A. (2007). Efectos del vino tinto sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el trióxido de cromo en el ratón *in vivo*. Tesis Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, (UNAM-FESZAR). México, D.F. pp. 59.
- Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and 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. *Mutation Res.* 239:29-80.
- Müller, L., Kikuchi, Y., Probst, G., Schechtman, L., Shimada, H., Sofuni, T. and Tweats, D. (1999). ICH-harmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Res.* 436:195-225.
- Oak, M., El Bedoui, J. and Schini-Kerth, V. B. (2005). Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J. Nutr. Biochem.* 16:1-8.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. (1997). Guideline for the testing of chemicals. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. 474:1-10.
- Park, Y. K., Park, E., Kim, J. and Kang, M. (2003). Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutation Res.* 529:77-86.
- Peto, R., Doll, R., Ruckley, J.D. and Sporn, M.B. (1981). Can dietary  $\beta$ -carotene materially reduce human cancer rates?. *Nature*. 290:201-208. Citado en: Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Res.* 46:145-151.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology Medicine*. 20(7):933-956.
- Rice-Evans, C. and Packer, L. (2003). *Flavonoids in Health and Disease*. Second edition Revised and Expanded. New York. pp. 467.
- Rimm, E.R., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M. and Willet, W. (1996). Relation between intake of flavonoides and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Annu. Intern. Med.* 125:384-389.
- Rodgers, H. and Grant, 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.
- Rolland, M. (2008). *Los Vinos: Los secretos del vino, paises y regiones*. Segunda edición. Larousse. España. pp. 599.
- Sandler, M. and Pinder, R. (2003). *Wine A: scientific exploration*. Imperial college Medical school and Organ Inc. Taylor & Francis group. London, UK. pp. 320.
- Scialli, A.R. (1992). *A clinical guide to reproductive and developmental toxicology*. CRC Press, Inc. USA. pp. 284.
- Singleton, V.L. (1981). Flavonoids. En: Childester, C.O., Mrak, E.M. and Stewart, G. *Advances in Food Research*. New York: Academic Press. 149-242.
- Skibola, C.F. and Smith, M. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology Medicine*. 29:375-383.
- Soleas, G.J., Grass, L., Josephy, P.D., Goldberg, D.M. and Diamandis, E.P. (2002). A comparison of the anticarcinogenesis properties of four red wine polyphenols. *Clin. Biochem.* 35:119-124.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I. and Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Res.* 579:200-213.
- Steinmetz, K. and Potter, J. D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 96:1027-1039.

- Streissguth, A. and Bonthius, D. (2005). Alcohol and pregnancy and the fetal alcohol syndrome. *Encyclopedia of life sciences*. Washington and Iowa, USA. pp.1-7.
- Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, G., Russo, G.L., Carraturo, A., Faruolo, C., Moio, L. and Palumbo, R. (2000). Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *J. Nutr. Biochem.* 11:114-119.
- Téllez, J. y Cote, M. (2006). Alcohol étílico: Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia*. vol. 54. no. 1. pp. 32-47.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress- induce cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160:1-40.
- Vallarino-Kelly, T. and Morales-Ramirez, P. (2001). Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast *in vivo*. *Mutation Res.* 495:51-59.
- Von Ledebur, M.V. and Schmid, W. (1973). The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Res.* 19:109-117.
- Wilson, J. (1979). Environmental chemicals. Citado en: *Handbook of teratology*. Plenum press. New York and London. pp. 357-385.
- Winn, D.M., Ziegler, K.G., Pickle, L.P., Gridley, G., Blot, W. and Hoover, R.N. (1984). Diet in the etiology of oral and pharyngeal cancer among women from southern United States. *Cancer Res.* 44:1216-1222. Citado en: Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Res.* 46:145-151.
- Zeiger, E. (2007). Guest Editorial. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript?. *Mutation Res.* 626:1-3.
- Zhanataev, A.K., Kulakova, V.V. and Durnev, A.D. (2008). *In vivo* of dihydroquercetin genotoxicity. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Pharmacology and Toxicology*. vol. 145, no. 3:338-340.
- Zúñiga, M. (2005). Caracterización de fibra dietaria en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva. Tesis de la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. pp. 68.

## 10. ANEXOS

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

### A) NACIONALES

**Evento:** XIII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, D.F., Celebrado del 1 al 3 de octubre de 2008.

**Título de la ponencia:** “Efecto del tratamiento del vino tinto y de la quercetina, sobre del vino tinto y de la quercetina, sobre la frecuencia de micronúcleos en el ratón *in vivo*.”

**Autores:** Guerrero Palomo Gabriela, Altamirano Lozano Mario y García Rodríguez María del Carmen.

**Evento:** IV Congreso de Investigación, FES Zaragoza, UNAM. Iztapalapa, México D.F., Celebrado del 21 al 24 de octubre de 2008.

**Título de la ponencia:** “Estudios del efecto de componentes de la dieta sobre el daño al ADN inducido por el trióxido de cromo en el ratón *in vivo*.”

**Autores:** García Rodríguez, M. C., Vilches Larrea, R. E., López Salinas G.V., Guerrero Palomo, G., y Altamirano-Lozano, M.

**Evento:** IV Foro de Investigación Escolar en Biología (V Foro de Investigación Formativa, XXXIII Foro de Investigación Escolar, XXVII Foro de Salidas Terminales), FES Zaragoza, UNAM. Iztapalapa, México D.F., Celebrado del 12 al 16 de enero de 2009.

**Título de la ponencia:** “Estudio de los efectos de los pigmentos vegetales (clorofilina y flavonoides) sobre el daño al ADN inducido por el trióxido de cromo en el ratón *in vivo*.”

**Autores:** García Rodríguez, M. C., Guerrero Palomo, G., Vilches Larrea, R. E., López Salinas G.V., y Altamirano-Lozano, M.

### B) INTERNACIONALES

**Evento:** 3<sup>rd</sup> International Congress, Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries, Querétaro, México, Celebrado del 14 al 17 de octubre de 2008.

**Título de la ponencia:** “Evaluation of DNA Damage of Red Wine and Red Wine Enriched with Quercetin in the Mouse *in vivo*.”

**Autores:** García-Rodríguez, M. C., Guerrero-Palomo, G. and Altamirano-Lozano, M.

**Organizador:** Asociación Mexicana de la Ciencia de los Alimentos (AMECA) y La Universidad Autónoma de Querétaro, Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la Republica (PROPAC).

**Evento:** II Congreso de Radicales Libres y Estrés Oxidativo de la SMB, en Taxco, Guerrero, México. Celebrado del 31 de marzo al 3 de abril de 2009.

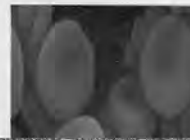
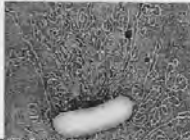
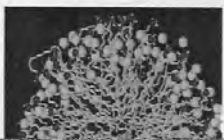
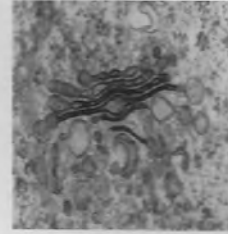
**Título de la ponencia:** “Effects of green tea and red wine and red wine enriched with quercetin on DNA damage induced by trioxid chromium in mice *in vivo*.”

**Autores:** García-Rodríguez, M. C., Vilches-Larrea, R. E, Guerrero-Palomo, G. and Altamirano-Lozano, M.



XXIII

# Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud



## **EFFECTO DEL TRATAMIENTO DEL VINO TINTO Y DE LA QUERCETINA, SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS EN EL RATÓN *in vivo*.**

Guerrero Palomo Gabriela, Altamirano Lozano Mario y García Rodríguez María del Carmen.  
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, D.F.

El vino tinto es una bebida obtenida de la uva tinta, dentro de sus componentes se han encontrado sustancias con propiedades antioxidantes tales como los polifenoles, los que han sido descritos como benéficos para la salud, ya que previenen de enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y del daño al ADN. Dentro de los polifenoles, ha llamado la atención la quercetina, por presentar un mayor potencial antioxidante comparado con los otros componentes del vino tinto. En estudios previamente realizados en nuestro laboratorio, se observó que la administración *ad limitum* de vino tinto diluido al 75% durante una semana no modificaba la frecuencia de micronúcleos (MN) en sangre periférica de ratones de la cepa CD-1, al igual que la administración de una sola dosis de quercetina (625 mg/kg) vía intraperitoneal (i.p.). Por lo que, en este trabajo se estudiaron los efectos de la administración del vino tinto y del vino tinto con quercetina, sobre la frecuencia de MN en sangre periférica de ratón *in vivo*, utilizando la técnica de naranja de acridina (NA) de Hayashi, *et al.*, 1991. Se emplearon ratones hembras de la cepa CD-1, las cuales se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas. Se conformaron grupos de estudio de cinco hembras cada uno y se dividieron de la siguiente manera: 1) Grupo Testigo, se le administró vía sonda únicamente el vehículo; 2) Grupo Vino, se les trató vía sonda por 2 días cada 12 horas con una dosis de 0.20 ml de vino tinto (Cabernet sauvignon) y 3) Grupo Vino-Quercetina, se les administraron dosis de 0.20 ml de vino tinto (Cabernet sauvignon) vía sonda por 2 días, cada 12 horas y una dosis por vía i.p. de 100 mg/kg peso corporal de quercetina en el tercer día después de iniciar los tratamientos del vino. En los resultados obtenidos hasta el momento se ha observado que, al grupo que sólo se le administró el vehículo (testigo) no se le modifica la frecuencia de MN, mientras que, en los grupos tratados con vino y con vino tinto-quercetina la frecuencia de MN se incrementa alrededor de 2 MN por 1000 células (en las hora 48 y 72), lo cual si bien no es un claro efecto sobre un posible daño al ADN, comparado con agentes genotóxicos como los compuestos del cromo o la ciclofosfamida, el incrementó es considerable sobre todo si los polifenoles son antioxidantes que protegen al ADN del estrés oxidativo. Estos resultados nos hacen suponer que, el daño al ADN observado es producido principalmente por el contenido del alcohol en el vino tinto, por lo que se sugiere probar otros protocolos modificando las dosis y concentración del vino tinto.

Palabras clave: vino tinto, quercetina, micronúcleos



**PROGRAMA**

**IV Congreso de Investigación  
en la FES Zaragoza**



**Del 21 al 24 de octubre de 2008**

## **ESTUDIO DEL EFECTO DE COMPONENTES DE LA DIETA SOBRE EL DAÑO AL ADN INDUCIDO POR EL TRIÓXIDO DE CROMO EN EL RATÓN *in vivo*.**

García-Rodríguez, M.C., Vilches Larrea, R.E., López Salinas, G.V., Guerrero Palomo G. y Altamirano Lozano M. Unidad de Investigación en Genética. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.  
D.F. maricar\_67@yahoo.com

Las poblaciones humanas se encuentran expuestas a diversos agentes que pueden alterar la integridad del ADN y repercutir en la salud. En los últimos años se ha incrementado el estudio de sustancias con propiedades antioxidantes, con fines de buscar protección de daño al ADN. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar los efectos del té verde, el vino tinto y la clorofilina sobre el daño al ADN inducido por el trióxido de cromo ( $\text{CrO}_3$ ). Se empleó la técnica de micronúcleos (MN) en sangre periférica de ratón *in vivo*. Grupos de cinco ratones de la cepa CD-1 fueron tratados con agua, té verde y vino tinto (por vía intragástrica),  $\text{CrO}_3$  y clorofilina (por vía intraperitoneal) y grupos combinados del té verde, vino tinto y la clorofilina con el  $\text{CrO}_3$ . Las muestras de sangre se tomaron de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos. Se observó que; en los grupos testigo, té verde y clorofilina no se modifica la frecuencia de MN, mientras que, en los grupos tratados con el  $\text{CrO}_3$  y vino tinto se incrementa el número de MN, siendo más significativo para el grupo  $\text{CrO}_3$ , ya que el grupo de vino tinto solo se incremento alrededor de dos MN, mientras que en el de  $\text{CrO}_3$  hasta 8 MN. En los grupos que se combinaron los tratamientos se observo que, la clorofilina disminuye el efecto del  $\text{CrO}_3$ , sin embargo, el té verde no modificó el efecto inducido por el  $\text{CrO}_3$ .



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

División de Ciencias Químico Biológicas

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**IV FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA**

(V FORO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA, XXXIII FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR, XXVII FORO DE SALIDAS TERMINALES)

**M E M O R I A S**

Realizado en el Auditorio de Campus II y Sala de Audiovisuales de la Biblioteca Campo II del 12 al 16 de enero del 2009

Al hacer clic sobre un trabajo del programa se muestra el resumen correspondiente y en el ángulo superior derecho de cada página está el icono para regresar.

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS PIGMENTOS VEGETALES  
(CLOROFILINA Y FLAVONOIDES) SOBRE EL DAÑO AL ADN INDUCIDO POR  
EL TRIÓXIDO DE CROMO EN EL RATÓN *in vivo*.**

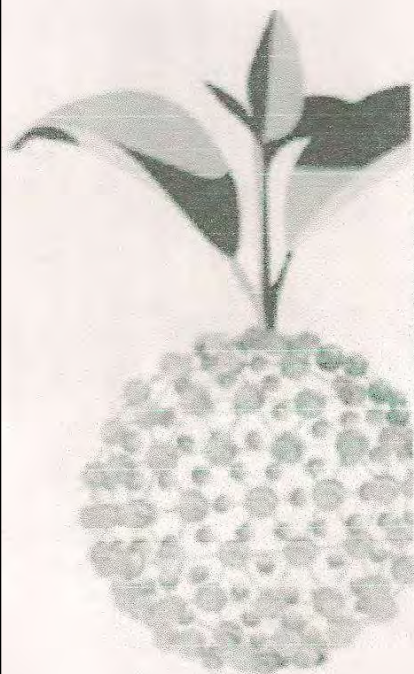
García Rodríguez, M. C., Guerrero Palomo, G., López Salinas G.V., Vilches Larrea, R. E. y  
Altamirano-Lozano, M.

Las poblaciones humanas se encuentran expuestas a diversos agentes que pueden alterar la integridad del ADN y repercutir en la salud. En los últimos años se ha incrementado el estudio de sustancias con propiedades antioxidantes, con fines de buscar protección de daño al ADN. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar los efectos del té verde, el vino tinto y la clorofilina sobre el daños al ADN inducido por el trióxido de cromo ( $\text{CrO}_3$ ). Se empleó la técnica de micronúcleos (MN) en sangre periférica de ratón *in vivo*. Grupos de cinco ratones de la cepa CD-1 fueron tratados con agua, té verde y vino tino (por vía intragástrica),  $\text{CrO}_3$  y clorofilina (por vía intraperitoneal) y grupos combinados del té verde, vino tinto y la clorofilina con el  $\text{CrO}_3$ . Las muestras de sangre se tomaron de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos. Se observó que; en los grupos testigo, té verde y clorofilina no se modifica la frecuencia de MN, mientras que, en los grupos tratados con el  $\text{CrO}_3$  y vino tinto se incrementa el número de MN, siendo más significativo para el grupo  $\text{CrO}_3$ , ya que el grupo de vino tinto solo se incremento alrededor de dos MN, mientras que en el de  $\text{CrO}_3$  hasta 8 MN. En los grupos que se combinaron los tratamientos se observo que, la clorofilina disminuye el efecto del  $\text{CrO}_3$ , sin embargo, el té verde no modificó el efecto inducido por el  $\text{CrO}_3$ .

FSFB, 3rd International Congress, 14-17 October, 2008, Querétaro



## **PROGRAM**



FOOD SCIENCE AND  
FOOD BIOTECHNOLOGY  
IN DEVELOPING  
COUNTRIES

**3<sup>rd</sup> International Congress**

**Organized by**

Asociación Mexicana de Ciencia de los  
Alimentos (AMECA),  
Universidad Autónoma de Querétaro,  
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro  
de la República (PROPAC)

**Querétaro, México  
October 14-17, 2008**

## **Evaluation of DNA Damage of Red Wine and Red Wine Enriched with Quercetin in the Mouse *in vivo*.**

García-Rodríguez, M. C., Guerrero-Palomo, G. and Altamirano-Lozano, M.  
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, D.F.

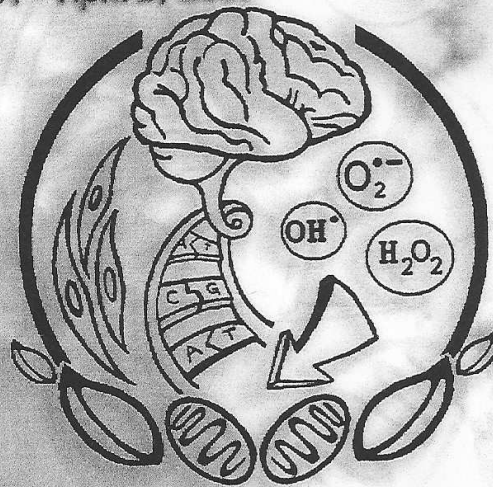
A large body of literature has been devoted to studies describing the potential anticancer activities of red wine polyphenols. In many instances, these effects can be attributed to plausible biochemical mechanisms including enhanced apoptosis, growth arrest at one or more points in the cell cycle, inhibition of DNA synthesis, and modulation of signal transduction pathways by altered expression of key enzymes such as cyclooxygenases and protein kinases. Quercetin (flavone) has a wide spectrum of anticancer properties including inhibition of the growth of cells derived from human cancers such as those of stomach, colon, prostate and breast. The aim of this study was to determine the effects of red wine and red wine enriched with quercetin on DNA, evaluated by the analysis of micronuclei (MN) using the acridine orange technique. Mice from CD-1 strain were treated with red wine and red wine enriched with quercetin (polyphenols of red wine). Quercetin (100 mg/kg) was administered by intraperitoneal via and red wine was administered two days by gavage via (0.20 ml of red wine were administered every 12 hours). Blood samples were obtained from the tail vein. Results shown that the administration of red wine and red wine enriched with quercetin, increase marginal the number of MN at 48 and 72 hours (one to two MN) after treatments, suggesting that red wine induce damage to DNA, possible by its contain alcohol. On the other hand, the frequency of polychromatic erythrocytes (PCE) was not modifying suggesting a non-cytotoxic effect. New experiments are necessary to identify no effects of doses of red wine and its mechanisms.

(Key words: red wine, quercetin, DNA damage, micronuclei)

4<sup>th</sup> International workshop  
On comparative aspects  
Of **oxidative stress**  
In biological systems,

II Meeting of the Free Radicals and  
Oxidative Stress branch of the  
Mexican Biochemical Society.

March 31 - April 3, 2009



## **EFFECTS OF GREEN TEA AND RED WINE AND RED WINE ENRICHED WITH QUERCETIN ON DNA DAMAGE INDUCED BY TRIOXID CHROMIUM IN MICE *IN VIVO*.**

García-Rodríguez, M. C., Vilches-Larrea, R. E, Guerrero-Palomo, G. and Altamirano-Lozano, M.  
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, D.F.

Epidemiological evidence indicates that a diet including phenolic compounds, may decrease the incidence of diseases associated with DNA damage mediated by reactive oxygen species (ROS). Green tea (*Camellia sinensis*) and red wine are of the most common beverages worldwide consumed and contains more polyphenols, especially catechins and quercetin. Chromium (VI) compounds induces DNA damage by reactive oxygen species (ROS), during its reduction to Cr(III). The aim of this study was to determine the effects of green tea and red wine on DNA damage and its effects on micronuclei induced by CrO<sub>3</sub> *in vivo*. Groups of five mice CD-1 strain were treated as follows: Control group (administrated doses of vehicle by gavage); green tea group (administrated four 0.25 ml doses, 1g of tea in 7 ml of boiling water, of green tea by gavage); chromium group, which was treated by a single dose of CrO<sub>3</sub> (20 mg/kg) by intraperitoneal via; green tea-chromium group, which was treated by four doses of green tea administered 48 hours before the application of CrO<sub>3</sub>; quercetin group, which was administrated by i.p. via 100 mg/kg and red wine group, which administrated two days by gavage via 0.20 ml of red wine every 12 hours. DNA damage was evaluated by the analysis of micronucleus (MN) using the acridine orange technique. Blood samples were obtained from the tail vein at 0, 24, 48 and 72 h after treatment. Results showed that the administration of red wine and red wine enriched with quercetin, increase the number of MN at 48 and 72 hours (from one to two MN) after treatments, suggesting that red wine induces damage to DNA, possible by its alcohol content. On the other hand, the administration of CrO<sub>3</sub> to mice increased the MN frequency at 48 h. When green tea was administrated alone, effects were not observed on MN number. When green tea was administrated previously to the injection of CrO<sub>3</sub>, the number of MN tended to increase significantly, suggesting that green tea does not protect the DNA damage induced by CrO<sub>3</sub>. It is remarkable to note that at hours 24 and 48, the number of micronuclei increased more than in the CrO<sub>3</sub> group, which could be related to the synergic effect. On the other hand, the frequency of polychromatic erythrocytes (PCE) was not-modifying, suggesting a non-cytotoxic effect. It is necessary to perform new experiments using other protocols with green tea and red wine.

(Key words: green tea, DNA damage, micronuclei, Chromium)