



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“Evaluación de los efectos del ácido ascórbico, del α -tocoferol y de los β -carotenos sobre las frecuencias de micronúcleos inducidas por el trióxido de cromo en ratones hembra de la cepa CD-1”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
GABRIELA SERRANO REYES

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

Agosto 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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



Agradecimientos

A mi madre por patrocinar en todos los sentidos los momentos más felices de mi vida hasta ahora y por regalarme la oportunidad de ser independiente.

A mi padre quien me enseñó que la eficiencia se practica por respeto a uno mismo y que el conocimiento es maravilloso.

A la Dra. María del Carmen porque, incluso antes de ser mi asesora, con su ejemplo me ayudó a entender que la ciencia es una recompensa en sí misma. Por invertir en mi su confianza y amistad.

A mi hermana Li con toda mi admiración, a quien por algún don inexplicable siempre supo como apoyarme ¡hermana lo hicimos!

A Diego por defender mi causa con entusiasmo propio y porque... en la calle codo a codo somos mucho más que dos, te amo.

A Nancy, Cristina y Tonancy por apoyarme en todo momento y por los incontables momentos en que hemos reído juntas. Mujeres admirables por su fortaleza, las quiero.

A mis hermanos y hermanas de AMPAG, porque en su labor profunda de transformar su vida, ayudaron a transformar la mía. En cada oportunidad que le he dado... ha sido espectacular.

A todas las personas que han caminado a mi lado, sólo puedo decir... **GRACIAS.**

Dedicatorias

A Olga Reyes, mi madre... mi heroína

A Miguel Ángel Serrano, mi padre... mi mentor

A Liliana Serrano, mi hermana... mi complemento

Índice de Contenido

Resumen	i
Índice de abreviaturas	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antimutagénesis	1
1.2. Principales fuentes de agentes antimutagénos	1
1.3. Antioxidantes en la dieta	2
1.4. Ácido ascórbico	2
1.5. α -tocoferol	5
1.6. β -caroteno	6
1.7. Estrés oxidante	8
1.7.1. Radicales libres y especies reactivas.....	8
1.7.2. Daño oxidante al ADN	9
1.8. Genotoxicidad	9
1.8.1. Evaluación de daño genotóxico	10
1.8.2. Micronúcleos	10
1.9. Metales como inductores de daño genotóxico	11
1.9.1. Compuestos de Cr(VI)	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. HIPÓTESIS.....	14
4. OBJETIVOS.....	15
4.1. Objetivo general	15
4.2. Objetivos particulares.....	15
5. MATERIAL Y MÉTODO.....	16
5.1. Animales	16
5.2. Reactivos	16
5.3. Tratamientos	16
5.4. Preparación de laminillas	19

5.5.	Obtención de sangre periférica	19
5.6.	Análisis de Micronúcleos	19
5.7.	Análisis estadístico	20
6.	RESULTADOS	21
7.	DISCUSIÓN.....	34
8.	CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES.....	43
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
10.	ANEXOS.....	51

Resumen

La exposición a agentes mutágenos así como el estilo de vida y deficiencias nutricionales, incrementan la probabilidad de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con el daño al ADN. En contra parte, en estudios epidemiológicos se ha observado que los componentes antioxidantes de las frutas y los vegetales son un factor importante en la modulación de algunas enfermedades relacionadas con el daño al ADN y algunos tipos de cáncer. De hecho, se ha observado que algunas sustancias con propiedades antimutágenas también presentan actividad como agentes anticancerígenos, ya que los mecanismos de acción inhibitoria pueden estar relacionados. En el presente estudio se evaluó el efecto sobre el daño genotóxico inducido por compuestos cancerígenos [Cr (VI)], de sustancias componentes de la dieta que han sido identificadas como antimutágenas tales como; el ácido ascórbico, el α -tocoferol y el β -caroteno, para lo cual se empleó el ensayo de MN en sangre periférica en ratones de la cepa CD-1. Grupos de 5 ratones fueron tratados de la siguiente manera: a) Grupo testigo, solo se le administro el vehículo, b) Grupo testigo positivo, se le administro 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p., c) Grupos de antioxidantes, se les administraron dosis únicas de 100 mg/ kg de ácido ascórbico vía i.p., 20 mg/kg de α -tocoferol , 50 mg/ kg de β -caroteno vía oral (sonda intragastrica) y 100-20 mg/kg de ácido ascórbico- α -tocoferol y d) Grupos experimentales, a los que se les administró el tratamiento de antioxidantes (100 mg/ kg de ácido ascórbico vía i.p., 20 mg/kg de α -tocoferol , 50 mg/ kg de β -caroteno vía oral (sonda intragastrica) y 100-20 mg/kg de ácido ascórbico- α -tocoferol) y dos horas después el agente genotóxico (20 mg/kg de CrO₃). Muestras de sangre periférica fueron obtenidas de la vena caudal a las horas 0, 24, 48 y 72 después de la aplicación de los tratamientos y se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia para identificar la presencia de MN en EPC. Los resultados obtenidos muestran que la administración sola de antioxidantes no incrementan las frecuencias de MN, si no por el contrario para el caso del ácido ascórbico se redujo la frecuencia basal de MN. La administración del CrO₃ incrementó la frecuencia de MN de manera estadísticamente significativa, lo cual corroboró el daño genotóxico de los compuestos de Cr (VI). Cuando se combinaron los tratamientos de antioxidantes con CrO₃ se observó que disminuyó el daño genotóxico inducido por el tratamiento de CrO₃, ya que se presentó una disminución en las frecuencias de MN (hora 48) en el siguiente orden: ácido ascórbico (57%) > α -tocoferol (48%) > β -caroteno (25%). Esto puede estar relacionado con el potencial de los tratamientos antioxidantes para neutralizar las ERO's y RL generados por la reducción del Cr (VI) a Cr (III). Cuando se combinaron los tratamientos de β -caroteno y CrO₃ se presentó un efecto dual, ya que a las 24 y 48 horas se disminuyeron las frecuencias de MN, pero a las 72 horas se incrementaron, lo que sugiere efecto anti y prooxidante del β -caroteno. La administración del ácido ascórbico- α -tocoferol previo a la administración del CrO₃ no incremento la protección observada en comparación con la administración independiente de cada uno de los tratamientos. Finalmente, la administración de los tratamientos antioxidantes y CrO₃ no modificaron las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, por lo que no presentan efectos citotóxicos evaluados con este parámetro.

Índice de abreviaturas

α-toc	α -tocoferol
α-TO·	Radical α -tocoferoxil
A·	Radical ascorbilo
aa	Ácido ascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
β-car	β -caroteno
Cr(VI)	Cromo hexavalente
Cr	Cromo
CrO₃	Trióxido de cromo
DHA	Ácido dehidroascórbico
DIF	Frecuencia Diferencial de la Inducción de MN
EPA	Environmental Protection Agency
EPC	Eritrocitos Policromáticos
ENC	Eritrocitos Normocromáticos
ERC's	Especies Reactivas de Cobre
ERO's	Especies Reactivas de Oxígeno
ERI's	Especies Reactivas de Hierro
ERN's	Especies Reactivas de Nitrogeno
FDA	Food and Drug Administration
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICH	Intercambio de Cromátidas Hermanas
i.p.	Intraperitoneal
LD₅₀	Dosis Letal 50

MN	Micronúcleo (s)
NA	Naranja de Acridina
NIF	Frecuencia Neta de la Inducción de MN
-OH	Radical hidroxilo
RL	Radicales Libres
ROO·	Radical peroxilo
O₂·	Radical superoxido
¹O₂	Oxigeno singulete
WHO	World Health Organization

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antimutagénesis

El término “antimutagénesis” se refiere al proceso mediante el cual se reduce la frecuencia de mutaciones espontáneas o inducidas (Kada, 1984). Los antimutágenos pueden ser agrupados en agentes bloqueadores, los cuales impiden que los mutágenos lleguen o reaccionen con los órganos blanco y en agentes supresores, que previenen la evolución de los procesos mutagénicos (Wattenberg, 1981). Se ha descrito que dentro de los mecanismos de antimutagénesis se pueden encontrar:

- a) Desmutagénesis; comprende a la actividad que se presenta en el organismo para excretar los agentes mutagénicos, desactivarlos ya sea por medio de mecanismos físicos o químicos, inhibir su activación enzimática y la entrada de estos a la célula, así como impedir la formación endógena.
- b) Bioantimutagénesis; consisten en disminuir la frecuencia de mutaciones, mediante la reparación del ADN, inhibición y control de la replicación celular y el control de la expresión génica (Kada *et al.*, 1982; De Flora, 1998).

1.2. Principales fuentes de agentes antimutagénos

La dieta es reconocida como un factor importante en la modulación de distintas enfermedades relacionadas con el daño al ADN. En estudios epidemiológicos y experimentales se ha mostrado que algunas plantas comestibles o sus componentes presentan actividad como antimutágenos y tienen efectos protectores en la carcinogénesis humana (Surh y Ferguson, 2003). Dentro de los componentes vegetales con mayor actividad se encuentran algunos pigmentos como la clorofila y sus sales, los flavonoides y los β -carotenos, así como las vitaminas C (ácido ascórbico) y la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) (Konopacka, 1998; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2001).

Particularmente, se ha observado en poblaciones del mediterráneo que llevan una dieta a base de aceite de oliva, pescado, frutas, verduras y vino tinto, que presentan alrededor de un 50% menos en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer en comparación con las poblaciones occidentales o las que no llevan este tipo de dieta. La disminución de este tipo de enfermedades se le ha atribuido principalmente a los componentes antioxidantes de las mismas; como lo son las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (α -tocoferoles y tocotrienoles) y a los flavonoides (principalmente las catequinas). Se

ha encontrado que los vegetales oscuros (hojas de color verde y amarillo / naranja de frutas y verduras) presentan una mayor concentración de vitaminas así como de los precursores de las vitaminas y de flavonoides. También, se han observado una disminución de algunos tipos de cáncer en las poblaciones asiáticas, que se le ha asociado al consumo de soya, té verde, ajo y ginseng entre otros (Lindsay y Astley, 2002; Surh, 2003).

1.3. Antioxidantes en la dieta

Se ha propuesto como principal vía de protección de los componentes de la dieta a la actividad antioxidante ya que al interaccionar con los radicales libres evitan que dañe el material genético. El ácido ascórbico, el α -tocoferol y los β -carotenos se encuentran en diversos alimentos vegetales y han mostrado un alto potencial antioxidante (Gonzales-Torres *et al.*, 2000).

Los antioxidantes son sustancias que, a bajas concentraciones retrasan o inhiben la oxidación celular, pueden ser sintetizados por la célula (endógenos) o provienen de la dieta (exógenos). La protección antioxidante comprende no solo la captura de radicales libres, sino también previene su formación, inhibe su propagación y estimula los procesos de reparación celular. En el caso de los antioxidantes exógenos también pueden estimular los mecanismos antioxidantes endógenos. Los mecanismos antioxidantes evitan la alteración de lípidos y proteínas además disminuyen la tasa de mutación en las células, a través de dos vías: disminución de los daños oxidantes al ADN y la disminución en la tasa de divisiones celulares (Gonzales-Torres *et al.*, 2000).

Enfermedades degenerativas como el cáncer se han relacionado al estrés oxidante, por lo que el estudio de los componentes antioxidantes en la dieta, ha surgido con grandes expectativas en la actualidad (Serrano *et al.*, 1991).

1.4. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) es una vitamina hidrosoluble con un alto potencial antioxidante. Debido a que los humanos no podemos sintetizarlo, se obtiene con la ingesta de frutas y verduras entre los que destacan por su alto contenido: el chile poblano, el pimiento verde, el brócoli, el nopal, el tomatillo, la guayaba, el mango y los cítricos (Padayatty *et al.*, 2003).

La ingesta recomendada de ácido ascórbico para personas sanas es de 75 a 90 mg/día, lo cual puede obtenerse con el consumo de cinco porciones de frutas o verduras (200mg/kg), estos requerimientos aumentan en caso de embarazo, intensa actividad física,

tabaquismo y en estados patológico Una dieta deficiente en este nutrimento ocasiona escorbuto (Cadenas y Packer, 2002; Lee, 2009).

El ácido ascórbico se absorbe en el intestino delgado en un 90% mediante transporte activo dependiente de sodio, este proceso es saturable y dosis-dependiente. Tanto el ácido ascórbico como su forma oxidada el ácido dehidroascórbico se transportan en el plasma y se distribuyen a todos los tejidos, particularmente a los tejidos glandulares, al cristalino y los leucocitos. Al igual que en el intestino el paso del ácido ascórbico al citosol se realiza mediante transporte activo por los transportadores específicos SVTC (*sodium- dependent vitamin C transporter*) y los transportadores de glucosa GLUTs. En el interior de la célula el ácido dehidroascórbico, se reduce a ácido ascórbico en presencia de glutatión (GSH). Una parte del ácido ascórbico que no captan los tejido se reabsorbe en el riñón, el resto se excreta en la orina al igual que el ácido dehidroascórbico que no pudo ser reducido por el GSH (Oro y Donnamaría, 2006; Serra y Cefaro, 2007).

La mayoría de las funciones fisiológicas del ácido ascórbico dependen de su potencial de oxido reducción. En la biosíntesis de colágeno, carnitina, y neurotransmisores como la neuroadrenalina y la serotonina, así como en el metabolismo de la tirosina actúa como un cofactor de las enzimas hidroxilasas y oxigenasas, manteniendo los iones metálicos en el centro activo de estas enzimas en su forma reducida (Konigsberg, 2008). Otra de sus principales funciones es reducir el hierro no hémico a su forma férrica para favorecer su absorción intestinal. Por otra parte aumenta: la actividad de los linfocitos, la producción de interferon y la integridad de las membranas mucosas; funciones por las cuales se le considera benéfico en procesos infecciosos y de catarro común. Finalmente una de las funciones del ácido ascórbico a la que se les ha dado mayor importancia en la actualidad, es la antioxidante (FAO/ WHO, 2001).

Se ha propuesto como mecanismo antioxidante del ácido ascórbico, la neutralización en fase acuosa de las especies reactivas, así como la regeneración de otros antioxidantes como el α -tocoferol, glutatión, ácido úrico y β -carotenos. Tanto el ácido ascórbico y como el ascorbato (forma aniónica del ácido ascórbico) puede donar sus electrones a especies reactivas potencialmente dañinas para neutralizarlas, como producto de esta interacción se forma el radical ascorbilo (A^{\bullet}). El A^{\bullet} es una molécula radical de baja reactividad, debido a que su electrón desapareado se encuentra estabilizado por resonancia y a su capacidad para regenerarse hasta formar nuevamente ácido ascórbico o donar un segundo electrón y formar ácido dehidroascórbico (DHA). La molécula de DHA puede reducirse y formar nuevamente ácido ascórbico, por reacción directa libre de enzimas o a través de la acción de las enzimas NADH y GSH (Konigsberg, 2008).

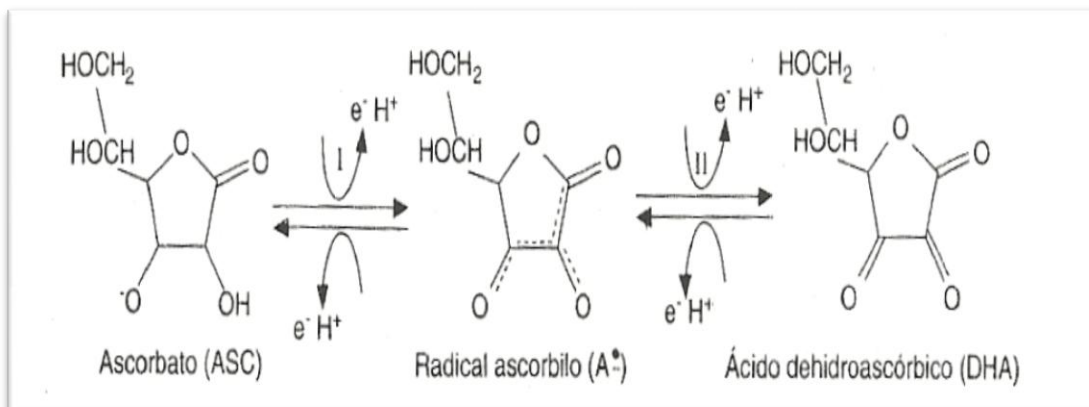


Fig. 1. Regeneración del ascorbato (Tomada de Konigsberg, 2008).

El ácido ascórbico fue descubierto por Haworth y Szent-Györgyi en 1937, desde entonces se han investigado sus posibles beneficios en la prevención y tratamiento de enfermedades como la influenza, el alzheimer, la esclerosis múltiple, la diabetes, la hipertensión, el asma, el glaucoma, las cataratas y algunos tipos de cáncer (Oro y Donnamaría, 2006).

En los primeros estudios que se realizaron para evaluar el ácido ascórbico como tratamiento experimental de cáncer se observó que suplementos de altas dosis de ácido ascórbico aumentan la supervivencia en pacientes con cáncer terminal (Cameron y Pauling, 1976), a partir de este planteamiento, muchos estudios posteriores evaluaron el efecto anticancerígeno de la suplementación con ácido ascórbico, sin embargo actualmente se ha descrito que la administración por vía oral no es suficiente para producir concentraciones farmacológicas suficientes en el plasma lo que ha causado discrepancia en los resultados de estos trabajos (Lee, 2009).

La FDA en el 2007 aprobó un ensayo de toxicidad fase I para determinar las dosis seguras de ácido ascórbico (vía intravenosa), como posible tratamiento para el cáncer en pacientes que han agotado otros tratamientos convencionales. Actualmente distintas líneas de investigación apoyan la hipótesis, de que dosis altas de ácido ascórbico administradas vía intravenosa son benéficas en el tratamiento del cáncer debido a sus propiedades antioxidantes y a que tienen efectos adversos mínimos. Entre los últimos hallazgos sobre la actividad antineoplásica del ácido ascórbico, están los reportados por Chen *et al.* (2008) quienes observaron que la inyección directa de altas dosis de este antioxidante reduce en un 50 % el peso y crecimiento de tumores en modelos de ratones con cáncer de ovario, cerebro y páncreas (Chen *et al.*, 2008; Padayatty *et al.*, 2010).

Otras áreas de investigación han mostrado en modelos animales que el ácido ascórbico optimiza los sistemas enzimáticos hepáticos para la desintoxicación de metales pesados y que forma complejos con estos metales que son más fáciles de excretar (Flora y Tandon, 1986; Houston y Johnson, 2000). Por su parte, en estudios bioquímicos, clínicos y

epidemiológicos se ha observado que el ácido ascórbico puede prevenir el daño genético causado por diferentes agentes mutágenos, debido a su capacidad para neutralizar especies reactivas (ER's) y prevenir la formación de metabolitos tóxicos (Konopacka y Rzeszowska, 2001; Murugesan *et al.*, 2005).

La mayoría de los trabajos experimentales en relación con el ácido ascórbico atribuyen los efectos benéficos encontrados en distintos modelos experimentales, a sus propiedades como antioxidante, sin embargo este mecanismo aun no ha sido claramente descrito. A pesar de que la investigación de las propiedades terapéuticas del ácido ascórbico sigue en proceso, se consumen una amplia variedad de suplementos de este antioxidante, como complementario en el tratamiento del resfriado común e infecciones, en la curación y cicatrización de heridas, fracturas y quemaduras, e incluso se ha implementado como una práctica médica común la administración de ácido ascórbico (500 mg) durante 10 días después de una cirugía para optimizar el proceso de cicatrización (Padayatty *et al.*, 2010). La utilización del ácido ascórbico tanto en la medicina tradicional como en tratamientos experimentales, se debe en gran parte a que no se han observado efectos adversos aparentes. Actualmente la dosis segura tolerable de ácido ascórbico se considera de 1000 mg diarios (Oro y Donnamaría, 2006).

1.5. α - tocoferol

El α -tocoferol es el principal antioxidante de la fase lipídica y se encuentra principalmente en aceites vegetales (soja, maíz, algodón y girasol), partes verdes de las plantas así como en el tejido adiposo de los animales (Sayago *et al.*, 2007). Para la población mexicana se sugiere una ingesta diaria de 15 mg/día (Konigsberg, 2008).

El α -tocoferol es la forma más activa biológicamente de los tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E) los cuales se caracterizan por tener en su estructura química un núcleo heterocíclico oxigenado, un núcleo cromano, un grupo OH, además de grupos metilo y una cadena lateral de origen terpénico. El α -tocoferol se encuentra principalmente en las membranas celulares y en las lipoproteínas plasmáticas, a diferencia de la mayor parte de las vitaminas, no reacciona acoplado a una enzima, sino a través de su sitio activo -OH, en la posición 6 del anillo cromano (Gliszczynska-Swiglo y Sikorska, 2004).

Los tocoferoles y tocotrienoles participan en la estabilización de las membranas, la agregación plaquetaria, y la hemólisis. Se ha descrito que participa como "regulador genético" a nivel del ARNm y que podría tener consecuencias en la regulación de transcripción de genes, traducción de proteínas y estabilidad proteica (Gliszczynska-Swiglo y Sikorska, 2004). Sin embargo su principal función es la defensa celular (especialmente glóbulos rojos, células musculares y células nerviosas) frente a los efectos nocivos producidos por radicales libres (Gerald y Combs, 1992).

El α -tocoferol elimina los RL solubles en lípidos que causan daño oxidante en la membrana celular, la cual, de forma progresiva puede ocasionar patologías cardíacas y cáncer (Sayago *et al*, 2007).

Los tocoferoles interrumpen la autooxidación lipídica mediante la donación de un hidrogeno al radical peroxilo (ROO^\bullet) y se transforman en el radical α -tocoferoxil ($\alpha\text{-TO}^\bullet$) cuyo electrón desapareado se estabiliza por deslocalización electrónica, sin la posibilidad de abstraer hidrogeno de moléculas lipídicas estables y continuar la reacción en cadena de la lipoperoxidación. El α -tocoferol también elimina radicales triclorometil ($^\bullet\text{CCl}_3$), hidroxilo ($^\bullet\text{OH}$), superóxido (O_2^\bullet) y oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) (Konigsberg, 2008).

Los tocoferoles y tocotrienoles fueron descubiertos por Evans en 1922, quien nombro a este grupo de sustancias como vitamina E. Posteriormente estableció que el α -tocoferol es la forma de esta vitamina más abundante en el organismo humano y con mayor actividad biológica. Distintos estudios desde la década de los 70 han propuesto que el α -tocoferol tiene la capacidad de actuar como un agente terapéutico debido a sus propiedades antioxidantes, particularmente en pacientes con enfermedades cardiovasculares (Blé-Castillo *et al*, 2007). Gillilan *et al.* (1977) describieron que suplementos de 1600 UI (un miligramo de α -tocoferol equivale a 1.5 UI) al día en pacientes con enfermedad cardiovascular, disminuye la incidencia de infartos, al igual que Meydani *et al.* (1998) quienes administraron suplementos de 800 UI al día. Por otra parte se ha descrito que los tocoferoles puede reducir las lesiones ateroscleróticas, en distintos modelos animales (Verlangieri y Bush, 1992; Pratico *et al.*, 1998).

La suplementación con α -tocoferol también se ha relacionado con la prevención y tratamiento de cáncer. En estudios *in vitro* se ha descrito que los tocoferoles, particularmente el α -tocoferol, puede inducir apoptosis en la células tumorales (Prasad y Edwards-Prasad, 1982). Sin embargo en estudios como tratamiento experimental anticancerígeno en humanos, se han observado resultados contradictorios (Konigsberg, 2008). Muchos aspectos sobre los mecanismo de acción intracelular por los cuales actúan los tocoferoles y tocotrienoles se desconocen (Blé-Castillo *et al.*, 2007).

1.6. β -caroteno

El β -caroteno es un carotenoide liposoluble precursor de la vitamina A. En los animales se incorpora al organismo a través de la dieta y se almacena en el tejido adiposo e hígado. Es necesario para el crecimiento óseo, para la función ovárica y testicular, el desarrollo embrionario, la regulación del crecimiento y la diferenciación de los tejidos epiteliales. Cuando el β -caroteno se fija en la piel, la protege de los rayos solares y ayuda a disminuir manchas que se originan en el proceso de envejecimiento (Graham y Rosser, 2000).

El mayor aporte de β -caroteno, se obtiene al consumir vegetales como: la zanahoria y el pimiento rojo en los que aporta coloración roja-amarilla y otros como las espinacas y la calabaza. Aunque no ha sido establecida una ingesta recomendada se sugiere consumir un mínimo de 6 mg/día, lo que se obtiene consumiendo 5 porciones diarias de frutas y vegetales. Los suplementos de β -caroteno regularmente consiste en 15 mg/día, aunque no se consideran necesarios (National Cancer Institute, 2010).

Estructuralmente los carotenos son hidrocarburos formados por cadenas poliisoprenoides, casi siempre de 40 carbonos con un complejo sistema de dobles ligaduras conjugadas. El β -caroteno ha sido el carotenoide más investigado como quimiopreventivo, antimutágeno y un agente protector del foto-envejecimiento de la piel. Aunque existen algunos datos inconsistentes que le confieren actividad prooxidativa (Shu-Lan *et al.*, 2004).

Los carotenoides protegen a las células del estrés oxidante al actuar como foto protectores y como moléculas reactivas en la membrana celular contra especies químicas oxidantes generadas dentro de la célula. También, los carotenoides tienen la capacidad como agentes fotosensibles al suprimir al oxígeno singulete generado intracelularmente en las células mediante la absorción de energía. Se ha observado que los carotenoides pueden actuar como agentes reactivos, ya que incorporan los radicales libres a su sistema de dobles enlaces conjugados, de modo que el electrón desapareado forma un radical dentro del carotenoide que se estabiliza en la estructura del mismo por resonancia. En β -caroteno neutraliza radicales peróxido, siempre y cuando se mantengan bajas las presiones parciales de O₂. Si la presión es alta prosigue el proceso oxidante, actuando en este caso como prooxidante. Por tanto, según cuales sean las características fisiológicas actuará de antioxidante o prooxidante. Particularmente con las especies reactivas de oxígeno, los carotenoides pueden reaccionar con ellas, por transferencia de un electrón, remoción de iones hidrogeno y adición de especies reactivas (Konigsberg, 2008).

Un gran número de estudios epidemiológicos sugieren que los nutrientes reguladores del estrés oxidante, como el β -caroteno tienen un efecto protector contra alteraciones genéticas y desarrollo de cáncer inducido por químicos carcinogénicos (Salvadori *et al.*, 1992). La estructura del β -caroteno fue determinada por Paul Karrer (1930). Desde su descubrimiento, numerosos estudios han mostrado que este antioxidante es el carotenoide más abundante en la naturaleza y el de mayor actividad biológica en los humanos, por lo que distintas líneas de investigación han tratado de describir el efecto del β -caroteno en la salud, particularmente por sus características antioxidantes en la incidencia de cáncer y enfermedades cardíacas.

La mayoría de los estudios realizados para determinar las propiedades terapéuticas del β -caroteno, están relacionados con la prevención y tratamiento del cáncer. En modelos animales se ha descrito que el β -caroteno puede inhibir el crecimiento de células tumorales, así como la progresión de la carcinogénesis tanto *in vivo* como *in vitro* (Edes *et al.*, 1989; De Flora *et al.*, 1999). Por otra parte estudios observacionales en humanos, indican que las personas que ingieren dietas con alto contenido en antioxidantes, como el β -caroteno presentan menor riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas como el cáncer (G van Poppel y Goldbohm, 1995; Patrick, 2000).

En ensayos clínicos se ha observado que la administración de dosis altas de β -caroteno (20-50 mg) administradas en poblaciones con alto riesgo de padecer cáncer esofágico y gástrico, disminuye el índice de mortalidad (Blot *et al.*, 1993) de la misma manera que en pacientes con cáncer de piel (Greenberg *et al.* 1990). Sin embargo, en estudios posteriores se observó un incremento en la incidencia de cáncer de pulmón en individuos fumadores que habían sido tratados crónicamente con β -caroteno, lo cual provocó la suspensión del tratamiento (Virtamo *et al.*, 2003). Actualmente se ha descrito que el β -caroteno presenta efectos adversos solo se en individuos fumadores debido a que componentes del tabaco inducen la oxidación del caroteno (Palozza *et al.*, 2006).

Los resultados de la investigación del β -caroteno como tratamiento experimental de cáncer, son contradictorios hasta el momento y no han podido determinarse los mecanismo de acción de este antioxidante, por lo cual la suplementación con β -caroteno no se utiliza con fines terapéuticos, si no experimentales (Navarro *et al.*, 2008).

1.7. Estrés oxidante

El estrés oxidante es un desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas y radicales libres que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes. El estrés oxidante se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la función celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como el Alzheimer, la Esclerosis Múltiple, la Diabetes, la Hipertensión, el Asma, el Glaucoma, las Cataratas y algunos tipos de cáncer (Gutteridge y Helliwell, 1999).

1.7.1. Radicales libres y especies reactivas

Los radicales libres (RL) son especies químicas que contienen un electrón (e^-) no apareado en su órbita externa, ésta característica los hace sumamente reactivos y capaces de provocar una reacción en cadena que causa daño oxidante, desde células hasta tejidos. Las especies reactivas (ER) por otra parte incluyen radicales y no radicales; puede haberlas de oxígeno (ERO's), de hierro (ERI's), de cobre (ERC's) y de nitrógeno (ERN's). Estas moléculas poseen al menos un electrón de mayor contenido energético que el correspondiente en su estado fundamental, lo que las hace moléculas oxidantes que pueden generar radicales libres. Las ER se forman como productos metabólicos de los RL, aunque no todas tienen ese origen (Ramos *et al.*, 2006).

1.7.2. Daño oxidante al ADN

Se ha mostrado que el estrés oxidante genera daño directamente al ADN y indirectamente mediante alteraciones en los componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad de los cromosomas. La acumulación del daño al material genético puede llegar a ocasionar progresión descontrolada del ciclo celular, lo cual puede contribuir a la generación de neoplasias (Ward, 1985).

Uno de los componentes de la molécula de ADN susceptible a ser dañado por radicales libres es la desoxirribosa especialmente por el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) al ser oxidada se induce el rompimiento del enlace entre esta y el grupo fosfato del siguiente nucleótido, mecanismo mediante el cual se generan rompimientos de cadena sencilla. Cuando la cantidad de estos es numerosa y se encuentran muy próximos en la cadena de ADN, conducen a la formación de rompimientos de cadena doble, los que pueden provocar daño permanente al material genético. En consecuencia del estrés oxidante también se modifican las bases nitrogenadas del ADN. El tipo predominante de alteración que genera son las sustituciones y con menor frecuencia deleciones. Las sustituciones generalmente involucran al par guanina-citocina, cuando el oxígeno reacciona con la guanina la elimina del ADN, lo que provoca la formación de rompimientos de cadena sencilla, o bien genera zonas sensibles a rompimientos (González-Torres *et al.*, 2000).

1.8. Genotoxicidad

El concepto genotoxicidad se refiere a cualquier tipo de daño causado sobre el material genético. La exposición a agentes mutagénicos, incrementa el grado de mutaciones en células de la línea germinal, lo que origina problemas reproductivos y enfermedades genéticas en la descendencia, o bien en células somáticas, lo cual es un factor que aumenta el riesgo de enfermedades crónicas y degenerativas así como procesos carcinogénicos (Arencibia *et al.*, 2009).

La probabilidad de que una determinada sustancia cause un daño genético depende del nivel de exposición, la distribución y retención, así como de la eficiencia de los sistemas de activación metabólica, de detoxificación y la reactividad de la sustancia con macromoléculas de las células. Sin embargo existe el riesgo de que la interacción de una molécula genotóxica con el ADN pueda dar lugar a la formación de una lesión premutagena o precancerígena ya que una vez establecido el efecto producido sobre el material genético es irreversible y acumulativo (Abrevaya, 2008; Arencibia *et al.*, 2009).

1.8.1. Evaluación de daño genotóxico

La exposición de las poblaciones humanas a diferentes agentes xenobióticos, ha generado un considerable interés por las sustancias inductoras de daño mutagénico. Las pruebas de genotoxicidad no solo son indispensables para evaluar agentes genotóxicos y sus mecanismos inductores, si no también sustancias con propiedades protectoras o moduladoras de daño al ADN (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano 2007).

La “International Conference on Harmonization (ICH) y otras agencias reguladoras como: La Food and Drug Administration (FDA), la International Agency for Research on Cancer (IARC) y la Environmental Protection Agency (EPA), establecieron la realización de tres pruebas como predictivos de potencial genotóxico que son: 1) prueba de mutación en bacterias (AMES), 2) prueba de aberraciones cromosómicas y 3) evaluación de micronúcleos (MN) (Müller *et al.*, 1998).

1.8.2. Micronúcleos

El ensayo de MN ha sido recomendado como batería de prueba para la evaluación genotóxica en la “International Conference on Harmonization (ICH) of Genotoxicity Guidelines”, así como otras agencias reguladoras tales como la “Environmental Protection Agency” (EPA), la “Food and Drug Administration” (FDA) y la “International Agency for Research on Cancer” (IARC). El propósito del ensayo es identificar sustancias que causan daño citogenético, originado por clastogénesis o aneuploidogénesis (Müller *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 2000). La técnica de MN fue desarrollada por Schmid y Boller en 1970, y es utilizada como ensayo de corto plazo. Detecta daño citogenético asociado con la frecuencia de AC, evalúa el daño en cromosomas enteros o en fragmentos y también puede identificar daño citotóxico (Von Ledebur y Schmid, 1973; Hayashi *et al.*, 2000). Los MN son pequeños cuerpos de cromatina que se originan de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que no son incorporados dentro del núcleo después de la mitosis, por lo que se identifican en el citoplasma como pequeños núcleos adicionales (Von Ledebur y Schmid, 1973).

Los MN tienen su origen en alguno de los siguientes eventos:

- a) Aberraciones cromosómicas que conllevan a la formación de fragmentos acéntricos (daño clastógeno).
- b) Daño a nivel de las 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 centriolo, centromero inactivado, entre otros (daño aneuploidógeno).
- c) Recientemente, se ha sugerido que también pueden provenir de procesos de amplificación génica (Fenech y Crott, 2002; Kirsch-Volders *et al.*, 2003). La evaluación de

MN es un ensayo *in vivo* que se realiza en cualquier tejido que este en proliferación, puede ser en medula ósea o en eritrocitos de sangre periférica de animales donde el bazo no elimine eritrocitos micronucleados (FDA, 2000).

Cuando los eritrocitos policromáticos, también llamados “jóvenes” (EPC) son expulsados de la medula ósea, el núcleo queda extruido y si un MN se ha formado permanece en el citoplasma, estos eritrocitos aun contiene ARN y son basófilos lo que los diferencia fácilmente de eritrocitos normocromáticos, también llamados “maduros” (ENC) en los que se ha degradado el ARN y son acidófilos. La visualización de los EPC con micronúcleos es fácil si se utiliza alguna técnica de tinción como May-Grünwald, Giemsa o naranja de acridina (NA) (Hayashi *et al.*, 1990).

El ensayo de MN se utiliza en estudios a corto plazo por la rapidez y sencillez de la técnica para detectar daño clastógeno y aneuploidógeno e incluso daño citotóxico. Agencias reguladoras como la FDA han propuesto que sean considerados como agentes genotóxicos, aquellos compuestos que incrementen la frecuencia de MN en un 0.4 % (4 MN en 1000 EPC) con respecto a su grupo testigo (Kim *et al.*, 2000).

1.9. Metales como inductores de daño genotóxico

Entre los agentes que se han detectado como altamente genotóxicos se encuentran los metales pesados, los cuales son agentes químicos que salvo algunas excepciones presentan una densidad igual o mayor a 5 g/cm³. Entre los principales metales pesados catalogados como tóxicos están el cromo, el arsénico, el cobalto, el níquel, el cobre, el zinc, cadmio, mercurio, titanio, selenio y plomo (EPA, 1998).

El mecanismo de acción tóxica fundamental de los metales ocurre a nivel de la membrana celular, donde afectan tanto los fenómenos de permeabilidad, como el funcionamiento normal de las enzimas implicadas en el transporte. La gravedad toxica de estos elementos se debe a su capacidad de bioacumularse y a la facilidad con que reaccionan con moléculas orgánicas. Específicamente con sus grupos sulfidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El resultado de estas uniones ocasiona principalmente alteración metabólica, incremento de estrés oxidante y genotoxicidad (Navarro-Aviñó, *et al.*, 2007).

El estudio de toxicidad y del comportamiento oxidante de los metales pesados en las células está determinado por la reacción química de Fenton y el ciclo de Haber–Weiss, en las que participan las ERO's: O₂[•] y H₂O₂ (Navarro-Aviñó, *et al.*, 2007).

1.9.1. Compuestos de Cr (VI)

El cromo presenta distintos estados de oxidación, que van del 3+ al 6+. En las aplicaciones industriales se utilizan principalmente los compuestos de cromo (VI), debido a sus propiedades ácidas y oxidantes en procesos de cromado, pigmentos, ferrocromos, curtido de cuero y soldaduras (EPA, 1998).

Se ha encontrado que los compuestos de Cr (VI) tienen actividad genotóxica y cancerígena. La exposición a los compuestos de Cr (VI) también se puede dar por agua, suelo y alimentos contaminados, así como al contacto con el humo de cigarro (O'Brien *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el Cr (VI) atraviesa la membrana celular, dentro de esta se reduce rápidamente por la interacción con moléculas citoplasmáticas a cromo (V), (IV) y (III) los cuales tienen gran afinidad con las bases y fosfatos de la cadena de ADN, además de generar radicales libres, principalmente hidroxilo los cuales pueden inducir aductos en la cadena de ADN, así como entrecruzamientos e interacción con proteínas (Fig.2), aspectos que tienen efecto mutágeno y cancerígeno (O'Brien *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006).

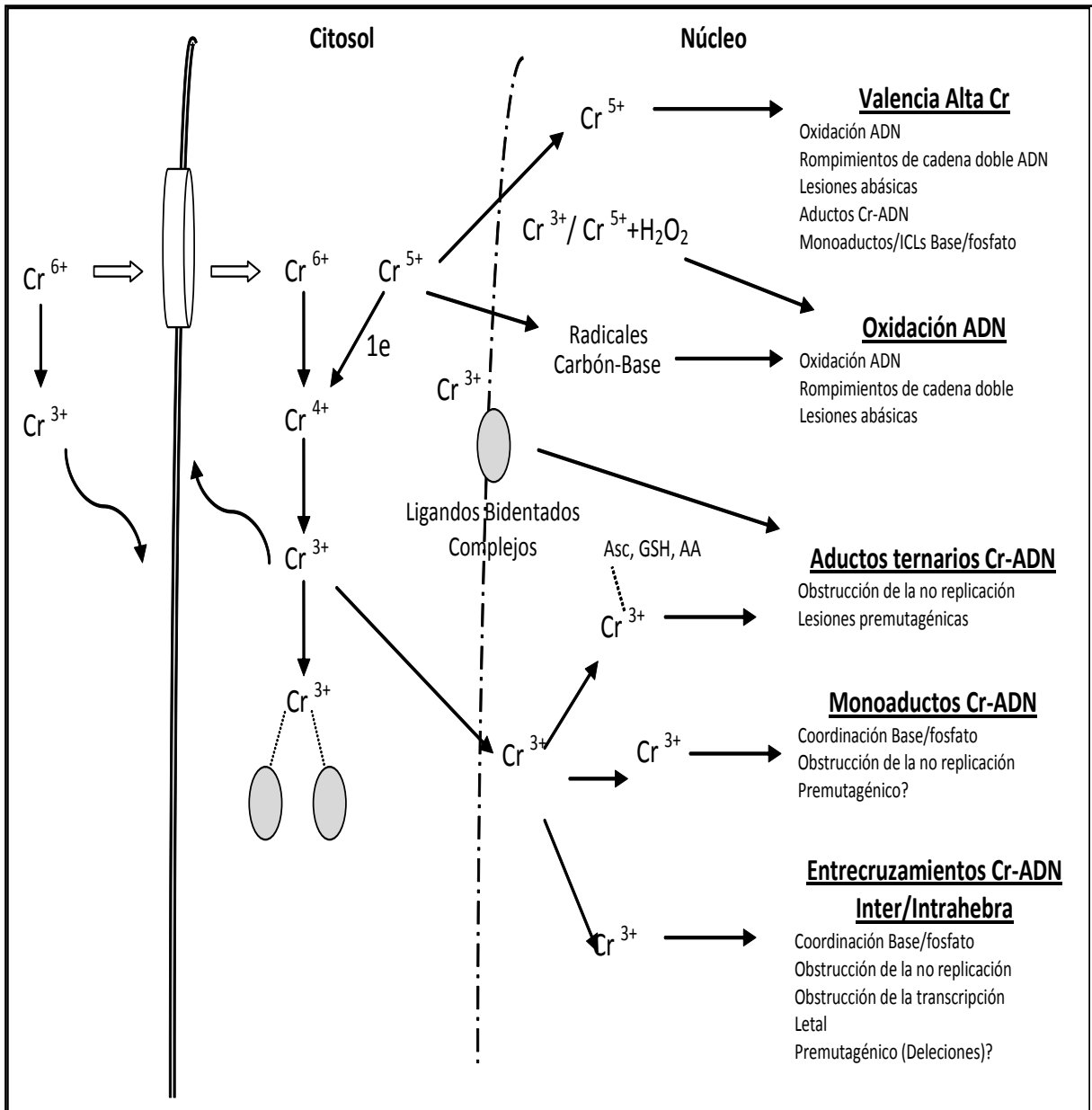


Fig. 2. Principales rutas involucradas en las lesiones genéticas causadas por el Cr.
(Tomada de Pereyra 2010 y modificada de O'Brien et al., 2003).

2. JUSTIFICACIÓN

La exposición de las poblaciones humanas a diferentes agentes xenobióticos ha generado un considerable interés en el uso de suplementos dietéticos particularmente derivados de plantas debido a que se ha mostrado que existe una relación inversamente proporcional entre el consumo de vegetales y la incidencia de enfermedades degenerativa como lo es el cáncer. El estudio de sustancias con propiedades protectoras o moduladoras del daño al ADN, surge como una opción complementaria a los estudios de genotoxicidad, ya que al conocer los mecanismos de protección se puede generar alternativas para contrarrestar los efectos de los agentes inductores de daño genotóxico. Dentro de los componentes vegetales con mayor actividad se encuentran algunos pigmentos como la clorofila y sus sales, los flavonoides y los β -carotenos, así como las vitaminas C (*ácido ascórbico*) y E (tocoferoles y tocotrienoles) (Konopacka *et al.*, 1998; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano 2001). En contra parte, se ha mostrado que los compuestos de Cr (VI) son capaces de atravesar la membrana celular *in vivo* y generar daño al ADN mediante la generación de especies reactivas de oxígeno. Los compuestas de Cr se utilizan ampliamente en la industria por lo que la exposición a estos compuestos se da tanto de manera ocupacional como por la contaminación generada por el mal manejo de los desechos industriales (O'Brien *et al.*, 2003). De ahí, que resulta de interés estudiar sustancias con propiedades antioxidantes como el *ácido ascórbico*, el α - tocoferol y el β -caroteno al ser administradas previamente a la exposición de compuestos de Cr(VI) con la finalidad de plantear estrategias de protección o modulación del daño al ADN.

3. HIPÓTESIS

Se ha mostrado en diversos estudios la capacidad antioxidante que presentan algunos componentes de las frutas y vegetales verdes como los β -carotenos, el ácido ascórbico y el alfa-tocoferol. Por otra parte los compuestos de Cr (VI) son capaces de atravesar la membrana celular y reducirse hasta Cr (III) liberando especies reactivas de oxígeno que pueden generar radicales libres e interaccionar con el ADN. Particularmente, se ha observado que la administración de CrO_3 a ratones induce MN. Entonces, en el presente estudio se espera que la administración previa de antioxidantes como el ácido ascórbico, el α -tocoferol y los β -carotenos a ratones tratados con CrO_3 , disminuya el daño al ADN mediante la reducción de la frecuencia de MN.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Evaluación del efecto del ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno sobre el daño genotóxico inducido por compuestos de Cr (VI), mediante la cuantificación de las frecuencias de MN en sangre periférica en ratones hembra de la cepa CD-1.

4.2. Objetivos particulares:

- Establecer las dosis no genotóxicas de ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno, mediante la evaluación de inducción de MN en sangre periférica de ratones hembras de la cepa CD-1.
- Establecer la cinética de inducción de MN del ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno, mediante la evaluación de MN en EPC de muestras de sangre periférica tomadas cada 24 horas después de la administración de los tratamientos durante 72 horas en ratones hembras de la cepa CD-1.
- Evaluar el efecto del ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno sobre el daño genotóxico inducido por el CrO_3 mediante la evaluación de las frecuencias de MN en sangre periférica de ratones hembras de la cepa CD-1.
- Evaluar el efecto del ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno sobre el daño citotóxico inducido por el CrO_3 , mediante la evaluación de la frecuencia de EPC con relación a los ENC en sangre periférica de ratones hembras de la cepa CD-1.
- Evaluar el efecto de la administración simultánea del ácido y del α -tocoferol sobre el daño genotóxico inducido por el CrO_3 mediante la evaluación de la inducción de MN en sangre periférica de ratones hembras de la cepa CD-1.
- Establecer las dosis no citotóxicas de ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno, mediante la evaluación de las frecuencias de EPC con relación a los ENC en sangre periférica de ratones hembras de la cepa CD-1.
- Evaluar el efecto de la administración simultánea del ácido y del α -tocoferol sobre el daño citotóxico inducido por el CrO_3 , mediante la evaluación de la frecuencia de EPC con relación a los ENC en sangre periférica de ratones hembras de la cepa CD-1.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1. Animales

Se emplearon ratones hembra jóvenes de la CD-1, de dos a tres meses de edad, de un peso variable entre los 30 - 40 g provenientes del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Estos se mantuvieron en cajas de plástico, con alimentación de nutricubos, libre acceso al agua, en condiciones estériles, a una temperatura y humedad controladas, con fotoperiodo de 12 - 12 horas luz - oscuridad.

5.1. Reactivos

Como colorante en la técnica de micronúcleos se utilizó naranja de acridina $C_{17}H_{20}N_3Cl$ [CAT 1775-25] de Química Meyer. El resto de los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. EUA). Ácido ascórbico $C_6H_8O_6$ [CAS No. 50-81-7], alfa tocoferol $C_{29}H_{50}O_2$ [CAS No. 10191-41-0], β -caroteno $C_{40}H_{56}$ [CAS No. 7235-40-7] y CrO_3 [CAS No. 1333-82-0] como agente inductor de MN.

5.2. Tratamientos

El ácido ascórbico y el CrO_3 fueron preparados en una solución mediante su disolución en agua destilada estéril, mientras que, el α -tocoferol y el β -caroteno fueron disueltos en aceite de maíz. Una vez preparados los reactivos se administraron inmediatamente por vía oral (sonda intragástrica) ó vía i.p. según el protocolo establecido, en un volumen de alrededor de 0.25 ml por ratón.

Los grupos experimentales fueron conformados por cinco individuos cada uno y se dividieron de la siguiente manera:

- a) Grupo testigo, solo se le administro el vehículo (0.25 ml de aceite de maíz).
- b) Grupo testigo positivo, se le administro 20 mg/kg de peso corporal de CrO_3 por vía i.p.
- c) Grupos de antioxidantes, se les administraron ácido ascórbico en una dosis única de 100 mg/kg de peso corporal vía i.p., α -tocoferol y β -caroteno en dosis de 20 y 50 mg/kg de peso corporal respectivamente, vía oral (sonda intragástrica) y la administración simultanea de ácido ascórbico y α -tocoferol en las mismas dosis y vías.
- d) Grupos combinados, a los que se les administro el tratamiento antioxidante y dos horas después el CrO_3 (Fig.3).

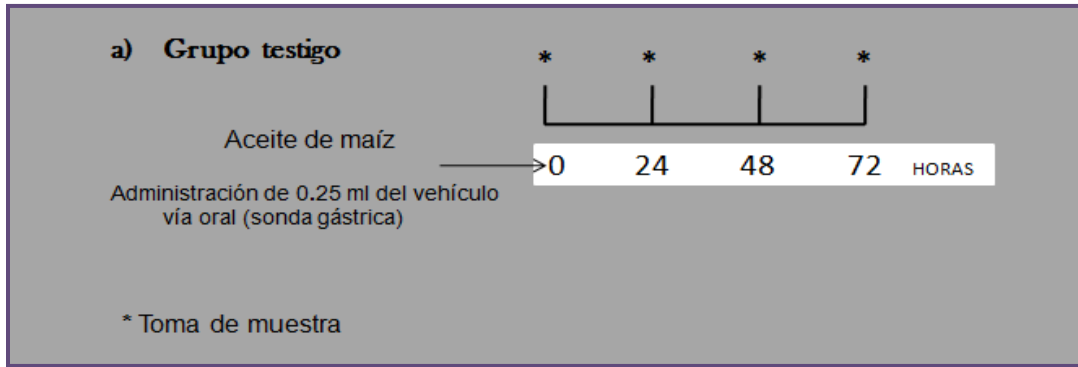


Fig. 3a. Protocolo grupo testigo.

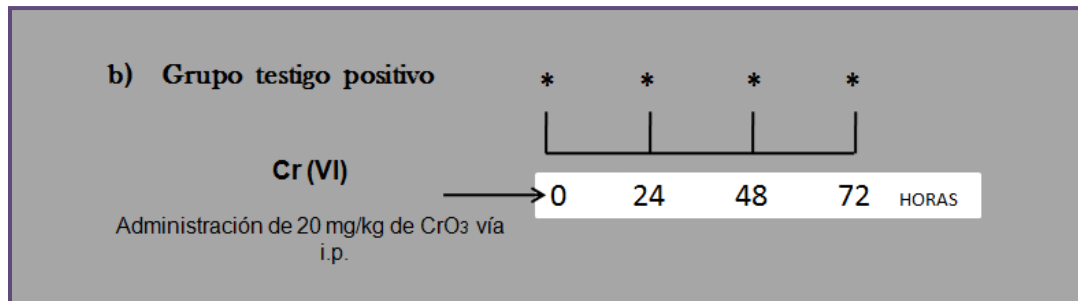


Fig. 3b. Protocolo grupo testigo positivo (CrO₃).

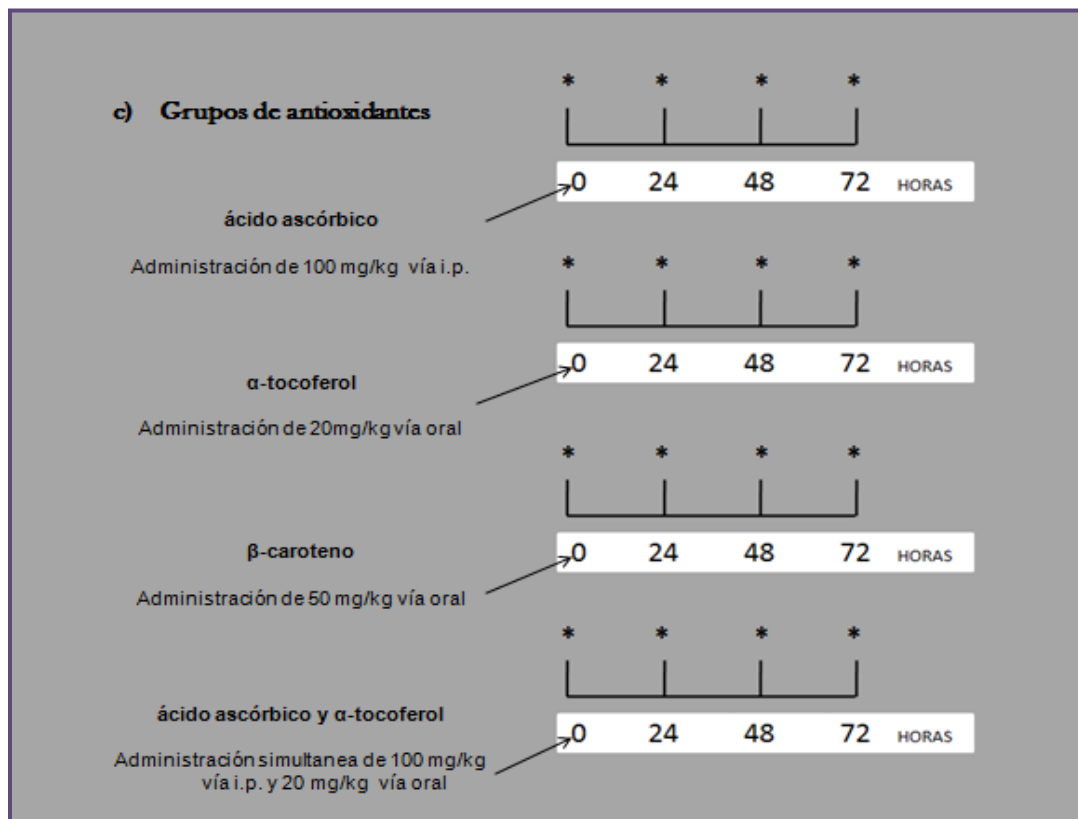


Fig. 3c. Protocolo grupos testigo negativo (ácido ascórbico, alfa-tocoferol y beta-caroteno).

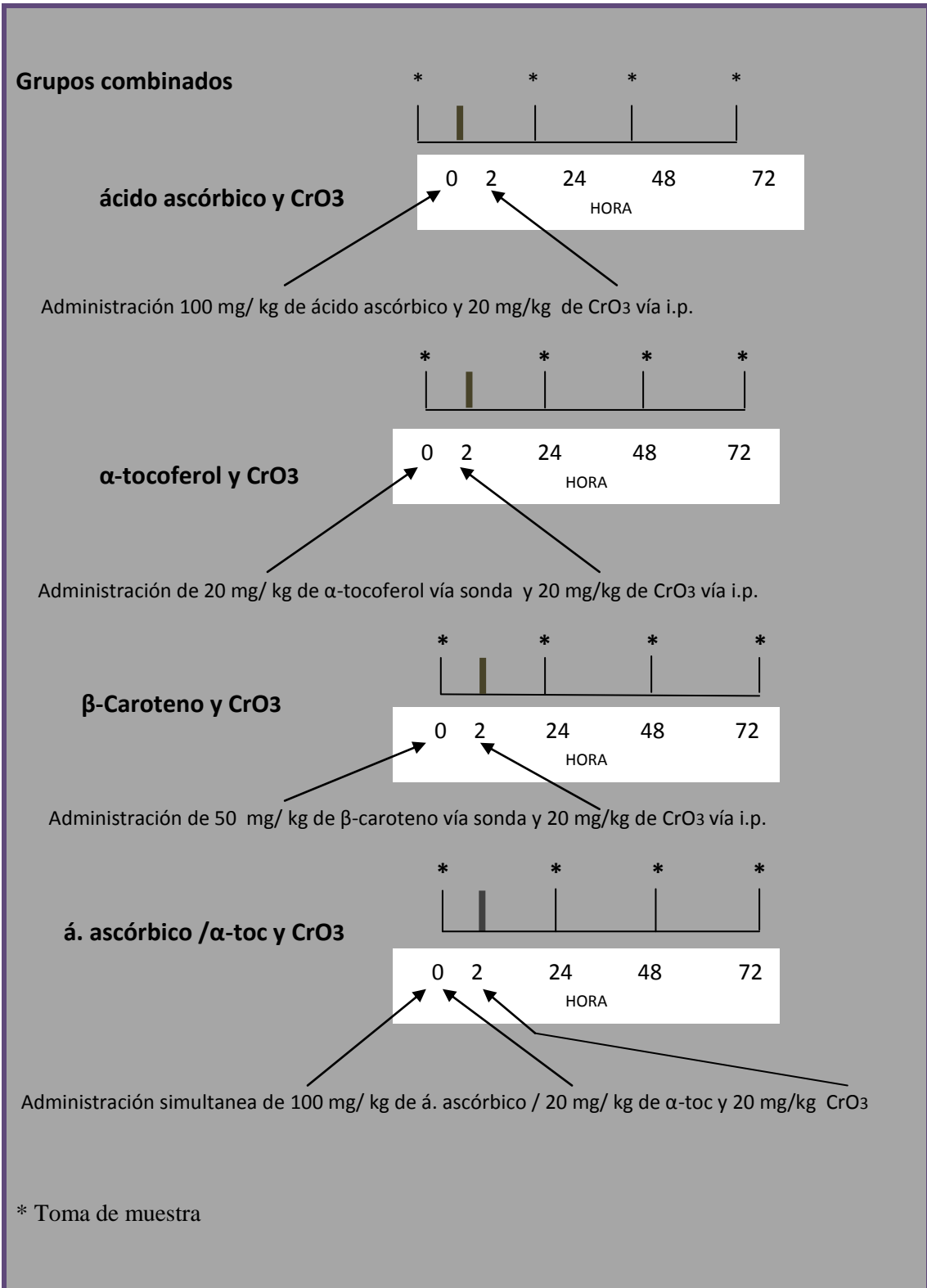


Fig. 3d. Protocolo grupos experimentales (ácido ascórbico, alfa-tocoferol y beta-caroteno) y CrO₃.

5.3. Preparación de laminillas

Se preparó una solución de naranja de acridina (NA) en agua desionizada a una concentración de 1 mg/ml. Se tomaron 10 µml de esta solución y se colocaron sobre portaobjetos precalentados a 70 °C, con ayuda de otro portaobjetos se extendió el colorante. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en la oscuridad hasta su uso (Hayashi, 1990).

5.4. Obtención de sangre periférica

La evaluación de EPC- MN y la frecuencia de EPC se realizó en sangre periférica, la cual se obtuvo cortando la punta de la cola de los ratones. La sangre obtenida se colocó directamente sobre las laminillas preparadas con NA, inmediatamente se cubrieron con un cubreobjetos y se sellaron. Las preparaciones se guardaron en una caja de plástico en la oscuridad a una temperatura de 4 °C. 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.

5.5. Análisis de Micronúcleos

El análisis de las muestras se realizó en un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2) 24 horas después de su preparación, procurando no exceder de 8 días. La tinción de los eritrocitos que se observó con la NA, permitió diferenciar a los eritrocitos normocromáticos de los eritrocitos policromáticos ya que estos últimos se tiñeron de color rojo debido a la presencia de ARN-ribosomal. Con esta tinción también se pudo identificar la presencia de MN ya que el ADN se tiñó de color amarillo fluorescente. Para la evaluación del daño genotóxico se cuantificaron los eritrocitos policromáticos con formación de MN (EPC- MN) que hay en 2000 eritrocitos policromáticos (EPC) por ratón, y para la evaluación de daño citotóxico la frecuencia de eritrocitos policromáticos que se encuentran en 1000 eritrocitos totales (EPC + ENC). Se calculó también la Frecuencia de Inducción Neta (NIF) y la Frecuencia Diferencial de Inducción de micronúcleos (DIF) (García-Rodríguez *et al.*, 2000; García, 2006).

$$\text{NIF} = \text{MN observados en "A" a la hora } x_i - \text{MN observados en "A" a la } x_0$$

$$\text{DIF} = \text{MN observados en "A" a la hora } x_i - \text{MN observados en "T" a la } x_i$$

Donde:

A = grupo; x_i = tiempo de evaluación; x_0 = tiempo 0; T = grupo testigo

5.6. Análisis estadístico

Los resultados de la inducción de MN y de la frecuencia de los EPC se presentan en media \pm desviación estándar, con el programa estadístico SPSS/PC versión 15 se compararon mediante un análisis de varianzas, seguido de una prueba de Tukey. Para los casos de la frecuencia neta de la inducción de MN (NIF) y la frecuencia diferencial de la inducción de MN (DIF), se analizaron con una chi-cuadrada, con el programa Statistica versión 7.0. Para todos los casos se considero el nivel de significancia de $P < 0.05$ (Adler *et al.*, 1998)

6. RESULTADOS

6.1. Efecto del ácido ascórbico, α -tocoferol y del β -caroteno sobre el material genético

En el cuadro 1 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluadas de las 0 a las 72 horas cuando se administraron en dosis únicas: a) ácido ascórbico (100mg/kg vía i.p.), b) α -tocoferol (20 mg/kg vía sonda), c) β -caroteno (50 mg/kg vía sonda) y d) CrO_3 (20 mg/kg vía i.p.). Se observa que ninguno de los antioxidantes administrados incrementó las frecuencias de MN de forma estadísticamente significativa, si no por el contrario, el tratamiento de ácido ascórbico disminuyó la frecuencia basal de MN (alrededor de uno). Al grupo que se le aplicó el CrO_3 , mostró un incremento en las frecuencias de MN (entre 2 y 6 a las 24 y 48 horas respectivamente) resultaron estadísticamente significativos al compararse con el grupo testigo y con su hora 0 (es decir la evaluación antes de administrar el CrO_3).

Cuadro 1. Frecuencia de MN en ratones CD-1 tratados con CrO_3 , ácido ascórbico, α -tocoferol ó β -caroteno (media \pm d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Hora	MN/1000 células (media \pm d.e.)
Testigo	0	5	0	0.90 \pm 0.65
			24	0.70 \pm 0.45
			48	0.80 \pm 0.45
			72	0.90 \pm 0.65
CrO_3	20	5	0	1.10 \pm 0.42
			24	3.40 \pm 1.56 ^{a,b}
			48	7.00 \pm 2.15 ^{a,b}
			72	1.70 \pm 1.10
ácido ascórbico	100	5	0	1.20 \pm 0.70
			24	0.20 \pm 0.28
			48	0.40 \pm 0.65
			72	0.50 \pm 0.00
α-tocoferol	20	5	0	0.40 \pm 0.42
			24	0.50 \pm 0.36
			48	0.20 \pm 0.28
			72	0.30 \pm 0.45
β-caroteno	50	5	0	0.30 \pm 0.45
			24	0.90 \pm 0.96
			48	0.30 \pm 0.28
			72	0.50 \pm 0.50

^a $p < 0.05$ CrO_3 vs testigo; ^b CrO_3 vs CrO_3 hora 0

A las evaluaciones de las frecuencias de MN se les calculó la Frecuencia Neta de Inducción de MN (NIF) partiendo de la premisa de que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que se les restaron los MN evaluados en la hora 0 a los valores evaluados en siguientes horas (García-Rodríguez *et al.*, 2001). En la figura 4 se muestra el análisis del NIF para 10 000 eritrocitos policromáticos (EPC) cuando se administraron tanto los antioxidantes (ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno) como el CrO_3 . Se puede observar que la disminución de las frecuencias de MN observada en el grupo tratado con ácido ascórbico resulta estadísticamente significativa (24 y 48 horas) con respecto al grupo testigo.

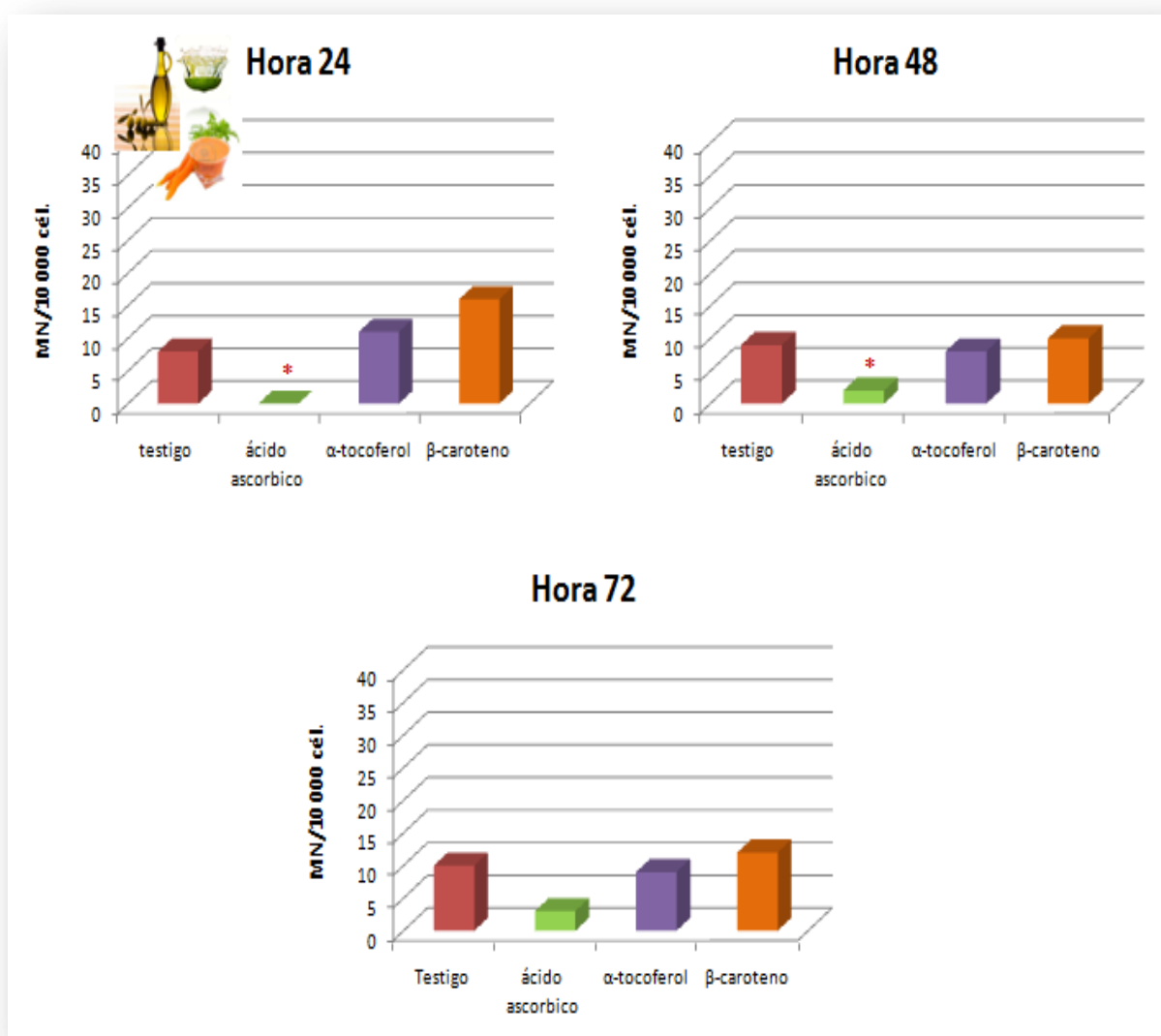


Figura 4. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10,000 EPC, cuando se administró una dosis de 100mg/kg de ácido ascórbico 20 mg/kg de α -tocoferol y 50 mg/kg de β -caroteno (*: Estadísticamente significativo $p < 0.05$)

También se calculó la Frecuencia Diferencial en la Inducción de MN (DIF) la cual consistió en restar los valores observados de MN en todas las horas evaluadas del grupo testigo a sus correspondientes horas evaluadas de los grupos tratados tanto con los fitoquímicos como con el CrO₃ (García, 2006). En la figura 5 se muestra el comportamiento de las frecuencias del DIF de MN. Se puede observar que al igual que en el análisis del NIF hay una disminución de la frecuencia de MN en el grupo tratado con ácido ascórbico, la cual resulta estadísticamente significativa comparada con su hora 0. Una vez encontradas las dosis no genotóxicas de los antioxidantes y la genotóxica del CrO₃, estas se combinaron.

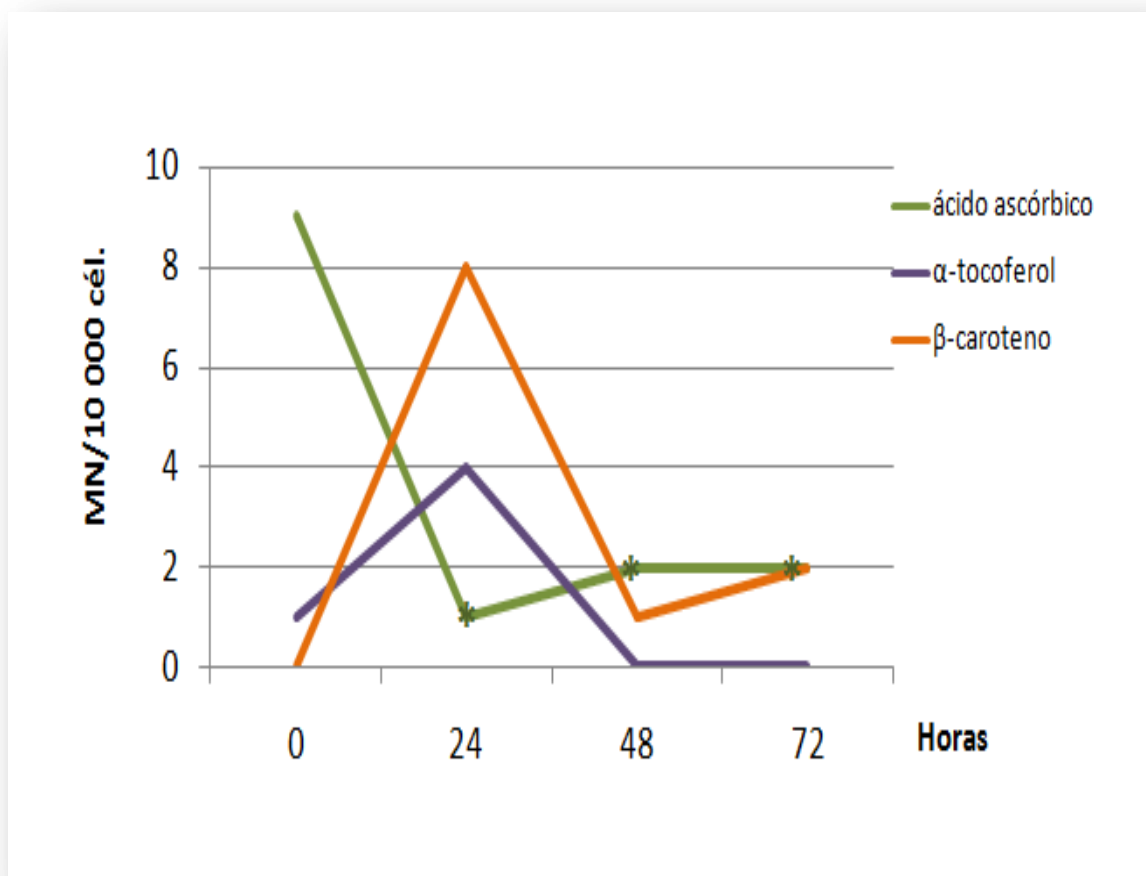


Figura 5. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN, calculado para 10,000 EPC, cuando se administró una dosis de 100mg/kg de ácido ascórbico (*: Estadísticamente significativo $p < 0.05$)

6.2. Efecto de los tratamientos con ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno sobre el daño genotóxico inducido por CrO_3

En el cuadro 2 se muestran los promedios de las frecuencias de MN, que fueron evaluadas de las 0 a las 72 horas cuando se administraron 100 mg/kg del ácido ascórbico por vía i.p., 20 mg/kg de CrO_3 por vía i.p. y cuando se administró la combinación de los tratamientos. Se observa que la administración sola del ácido ascórbico no incrementó las frecuencias de MN, mientras que en el grupo tratado con CrO_3 se incrementaron 2 y 6 MN a las 24 y 48 horas respectivamente, resultando estadísticamente significativas al compararse con el grupo testigo. Cuando se administraron los tratamientos combinados (ácido ascórbico - CrO_3) se disminuyeron a la hora 48 las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 de forma estadísticamente significativa. La frecuencia de MN observada a la hora 48 en el grupo combinado también es estadísticamente significativa comparada con el grupo testigo, lo que sugiere que si bien hay una protección de daño genotóxico, esta es parcial.

Cuadro 2. Frecuencia de MN en ratones CD-1 tratados con CrO_3 y ácido ascórbico (media \pm d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	n	Hora	MN/1000 células (media \pm d.e.)
Testigo	0	5	0	0.90 \pm 0.65
			24	0.70 \pm 0.45
			48	0.80 \pm 0.45
			72	0.90 \pm 0.65
CrO_3	20	5	0	1.10 \pm 0.42
			24	3.40 \pm 1.56 ^{a,c}
			48	7.00 \pm 2.15 ^{a,b,c}
			72	1.70 \pm 1.10
ácido ascórbico	100	5	0	1.20 \pm 0.70
			24	0.20 \pm 0.28
			48	0.40 \pm 0.65
			72	0.50 \pm 0.00
ácido ascórbico- CrO_3	100+20	5	0	1.00 \pm 0.36
			24	2.00 \pm 0.71
			48	3.00 \pm 1.17 ^a
			72	1.00 \pm 0.36

^a $p < 0.05$ vs testigo; ^b CrO_3 vs ácido ascórbico- CrO_3 ; ^c CrO_3 vs CrO_3 hora 0

Al hacer el análisis del NIF (figura 6) se observa que los porcentajes de disminución de las frecuencias de MN fueron del 37% y 39% a las 72 y 24 horas respectivamente, y que a la hora 48 se presenta la mayor disminución (56%), por lo que se puede decir que la mayor protección del ácido ascórbico observada coincide con la hora de mayor inducción de MN del CrO₃.

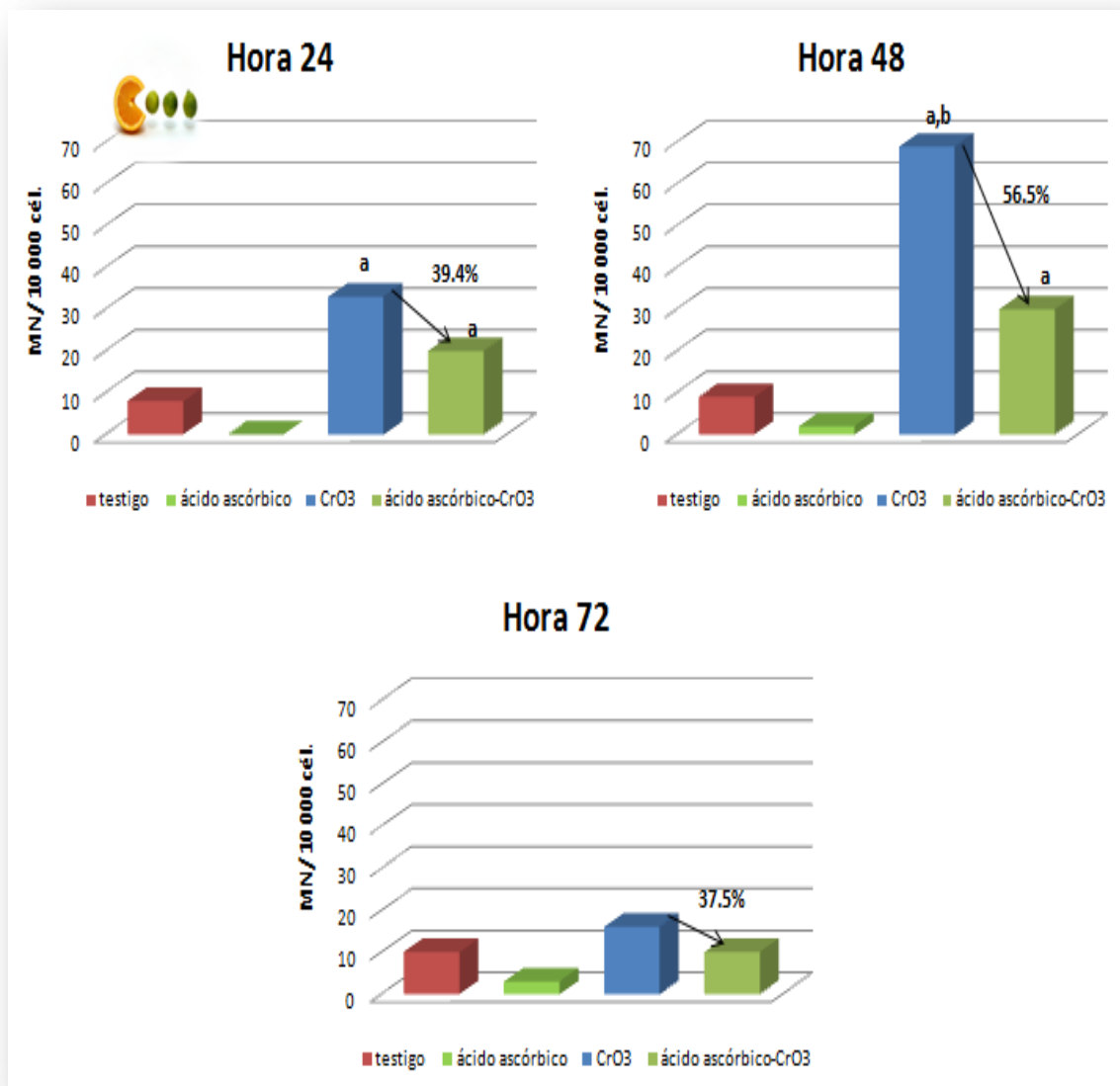


Figura 6. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10,000 EPC, cuando se administró una dosis de 100mg/kg de ácido ascórbico (^a: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs testigo; ^b: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs ácido ascórbico-CrO₃)

Cuando se administraron los tratamientos de 20 mg/kg del α -tocoferol por vía oral (sonda intragástrica), 20 mg/kg de CrO_3 por vía i.p. y la combinación de los tratamientos, se observó que la administración sola de α -tocoferol tampoco incrementa las frecuencias de MN. En el grupo que se combinaron los tratamientos de α -tocoferol y CrO_3 se observa una disminución de las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 , pero también resultan estadísticamente significativas a las 24 y 48 horas al compararlas con el grupo testigo (cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencia de MN en ratones CD-1 tratados con CrO_3 y α -tocoferol (media \pm d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Hora	MN/1000 células (media \pm d.e.)
Testigo	0	5	0	0.90 \pm 0.65
			24	0.70 \pm 0.45
			48	0.80 \pm 0.45
			72	0.90 \pm 0.65
CrO_3	20	5	0	1.10 \pm 0.42
			24	3.40 \pm 1.56 ^{a,c}
			48	7.00 \pm 2.15 ^{a,b,c}
			72	1.70 \pm 1.10
α -tocoferol	20	5	0	0.40 \pm 0.42
			24	0.50 \pm 0.36
			48	0.20 \pm 0.28
			72	0.30 \pm 0.45
α -tocoferol- CrO_3	20+ 20	5	0	1.10 \pm 0.74
			24	3.20 \pm 0.57 ^a
			48	3.70 \pm 1.15 ^a
			72	1.30 \pm 0.57

^a $p < 0.05$ testigo; ^b CrO_3 vs α -tocoferol- CrO_3 ; ^c CrO_3 vs CrO_3 hora 0

En la figura 7 se muestra el análisis del NIF cuando se administraron los tratamientos de α -tocoferol, CrO_3 y α -tocoferol - CrO_3 . Se observa que en el grupo que se combinaron los tratamientos (α -tocoferol y CrO_3) se presentó una disminución del 6 % en las frecuencias de MN a la hora 24, la cual se incrementó al 48 % a la hora 48 y a la hora 72 fue del 25 %, por lo que se puede decir también que el α -tocoferol protege parcialmente del efecto genotóxico del CrO_3 y que la mayor protección del α -tocoferol, al igual que con el ácido ascórbico, se presenta a la hora 48 aunque su efecto protector es menor.

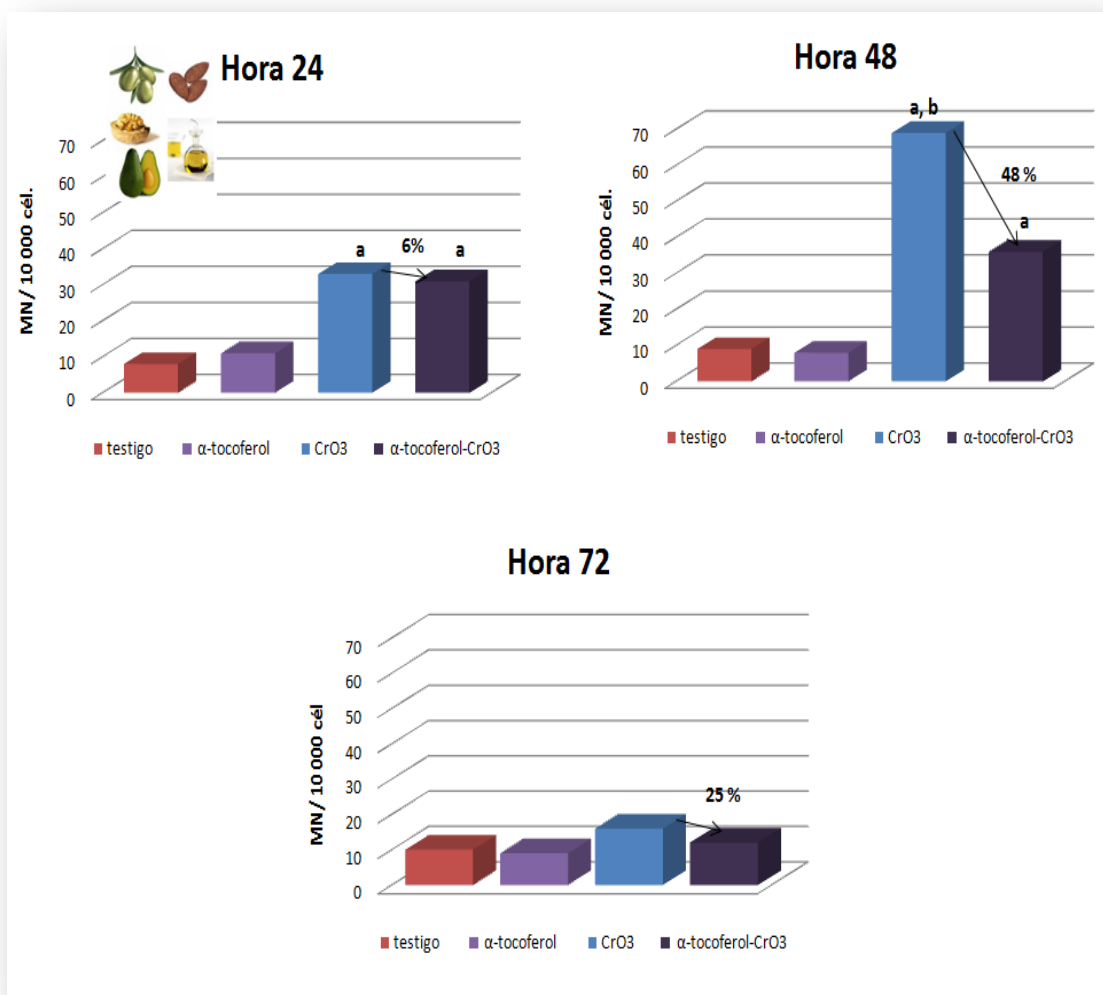


Figura 7. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10,000 EPC, cuando se administró una dosis de 20 mg/kg de α-tocoferol (ª: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs testigo; ¸: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs α-tocoferol - CrO₃)

Al administrar 50mg/kg de β-caroteno por vía oral (sonda intragástrica), 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. y la combinación de los tratamientos, se observó que el β-caroteno al igual que los anteriores tratamientos antioxidantes, no incrementa las frecuencias de MN. Cuando se combinaron los tratamientos (β-caroteno - CrO₃) se disminuyeron las frecuencias de MN a las 24 y 48 horas con respecto al grupo tratado solo con CrO₃, mientras que aumentaron a la hora 72 con respecto al grupo testigo. La frecuencia de MN observada a la hora 48 en este grupo resulta estadísticamente significativa comparada con el grupo testigo (cuadro 4).

Cuadro 4. Frecuencia de MN en ratones CD-1 tratados con CrO₃ y β-caroteno (media ± d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	n	Hora	MN/1000 células (media ± d.e.)
Testigo	0	5	0	0.90 ± 0.65
			24	0.70 ± 0.45
			48	0.80 ± 0.45
			72	0.90 ± 0.65
CrO ₃	20	5	0	1.10 ± 0.42
			24	3.40 ± 1.56 ^{a,b,c}
			48	7.00 ± 2.15 ^{a,c}
			72	1.70 ± 1.10
β-caroteno	50	5	0	0.30 ± 0.45
			24	0.90 ± 0.96
			48	0.30 ± 0.28
			72	0.50 ± 0.50
β-caroteno - CrO ₃	50+20	5	0	0.80 ± 0.57
			24	0.90 ± 0.55
			48	5.00 ± 1.70 ^{a,d}
			72	2.70 ± 1.68

^a p<0.05 vs testigo; ^b CrO₃ vs β-caroteno - CrO₃; ^cCrO₃ vs CrO₃ hora 0; ^d β-caroteno - CrO₃ vs β-caroteno - CrO₃ hora 0

En la figura 8 se muestra el análisis de NIF calculado para las frecuencias de MN evaluadas en los grupos de β-caroteno, CrO₃ y combinado. Puede observarse que en el grupo en el que se combinaron los tratamientos (β-caroteno y CrO₃) hay una disminución del 67% a la hora 24 y del 25 % a la hora 48 en las frecuencias de MN. A la hora 72 por el contrario, se presentó un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de MN al compararse con el grupo testigo. Estos resultados indican que el β-caroteno presenta a la hora 24 un efecto protector mayor que el ácido ascórbico y el α-tocoferol y que sin embargo el efecto protector disminuye a la hora 42 e incrementa la frecuencia de MN a la hora 72 lo cual no se observo en los tratamientos anteriormente descritos

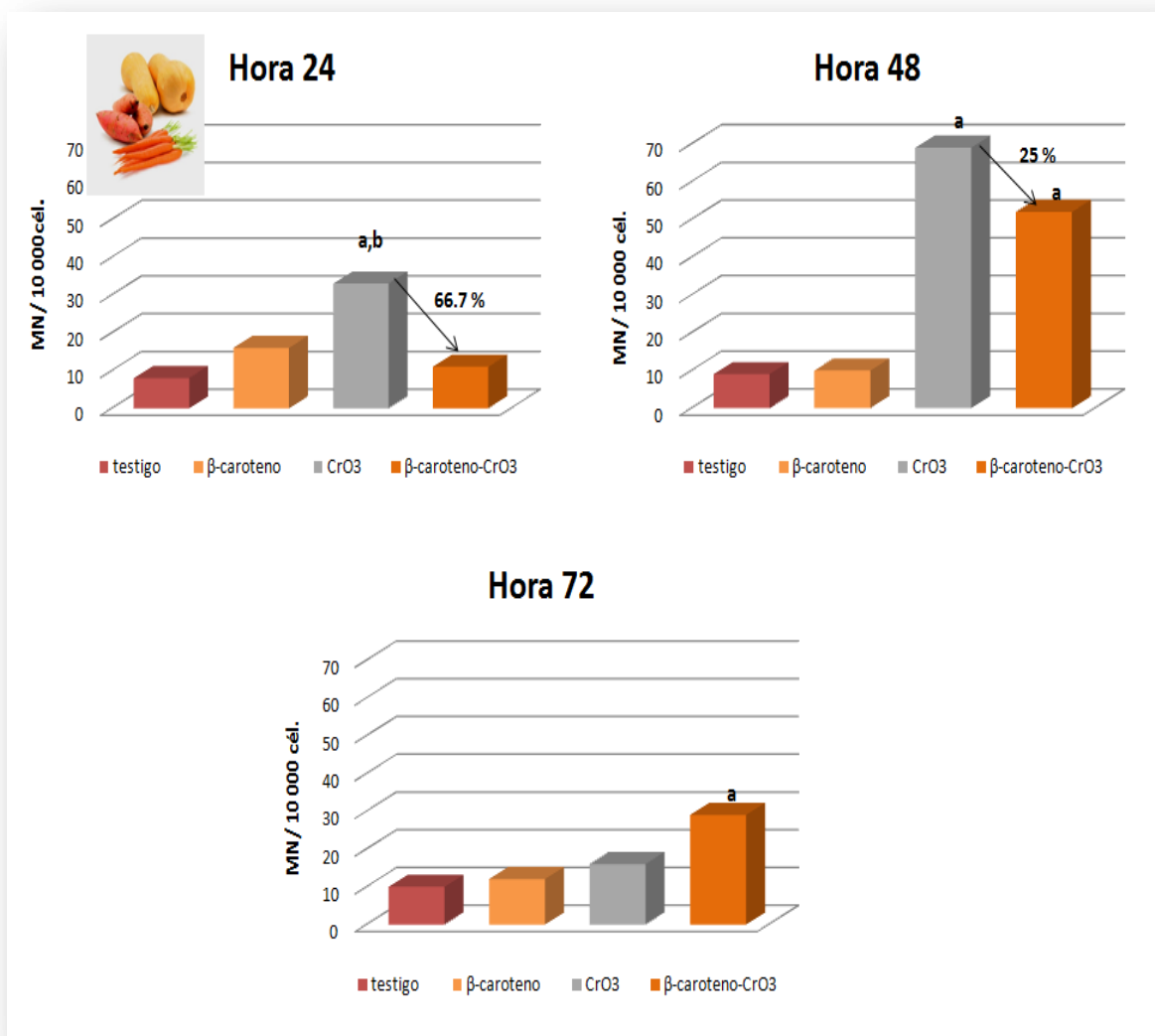


Figura 8. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10,000 EPC, cuando se administró una dosis de 50 mg/kg de β-caroteno (^a: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs testigo; ^b: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs β-caroteno - CrO₃)

6.3. Efecto de la co-administración del ácido ascórbico y del α-tocoferol sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃

Dado que en los tratamientos combinados de ácido ascórbico y α-tocoferol se observaron los porcentaje más alto de protección ante la exposición a CrO₃, particularmente a la hora 48, cuando este presenta el mayor efecto inductor de MN, se decidió evaluar el efecto de la administración simultánea de estos tratamientos antioxidantes.

En el cuadro 5 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluadas cuando se administraron los tratamientos de 100mg/kg de ácido ascórbico por vía i.p. co-administrado con 20 mg/ kg α -tocoferol vía oral (sonda intragástrica), 20 mg/kg de CrO_3 por vía i.p. y la combinación de los tratamientos. Se observa que la co-administración de ácido ascórbico y α -tocoferol al igual que su administración independiente no incrementó las frecuencias de MN. En el grupo en el que se combinaron los tratamientos (ácido ascórbico - α -tocoferol y CrO_3) se presentó una disminución mínima en las frecuencias de MN a las 24 y 48 horas con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 mismas que resultaron estadísticamente significativas comparadas con el grupo testigo

Cuadro 5. Frecuencia de MN en ratones CD-1 tratados con CrO_3 y ácido ascórbico simultáneamente con α -tocoferol (media \pm d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	n	Hora	MN/1000 células (media \pm d.e.)
Testigo	0	5	0	0.90 \pm 0.65
			24	0.70 \pm 0.45
			48	0.80 \pm 0.45
			72	0.90 \pm 0.65
CrO_3	20	5	0	1.10 \pm 0.42
			24	3.40 \pm 1.56 ^{a,b}
			48	7.00 \pm 2.15 ^{a,b}
			72	1.70 \pm 1.10
ácido ascórbico - α -tocoferol	100+20	5	0	1.30 \pm 0.84
			24	1.10 \pm 0.74
			48	1.00 \pm 0.71
			72	0.70 \pm 0.57
ácido ascórbico - α -tocoferol - CrO_3	100+20+ 20	5	0	1.00 \pm 0.50
			24	3.00 \pm 2.05 ^a
			48	5.80 \pm 0.50 ^{a,c}
			72	1.80 \pm 0.45

^a p<0.05 vs testigo; ^b CrO_3 vs CrO_3 hora 0; ^c p ácido ascórbico - α -toc - CrO_3 vs ácido ascórbico - α -toc - CrO_3 hora 0

Cuando se realizó el análisis del NIF se observó (Figura 9) que en el grupo combinado de ácido ascórbico, α -tocoferol y CrO_3 , hay una disminución con respecto al grupo CrO_3 del 30 % en las frecuencias de MN a la hora 24, la cual decrece al 16% a la hora 48 y se pierde a la hora 72. En base a estos resultados puede decirse que la protección de la combinación de ácido ascórbico con α - tocoferol disminuye con las horas de evaluación y que su efecto protector a la hora 48 es menor con respecto al que se presentó con la administración independiente de los tratamientos.

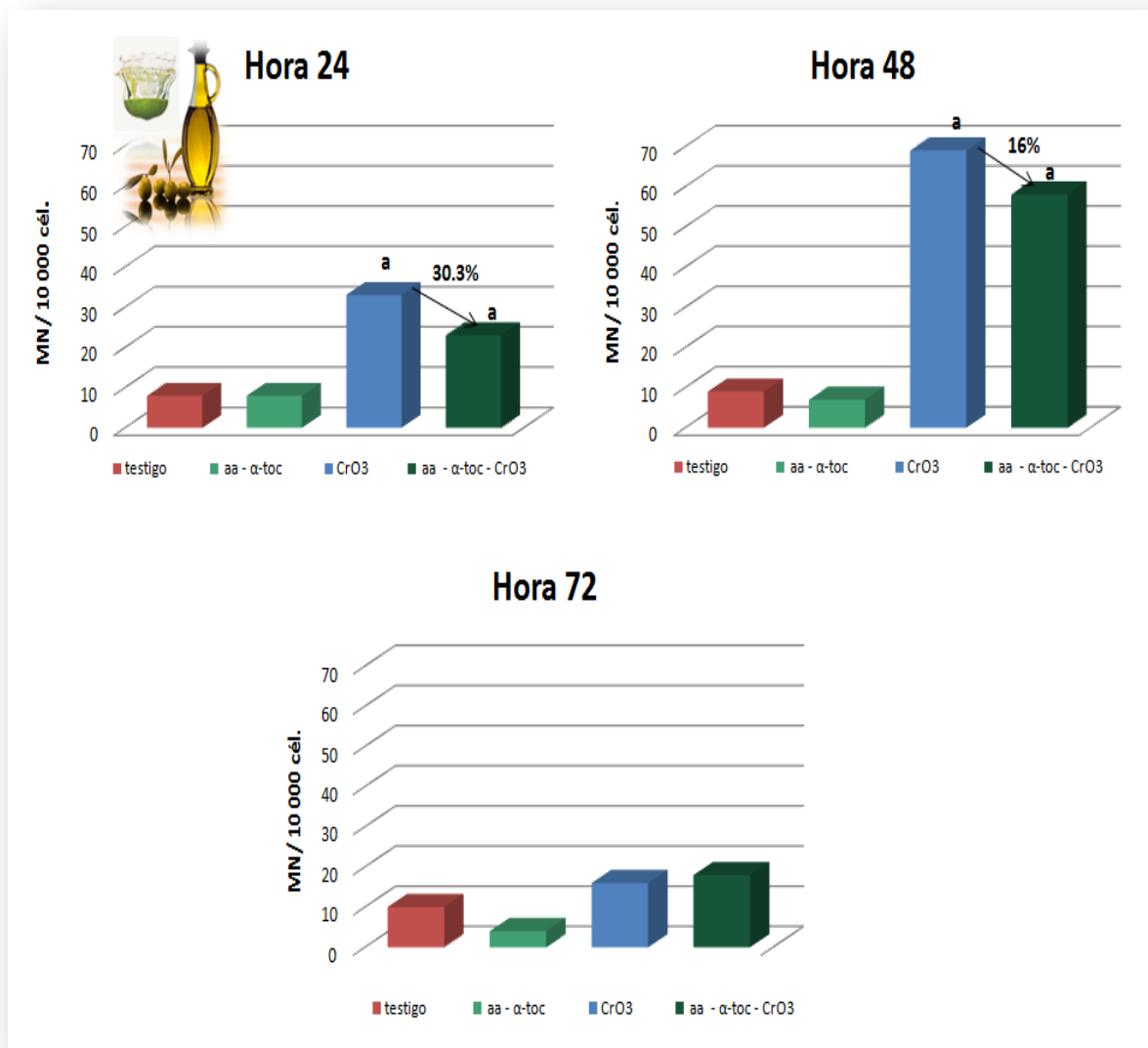


Figura 9. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10,000 EPC, cuando se administró simultáneamente 100mg/Kg de ácido ascórbico y 20 mg/Kg de α-tocoferol (^a: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs testigo; ^b: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs ácido ascórbico - α-tocoferol - CrO₃)

En la figura 10 se muestran a manera de resumen los porcentajes de disminución en las frecuencias de MN, que se observaron con cada uno de los antioxidantes cuando se combinaron con CrO₃. Puede observarse que el mayor porcentaje de disminución a la hora 48 y 72 se presentó en el grupo tratado con ácido ascórbico, seguido del grupo tratado con α-tocoferol. A la hora 24 el mayor porcentaje de disminución se presentó en el grupo β-caroteno, seguido por el grupo al que se le co-administró ácido ascórbico y α-tocoferol, sin embargo en estos mismos grupos se presentó a la hora 72 mayor porcentaje de MN que en el grupo tratado solo con CrO₃.

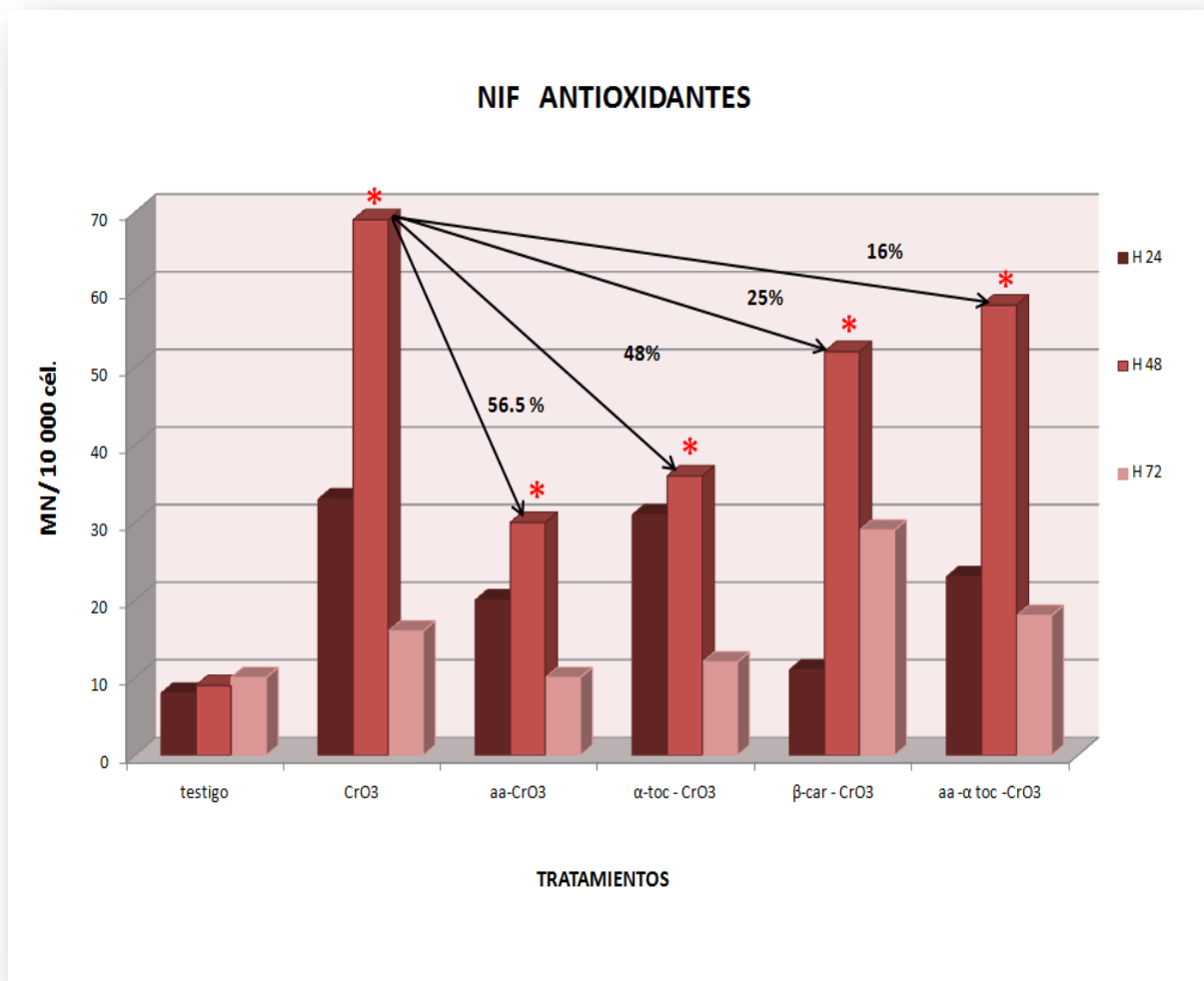


Figura 10 . Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10,000 EPC, de todos los tratamientos antioxidantes administrados (* : estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs testigo)

6.4. Efecto del ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno sobre el daño citotóxico inducido por el CrO3

En el cuadro 6 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC con respecto a las frecuencias de ENC en ratones CD1 tratados con ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno y CrO3 en los diferentes protocolos empleados en el estudio, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos. En base a estos resultados podemos inferir que ninguno de los tratamientos tiene efectos citotóxicos, sin embargo este parámetro debe tomarse con reserva.

Cuadro 6. Promedio de las frecuencia de EPC en ratones CD-1 tratados con fitoquímicos (ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno), CrO_3 y dosis combinadas (media \pm d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Hora	EPC/1000 células (media \pm d.e.)
Testigo	0	5	0	64.00 \pm 12.65
			24	60.20 \pm 6.87
			48	66.40 \pm 9.53
			72	68.00 \pm 10.34
CrO_3	20	5	0	56.80 \pm 13.20
			24	61.20 \pm 7.40
			48	72.60 \pm 15.88
			72	63.40 \pm 8.68
ácido ascórbico	100	5	0	62.20 \pm 14.32
			24	61.40 \pm 9.24
			48	61.00 \pm 9.08
			72	63.80 \pm 10.28
α -tocoferol	20	5	0	53.20 \pm 11.92
			24	50.00 \pm 5.52
			48	58.40 \pm 2.07
			72	70.40 \pm 12.93
β -caroteno	50	5	0	63.80 \pm 4.82
			24	61.80 \pm 14.11
			48	69.20 \pm 9.20
			72	61.80 \pm 9.71
ácido ascórbico - CrO_3	100+20	5	0	62.40 \pm 14.84
			24	57.00 \pm 10.65
			48	59.40 \pm 6.95
			72	66.80 \pm 11.90
α -tocoferol- CrO_3	20+ 20	5	0	59.20 \pm 7.12
			24	63.40 \pm 6.02
			48	56.60 \pm 5.94
			72	61.40 \pm 3.51
β -caroteno - CrO_3	50+20	5	0	56.20 \pm 9.20
			24	58.40 \pm 18.49
			48	60.00 \pm 21.18
			72	59.40 \pm 16.23
ácido ascórbico - α -tocoferol	100+20	5	0	91.60 \pm 7.50
			24	84.20 \pm 14.06
			48	80.00 \pm 11.40
			72	75.00 \pm 12.25
ácido ascórbico - α -tocoferol - CrO_3	100+20+ 20	5	0	79.00 \pm 14.18
			24	80.17 \pm 15.63
			48	72.50 \pm 8.75
			72	51.00 \pm 5.00

7. DISCUSIÓN

La exposición a agentes mutágenos así como el estilo de vida y deficiencias nutricionales, incrementan la probabilidad de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con el daño al ADN (Kohimeier *et al.*, 1995; Vitale *et al.*, 2010). En contra parte, en estudios epidemiológicos se ha observado que los componentes de frutas y vegetales son un factor importante en la modulación de algunas enfermedades relacionadas con el daño al ADN y algunos tipos de cáncer (Surh, 2003). De hecho, se ha observado que algunas sustancias con propiedades antimutágenas también presentan actividad como agentes anticancerígenos, ya que los mecanismos de acción inhibitoria pueden estar relacionados (De Flora, 1998). Por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto sobre el daño genotóxico inducido por compuestos cancerígenos [Cr (VI)], de sustancias componentes de la dieta que ya han sido identificadas como antimutágenos tales como; el ácido ascórbico, el α -tocoferol y el β -caroteno, para lo cual se empleó el ensayo de MN en sangre periférica en ratones de la cepa CD-1.

Como se muestra en los resultados, la administración sola de los antioxidantes; ácido ascórbico, α -tocoferol y β -carotenos no presentaron efectos tóxicos aparentes, ni indujeron daño genotóxico mediante el incremento de las frecuencias de MN. En diversos estudios se ha observado que componentes de las frutas y los vegetales presentan una alta capacidad antioxidante, a la cual se le ha relacionado con protección de daño al ADN. Dentro de los principales antioxidantes se han encontrado sustancias como los β -carotenos, el ácido ascórbico y el α -tocoferol entre otros (Surh y Ferguson, 2003). En el presente estudio cuando se administraron 100 mg/kg de de ácido ascórbico tampoco se observaron efectos tóxicos aparentes, ya que los ratones mostraron un comportamiento, pelaje y peso normal. En estudios previos realizados en ratones, en los que se administraron dosis mayores a la empleada en este estudio (4 g/kg) de ácido ascórbico por vía i.p. tampoco se observaron efectos tóxicos, si no por el contrario se disminuyó el crecimiento de tumores implantados (Chen *et al.*, 2008). También, en un estudio realizado en ratas, al administrar 200 mg/kg de ácido ascórbico por vía i.p., no se observaron efectos tóxicos y reportaron que se disminuyó el daño cerebral inducido por pilocarpina (Tome *et al.*, 2010). En evaluaciones realizadas en humanos también se ha reportado que la administración de dosis altas (1.5 g/kg) de ácido ascórbico por vía oral o intravenosa no induce efectos tóxicos, al ser el ácido ascórbico empleado como tratamiento experimental anticancerígeno (Cameron y Pauling, 1976; Hoffer *et al.*, 2008).

De igual manera, cuando se administraron 20 mg/kg de α -tocoferol, tampoco se observaron signos de toxicidad aparente en los ratones. Al igual que para el ácido ascórbico, estudios previos realizados en ratas a las que se suplementaron con 500 mg/kg de α -tocoferol no se observaron efectos tóxicos, si no por el contrario se disminuyó el daño causado en el tejido aórtico por altos niveles de colesterol en la dieta de los animales (Oré *et al.*, 2001). En estudios realizados en humanos se ha reportado que la administración crónica de 2000 UI vía oral no induce toxicidad al ser probado sobre la progresión de la enfermedad de Parkinson (The Parkinson Study Group, 1993), así como

tampoco la administración de 400 UI y 800 diarias en pacientes con enfermedad cardiovascular, en los cuales incluso redujo la incidencia de infarto de miocardio (Stephens *et al.*, 1996).

Cabe señalar que las dosis de 100 mg/kg de ácido ascórbico y 20 mg/kg de α -tocoferol empleadas en este estudio son menores a la LD₅₀ reportadas para ratones (USP DI, 1999) y que dichas dosis pueden alcanzarse en humanos con la ingesta recomendada de cinco fruta o verduras al día (Cadenas y Packer, 2002).

Por su parte, la administración de 50 mg/kg de β -caroteno al igual que los tratamientos anteriores (ácido ascórbico y α -tocoferol) tampoco presentó efectos tóxicos aparentes (comportamiento, pelaje y peso). Estudios realizados en ratas, en los que, se administraron 75 mg/kg de β -caroteno por vía oral (sonda intragástrica) tampoco reportaron toxicidad, si no por el contrario disminución en el grado de fibrosis hepática inducida por tioacetamida (Wardi *et al.*, 2001). Mientras que, en humanos se ha reportado que la administración por vía oral de 50 mg/kg de β -caroteno no induce toxicidad, al ser empleado como tratamiento experimental anticancerígeno (Greenberg *et al.* 1990). Cabe señalar que la dosis de β -caroteno (50 mg/kg) empleada en este estudio es menor a la LD₅₀ reportada para ratones (USP DI, 1999).

Una vez encontradas las dosis no tóxicas de los antioxidantes (ácido ascórbico 100 mg/kg, α -tocoferol 20 mg/kg y β -caroteno 50 mg/kg), se iniciaron las evaluaciones del daño genotóxico, para lo cual se empleó el ensayo de MN en sangre periférica con base en los lineamientos de la FDA (Hayashi *et al.*, 1990; FDA, 2000). La administración sola de 100 mg/kg de de ácido ascórbico como ya se mencionó, no incrementó las frecuencias de MN. En estudios realizados en ratones, en los que se administraron 60 mg/kg de ácido ascórbico por vía i.p. no se observó daño genotóxico, mediante la prueba de intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas (Siddique, 2005). De igual manera, en estudios realizados en ratones hembras (gestantes) a las cuales se les administraron las mismas dosis de ácido ascórbico por vía i.p. que las empleadas en nuestro estudio (100 mg/kg) tampoco observaron efectos genotóxicos mediante el incremento en las frecuencias de MN, tanto en los organismos adultos como en los embriones (Mozdarani y Nazari, 2007). Algo que llamo la atención en los resultados del presente estudio es que la administración del ácido ascórbico no solo no incremento las frecuencias de MN, sino por el contrario, redujo la frecuencia basal de MN, esto puede estar relacionado con su capacidad para neutralizar estrés oxidante generado intracelularmente de forma espontánea en las reacciones de óxido-reducción que son fundamentales para la obtención de la energía entre otros procesos en los seres vivos (Konigsberg, 2008). Aunque el oxígeno es imprescindible para la vida, ya que en el metabolismo aeróbico tiene lugar un proceso que permite almacenar la energía libre producida en la oxidación de los carbohidratos y de otros compuestos orgánicos, en forma de ATP, sin embargo se ha observado que cuando el contenido intracelular de oxidantes sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula, a lo que se le conoce como estrés oxidante, se puede inducir daño al ADN a través de la producción espontánea de ERO's y RL, mismos que también pueden dañar otras macromoléculas como los lípidos, las

proteínas y los hidratos de carbono, por lo que se pueden alterar los procesos celulares como la funcionalidad de las membranas, la producción de enzimas, la respiración celular, etc. (Rios de Molina, 2003; Konigsberg, 2008). Los RL además de producirse durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia, también pueden ser generados durante la exposición a determinados agentes químicos y físicos como algunos de los componentes de la contaminación ambiental, humo del tabaco, radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, etc. (Rios de Molina, 2003; Avello y Suwalsky, 2006). Por su parte, el ácido ascórbico es un antioxidante natural implicado en los procesos antioxidantes intracelulares de manera normal, por lo que la administración exógena que se realizó en este estudio al incrementar la concentración intracelular pudo disminuir el daño basal al ADN, mismo que se observó mediante el decremento de MN.

La administración sola de 20 mg/kg de α -tocoferol tampoco incrementó las frecuencias de MN. En estudios previos de genotoxicidad realizados en ratas albinas, se ha observado que la administración de 20 mg/kg de α -tocoferol por vía oral (sonda gástrica) no induce daño en el material genético mediante la inducción de MN (Chorvatovicova *et al.*, 1991) El α -tocoferol es un nutrimento esencial en la dieta, el cual tiene distintas funciones metabólicas, como la protección de la membrana celular frente a los efectos nocivos producidos por radicales libres, la ingesta diaria recomendada es de 15 a 30 mg/kg, por lo que la dosis empleada en nuestro estudio se encuentra dentro del intervalo (Konigsberg, 2008). Por otra parte, también la administración sola de 50 mg/kg de β -caroteno no incrementó las frecuencias de MN. Se ha propuesto que los β -carotenos presentan efectos benéficos para el organismo, ya que al ser un componente en la dieta dadas sus propiedades antioxidantes puede neutralizar las ERO's y los RL (Graham y Rosser, 2000). Se ha reportado que la administración de 250 mg/kg de β -caroteno por vía oral (sonda gástrica) no induce daño genotóxico mediante la inducción de aberraciones cromosómicas en hámster (Renner, 1985).

Por otra parte, cuando se administraron 20 mg/kg de CrO_3 por vía i.p., se observó que se incrementaron las frecuencias de MN, lo cual corrobora el daño genotóxico previamente reportado para los compuestos de Cr (VI) y en particular para el CrO_3 (García-Rodríguez *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2003; Henkler *et al.*, 2010; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2006). En el presente estudio se optó por realizar la cinética de MN para hacer el seguimiento de la inducción de MN durante 72 horas, se observó que el mayor efecto se presentó a la hora 48, esto se pudo haber debido a que en general la mayor distribución y biotransformación de los agentes químicos se presenta a la hora 48 después de su administración (Heddle *et al.*, 1983; Hayashi *et al.*, 1990). El mecanismo de daño genotóxico de los compuestos de Cr(VI) se ha planteado, con base en que los compuestos de Cr (VI) tienen la capacidad de atravesar la membrana celular a través de transportadores de aniones no específicos y dentro de la célula el Cr (VI) se reduce rápidamente por la interacción con moléculas citoplasmáticas a cromo (V), (IV) y (III) los cuales tienen afinidad con las bases y fosfatos de la cadena de ADN, además de generar ERO's y RL en cada reducción, mismos que pueden inducir, rupturas y aductos en la cadena de ADN así como entrecruzamientos, y por lo tanto inducir daño mutagénico y

cancerígeno (O'Brien *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006). Un exceso de RL rompe el equilibrio produciendo el llamado estrés oxidante.

Una vez encontradas las dosis no genotóxicas de los antioxidantes así como la dosis genotóxica del CrO₃, se combinaron los tratamientos con la finalidad de evaluar el efecto de los antioxidantes sobre el daño genotóxico inducido por la aplicación de 20 mg/kg de CrO₃, mediante las evaluaciones de las frecuencias de MN. Como se mostró en los resultados la administración previa de los antioxidantes redujo las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO₃, esto puede estar relacionado con su potencial antioxidante para neutralizar las ERO's y RL generadas por la reducción del Cr (VI) a Cr (III). Se ha propuesto que el ácido ascórbico es un eficaz antioxidante no enzimático, debido a que dona fácilmente sus electrones a las ERO's para neutralizarlas y puede regenerarse a partir del radical ascorbilo (A[•]), además de que el A[•] puede estabilizar el electrón desapareado en su estructura molecular. Estas propiedades hacen que el A[•] sea una molécula de menor reactividad en comparación con otras especies reactivas potencialmente dañinas. Por estas características se ha propuesto que la protección del ácido ascórbico a las macromoléculas celulares como el ADN se debe principalmente a su mecanismo para neutralizar las especies reactivas generadas en fase acuosa (Padayatty *et al.*, 2003).

En estudios previos realizados en ratones *in vivo*, se ha reportado que el ácido ascórbico puede proteger del daño inducido por agentes genotóxicos que generan daño oxidante tales como el FeSO₄, en el cual al ser aplicado después de administrar suplementos de 15 g/kg de ácido ascórbico se disminuyen las frecuencias de MN inducidas en medula ósea (Premkumar y Bowlus, 2003). Por su parte, El-Nahas *et al.* (1993) así como Mozdarani y Nazari (2009) describieron que la administración de 100 mg/kg vía i.p. disminuyen el porcentaje de aberraciones cromosómicas y MN generadas en ratones expuestos a radiación gamma y atribuyeron el efecto antimutágeno a su capacidad para neutralizar las ERO's generadas por la exposición a radiación. En estudios *in vitro* realizados en linfocitos humanos, también se ha observado un efecto antimutágeno del ácido ascórbico sobre el daño genotóxico inducido por el cisplatino mediante la reducción de intercambio de cromátidas hermana (Nefic 2001). Sin embargo, en evaluaciones *in vitro* realizadas en *Salmonella* mediante la prueba de Ames, se observó que el ácido ascórbico no tiene efectos protectores sobre el daño genotóxico inducido por fluoroquinolones, los cuales inducen genotoxicidad por la generación de ERO's, de hecho se incrementó el daño por lo que se propuso que el ácido ascórbico puede actuar también como prooxidante. En estudios realizados en cultivos celulares de *Salmonella* se observó que los cationes divalentes adicionados al cultivo, pueden reaccionar con el ácido ascórbico e inducir la reacción de Fenton, y la generación de ERO's y RL (Jarabask y Jabask, 1995; Alba *et al.*, 2008). En particular, Sugiyama *et al.* (1989) reportaron que el ácido ascórbico es capaz de reducir directamente el Cr (VI) a Cr (III) en solución acuosa. Al igual que Xu *et al.* (2004) quienes observaron que el ácido ascórbico puede reducir el K₂Cr₂O₇ en solución acuosa tanto en condiciones acidas como ligeramente básicas. Aunque en otros estudios realizados *in vitro* ha observado que el ácido ascórbico puede proteger el material genético no solo de las especies radicales generadas por la reducción de Cr(VI) si no que

también del daño generado directamente por el Cr(III). Qui *et al.* (2000) observaron que el ácido ascórbico reduce los niveles del marcador de inestabilidad genómica 8-hidroxideoxiguanosina (8OHdG) en ADN de ternera incubado con CrCl₃.

Se ha observado que la administración de 6.68 g/kg de ácido ascórbico por vía i.p. reduce entre 40% y 75% el intercambio de cromátidas hermanas inducidas por ciclofosfamida y mitomicina en médula ósea de ratón, los cuales son agentes utilizados como antineoplásicos (Krishna *et al.* 1986). De igual manera, en estudios realizados en ratones, en los que se administraron 60 mg/kg de ácido ascórbico por vía i.p. se redujo el daño genotóxico inducido por la exposición a acetato de megestrol (esteroide usado en el tratamiento de algunos carcinomas), el cual fue evaluado mediante las pruebas de intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas (Siddique *et al.*, 2005) en ambos casos no se ha esclarecido el posible mecanismo de daño y protección del ADN.

A partir de los resultados obtenidos hasta el momento en el presente estudio se puede plantear que el ácido ascórbico protege del daño al ADN causado por agentes genotóxicos como el CrO₃, que son inductores de ERO's y RL; y que la disminución de las frecuencias de MN que se presentó con la administración de ácido ascórbico puede estar relacionada con el mecanismo antioxidante por captura de RL y ERO's, ya que como se describió anteriormente la reducción de Cr (VI) a Cr (III) dentro de la célula genera ERO's y RL mismos que interaccionan con el ADN generando genotoxicidad. Sin embargo, aunque no se observó un incremento de MN al administrar el ácido ascórbico, no se debe descartar su actividad prooxidante.

Cuando se combinaron los tratamientos de 20 mg/kg de α -tocoferol y CrO₃ se disminuyeron las frecuencias de MN con respecto al grupo al que solo se le administro el agente inductor de daño al ADN, por lo que el α -tocoferol protegió del daño genotóxico inducido por el CrO₃. Se ha descrito que el α -tocoferol es el principal antioxidante liposoluble y que presenta protección del daño oxidante generado por especies radicales altamente dañinas en la membrana celular (Gerald y Combs, 1992). En estudios previos en los que se ha administrado el α -tocoferol se observó que tiene efectos protectores sobre el daño genotóxico inducido por compuesto de Cr (VI), ya que al administrar 20 mg/kg de α -tocoferol por vía oral (sonda gástrica) en ratas se disminuyeron las frecuencias de MN inducidas por el K₂Cr₂O₇ (Chorvatovicova *et al.*, 1991). Sugiyama (1991), también observo que el α -tocoferol puede inhibir los rompimientos de cadena sencilla del ADN generadas por el Na₂CrO₄ en células V79 de hámster. En ambos estudios se atribuyo el efecto protector del α -tocoferol a su capacidad antioxidante para neutralizar las ERO's generadas por la reducción de Cr (VI) las cuales están implicadas en el daño al ADN generado por estos agentes.

En otros estudios realizados *in vivo*, también se ha observado el efecto protector del α -tocoferol sobre el daño al ADN inducido por otros agentes genotóxicos diferentes a los compuestos de Cr (VI) que también generan ERO's y RL. Sarma y Kesavan (1993) observaron que la administración de 100 mg/kg de α -tocoferol por vía oral (sonda

intragástrica) reduce significativamente la frecuencia de MN y aberraciones cromosómicas en medula ósea de ratones expuestos a radiación gamma. Por su parte, Singh *et al* (2008) reportaron que la administración de esta misma dosis (100 mg/ kg) de α -tocoferol tiene efectos protectores sobre el daño genotóxico inducido por la atrazina en ratones al evaluarse con tres pruebas de genotoxicidad: ensayo de MN, ensayo cometa y electroforesis en gel. En estudios *in vitro* realizados en *Salmonella typhimurium* mediante la prueba de Ames se ha determinado que el α -tocoferol disminuye el efecto genotóxico inducido por el norfloxacin, por lo que se ha planteado su capacidad antioxidante le permite neutralizar las RL y ERO's (Alba *et al.*, 2008).

También se ha reportado que la deficiencia de α -tocoferol en la dieta reduce la capacidad de los organismos para reparar daños en el ADN generados por la exposición a agentes genotóxicos. Odagiri *et al.* (1992) reportaron que la deficiencia de α -tocoferol en la dieta incrementa los MN en ratones expuestos a rayos X, en comparación con los que no presentaban deficiencia del α -tocoferol en la dieta. Por su parte, Chandra *et al* (2010) observaron que la suplementación de α -tocoferol (50 mg/kg) en la dieta de ratas expuestas a $K_2Cr_2O_7$ es capaz de disminuir el nivel de peroxidación lipídica generada por el Cr (VI) en los testículos, manteniendo los niveles normales de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa. Qi *et al.* (2000) también reportaron que el α -tocoferol evita la formación *in vitro* del marcador de daño genómico, 8-hidroxideoxiguanosina (8OHdG), inducido por Cr (III) en presencia de H_2O_2 . De igual manera, Huang *et al.* (2002) observaron mediante la medición del marcador de estrés oxidante 8-iso-PGF en la excreción urinaria, que la suplementación con 400 IU de α -tocoferol disminuye la peroxidación lipídica basal en el organismo. Particularmente, se ha descrito el mecanismo de acción antioxidante del α -tocoferol en las membranas celulares, este mecanismo consiste en interrumpir el proceso de lipoperoxidación, mediante la donación de un hidrogeno al radical peroxilo ($ROO\bullet$) lo cual genera radicales menos reactivos, (α -tocoferoxil, ariloxilo) que se estabilizan por deslocalización electrónica sin la posibilidad de abstraer hidrogeno de moléculas lipídicas estables y continuar la reacción en cadena de la lipoperoxidación. El α -tocoferol también puede reaccionar con los radicales triclorometil ($\bullet CCl_3$), hidroxilo ($\bullet OH$), superóxido ($O_2\bullet$) y oxígeno singulete (1O_2) (Sagayo *et al.*, 2007; Fukuzawa, 2008; Engin, 2009). Con base en los resultados del presente estudio, el efecto antígenotóxico que se observó con la administración del α -tocoferol inducido por el CrO_3 , puede estar relacionado con la captura de las ERO's y RL que se generan durante la reducción de Cr (VI) a Cr (III).

Finalmente, cuando se combinaron los tratamiento de 50 mg/kg de β -caroteno y 20 mg/kg de CrO_3 se presentó un efecto dual, ya que a la hora 24 y 48 se disminuyeron las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 , mientras que a la hora 72 se incrementó con respecto al grupo testigo, esto puede deberse a un efecto tanto antioxidante como prooxidante que pueden presentar algunos antioxidantes como el β -caroteno (Dias *et al.*, 2009). Renner (1985) observó que la administración de distintas dosis (10-250mg) de β -caroteno por vía oral (sonda intragástrica) disminuían el porcentaje de aberraciones cromosómicas inducidas por thiotepa, metilmetanosulfonato y bisulfan en

hámsters chinos, por lo que le atribuyo propiedades antimutagénicas. Por su parte, Salvadori *et al.* (1992) también observaron mediante la prueba de aberraciones cromosómicas, que dosis de 50 mg/kg β -caroteno administrado por vía oral presentaba efectos protectores sobre el daño inducido por ciclofosfamida en medula ósea de ratón. También El-Makawi y El Ashmaoui (2003) reportaron que la administración de 30 mg/kg de β -caroteno por vía i.p., reduce las frecuencias de MN inducidas por doxorubicina (hidroxildaunorrubicina), en medula ósea de ratón. Sin embargo, en las evaluaciones anteriormente descritas, no se pudo establecer una relación directa ni el mecanismo de protección entre las dosis de β -caroteno administradas y los resultados obtenidos, por lo que se planteó que es posible que el β -caroteno actúe por más de un mecanismos (Konigsberg, 2008).

Recientemente se ha propuesto que los carotenoides protegen a las células del estrés oxidante al actuar como foto protectores y como moléculas reactivas en la membrana celular contra especies químicas oxidantes generadas dentro de la célula, debido a que pueden incorporar los RL a su sistema de dobles enlaces conjugados y estabilizarlos por resonancia (Konigsberg, 2008). En estudios *in vivo* realizados en *Drosophila melanogaster*, se ha mostrado que la suplementación con 1, 2 ó 4 mg/ml de β -caroteno en el alimento disminuye las mutaciones somáticas inducidas por doxorubicina, al evaluar las características fenotípicas de las alas, este efecto fue atribuido a la capacidad antioxidante del β -caroteno para modular el estrés oxidante generado por la doxorubicina, mediante la captura de los RL y ERO's (Dias *et al.*, 2009). En humanos se ha reportado que la ingesta diaria (crónica) de 22 mg de β -caroteno (en jugo de zanahoria) disminuye el daño basal inducido por diferentes factores ambientales, como la contaminación y los hábitos alimentario en el material genético, evaluado mediante el ensayo cometa (Pool-Zobel *et al.*, 1997).

Por otra parte, se ha descrito la capacidad del β -caroteno para neutraliza radicales peróxido, la cual se presenta siempre y cuando se mantengan bajas las concentraciones parciales de O₂, pero si estas son altas se incrementa el proceso oxidante, actuando en este caso como prooxidante (Konigsberg, 2008; Helden *et al.*, 2009). Lo cual podría estar relacionado con el incremento de MN observado a las 72 horas en nuestro estudio.

En humanos se ha descrito que β -caroteno, puede actuar como un agente promotor de cáncer o como un agente anticancerígeno, dependiendo del grado de exposición a genotóxicos. Omenn *et al.* (1996) observaron que la suplementación con 30 mg/día de β -caroteno a individuos ocupacionalmente expuestos a asbesto, aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, en los individuos con mayor grado de exposición y en los consumidores de tabaco. De la misma forma, Virtamo *et al.* (2003) reportaron que la administración de 20 mg/día al día de β -caroteno en hombres entre los 50 y 69 años, aumenta el índice de mortalidad así como el riesgo de padecer cáncer de pulmón en los individuos que consumen más de 5 cigarros al día. Sin embargo, Greenberg *et al.* (1990) observaron que la administración por vía oral de 50 mg/día de β -caroteno disminuye la incidencia de cáncer de piel en individuos sin factores de riesgo (exposición a tabaco). Por lo que se ha propuesto que el efecto genotóxico del β -caroteno está limitado en este caso

sólo a los fumadores, debido a que el tabaco incrementa su oxidación y la concentración de radicales libres (Navarro *et al.*, 2008). Por su parte, Palozza *et al.* (2006) también observaron un efecto dual del β -caroteno al cuantificar los productos de la peroxidación lipídica *in vitro* del alquitrán modificando las concentraciones de O₂, ya que observaron que se presentaban tanto efectos antioxidantes como daño oxidante en forma proporcional a las concentraciones de O₂. Por lo que se ha propuesto que la concentración de oxígeno presentes en el pulmón puede inducir daño prooxidante del β -caroteno en la presencia del alquitrán en personas fumadoras.

También, se ha propuesto que los productos de degradación del β -caroteno en hepatocitos de rata generan daño al ADN mediante la inducción de MN, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, por lo que sugieren que no es el β -caroteno el que genera genotoxicidad si no sus metabolitos (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004; Alija *et al.*, 2010).

El efecto protector que se presentó con la administración de β -caroteno sobre el efecto genotóxico inducido por el CrO₃, puede estar relacionado con sus propiedades antioxidantes partiendo de que los carotenoides protegen a las células al actuar como foto protectores y como moléculas reactivas en la membrana celular contra especies químicas oxidantes generadas dentro de la célula, al incorporar los radicales libres a su sistema de dobles enlaces conjugados y estabilizarlo por resonancia, mientras que, el efecto dual que se presentó con la administración del β -caroteno, posiblemente se debe a que durante las primeras 48 horas de evaluación la cantidad de especies reactivas generadas por el CrO₃ no fueron tan altas como para degradar al β -caroteno por lo que este actuó como antioxidante sobre el daño inducido por el Cr(VI), sin embargo por el incremento de las especies reactivas generadas por el CrO₃ de la hora 48 a la 72, el β -caroteno posiblemente se degradó y sus productos de degradación incrementaron el estrés oxidante, llevando finalmente al incremento en las frecuencias de MN.

Debido a que en los tratamientos combinados de ácido ascórbico y α -tocoferol se observó la protección más alta (56% y 48 %) sobre el daño al ADN inducido por la exposición a CrO₃ de los ratones CD-1, se decidió evaluar el efecto de la administración simultánea de estos dos antioxidantes. Sin embargo, la protección observada fue menor que la que se presentó con la administración independiente de cada uno de los tratamientos. En estudios previos realizados en humanos se ha observado que la suplementación de ácido ascórbico y α -tocoferol (500 mg y 400 UI respectivamente) de manera independiente, reduce la peroxidación lipídica evaluada mediante el marcador de estrés oxidante 8-iso-PGF₂ en la excreción urinaria, sin embargo cuando los suplementos se administraron de manera simultánea no se presenta ningún efecto en los marcadores de estrés oxidante (Huang *et al.*, 2002), esto se puede deber a que se presenta un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el α -tocoferol. Se ha propuesto que se puede dar una regeneración del α -tocoferol por acción de ácido ascórbico, debido a que en este proceso el radical α -tocoferilo se genera en las membranas celulares como consecuencia de la acción del α -tocoferol con ERO's y RL, el cual a su vez reacciona con el ácido ascórbico transfiriendo así el daño oxidante a la fase acuosa, donde el ácido ascórbico también puede ser

regenerado. Sin embargo, la regeneración de grandes cantidades de ácido ascórbico, resulta en la reducción de las concentraciones intracelulares de las enzimas NADPH y GSH, lo que desencadena a su vez un proceso de estrés oxidante, por lo que se enmascara o se pierde la protección oxidante, situación que se pudo haber presentado en nuestro estudio al administrar simultáneamente el ácido ascórbico y el α -tocoferol, por lo que se disminuyó la protección del daño al ADN inducido por el CrO₃, en comparación con los tratamientos independientes. Aunque este mecanismo ha sido descrito *in vitro*, la interacción del ácido ascórbico y el α -tocoferol *in vivo* sigue siendo controversial (Konigsberg, 2008).

En cuanto al efecto citotóxico, al administrar los tratamientos empleados en el presente estudio, no se observaron modificaciones estadísticamente significativas en las frecuencias de MN en ninguna de las horas de evaluación. Se ha descrito que el daño citotóxico puede determinarse por la reducción de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC (Vallarino-Kelly y Morales-Ramírez, 2001). Sin embargo, cabe mencionar que la evaluación de este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (Krishna *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 2000). En estudios previos tampoco se han reportado efectos sobre las frecuencias de EPC con respecto a los ENC con tratamientos de Cr(VI) (García-Rodríguez, 2006; Macedo, 2010) ni con los tratamientos con los antioxidantes empleados en el presente estudio (Konopacka, 1998).

8. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

- La administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. induce daño genotóxico ya que incrementó la frecuencia de MN de manera estadísticamente significativa.
- La administración del ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno a ratones de la cepa CD-1 no inducen daño genotóxico, ya que no incrementan de manera estadísticamente significativa la frecuencia de MN con respecto al grupo testigo.
- La administración sola de ácido ascórbico disminuyó la frecuencia basal de MN, lo cual pudo deberse a que al incrementar la concentración intracelular de ácido ascórbico, se aumentó su capacidad para neutralizar el estrés oxidante generado intracelularmente de forma espontánea en las reacciones de óxido-reducción que son fundamentales para la obtención de la energía entre otros procesos en los seres vivos.
- La administración previa de los antioxidantes protege del daño genotóxico inducido por el tratamiento de CrO₃, ya que se presentó una disminución en las frecuencias de MN a las 48 horas en el siguiente orden: ácido ascórbico (57%) > α -tocoferol (48%) > β -caroteno (25%).
- La administración del β -caroteno previa al tratamiento de CrO₃ presenta un efecto dual, ya que se disminuyen las frecuencias de MN a las 24 y 48 horas y se incrementan a la hora 72, por lo que se sugiere que el β -caroteno presenta un efecto anti y prooxidante.
- La administración simultánea de ácido ascórbico y α -tocoferol presenta una menor protección del daño genotóxico inducido por el CrO₃ en comparación con las administraciones independientes de cada uno de los tratamientos, lo cual puede ser debido a una interacción entre ambos antioxidantes que disminuye su efecto antioxidante.
- La administración de los tratamientos antioxidantes y CrO₃ no presentan efectos citotóxicos, ya que no se modificaron las frecuencias de EPC con respecto a los ENC. Sin embargo estos datos deben tomarse con reserva.

9. REFERENCIAS BIBLOGRAFICAS

- Abrevaya X (2008) ¿Qué es la genotoxicidad?. Intra Med . Artículos (4711).
- Alba M, Sánchez R, Ruíz N, Navarrete J, Flores R, Araceli Montoya-Estrada A y Hicks J (2008) Comparative study of the antimutagenic properties of vitamins C and E against mutation induced by norfloxacin Bio. Med Central, Pharmacology 8:2.
- Alija A, Bresgen N, Bojaxhi E, Vogl C, Siems W y Eckl P (2010) Cytotoxicity of β -carotene cleavage products and its prevention by antioxidants. Act. Biochim Pol. 57(2): 217-21.
- Arencibia D, Rosario L, López Y y Díaz D (2009). Las plantas, fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. Retel / n°21 :37-51.
- Avello, M y Suwalsky, M. (2006) Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea 494:161-172
- Blé-Castillo J, Díaz-Zagoya J y Méndez J (2007) Suplementación con vitamina E, ¿benéfica o dañina?. Gac Méd Méx 144 (2).
- Blot W, Li J, Taylor P, Guo W, Dawsey S, Wang G, Yang C, Zheng S, Gail M, Li G, Yu Y, Liu B, Tangrea J, Sun Y, Liu F, Fraumeni J, Zhang Y y Li B (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. Journal of the National Cancer Institute, 85: 1483-1492.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M y Lando C (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis 28: 625-631.
- Cadenas E y Packer L (2002) Handbook of Antioxidants: Second edition revised and expanded. New York: Marcel Dekker, Inc.; pp 744.
- Cameron E y Pauling L (1976) Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 (10): 3685-3689.
- Chandra A, Chatterjee A, Ghosh R y Sarkar M (2010) Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats. Food and Chemical Toxicology 48: 972-979.
- Chen Q, Espey G, Sun Y, Pooput C, Kirk L., Krishna C, Khosh B, Drisko J y Levine M (2008) Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. PNAS; 105 (32): 11105-11109.
- Chorvatovicova D, Ginter E, Kosinova A y Zloch Z (1991) Effect of vitamins C and E on toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium in rat and guinea pig. Mutation Research; 262 (1): 41-46.
- De Flora S (1998) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. Mutation Research; 402 (1-2): 151-158.
- De Flora S, Bagnasco M y Harri Vainio (1999) Modulation of genotoxic and related effects by carotenoids and vitamin A in experimental models: mechanistic issues. Mutagenesis 14 (2): 153-172.
- Dias C, Araújo B, Dutra E y Nepomuceno J (2009) Protective effects of β -carotene against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster* .Genetics and Molecular Research 8 (4): 1367-1375.

- Edes T, Thornton W y Shah J (1989) Beta-carotene and aryl hydrocarbon hydroxylase in the rat: an effect of beta-carotene independent of vitamin A activity. *J Nutr* ;119:796-799.
- El-Makawi A y El Ashmaoui H (2003) Evaluation of the protective activity of beta-carotene and l-carnitine on doxorubicin -induced genotoxicity in rat. *Arab J. Biotech* 6 (2): 289-296.
- El-Nahas S, Mattar F y Mohamed A (1993) Radioprotective effect of Vitamins C and E, *Mutat. Res.* 301: 143-147.
- Engin K (2009) Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant *Molecular Vision* ; 15:855-860.
- EPA, Environmental Protection Agency (1998) Integrated Risk information System (IRIS) on Chromium VI. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- FAO/WHO (2001) Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand.
- FDA (2000) Redbook. IV.C.1.d. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. pp. 1-6.
- Fenech, M y 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. *Mut. Res.* 504: 131-136.
- Flora S y Tandon S (1986) Preventive and therapeutic effects of thiamine, ascorbic acid and their combination in lead intoxication. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 58:374-8
- Fukuzawa K (2008) Dynamics of Lipid peroxidation and Antioxidation of α -Tocopherol in membranes. *J Nutr Sci Vitaminol*, 54: 273-285.
- García-Rodríguez y Altamirano-Lozano (2001). Sales de sodio y cobre de la clorofila: usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígena. *TIP Revista especializada en Ciencias*
- García-Rodríguez y Altamirano-Lozano (2006) Estudios de los efectos de la clorofilina sobre la acción genotóxica y teratógena del cromo VI. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, FES Zaragoza, UNAM.
- García-Rodríguez y Altamirano-Lozano (2007). La clorofilina como modulador y protector del daño al ADN: experiencia en el ratón in vivo. *Bioquímica* 32, p. 15-24.
- Gerald F y Combs J (1992). *The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, Academic Press Inc., (California).
- Gillilan R, Mondell B y Warbasse J (1977) Quantitative evaluation of vitamin E in the treatment of angina pectoris. *Am Heart* ; 93: 444-449.
- Gliszczynska-Swiglo A y Sikorska E (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *J. Chromatogr. A* 1048, 195-198.
- González-Torres M, Betancourt M y Ortiz R (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1): 3-9.
- Graham R y Rosser J (2000) Carotenoids in staple foods: their potential to improve human nutrition. *Food and Nutrition Bulletin* 21(4):404-409.
- Greenberg E, Baron J y Stukel T (1990) A clinical trial of beta carotene to prevent basal-cell and squamous-cell cancers of skin. The Skin Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med* 323: 789-795.

- Gutteridge J y Halliwell B (1999). Reactive oxygen species in biological systems. Ed. D.L.Gilbert and C.A.Colton. pp. 189-218.
- G van Poppel y Goldbohm R (1995) Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention American Journal of Clinical Nutrition, 6: 1393S-1402S.
- Halliwell B y Poulsen H (2006). Cigarette Smoke and Oxidative Stress. Editorial Springer-Verlag. Berlin.
- Huang H, Appel L , Croft K, Miller E , Mori T y Puddey I (2002) Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial Am J Clin Nutr ;76:549–55.
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T y Ishidate M (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutation Research, 245 pag. 245-249
- Hayashi M, Mac Gregor J, Gatehouse D, Adler I, Blaker D, Dertinger S, Krishna G, Morita T, Ruso A y Suto S (2000) *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatment, integration with toxicity testing, and automated scoring. Env. Mol. Mutagen .35, 234-252
- Heddle A, Hite M, Kirkhart M y Salamone F (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity , Ed. Elsevier Science publisher, 83: 165-1110.
- Helden Y, Keijer J, Heil S, Pico C, Palou A, Oliver P, Munnias A, Briede J, Peluso M, Franssen-van Hal N, Schooten F y Godschalk R (2009) Carcinogenesis, 3(12): 2070–2076.
- Henkler F, Brinkmann J y Luch A (2010) The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis Induced by Metals and Xenobiotics .Cancers , 2: 376-396.
- Hoffer L, Levine M, Assouline S, Melnychuk D, Padayatty S, Rosadiuk K, Rousseau C, Robitaille L y Miller W (2008) Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced Malignancy. Annals of Oncology 19: 1969–1974
- Houston D y Johnson M (2000). Does vitamin C intake protect against lead toxicity? Nutr Rev; 58:73-75.
- Jarabask A y Jabask J (1995) Effect of ascorbate on the DT mediated redox cycling of 2-methyl 1,4-naphthoquinone. Arch Biochem Biophys , 318:418-423.
- Kada T (1984) Environmental desmutagens and antimutagenic agents. Environ 240:135-151.
- Kada T, Inoue T y Namiki N (1982) Environmental desmutagens and antimutagenic. Klekowski Ed., Environmental Mutagenesis and Plant Biology, Praeger, New York, pp. 137–151.
- Kim B, Cho M y Kim H (2000) Statistical analysis of in vivo rodent micronucleus assay. Mutation Research, 469 (2): 233-241.
- Kohimeier L, Simonsen N y Mottus K (1995) Dietary Modifiers of Carcinogenesis. Environmental Health perspectives. 103: 177-184.
- Konigsberg M (2008).Radicales libres y Estrés Oxidante. El manual moderno. México.
- Konopacka M y Rzeszowska J (2001) Antioxidant Vitamins C, E and b-carotene reduce DNA damage before as well as after g-ray irradiation of human lymphocytes in vitro.
- Konopacka M (1998) .Modifying effect of vitamins C, E, and beta-carotene against gamma-rayinduced DNA damage in mouse cells. Mutation Research 417: 85-94.

- Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, Eichenlaub-Ritter U y Decordier I (2003) Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol Lett* 140-141:63-74.
- Krishna G, Nath J y Ong T (1986) Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C Inhibition *Cancer Res*; 46:2670-2674.
- Lee Wang-Jae (2009) The Prospects of Vitamin C in Cancer Therapy. *Immune Netw.* 2009 October; 9(5): 147–152.
- Lindsay D y Astley S (2002) European research on the functional effects of dietary antioxidants-EUROFEDA. *Mol. Aspects. Med.* 23 (1-3) 1- 38.
- Macedo C (2010) Protección diferenciada de la clorofilina sobre el efecto genotóxico del trióxido de cromo en ratones machos *in vivo*. Tesis de licenciatura en Biología, facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Meydani S, Meydani M y Blumberg J (1998) Assesment of the safety of supplementation of different amounts of vitamin E in healthy older adults. *Am J Clin Nutr* ; 63:311-318.
- Meléndez- Martínez A, Vicario I y Heredia F (2004) Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Arch. latinoam. nutr*; 54(2):209-215.
- Mozdarani H y Nazari E (2007) Frequency of micronuclei in 4-8 cell mouse embryos generated after maternal gamma-irradiation in the presence and in the absence of vitamin C. *Radiat Environ Biophys.* 46(4):417-22.
- Müller L, Kikuchi Y, Probst G, Schechtman L, Shimada H, Sofuni T y Tweats D (1998) ICH harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Science*; 240: 1302-7.
- Mozdarani H y Nazari E (2009) Cytogenetic damage in preimplantation mouse embryos generated after paternal and parental g-irradiation and the influence of vitamin C. *Reproduction* 137 35–43.
- Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K y Aruna- karan J (2005) Studies on the protective role of vitamin C and E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254)-induced oxidative damage in Leydig cells. *Free Radial Res*; 39:1259–72.
- Nacional Cancer Institute. U.S National institutes of health (2010). www.cancer.gov.
- Navarro-Aviñó J, Aguilar I y López-Moya J (2007) Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas Ecosistemas 16 (2): 10-25.
- Navarro M, Serrano G y Expósito I (2008) Precaución con el uso del beta-caroteno. *Salud Estética XX*.
- Nefic H (2001) Anticlastogenic effect of Vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 498 (2001) 89–98.
- O'Brien, Ceryak S y Patierni S (2003) Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms *Mutation Research* 533:3–36.
- Odagiri Y, Karube T, Katayama H y Takemoto K (1992) Modification of the Clastogenic Activity of X-Ray and 6-Mercaptopurine in Mice by Prefeeding with Vitamins C and E. *J Nutr.* 122(7):1553-8.
- Omenn G, Goodman G, Thornquist , John Balmes, Cullen M, Glass A., Keogh J, Meyskens F, Valanis B, Williams J, Barnhart S, Cherniack M, Brodtkin C y Hammar S (1996) Risk Factors for Lung Cancer

- and for Intervention Effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 88 (21): 1550-1559.
- Oré R, Valdivieso R, Arnao I y Suárez S (2001) Beneficio de la Suplementación de la Vitamina E en Ratas Hipercolesterolémicas. *ISSN 1025 – 5583*; 62 (1).
- Oro J y Donnamaría M.C (2006) Acción Farmacológica, Biofísicoquímica y Estructura Dinámica de la Vitamina C. *Acta Farm. Bonaerense* 25 (1): 145-54.
- Padayatty S, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta S y Levine M. (2003) Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention *Journal of the American College of Nutrition*, 22 (1): 18–35.
- Padayatty S, Sun A, Chen Q, Espey M, Drisko J y Levine M (2010) Vitamin C: Intravenous Use by Complementary and Alternative Medicine Practitioners and Adverse Effects. *Plos One*; 5(7): 1414.
- Palozza P, Serini S, Trombino S, Lauriola L, Ranelletti F y Calviello G (2006) Dual role of b-carotene in combination with cigarette smoke aqueous extract on the formation of mutagenic lipid peroxidation products in lung membranes: dependence on pO₂. *Carcinogenesis*, 27(12): 2383–2391.
- Patrick L (2000) Beta-Carotene: The Controversy Continues. *Altern Med Rev* ; 5: 530-545.
- Pereyra M (2010). Efecto genotóxico de los compuestos de cromo (III) y (VI) en el ratón CD-1 in vivo. Tesis de licenciatura en Biología, facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Pool-Zobel B, Bub A , Muller H, Wollowski I y Rechkemmer G (1997) Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods, 18(9): 1847–1850.
- Prasad K y Edwards-Prasad J (1982) Effect of tocopherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture. *Cancer Res*; 42: 550-5.
- Pratico D, Tangirala R, Rader D, Rokach J y Fitz Gerald G (1998) Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Nat Med* ; 4:1189-1192.
- Premkumar K y Bowlus C. (2003) Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. *Mutation Research* 542: 99–103.
- Qi W, Reiter R, Tan D, Garcia J, Manchester L, Karbownik M y Calvo J (2000) Chromium(III)-Induced 8-Hydroxydeoxyguanosine in DNA and Its Reduction by Antioxidants: Comparative Effects of Melatonin, Ascorbate, and Vitamin E. *Environmental Health Perspectives*, 108(5): 399-402.
- Ramos M, Batista C, Gómez B, Zamora A. (2006) Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Inv salud* 2006; VIII (1): 7-15.
- Renner H (1985) Anticlastogenic effect of β-carotene in Chinese hamster, time and dose-response studies with different mutagens. *Mutation Research*; 144: 251- 256.
- Ríos de Molina M (2003) El estrés oxidativo y el destino celular. *Química viva*; 2(01): 17-28.
- Salvadori D, Ribeiro L, Oliveira D y Becak W (1992) Bete- carotene as a modulator of chromosomal aberrations induced in mouse bone marrow cell. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 20: 206-210.
- Sarma L y Kesavan P (1993) Protective effect of vitamin C and E against gamma-ray-induced chromosomal damage in mouse, *Int. J. Radiat. Biol.* 63, 759–764.

- Sayago A, Marín M, Aparicio I, Morales R y María T (2007) Vitamina E y aceites vegetales. GRASAS Y ACEITES, 58 (1), 74-86.
- Serra H y Cafaro T (2007) Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. Acta Bioquím Clín Latinoam ; 41 (4): 525-32.
- Serrano A, Jurado C, Sánchez C y López F (1991) Vitaminas A, C y E en la prevención del cáncer Nutrición Clínica, 11: 34-44.
- Shu-Lan Y, Wei-Yu W, Chin- Hsiu H y Miao-Lin H. (2004) Pro-oxidative effect of h-carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA strand breaks in mouse fibroblast C3H10T1/2 cells Journal of Nutritional Biochemistry 16: 729–735.
- Siddique Y (2005) Antigenotoxic effects of ascorbic acid against megestrol acetate-induced genotoxicity in mice. Hum Exp Toxicol, 24(3): 121-127.
- Singh M, Kaur P, Sandhir R y Kiran R (2008) Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. Mutation Research; 654 (2): 145-9.
- Stephens N, Parsons A y Schofield P (1996) Randomized controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). Lancet ; 347:781-786.
- Sugiyama M (1991) Effects of Vitamins on Chromium(VI)-Induced Damage. Environmental Health Perspectives , 92: 63-70.
- Surh Y-J (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nature Reviews Cancer 3, 768-780
- Surh Y-J, y Ferguson L (2003) Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential—highlights of a symposium Mutat. Res. 523-524: 1-8.
- The Parkinson Study Group (1993) Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. N Engl J Med. 328:176-183.
- Tomasetti M, Strafella E, Staffolani E, Santarelli L, Neuzil J y Guerrieri R (2010) α -Tocopheryl succinate promotes selective cell death induced by vitamin K3 in combination with ascorbate. British Journal of Cancer 102: 1224 – 1234.
- Tome A, Ferreira P y Freitas R (2010) Inhibitory action of antioxidants (ascorbic acid or α -tocopherol) on seizures and brain damage induced by pilocarpine in rats. Arq Neuropsiquiatr 68(3):355-361.
- USP DI (1999) Drug Information for the Health Care Professional. Vol I. Massachusetts. Micromedex, Inc. pp. 612-614
- Vallarino-Kelly T y Morales-Ramírez P (2001) Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast *in vivo*. Mutation Research 495 51–59.
- Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M y Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induce cancer. Chem- Bio. Interact.
- Verlangieri A y Bush M (1992) Effects of d- α -tocopherol supplementation on experimentally induced primate atherosclerosis. J Am Coll Nutr ;11:131-138.
- Virtamo J, Pietinen P, Huttunen J, Korhonen P, malila N, Virtanen M, Albanes D, Taylor P, Albert P : ATBC study group (2003) Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a postintervention follow-up. JAMA, 290 (4).

- Vitale A, Bernatene E y Pomilio A (2010) Carotenoides en quimioprevencion:Lycopeno. Acta bioquím. clín. latinoam. 44 (2): 195-238.
- Von Ledebur y Schmid W (1973) The micronucleus test methodological aspects. Mutation Research, 19 (1): 109-117.
- Ward J (1985) Biochemistry of DNA lesions. Radiat Res; 104: S103-11.
- Wardi J, Ram Reifen R, Aeed H, Zadel L, Avni Y y Bruck R (2001) Beta-Carotene Attenuates Experimentally Induced Liver Cirrhosis in Rats. Isr Med Assoc J;3(2):151-4.
- Wattenberg L (1981) Inhibitors of chemical carcinogens. Grune and Stratton, New York, NY; pp.517 -540.
- Xu X, Li H, Li X y Gu J (2004) Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid in aqueous solutions.

10. ANEXOS

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

- i) **Evento:** XIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Zacatecas. Zacatecas, Zacatecas, México. Celebrado del 26 al 27 de mayo de 2011.

Título de la ponencia: Efecto de los fitoquímicos incluidos en la dieta (ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, índole-3-carbinol, antraquinona y capsaicina) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el trióxido de cromo en ratones de la cepa CD-1.

Autores: García-Rodríguez, M. C., Sánchez-Nájera, N., Serrano-Reyes, G. y Altamirano-Lozano, M.

- ii) **Evento:** VI Foro de Investigación Escolar en Biología, FES Zaragoza, UNAM. Iztapalapa, México D.F., Celebrado del 11 al 13 de agosto de 2010.

Título de la ponencia: Evaluación de las frecuencias de micronúcleos en ratones hembras de la cepa CD-1 tratadas con ácido ascórbico, alfa-tocoferol y beta-carotenos.

Autores: Serrano-Reyes, G. y García-Rodríguez, M. C.

- iii) **Evento:** XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Guanajuato, México. Celebrado del 27 al 28 de mayo de 2010.

Título de la ponencia: Efecto de las vitaminas (ácido ascórbico, alfa-tocoferol) y del beta-caroteno (precursor de la vitamina A) sobre el material genético.

Autores: García-Rodríguez, M. C., Serrano-Reyes, G. y Altamirano-Lozano, M.

Los resultados del presente trabajo fueron publicados en la revista electrónica : Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN), Edición Especial N° 9 – 2010.

Título del artículo: Efecto de las vitaminas (ácido ascórbico, alfa-tocoferol) y del beta-caroteno (precursor de la vitamina A) sobre el material genético.

Autores: García-Rodríguez, M.C., Serrano-Reyes, G. y Altamirano-Lozano, M.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Organizan el:

XIII CONGRESO NACIONAL



**DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS**

26-27 de Mayo de 2011
Zacatecas, Zac. México

EFEECTO DE LOS FITOQUÍMICOS INCLUIDOS EN LA DIETA (ÁCIDO ASCÓRBICO, α -TOCOFEROL, β -CAROTENO, ÍNDOLE-3-CARBINOL, ANTRAQUINONA Y CAPSAICINA) SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO Y CITOTÓXICO INDUCIDO POR EL TRIOXIDO DE CROMO EN RATONES DE LA CEPA CD-1

García-Rodríguez, M. C.*, Sánchez-Nájera, N., Serrano-Reyes, G.
y Altamirano-Lozano, M.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Batalla 5 de mayo s/n Esq. Fuerte de Loreto. Col. Ejército de Oriente. C.P. 09230, México D.F. Tel (55)56230772.

* qrmc@puma2.zaragoza.unam.mx

RESUMEN:

Se ha observado que el estilo de vida y la dieta están asociados con la inducción de algunos tipos de cáncer. En contraparte, se ha encontrado que algunos componentes de las frutas y los vegetales al presentar propiedades antioxidantes pueden llegar a proteger del daño al ADN. En el presente estudio se evaluaron los efectos de diferentes fitoquímicos sobre el daño genotóxico inducido por CrO_3 . Grupos de 5 ratones fueron tratados por vía oral con α -tocoferol, β -caroteno o antraquinona (20 y 50 mg/kg) y por vía i.p. con capsaicina, ácido ascórbico e índole-3-cairbinol (2, 20 y 100 mg/kg). Al grupo CrO_3 se le aplicaron 20 mg/kg por vía i.p. Para evaluar la protección de los fitoquímicos, estos se combinaron con el CrO_3 . El daño de ADN fue evaluado mediante el análisis de micronúcleos. Muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 después de la aplicación de los tratamientos. Los resultados obtenidos muestran que la administración de fitoquímicos disminuye el daño al ADN inducido por CrO_3 . Los porcentajes de disminución de daño al ADN fueron del 75% para la antraquinona y el índole-3-cairbinol, del 50% para el ácido ascórbico y α -tocoferol; y del 25% para el β -caroteno y la capsaicina. Proyecto financiado por PAPIIT IN209309.

ABSTRACT:

It has been pointed out that diet and lifestyle are associated with the induction of some types of cancer. However, it was found that some components of fruits and vegetables, that present antioxidant properties might provide protection for DNA damage. In the present study, we evaluated the effects of several phytochemicals over genotoxic damage induced by CrO_3 . Groups of five mice each were treated by orally with α -tocopherol, β -carotene or anthraquinone (20 y 50 mg/kg) and intraperitoneally with capsaicin, ascorbic acid or indole-3-carbinol (2, 20 y 100 mg/kg). CrO_3 group injected 20 mg/kg by intraperitoneal route. To evaluate the protection of phytochemicals, these treatments were combined with CrO_3 . DNA damage was evaluated by the micronucleus technique. Blood samples were obtained from the tail vein at 0, 24, 48 and 72 hours after treatment. The results shown that administration of phytochemicals may decrease DNA damage induced by CrO_3 . The percentages of decrease in DNA damage were 75% for anthraquinone and indole-3-carbinol, 50% for ascorbic acid and α -tocopherol, and 25% for β -carotene and capsaicin. Financial support was obtained from DGAPA-UNAM IN209309.

Palabras clave:

Fitoquímicos, antioxidantes, Cr (VI), micronúcleos.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

División de Ciencias Químico Biológicas

CARRERA DE BIOLOGÍA

VI FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

(VII FORO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA, XXXV FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR,
XXXIX FORO DE SALIDAS TERMINALES)

MEMORIAS

Auditorio de Campus II, Auditorio de la UMIEZ y Sala de Audiovisuales de la Biblioteca Campo II
11, 12 y 13 de agosto de 2010

Objetivos:

- ❖ Promover y difundir los resultados de los proyectos de docencia-investigación que se desarrollan en los Laboratorios de Investigación Formativa y en los Laboratorios Integrales de Biología.
- ❖ Ofrecer un espacio de intercambio académico para la comunidad estudiantil.
- ❖ Contribuir al desarrollo de habilidades que faciliten en el alumno la comunicación de los resultados de su investigación.



VI Foro de Investigación Escolar
Carrera de Biología
Solicitud de registro de trabajo



EVALUACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE MICRONÚCLEOS EN RATONES HEMBRAS DE LA CEPA CD-1 TRATADAS CON ÁCIDO ASCÓRBICO, ALFA-TOCOFEROL Y BETA-CAROTENOS

Gabriela Serrano-Reyes¹ y Ma. del Carmen García-Rodríguez²

Modalidad Ciclo

Por favor marque con una x

<input type="checkbox"/>	Oral	<input type="checkbox"/>	Básico
<input checked="" type="checkbox"/>	Cartel	<input type="checkbox"/>	Intermedio
<input type="checkbox"/>	Video	<input checked="" type="checkbox"/>	Terminal

Resumen:

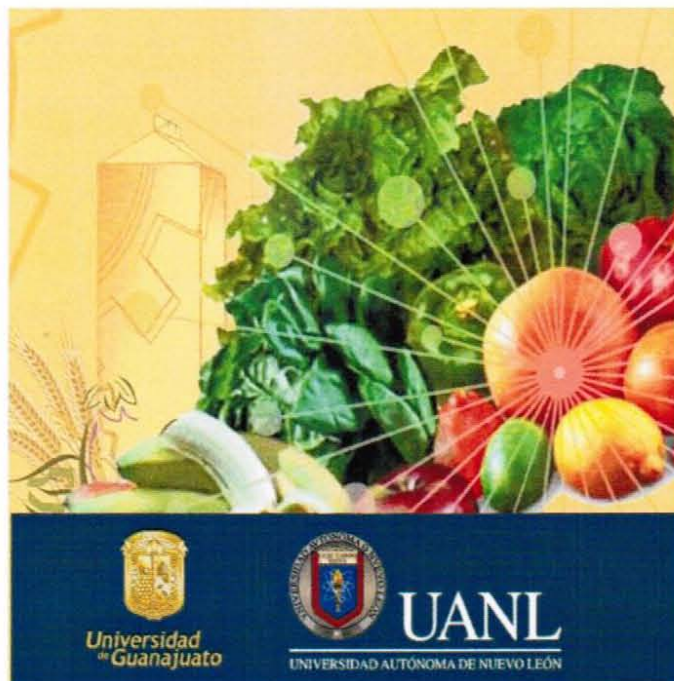
Algunas vitaminas y sus precursores como los β -carotenos, el ácido ascórbico y los tocoferoles presentan propiedades antioxidantes, por lo que recientemente han llamado la atención en estudios relacionados con la modulación y el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con el daño al ADN y el estrés oxidante como el cáncer. Se ha observado que estos compuestos antioxidantes no solo presentan actividad exógena, sino que también pueden estimular los mecanismos endógenos mediante la activación de enzimas. De ahí la importancia de estudiar los efectos sobre el material genético de los constituyentes antioxidantes de la dieta, como lo son el ácido ascórbico, los tocoferoles y los carotenos, para lo cual es conveniente usar un modelo *in vivo* bajo condiciones controladas como los ratones de la cepa CD-1. En el presente estudio se evaluó la frecuencia de micronúcleos (MN) en sangre de ratón empleando la técnica de naranja de acridina. Los ratones fueron divididos y tratados de la siguiente forma: 1) Testigo, solo se le administro el vehículo, 2) Ácido ascórbico (100 mg/kg) administrado por vía i.p., 3) Alfa-tocoferol (20 mg/kg) administrado por vía oral (sonda) usando como vehículo aceite de maíz y 4) Beta-caroteno (50 mg/kg) administrado por vía oral (sonda) usando como vehículo aceite de maíz. Se observó que la administración *in vivo* de ácido ascórbico, alfa-tocoferol y beta-carotenos no induce daño al material genético mediante el incremento en la frecuencia de MN, ni efectos citotóxicos. Particularmente, el ácido ascórbico reduce la frecuencia basal de MN posiblemente por su potencial antioxidante. Este estudio contribuye a la información básica con fines de una posible aplicación (uso como aditivos en los alimentos) de estos componentes de la dieta para proteger de los efectos sobre el material genético inducidos por la exposición a agentes mutágenos y cancerígenos.

Proyecto financiado por PAPIIT IN209309.

Palabras clave: (3-5 palabras)

Ácido ascórbico, alfa-tocoferol, beta-carotenos, micronúcleos, daño ADN

XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos



27 -28 de Mayo de 2010
Guanajuato, Gto. México



EFECTO DE LAS VITAMINAS (ACIDO ASCÓRBICO, ALFA-TOCOFEROL) Y DEL BETA-CAROTENO (PRECURSOR DE LA VITAMINA A) SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO

García-Rodríguez, M. C.^{*}, Serrano-Reyes, G. y Altamirano-Lozano, M.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Batalla 5 de mayo s/n Esq. Fuerte de Loreto. Col. Ejército de Oriente. C.P. 09230, México D.F. Tel (55)56230772.

grmc@puma2.zaragoza.unam.mx*

RESUMEN:

Se ha observado que constituyentes de la dieta humana disminuyen o protegen de la inducción de algunos tipos de cáncer. La mayoría de estos inhibidores se encuentran en las frutas y vegetales verdes, de los que se ha observado actividad de antioxidante. El objetivo de este estudio consistió en evaluar los efectos de ácido ascórbico, el alfa-tocopherol y los beta-carotenos sobre el daño de ADN. Grupos de ratones CD-1 fueron agrupados en: Testigo (solo se le administró el vehículo); Ácido ascórbico, fue tratado con una sola dosis de 150 mg/kg del peso corporal por vía intraperitoneal; Alfa-tocopherol, fue tratado con 216 mg/kg por vía oral (sonda) y Grupo beta-caroteno (15 g/kg) por vía oral (sonda). El daño de ADN fue evaluado mediante el análisis de micronúcleos (MN) empleando la técnica de naranja de acridina. Muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 de después de los tratamientos. Se observó que la administración de los tratamientos empleados en el estudio no incrementa las frecuencias de MN. Al parecer incluso el ácido ascórbico disminuyó la frecuencia basal de MN, indicando una posible protección. Por otro lado, la frecuencia de eritrocitos policromáticos (PCE), no se modificó en ninguno de los tratamientos, lo que sugiere que no se presentaron efectos citotóxicos.

RESUMEN:

Certain naturally occurring food constituents in the human diet exhibit protective effects against a wide range of carcinogens. Most of these inhibitors are found in fruits and green plants that has been reported to be responsible for its antioxidant activity by scavenging of free radicals. The aim of this study was to determine the effects of ascorbic acid, alpha-tocopherol and beta-carotene on DNA damage. Groups of mice CD-1 strain were treated as follows: Control group (administered only vehicle); Ascorbic acid group, which was treated by a single dose of 150 mg/kg of body weight by intraperitoneal vía; Alpha-tocopherol group, which was treated with 216 mg/ kg by gavage and Beta-carotene group (15 g/ kg) by gavage. DNA damage was evaluated by the analysis of micronucleus (MN) using the acridine orange technique. Blood samples were obtained from the tail vein 0, 24, 48 and 72 h after treatment. Results shown that the administration of all treatments effects was not observed on MN number. When ascorbic acid was administered, the number of MN tended to decrease, suggesting that protect the DNA. On the other hand, the frequency of polychromatic erythrocytes (PCE), was not-modifying, suggesting a non-cytotoxic effect. It is necessary to do new experiments using other protocols.

Palabras clave: Ácido ascórbico, alfa-tocopherol, beta-carotenos.

C **XII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**
 27 y 28 de Mayo de 2010; Guanajuato, Gto., México Edición Especial No.9-2010

Prefacio

Es un placer presentar en esta Edición Especial No. 9-2010 de la Revista Salud Pública y Nutrición las Memorias del XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos celebrado el 27 y 28 de Mayo de 2010, en la ciudad de Guanajuato, Gto., (México). Este fue organizado por la Universidad de Guanajuato y la Universidad Autónoma de Nuevo León. En ellas se tratan temas relacionados muy relevantes- con la ciencia de los alimentos; son resultado de la actividad de investigación por destacados científicos. En temas abordan aspectos relacionados con productos cárnicos; cereales, leguminosos y oleaginosos; desarrollo de nuevos productos; evaluación sensorial; frutas y hortalizas, lácteos; microbiología y biotecnología y otros más. Estas contribuciones serán muy relevantes para la comunidad científica, particularmente para los versados en esta materia.

Dr. Pedro César Cantú Martínez
 Editor en Jefe
 Revista Salud Pública y Nutrición

INDICE

ÁREA CÁRNICOS

CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LA CARNE DE BOVINO DURANTE LA MADURACIÓN

García-Barrientos, R., Pérez-Chabela, M. L., Ponce-Alquicira, E. y Guerrero-Legarreta, I.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE SEIS MARCAS COMERCIALES DE SALCHICHA TIPO VIENA

Gamero Barraza M., Velasco González O. H, Carrillo Bocardo M. F., Ibarra Alvarado M.

DESARROLLO DE PARA HAMBURGUESA UTILIZANDO GRANZA DE FRIJOL EXTRUDIDO (*Phaseolus vulgaris*) COMO AGENTE EXTENSOR

Carrillo Bocardo M. F., Velasco-González, O.H., Gamero Barraza, M., Ibarra Alvarado, M

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO ENLATADO EN ACEITE

González-Mena J.N., Reimers-Reyes A.E., Pérez-Bejarano J.A.

TEXTURA DE SALCHICHAS ELABORADAS CON MEZCLAS DE CARNE DE PAVO Y POLLO

Cortés López Mario, Elibeth Valera Quezada, Martín Meza Nieto, Rosa Hayde Alfaro Rodríguez, Norma Güemes Vera, Juan Francisco Hernández Chávez y S. Soto Simental

DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS EN MÚSCULO DE BOVINOS SACRIFICADOS EN RASTROS TIPO INSPECCIÓN FEDERAL (TIF) EN NUEVO LEÓN, MÉXICO, POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Lazcano Villarreal, Wong González A., Roig Sagués, Pérez Fernández, Moreno Degollado, Cantú Martínez, Zarate Ramos, Avalos Ramírez R, Aguirre Ramos A., Dávalos Aranda G.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA HPLC/MS PARA LA DETERMINACIÓN DE CUATRO METABOLITOS DE NITROFURANOS FURALTADONA (AMOZ), FURAZOLIDONA (AOZ), NITROFUZONA (SEM), NITROFURANTOÍNA (AHO), EN CARNE DE BOVINO EN NUEVO LEÓN MÉXICO

Cantú-Martínez M., Avalos-Ramírez, Roig-Sagués, Pérez-Fernández, Morales-Loredo, Silva Páez

ÁREA MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO PILOTO SOBRE LA FRECUENCIA EN CHORIZO DE Staphylococcus aureus EN LA ZONA METROPOLITANA DE GUADALAJARA

Ruiz-Quezada S. L., Orozco Anguiano A. E., Martínez Acosta D. G., López Sandoval M. G., Olea Rodríguez M. A., Flores Calzada S. C., Salazar García P. R.

FILTRACIÓN TANGENCIAL DE SUSPENSIÓN DE ESPORAS

Orozco Alvarez Carlos; García Salas Sergio y Mónica Martínez Zamudio

SECADO SOLAR DE HORTALIZAS. PARTE 3

Orozco Alvarez Carlos; García Salas Sergio y Mónica Martínez Zamudio

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE ETANOL COMO UNICA FUENTE DE CARBONO PARA LA PRODUCCIÓN DE Candida utilis CULTIVADA EN MATRACES AGITADOS

Palmerín Carreño D. M., Pérez Pérez C., Villaseñor Ortega F.

EFFECTO DE LAS VITAMINAS (ACIDO ASCÓRBICO, ALFA-TOCOFEROL) Y DEL BETA-CAROTENO (PRECURSOR DE LA VITAMINA A) SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO

García-Rodríguez M. C., Serrano-Reyes G. y Altamirano-Lozano, M.

ANALISIS COMPARATIVO DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE SALMONELLA SPP AISLADAS DE VEGETALES (Lactuca sativa) CONTRA ANTIBIÓTICOS, BACTERIOCINAS DE BACILLUS THURINGIENSIS Y NISINA

De la Fuente Salcido, N. M., Castañeda-Ramírez, C., Cortes-Rodríguez, V., Espino-Monzón, A. N., Barboza-Corona, J. E.

ESTANDARIZACION DEL MÉTODO FLUOROGÉNICO PARA DETECTAR LA ACTIVIDAD DE BACTERIOCINAS CONTRA Salmonella SPP

De la Fuente-Salcido, N. M., Salcedo-Hernández, R., Castañeda-Ramírez, C., Cortes-Rodríguez, V., Espino-Monzón, A. N., Barboza-Corona, J. E.

PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE PCR EN LA DETECCIÓN DE Escherichia coli SEROTIPO O157:H7 EN MUESTRAS DE HECES Y "MACHITOS" DE CABRITO EN PUNTO DE VENTA DE LA CIUDAD DE MONTERREY, NUEVO LEÓN, Y SU ZONA METROPOLITANA.

Aguirre Ramos A., Hernández Herrero, M., Dávalos Aranda G., Lazcano Villarreal J. L.



EFFECTO DE LAS VITAMINAS (ACIDO ASCÓRBICO, ALFA-TOCOFEROL) Y DEL BETA-CAROTENO (PRECURSOR DE LA VITAMINA A) SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO

García-Rodríguez, M. C.¹, Serrano-Reyes, G. y Altamirano-Lozano, M.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Batalla 5 de mayo s/n Esq. Fuerte de Loreto. Col. Ejército de Oriente. C.P. 09230, México D.F. Tel (55)56230772.

* grmc@puma2.zaragoza.unam.mx

RESUMEN:

Se ha observado que constituyentes de la dieta humana disminuyen o protegen de la inducción de algunos tipos de cáncer. La mayoría de estos inhibidores se encuentran en las frutas y vegetales verdes, de los que se ha observado actividad de antioxidante. El objetivo de este estudio consistió en evaluar los efectos de ácido ascórbico, el alfa-tocoferol y los beta-carotenos sobre el daño de ADN. Grupos de ratones CD-1 fueron agrupados en: Testigo (solo se le administró el vehículo); Ácido ascórbico, fue tratado con una sola dosis de 150 mg/kg del peso corporal por vía intraperitoneal; Alfa-tocoferol, fue tratado con 216 mg/kg por vía oral (sonda) y Grupo beta-caroteno (15 g/kg) por vía oral (sonda). El daño de ADN fue evaluado mediante el análisis de micronúcleos (MN) empleando la técnica de naranja de acridina. Muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 de después de los tratamientos. Se observó que la administración de los tratamientos empleados en el estudio no incrementa las frecuencias de MN. Al parecer incluso el ácido ascórbico disminuyó la frecuencia basal de MN, indicando una posible protección. Por otro lado, la frecuencia de eritrocitos policromáticos (PCE), no se modificó en ninguno de los tratamientos, lo que sugiere que no se presentaron efectos citotóxicos.

RESUMEN:

Certain naturally occurring food constituents in the human diet exhibit protective effects against a wide range of carcinogens. Most of these inhibitors are found in fruits and green plants that has been reported to be responsible for its antioxidant activity by scavenging of free radicals. The aim of this study was to determine the effects of ascorbic acid, alpha-tocopherol and beta-carotene on DNA damage. Groups of mice CD-1 strain were treated as follows: Control group (administrated only vehicle); Ascorbic acid group, which was treated by a single dose of 150 mg/kg of body weight by intraperitoneal via; Alpha-tocopherol group, which was treated with 216 mg/kg by gavage and Beta-carotene group (15 g/kg) by gavage. DNA damage was evaluated by the analysis of micronucleus (MN) using the acridine orange technique. Blood samples were obtained from the tail vein 0, 24, 48 and 72 h after treatment. Results shown that the administration of all treatments effects was not observed on MN number. When ascorbic acid was administrated, the number of MN tended to decrease, suggesting that protect the DNA. On the other hand, the frequency of polychromatic erythrocytes (PCE), was not-modifying, suggesting a non-cytotoxic effect. It is necessary to do new experiments using other protocols.

Palabras clave: Ácido ascórbico, alfa-tocoferol, beta-carotenos.

INTRODUCCIÓN

La exposición de las poblaciones humanas a diferentes agentes xenobióticos ha generado un considerable interés en el uso de suplementos dietéticos,

MB1071



particularmente productos derivados de plantas, debido a que se ha demostrado que existe una relación inversamente proporcional entre el consumo de vegetales y la incidencia de cáncer. Esta búsqueda y el estudio de sustancias con propiedades protectoras ó moduladoras del daño al ADN, surge como una opción complementaria a los estudios de genotoxicidad, ya que al conocer los mecanismos de protección se pueden generar alternativas para contrarrestar los efectos de los agentes inductores de daño genotóxico. La dieta es reconocida como un factor importante en la modulación de distintas enfermedades relacionadas con el daño al ADN. En estudios epidemiológicos y experimentales se ha mostrado que algunas plantas o sus componentes presentan actividad como antimutágenos y tienen efectos protectores en la carcinogénesis humana (Surh y Ferguson, 2003). Dentro de los componentes vegetales con mayor actividad se encuentran algunos pigmentos como la clorofila y sus sales, los flavonoides y los β -carotenos (precursor de vitamina A), así como las vitaminas C (ácido ascórbico) y la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) (Konopacka *et. al.* 1998; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2001). Se ha propuesto como principal mecanismo de protección la actividad antioxidante, la cual comprende no solo la captura de radicales libres y de Especies Reactivas de Oxígeno, sino también la prevención de su formación y la reparación de las lesiones que ocasionan. Los antioxidantes exógenos a su vez también pueden estimular los mecanismos endógenos (activación de enzimas). Se ha descrito que algunas enfermedades degenerativas como el cáncer, están relacionadas el estrés oxidativo, de ahí la importancia de estudiar los efectos antioxidantes y sus efectos en el material genético (inducción de MN) de los constituyentes de la dieta principalmente de frutas y vegetales, como lo son el ácido ascórbico, los tocoferoles y los carotenos, para lo cual es conveniente usar un modelo *in vivo*, bajo condiciones controladas como los ratones de la cepa CD-1,

METODOLOGÍA

Se emplearon ratones de la CD-1 (dos a tres meses de edad), obtenidos del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Se mantuvieron en condiciones estériles, a una temperatura y humedad controladas, con fotoperiodo de 12-12 horas luz-oscuridad y libre acceso al agua. Se conformaron grupos experimentales de 5 ratones, divididos de la siguiente forma: a) testigo, solo se le administro el vehículo y b) experimental, a los que se les administró (ácido ascórbico, alfa-tocoferol o beta-caroteno). El tratamiento de ácido ascórbico (150 mg/kg de peso corporal) se administró por vía i.p., mientras que los tratados con alfa-tocoferol (216 mg/ kg) y beta-caroteno (15 g/ kg) se administraron por vía oral (sonda) utilizando como vehículo aceite de maíz. Todos los tratamientos se dieron en una sola dosis. Para la evaluación del daño al ADN se siguió la técnica de Micronúcleos propuesta por Hayashi *et al.* (1991). Se prepararon laminillas cubiertas con naranja de acridina para colocar las muestras de sangre que se

MB1072



obtuvo de la vena caudal y guardar en caja de plástico en la oscuridad a 4 °C hasta su evaluación. Las evaluaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia. Se cuantificaron los eritrocitos policromáticos con formación de MN (EPC- MN) que hay en 2000 eritrocitos policromáticos (EPC) por ratón, así como la frecuencia de eritrocitos que se encontraron en 1000 eritrocitos totales (EPC + ENC). A los datos se les calculó el valor absoluto de la frecuencia neta de la inducción de MN (NIF). Esta frecuencia parte de la premisa de que la inducción de los MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que, al restarle el número de MN evaluados en la hora 0 a las siguientes horas, se asume que se obtiene la inducción "neta" de MN (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos se puede observar que la administración de los tratamientos de ácido ascórbico, alfa-tocoferol y beta-carotenos no incrementan la frecuencia de MN, con respecto a la hora cero que representa la toma de las muestras antes de administrar los tratamientos, inclusive al parecer el ácido ascórbico reduce la frecuencia basal de MN.

Estos datos pueden estar relacionados con lo observado en estudios en los que la ingestión de diferentes porciones de vegetales y frutas en la dieta, disminuye la formación de aductos en pacientes con cáncer, por lo que existe la posibilidad de que los componentes antioxidantes de este tipo de dieta puedan disminuir e incluso proteger de la inducción de cáncer en el bazo (Peluso *et al.*, 2000). Estos resultados generan grandes expectativas para la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con daño al ADN, como algunos tipos de cáncer, mediante la aplicación de sustancias con propiedades antioxidantes. Sin embargo, pese a que ya se han iniciado estudios sobre los efectos de los componentes de la dieta en pacientes con cáncer con buenos resultados (Sato *et al.*, 1986; Peluso *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2003; Kensler *et al.*, 2004; Gao y Hu, 2005), las perspectivas para la aplicación de estos agentes protectores de daño al ADN aún son limitadas. Si bien se están estudiando los mecanismos de protección que ejercen estos agentes, es necesario conocer los mecanismos de inducción del daño, para identificar el proceso de iniciación, promoción y progresión del cáncer, y saber en que momento y bajo que condiciones debe ser aplicado el tratamiento, y por lo tanto obtener una mayor eficacia. Finalmente, se ha descrito que el efecto citotóxico puede ser determinado por la reducción de la frecuencia de EPC, por lo que se ha sugerido evaluar la relación de EPC con respecto a los ENC (Vallarino-Kelly y Morales-Ramírez, 2001), en nuestro estudio no se observaron efectos al evaluar este parámetro en ninguno de los tratamientos administrados.

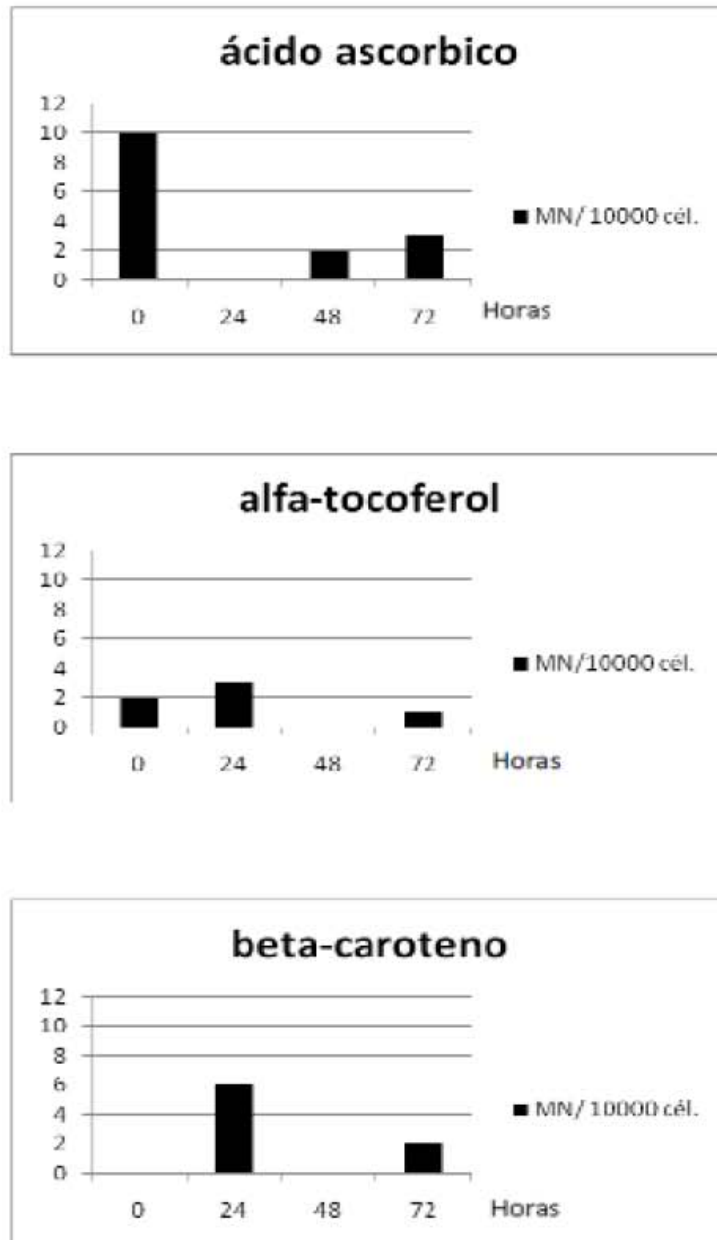


Figura 1. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN calculado para 10 000 EPC. (*: estadísticamente significativo $p < 0.05$).



CONCLUSIONES

La administración *in vivo* de ácido ascórbico, alfa-tocoferol y beta-carotenos no induce daño al material genético mediante el incremento en la frecuencia de MN, ni efectos citotóxicos. Particularmente, el ácido ascórbico reduce la frecuencia de MN y el posible mecanismo de protección podría estar relacionado con su potencial antioxidante. Este estudio contribuye a la información básica con fines de una posible aplicación (uso como aditivos en los alimentos) de estos componentes de la dieta para proteger de los posibles efectos en nuestro material genético.

REFERENCIAS

Díaz GD, Qingjie L, Daswood RH. 2003. Caspase-8 apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. *Cancer Res* 63: 1254-61

Gao F, Hu XF. 2005. Analysis of the therapeutic effect of sodium cooper chlorophyllin tablet in treating 60 cases of leucopenia. *Chin J Integr Med*. 11: 279-82.

García-Rodríguez, M C y Altamirano-Lozano, M. 2001. Sales de sodio y cobre de la clorofila: Usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígeno. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 4, 77-86.

García-Rodríguez, MC, López-Santiago, V y Altamirano-Lozano, M. 2001. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Res*. 496, 145-151.

Hayashi, M, Morita T, Kodama, Y Sofuni, T y Ishidate, M. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res*. 245, 245-249.

Kensler TW, Egner PA, Wang JB, Zhu YR, Zhang BC, Lu PX, *et al*. 2004. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas. *Gastroenterology* 127: S210-8.

Peluso M, Airoldi L, Magagnotti C, Fiorini L, Munnia A, Hautefeuille A, *et al*. 2000. White blood cell DNA adducts and fruit and vegetable consumption in bladder cancer. *Carcinogenesis* 21: 183-7.

Sato M, Fujimoto I, Sakai T, Aimoto T, Kimura R, Murata T. 1986. Effect of sodium cooper chlorophyllin on lipid peroxidation: IX On the antioxidative components in commercial preparations on sodium coopeer chlorophyllin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 34: 2428-34



Surh, Y-J y Ferguson, LR. 2003. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potencial—highlights of a symposium. *Mutation Res.* 523-524, 1-8.

Vallarino-Kelly, T y Morales-Ramírez, P. 2001. Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast in vivo. *Mutation Res.* 495, 51-59.