



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Estudio comparativo de los efectos del índole-3-carbinol, la antraquinona y la capsaicina sobre el daño genotóxico inducido por el trióxido de cromo en ratones macho 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:
N A N C Y S Á N C H E Z N Á J E R A

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



MÉXICO D. F.

NOVIEMBRE DE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

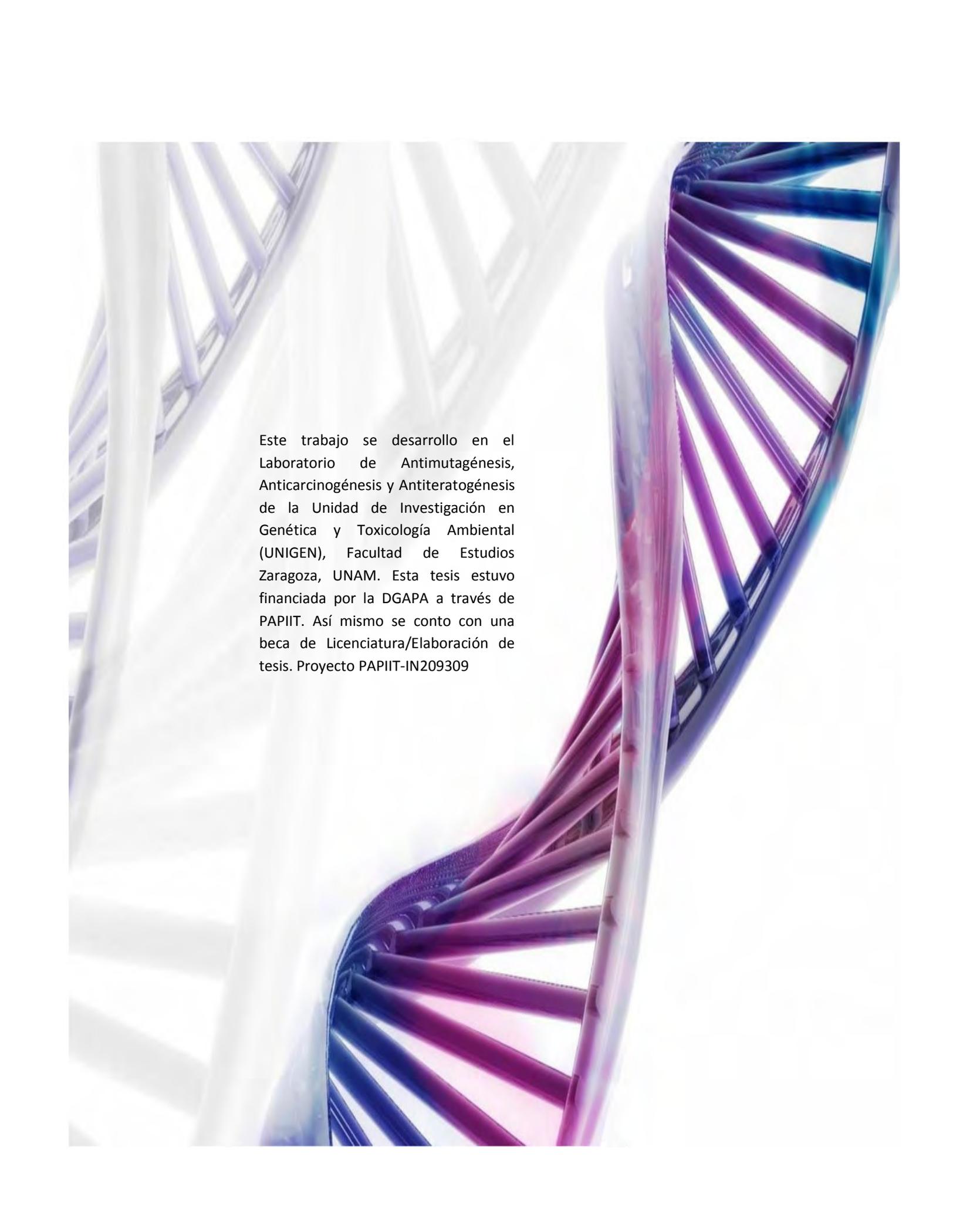


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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 desarrollo en el Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Zaragoza, UNAM. Esta tesis estuvo financiada por la DGAPA a través de PAPIIT. Así mismo se conto con una beca de Licenciatura/Elaboración de tesis. Proyecto PAPIIT-IN209309

¿Quién soy yo?

Soy las manos de mis abuelos.

Soy las lágrimas de mi madre.

La fuerza de mi padre.

Las bromas de mis hermanos.

Soy el amor de quien me ha amado,

y la disciplina de mis maestros.

Soy la inspiración de muchos para seguir adelante

y la gente que aplaudió mis éxitos.

Soy los consejos de muchas personas.

No solo soy yo.

Soy la suma de todos.

El orgulloso resultado de la suma de otros.

Aquellos que han tocado mi vida, de tantas maneras.

Llego el momento.

Es tiempo de dar.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS :

Por haberme dado sabiduría, fortaleza, salud y coraje para hacer este sueño realidad, no dejarme sola en los momentos difíciles, y haberme permitido llegar hasta este momento.

A MI MADRE :

Por tu amor, apoyo, dedicación y empeño. Por ayudarme a ser una mejor persona cada día. Por tanto esfuerzo para que yo alcanzara este triunfo. Porque sin ti, nunca lo hubiera logrado, eres lo mejor que me ha dado la vida...TE AMO MAMÁ!

A MI PADRE :

Por tu amor y paciencia aún en los momentos más difíciles. Por tu apoyo, dedicación y aliento para que siguiera adelante. Porque sin ti, nunca lo hubiera logrado. Gracias por lo vivido y aun más por lo enseñado....TE AMO PAPÁ!

A LA U.N.AM

Nuestra casa de estudios, por haberme abrazado y apoyado generosamente durante mis estudios de Licenciatura a través de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. MÉXICO, PUMAS, UNIVERSIDAD!

A LA DRA. CARMEN GARCÍA

Por haberme dado la oportunidad de pertenecer al proyecto. Porque me brindaste tus conocimientos y nunca escatimaste recursos en mi aprendizaje. Más que nada, gracias por tu confianza, gran amistad y sabiduría, siempre es un gusto escucharte hablar.

A MIS HERMANAS

Nayeli, Nadia, Alejandra y Mónica, por siempre escucharme, alentarme, por compartir conmigo tanto en la vida, ser mis cómplices y aguantar mis pláticas de Bióloga..... LAS AMO TANTO!!

A MIS SOBRINAS

Michel y Valentina, por el amor desinteresado que siempre me brindan, por hacerme la vida tan divertida, por lo que provocan en mí SON LO MÁXIMO!

A TODOS, por el aporte directa o indirectamente para la realización de este trabajo.....Gracias!

DEDICATORIAS

A MI MAMA...gracias por estar siempre y ser mi apoyo incondicional en todo momento.

A MI PAPA...gracias por tu apoyo y enseñarme a nadar contra corriente.

A MIS LOCAS HERMANAS...por compartir conmigo siempre todo, por los momentos vividos, por las risas, por estar siempre en lo mejor de mi vida. Por ser unas guerreras.....las admiro profundamente.

A MIS SOBRINAS...por ser siempre tan divertidas! Siempre están en mi mente y en mi corazón mis pequeñas mujercitas, gracias por quererme tanto y aprender de ustedes lo más importante de la vida.....el amor.

A MIS CUÑADOS...en ustedes encontré el cariño de los hermanos que no tuve, gracias por ser incondicionales siempre, los quiero muchísimo!

A TOODA MI FAMILIA...gracias abuelas, primos y tíos por siempre estar en los momentos más importantes, por todo el amor y apoyo que he recibido a lo largo de mi vida. Son una parte fundamental en este sueño.....**A TODOS LOS AMO!**

A ELY...en ti amiga, a pesar de la distancia y de que somos tan diferentes, encontré a mi primera gran amiga de toda la vida. Gracias por tu apoyo incondicional. **TE AMO IGUANA!**

A GABY Y TONANCY...más que mis compañeras de laboratorio se convirtieron en mis grandes amigas, gracias por escucharme, por lo que vivimos en este camino, por siempre estar a mi lado, las admiro profundamente ...lo logramos amigas...**SOMOS UNAS GUERRERAS!**

A LUIS... por caminar conmigo tanto tiempo, por ser parte de mi vida, porque a pesar de que no lo digas...sé que me quieres, yo también te quiero **MI CHECHE!**

A LOS QUE ME FALTARON.....gracias a todos los que no mencione, les ofrezco una disculpa y sepan que siempre están en mis pensamientos y les agradezco mucho el permitirme ser parte de su vida.

FINALMENTE.....gracias a todos los que confiaron en mí!

Índice de Contenido

Resumen.....	i
Índice de abreviaturas.....	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antimutagénesis.....	2
1.2 Antioxidantes.....	3
1.3 Antraquinona.....	5
1.4 Indole-3-carbinol.....	6
1.5 Capsaicína.....	8
1.6 Estrés oxidante.....	9
1.6.1 Radicales libres	9
1.6.2 Estrés oxidante y daño al ADN.....	10
1.7 Cromo.....	10
1.7.1 Genotoxicidad de los compuestos del cromo.....	11
1.8 Evaluación de daño genotóxico.....	13
1.9 Ensayo de micronúcleos.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	16
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 Objetivo general.....	17
4.2 Objetivos particulares.....	17
5. MATERIAL Y MÉTODO.....	18
5.1 Animales.....	18
5.2 Reactivos.....	18
5.3 Tratamientos.....	18
5.4 Preparación de laminillas con naranja de acridina.....	21

5.5 Obtención de sangre periférica	21
5.6 Evaluación de micronúcleos.....	21
5.7 Análisis estadístico.....	22
6. RESULTADOS.....	23
7. DISCUSIÓN.....	45
8. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES.....	53
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
10. ANEXOS.....	65

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. En el presente estudio se evaluó el efecto de sustancias componentes de la dieta que han sido identificadas como agentes quimiopreventivos tales como; el índole-3-carbinol, la antraquinona y la capsaicina sobre el daño genotóxico inducido por compuestos cancerígenos [Cr (VI)], 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 (agua inyectable y aceite de oliva), b) Grupo cromo (VI), se le administro 20 mg/kg de CrO₃ por vía *i.p.*, c) Grupo fitoquímico, se les administro antraquinona (20 µg/g, con ambos vehículos vía oral), índole-3-cabinol (100 µg/g, con ambos vehículos, vía *i.p.*) o capsaicina (2 µg/g con agua inyectable y 4 µg/g con aceite de oliva, ambos vía *i.p.*) y d) Grupos experimental, al que se les administro el fitoquímico (de acuerdo a la dosis y a la vía) y posteriormente la dosis de 20 µg/g de CrO₃ vía *ip*. 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 los fitoquímicos no incrementan las frecuencias 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 fitoquímicos 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: I3C (vehículo; agua inyectable) > I3C (vehículo; aceite de oliva) > antraquinona (vehículo; aceite de oliva) > antraquinona (vehículo; agua inyectable) > capsaicina (vehículo; aceite de oliva-dosis de 4µg/g) > capsaicina (vehículo; agua inyectable-dosis de 2µg/g). Esto puede estar relacionado con el potencial antioxidante de los tratamientos para neutralizar las ERO's y RL generados por la reducción del Cr (VI) a Cr (III). Se observó que al utilizar el vehículo de aceite de oliva al administrar la antraquinona y la capsaicina mejoro la protección del daño al ADN, por lo que se podría sugerir que es un factor importante en la solubilidad y absorción de éstos fitoquímicos en el organismo. Finalmente, la administración de los tratamientos fitoquímicos y del 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

AC	Aberraciones Cromosómicas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
ATQ	Antraquinona
Cr	Cromo
Cr(VI)	Cromo hexavalente
CrO ₃	Trióxido de cromo
CYP	Citocromo
DIF	Frecuencia Diferencial de Inducción de MN
ENC	Eritrocitos Normocromaticos
EPA	La Agencia de Protección Ambiental
EPC	Eritrocitos Policromaticos
EPCMN	Eritrocitos Policromaticos con Micronúcleo
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
ERO's	Especies Reactivas de Oxígeno
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
GSH	Glutatión
i.p.	Intraperitoneal
I3C	Indole-3-carbinol
IARC	La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
MN	Micronúcleos
MNU	N-metil-N-nitrosourea
NA	Naranja de Acridina
NIF	Frecuencia de la Inducción Neta de MN
RL	Radicales Libres

1. INTRODUCCIÓN

El uso de diversos productos químicos como los pesticidas y algunos fármacos sintéticos, así como las emisiones de automotores e industriales, incrementan la probabilidad de desarrollar enfermedades crónicas degenerativas relacionadas con el daño al ADN (Sen, *et al.*, 2010). En contra parte, en algunos estudios epidemiológicos se ha observado que el consumo de frutas y vegetales está asociado con una disminución de algunos tipos de cáncer (Steinmetz y Potter, 1991; Block, *et al.*, 1992; Steinmetz y Potter 1996). A la inducción de cáncer se le ha asociado con el estilo de vida y la exposición agentes mutágenos o cancerígenos, un tercio de esta incidencia se debe mayoritariamente a factores nutricionales (Fig. 1) (Peto y Doll, 1981).

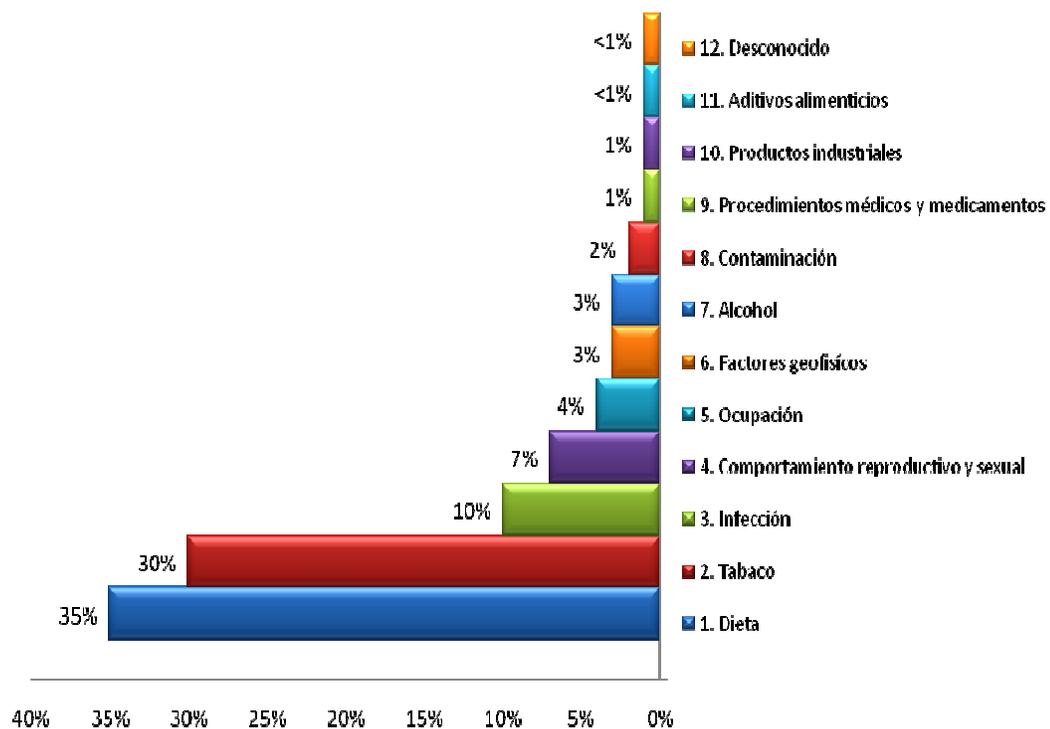


Figura 1. Estimación de diversos factores de riesgo asociados con las muertes por cáncer (Modificado de Lee, *et al.*, 2003).

1.1 Antimutagénesis

El término antimutagénesis se refiere a la reducción de la frecuencia de mutaciones espontáneas o inducidas, de ahí que la acción antimutagénica de un compuesto queda definida como la característica o acción para disminuir o evitar el daño al ADN (Kada, 1984). Por su parte, los anticancerígenos pueden agruparse en dos grandes categorías (Wattenberg, 1985):

1. Agentes de bloqueo, evitan que los agentes mutágenos o carcinógenos reaccionen con los sitios críticos de la célula blanco.
2. Agentes supresores, compuestos que inhiben el crecimiento de células cancerosas.

Existe otro grupo de inhibidores de la mutagénesis que presentan mecanismos diferentes de disminución de daño al ADN, a los cuales se les ha llamado bioantimutágenos ya que actúan como moduladores de la reparación del ADN y la replicación (Kada, 1984). Los efectos protectores de los bioantimutágenos están relacionados con: 1) Aumento en la fidelidad de la replicación del ADN, 2) Estimulación de la reparación de errores en el daño al ADN e 3) Inhibición de la reparación de sistemas inductores de errores (Simic, *et al.*, 1998).

Por otra parte existen antimutágenos que pueden a su vez actuar como desmutágenos, es decir tienen la capacidad de atrapar a los mutágenos en los tejidos o fuera de la célula (molécula interceptora) e inactivar a los mutágenos químicos reduciendo su biodisponibilidad, además de que facilitan la excreción de estos al formar complejos y por lo tanto impide lesiones al ADN (Tachino, *et al.*, 1994; Kuroda, *et al.*, 2001; Dashwood, 2002).

Los antimutágenos pueden actuar por alguno de los siguientes mecanismos (Kuroda y Shankel, 1990):

- a) Inactivación química de los mutágenos.
- b) Inactivación enzimática.
- c) Inhibición de la activación metabólica de promutágenos.
- d) Inactivación de los mutágenos activados (incluidos la recolección de residuos).

Dentro de las sustancias que se han descrito con propiedades antimutágenas se encuentran los antioxidantes, los cuales son de especial interés porque se han asociado con la inhibición de la iniciación, promoción y progresión tumoral. Los mecanismos de los antioxidantes sobre la inhibición de la mutagénesis y de la carcinogénesis están relacionados con la captura de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y radicales libres (RL), los cuales a su vez están vinculados con el daño al ADN (De Flora, 1998). Es por eso que en la actualidad el estudio de los fitoquímicos con propiedades antioxidantes componentes de la dieta (frutas y vegetales) ha llamado la atención (Murcia, 2001).

La búsqueda de inhibidores de la mutagénesis puede ser útil para el descubrimiento de agentes anticancerígenos, ya que los mecanismos de acción inhibitoria de los mutágenos han sido aclarados, su utilidad en la prevención del cáncer es más convincente (Simic, *et al.*, 1998).

1.2 Antioxidantes

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste. Como sustrato oxidable se pueden considerar todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN (Thomas, 1994; Halliwell, 2008). Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los RL y las ERO's que con el resto de las moléculas presentes. La acción antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas funcionalmente vitales (Reitter, 1995). Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadoras, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de éstos últimos. Dentro de los antioxidantes endógenos se encuentran: a) la catalasa, b) la superóxido dismutasa (SOD), c) la glutatión peroxidasa, d) la peroxidasa y e) el glutatión (GSH) (Zorrilla-García, 2002).

Se ha observado que los antioxidantes poseen un papel protector frente a los daños inducidos por los RL, los cuales se han asociado con algunos tipos de cáncer, las alteraciones cardio-circulatorias y neuro-degenerativas, así como la artritis entre otras (Thiidus, 1991). Dentro de los antioxidantes

también se encuentran los exógenos como el ácido ascórbico, el alfa-tocoferol, los beta-carotenos, las catequinas, el resveratrol, los flavonoides y las clorofilinas (Wayner, 1985). De ahí que la ingesta de antioxidantes naturales juega un papel importante en la defensa de los efectos dañinos de los agentes oxidantes. Algunos de los antioxidantes exógenos han sido identificados también como anticancerígenos (Ames, 1983) y se pierden al neutralizar los RL, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingesta de alimentos que los contengan.

Dentro de la dieta existe una amplia variedad de compuestos biológicamente activos con propiedades antimutágenas y anticancerígenas presentes principalmente en las frutas y vegetales, por lo que se le han utilizado en la medicina tradicional desde hace miles de años (Greenwald, 2001; Aggarwal, *et al.*, 2006). Las acciones biológicas de los fitoquímicos se han atribuido principalmente a sus propiedades antioxidantes.

Recientemente, se ha mostrado que los antioxidantes pueden utilizarse como agentes terapéuticos en enfermedades causadas por el estrés oxidante, al observar que los extractos de plantas y sus fitoconstituyentes son capaces de capturar RL e inhibir la peroxidación lipídica (Sen,*et al.*, 2010). De ahí que la quimioprevención se ha planteado como una estrategia en el tratamiento de algunas enfermedades relacionadas con el estrés oxidante, esta consiste en el uso de agentes para inhibir, retardar o revertir los daños inducidos por agentes químicos (Surh, 2003). Dentro de los agentes quimiopreventivos han llamado la atención compuestos como la antraquinona, la capsaicina y el índole-3-carbinol por sus propiedades antioxidantes.

1.3 Antraquinona

La antraquinona pertenece al grupo de los antracenos, su nomenclatura química es 9,10-dioxoantraceno ($C_{14}H_8O_2$). Es una molécula insoluble en agua (hidrofóbica) debido a su estructura y a la presencia de algunos grupos funcionales que pueden estar anclados a ella (fig. 2) (Bonose-Crosnier, *et al.*, 2011).

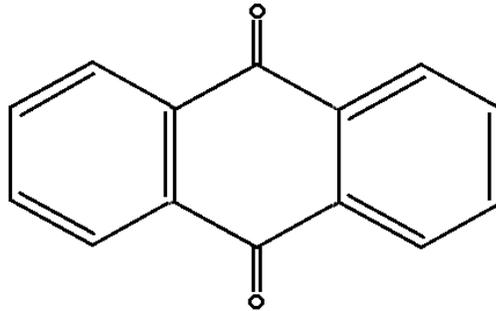


Figura 2. Molécula de antraquinona (Modificado de Bonose-Crosnier, *et al.*, 2011)

Las antraquinonas son un importante grupo de compuestos secundarios encontrados en bacterias, hongos, líquenes y plantas superiores las cuales la ocupan como base de pigmentos, principalmente se encuentran en las familias de plantas, que incluye las *Rubiaceae*, *Rhamnaceae*, *Poligonaceae* y *Leguminosae* (Borroto, 2005). Dentro de los efectos biológicos a los que se ha asociado se encuentra la actividad antimicrobiana (Brown, *et al.*, 1980), el efecto inmunosupresivo (Huang, *et al.*, 1992), y la actividad vaso-relajante (Huang, *et al.*, 1991). Entre las quinonas de interés biológico, se encuentran algunas antraquinonas y naftoquinonas por sus propiedades terapéuticas relacionadas con actividades antiinflamatorias y/o anticancerígenas. Algunas antraciclina y la mitomicina se les ha dado utilidad clínica con gran éxito en el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Las quinonas pueden tener un origen natural o sintético (Powis, *et al.*, 1989; Bonose-Crosnier, *et al.*, 2011)

A las antraquinonas se les ha relacionado como agentes de bloqueo, y con la reducción de la mutagenicidad mediante la inhibición de aductos de ADN a través de la interacción microsomal, activando enzimas que inhiben metabolitos activos e interactuando directamente con el metabolito, para inhibir la acción con el ADN (Jyu, *et al.*, 1995).

1.4 Indole-3-carbinol

El índole-3-carbinol (I3C) es un glucosinolato también llamado índole-3-glucosinolato (C_9H_9NO), es un derivado de la hidrólisis glucobrasicina. Los glucosinolatos se disocian por la hidrólisis catalizada por mirosinasa en un medio ácido. La mirosinasa es una enzima que se libera cuando se dañan las células vegetales (como cuando se cortan o mastican) formando el I3C que genera los metabolitos diindolimetano y indoilcarbazol. La nomenclatura química es 3-indolmetano y su estructura se muestra en la figura 3 (Grose, *et al.*, 1992; Dorette, *et al.*, 1997)

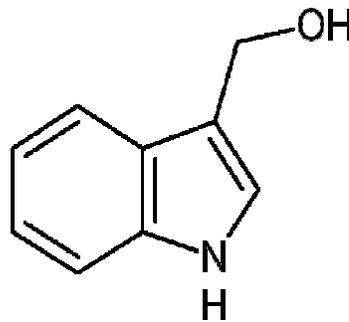


Figura 3. Molécula de índole-3-carbinol (Modificado de Ferguson, 1994)

Los glucosinolatos se encuentran principalmente en los vegetales crucíferos como el brócoli, la col, la col de Bruselas, la coliflor, la col rizada y los nabos entre otros (Oganessian, *et al.*, 1997). El I3C se ha asociado con efectos anti-aterogénicos, antioxidantes y anticancerígenos (Grose, *et al.*, 1992; Li, *et al.*, 2003). Una actividad inhibitoria posible del índole contra tumorigénesis se relaciona principalmente con la inhibición de la activación de promutágenos/procarcinógenos, la inducción de mecanismos de desintoxicación y la estimulación de la activación coordinada con la desintoxicación y el bloqueo de metabolitos reactivos (Bronzetti, *et al.*, 1993) que están implicados sobre las actividades de las enzimas de fase 1 y 2 de la biotransformación (Boone, 1990). También se ha observado que el I3C puede presentar efectos sobre algunos genes relacionados con el cáncer, mediante la activación o supresión de genes. Cabe señalar que en los diferentes estudios en los cuales se ha administrado el I3C no se han observado efectos tóxicos significativos, por lo que podría ser un buen agente quimiopreventivo (Ferguson, 1994; Li, *et al.*, 2003).

1.5 Capsaicina

La capsaicina pertenece al grupo de los capsaicinoides o fenilpropanoides que presenta el efecto pungente en los pimientos del género *Capsicum*. La nomenclatura química de la capsaicina es trans-8-metil-N-vanillil-6-nonenamide ($C_{18}H_{27}NO_3$) y su estructura se muestra en la figura 4 (Su, *et al.*, 2001; Morán-Bañuelos, 2008).

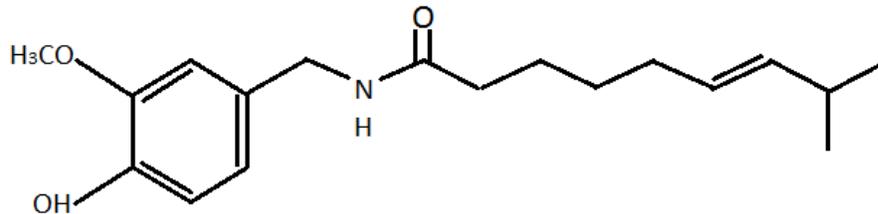


Figura 4. Molécula de capsaicina (Modificado de Aggarwal, 2006)

La capsaicina es un compuesto fenólico que tiene una amplia gama de propiedades farmacológicas debido a su actividad analgésica y antiinflamatoria. En la práctica clínica actualmente se le emplea para aliviar malestares relacionados con la artritis reumatoide, la osteoartritis y la neuropatía diabética (Su, *et al.*, 2001). A la capsaicina se le han atribuido propiedades antioxidantes e incluso anticancerígenas, ya que se ha observado que es capaz de inhibir el crecimiento de células cancerosas de mama, colon, gástricas y de próstata mediante la inducción de la apoptosis (Djamgoz e Isbilen, 2006; Oyagbemi, *et al.*, 2010). Al respecto se ha descrito como uno de los mecanismos de protección de la capsaicina la inhibición de la unión covalente de los Benzopirenos por ejemplo al ADN, en estudios realizados en queratinocitos de humanos y de ratón (Modly, *et al.*, 1986). También se ha observado que la administración a corto plazo de capsaicina inhibe de forma significativa las aberraciones cromosómicas (AC) y rompimientos de la cadena de ADN inducidas por la administración vía *i.p.* de ciclofosfamida, con lo que se demuestra el potencial terapéutico que presenta la capsaicina contra agentes químicos mutágenos que inducen clastogenicidad (Krishna, *et al.*, 1995).

1.6 Estrés oxidante

Se ha observado que los RL pueden presentar efectos perjudiciales o benéficos en los organismos. En bajas o moderadas concentraciones los RL están implicados en las funciones fisiológicas normales, pero en altas o excesivas concentraciones conducen a estrés oxidante, este es un proceso perjudicial que puede ser el mediador del daño de las estructuras celulares, incluyendo lípidos, proteínas, el ARN y el ADN que conduce a diversas enfermedades (Sen, *et al.*, 2010). Los RL están implicados como promotores endógenos de los procesos degenerativos, tales como daños en el ADN que pueden estar relacionados con la inducción de algunos tipos de cáncer, enfermedades cardio-vasculares, neurodegenerativas y envejecimiento (Ames, 1983).

1.6.1 Radicales libres

La oxidación es la transferencia de electrones y está implicada en los procesos aeróbicos del metabolismo celular. El oxígeno es el último aceptador de electrones en el sistema de flujo de energía (ATP). Sin embargo, cuando el flujo de electrones es incompleto (transferencia de un electrón no apareado) se generan radicales libres (RL), los cuales son altamente reactivos, por lo que pueden reaccionar con otras moléculas generando nuevos RL, produciendo superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxígeno singlete (1O_2), hidroxil ($\cdot OH$). En el estrés oxidante también están implicadas la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's), tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) como el óxido nítrico ($NO\cdot$) y el dióxido nítrico ($NO_2\cdot$) (Halliwell, *et al.*, 1995). A pesar de todos estos hallazgos aún se desconoce el significado fisiológico preciso de la inducción de las ERO's y su intervención en los sistemas que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, lo que llevaría a comprender mejor las causas de diversas enfermedades (Konigsberg, 2008).

1.6.2 Estrés oxidante y daño al ADN

El mecanismo por el cual las reacciones de oxidación que suceden dentro de las células, como resultado del metabolismo aeróbico, ha sido objeto de muchos estudios, por lo que una gran parte de las reacciones se han podido esclarecer. Se ha observado que tanto las ERO's y las ERN pueden modificar al ADN y tener consecuencias biológicas como las mutaciones y

transformaciones celulares (carcinogénesis), envejecimiento celular e incluso puede llevar a la muerte celular. Las especies reactivas (de oxígeno o nitrógeno) pueden al interactuar directamente con el ADN, afectar la transducción de señales y la comunicación intracelular, así como la proliferación celular (Konigsberg, 2008; Hernández-García, *et al.*, 2010). Se ha propuesto que la posible asociación de la generación de RL con la carcinogénesis se deba a la hidroxilación de bases nitrogenadas, a la escisión de hebras de ADN y a la formación de entrecruzamientos entre otros efectos (Maxwell, *et al.*, 1997).

1.7 Cromo

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).

1.7.1 Genotoxicidad de los compuestos del cromo

Se ha observado que los compuestos de cromo 6⁺ (Cr VI) son potencialmente tóxicos y cancerígenos, ya que se pueden reducir intracelularmente de Cr (VI) hasta Cr (III) generando estrés oxidante que induce daño al ADN. La actividad biológica del Cr (VI) se debe a los mecanismos bioquímicos en los que están involucrados el ciclo redox mediante la producción de ERO's. El Cr (VI) pasa fácilmente la membrana celular por los canales de proteínas, en donde, algunos componentes pueden ser reducidos intracelularmente por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), la glutatión reductasa, los carbohidratos, el ácido ascórbico, el citocromo P-450 y el aldehído oxidasa entre otros. El Cr (VI) al ser reducido produce reactivos intermedios como el Cr (V), Cr (IV) y finalmente Cr (III) (O'Brien, *et al.*, 2003), como lo muestra la figura 5.

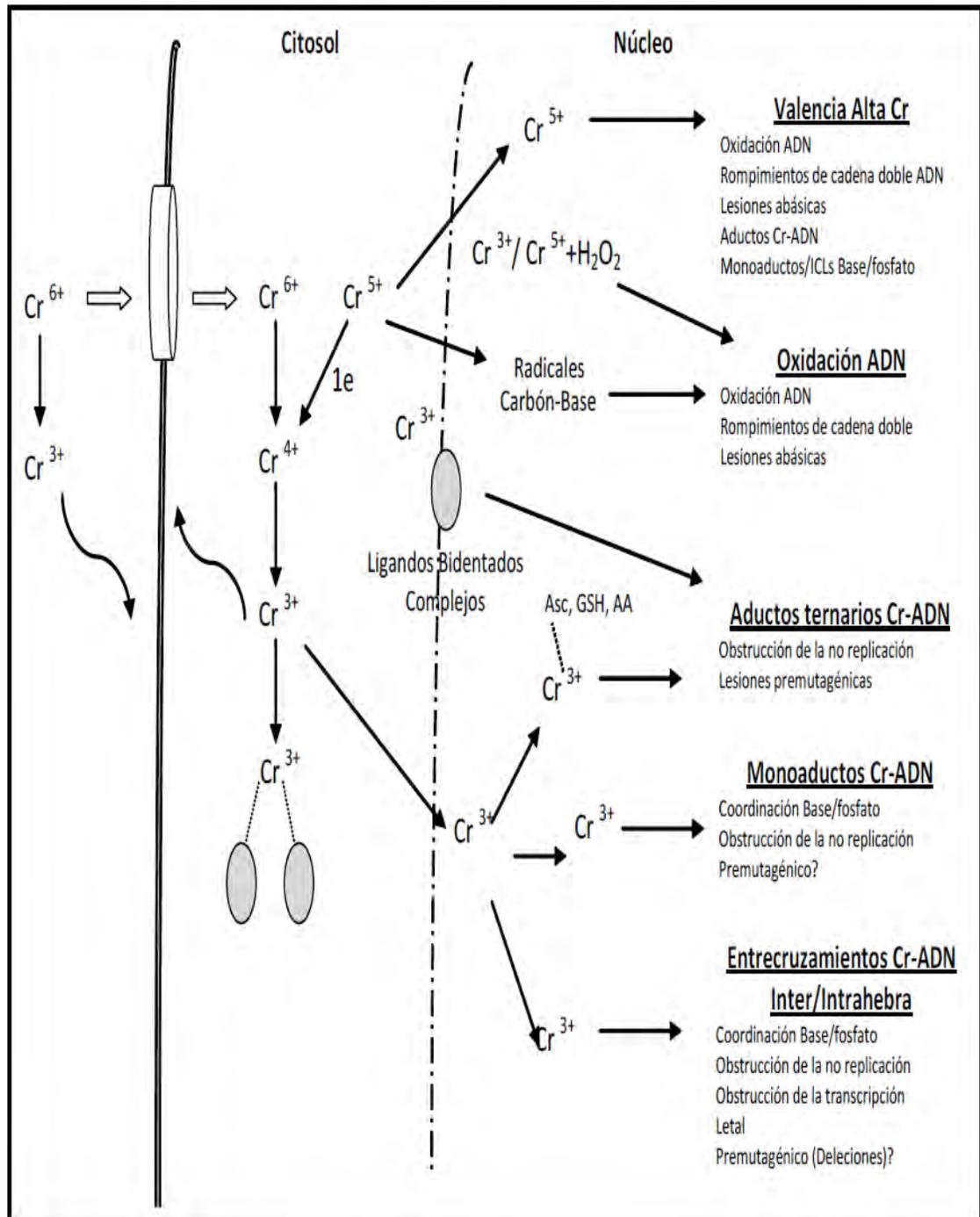


Figura 5. Principales rutas involucradas en las lesiones de ADN causadas por compuestos de Cr (VI) y sus subproductos (Tomada de Pereyra 2010 y Modificado de O'Brien, *et al.*, 2003.)

Por su parte, el Cr (V), Cr (IV) y Cr (III) también pueden interactuar directamente con el ADN formando: a) Aduetos de Cr-ADN, b) Entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas, c) Rompimientos del ADN y d) Daño en las bases del ADN; lo que podría estar relacionado con la

carcinogénesis causada por los compuestos de Cr (VI) (Zhitkovich, 2005; Valko, 2006; Salnikow, *et al.*, 2008). A pesar de Cr (III) no es considerado un carcinógeno humano al no atravesar la membrana celular, si interviene en la carcinogénesis provocada por Cr (VI), ya que se forma intracelularmente a partir del Cr (VI) e interaccionando directamente con el ADN (Snow, 1991). Se ha observado que los trabajadores en las ramas industriales como el manejo de acero, curtidurías y cromado, es decir que emplean compuestos de Cr (VI) presentan una mayor inducción de cáncer en las vías respiratorias y hepatocarcinomas, por lo que se le ha reconocido como un peligro para la salud (Henkler, *et al.*, 2010). De ahí que, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) en 1972, clasifico a los compuestos de cromo (VI) como carcinógenos humanos, ubicándolo en el grupo I, ya que afectan principalmente a las poblaciones humanas ocupacionalmente expuestas.

1.8 Evaluación de daño genotóxico

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

1.8.1 Ensayo de micronúcleos

Dentro de los ensayos para evaluar el daño al ADN la técnica de MN ha sido recomendada por diversas agencias reguladoras tales como La Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés), la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) y la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) (Mavournin *et al.*, 1990; Müller *et al.*, 1999). La técnica de MN fue desarrollada por Boller y Schmid en 1970. Detecta daño citogenético asociado con la frecuencia de AC, ya que evalúa el daño en cromosomas enteros o en fragmentos, además de que puede ser auxiliar en la evaluación del daño citotóxico.

Los MN son pequeños cuerpos de cromatina que se originan de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que no se incorporan dentro del núcleo después de la mitosis,

identificándose en el citoplasma como pequeños núcleos adicionales (Ledebur y Schmid, 1973; Hayashi *et al.*, 2000). Los MN se originan en alguno de los siguientes eventos: AC que conllevan a la formación de fragmentos acéntricos (daño clastógeno) o daño a nivel de proteínas involucradas directa o indirectamente en la segregación de cromosomas, esto incluye inhibición en el ensamble o desensamble de microtúbulos, remoción de cinetocoros, daños al centríolo, centrómero inactivado (daño aneuploidógeno) (Figura 6) (Fenech y Crott, 2002; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

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

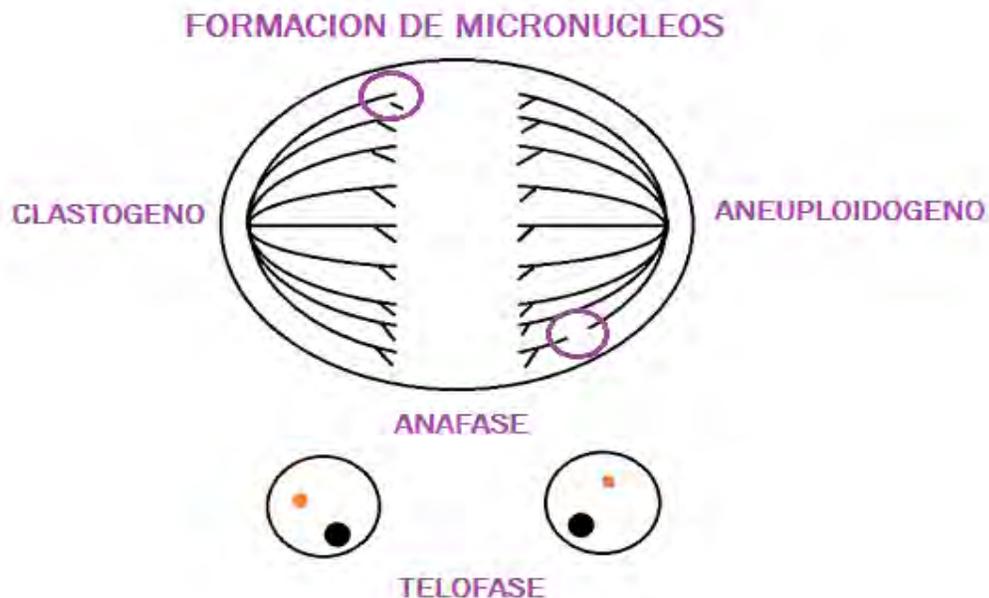


Figura 6. Procesos de formación de micronúcleos. Clastógeno, por ruptura cromosómica. Aneuploidógeno, por falla en el huso mitótico.

2. JUSTIFICACION

Hoy en día las poblaciones humanas se encuentran expuestas a diversos agentes que pueden aumentar el riesgo de padecer algún tipo de enfermedad asociada con el daño al ADN, como lo son algunos tipos de cáncer, en contra parte se ha descrito en estudios epidemiológicos que el consumo de frutas y verduras es benéfico para la salud, ya que contienen sustancias que de alguna manera controlan o protegen a los organismos de los efectos de algunos agentes inductores de cáncer. Por lo que actualmente se considera que los productos derivados de las plantas (fitoquímicos) causan un efecto benéfico para la salud y son importantes para mantener un equilibrio antioxidante. La mayoría de los agentes quimiopreventivos han sido relacionados a la protección del cáncer, tal es el caso los componentes obtenidos de los crucíferos (Índole-3-carbinol), las leguminosas (antraquinona) y las especies de chile del género *Capsicum* (capsaicina). Al ser estos vegetales parte de la dieta de la población mexicana, resultan de interés para su estudio con fines de una futura aplicación en la quimiopreención como terapia alternativa contra el cáncer. Por lo cual, en ésta investigación se evaluarán los efectos de fitoquímicos con potencial quimiopreventivo o quimioprotector de los componentes de la dieta como lo son el Índole-3-carbinol, la antraquinona y la capsaicina sobre las frecuencias de micronúcleos (MN) inducidas por trióxido de cromo (CrO_3) en eritrocitos policromáticos (EPC) en sangre periférica de ratones macho de la cepa CD-1.

3. HIPÓTESIS

Si en diversos estudios se han descrito que algunos compuestos de cromo (VI) inducen efectos mutágenos, citotóxicos, genotóxicos y cancerígenos; al atravesar la membrana celular y producir estrés oxidante por la reducción a cromo (III). La generación ERO's y RL como producto del estrés oxidante, provocando daño al ADN, ya que pueden inducir rompimientos, entrecruzamientos y formación de aductos en la cadena de ADN, induciendo la formación de micronúcleos. En contra parte, se ha mostrado que los compuestos fitoquímicos pueden actuar como antioxidantes y proteger del estrés oxidante que daña al ADN, entonces se espera que al administrar fitoquímicos antioxidantes tales como la Antraquinona, Capsaicina e Índole-3-carbinol previamente a la administración de Cr (VI) [CrO_3] se disminuya la inducción del daño genotóxico, mediante el decremento de las frecuencias de MN.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar y comparar los efectos del índole-3-carbinol, la antraquinona y la capsaicina sobre el daño genotóxico inducido por el trióxido de cromo en ratones macho de la cepa CD-1

4.2 Particulares

- Encontrar la dosis no genotóxica de los fitoquímicos capsaicina, antraquinona e índole-3-carbinol mediante la evaluación de la cinética de inducción de MN en muestras de sangre periférica obtenidas a las 24, 48 y 72 horas de ratones macho de la cepa CD-1.
- Evaluar los efectos de la capsaicina, la antraquinona y el índole-3-carbinol sobre el daño genotóxico inducido por CrO_3 , mediante las evaluaciones de las frecuencias de micronúcleos en sangre periférica de ratones macho de la cepa CD-1.
- Evaluar los efectos de la capsaicina, la antraquinona y el índole-3-carbinol sobre el daño citotóxico inducido por CrO_3 , mediante las evaluaciones de las frecuencias de EPC en sangre periférica de ratones macho de la cepa CD-1.
- Comparar los efectos de la capsaicina, la antraquinona y el índole-3-carbinol sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por CrO_3 , mediante las evaluaciones de las frecuencias de micronúcleos en sangre periférica de ratones macho de la cepa CD-1.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Animales

Se utilizaron ratones machos jóvenes, de la cepa CD-1, de 7 u 8 semanas de edad y de un peso de 25 a 35 g. Para lo cual se desarrollo un pie de cría en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, con ratones que se obtuvieron del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y periodos de luz-oscuridad (12-12 h) y se alimentaron con nutricubos (Purina) con libre acceso al agua y alimento.

5.2 Reactivos

Los reactivos que se emplearon en el estudio se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA) y Química Meyer: trióxido de cromo, CrO_3 (CAS No. 1333-82-0); índole-3-carbinol (I-3-C), $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}$ (CAS No. 700-06-1); antraquinona, $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_2$ (CAS No. 84-65-1); capsaicina, $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ (CAS No. 404-86-4); Naranja de acridina, $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Cl}$ (CAT No. 1775-25).

5.3 Tratamientos

Los fitoquímicos y el CrO_3 fueron preparados mediante su disolución en agua inyectable estéril, una vez preparados fueron administrados inmediatamente de acuerdo a la dosis y vía basados en estudios previos y la LD_{50} (Krishna, *et al.*, 1995; Marczylo, *et al.* 2003; Bailey, *et al.*, 2005), en un volumen de alrededor de 0.25 ml por ratón. Se utilizó tanto el agua como aceite de oliva como vehículo, dado que los fitoquímicos empleados presentan dificultad para disolverse (figura 7).

Se emplearon grupos de cinco ratones macho, de acuerdo a los lineamientos para pruebas de Genotoxicidad de la FDA, EPA y IARC. Para todos los protocolos, los grupos se dividio de la siguiente forma:

- a) Grupo testigo, se les administro solamente el vehículo.
- b) Grupo fitoquímico, se les administro antraquinona (20 $\mu\text{g}/\text{g}$, con ambos vehículos vía *oral*), índole-3-cabinol (100 $\mu\text{g}/\text{g}$, con ambos vehículos, vía *intra peritoneal [i.p.]*) o capsaicina (2 y 4 $\mu\text{g}/\text{g}$ con agua y aceite de oliva respectivamente vía *i.p.*).
- c) Grupo cromo (VI), al que se les administro 20 $\mu\text{g}/\text{g}$ de CrO_3 vía *i.p.*
- d) Grupo experimental (CrO_3 -Antraquinona, CrO_3 -Capsaicina, CrO_3 -Índole-3-carbinol), al que se les administro el fitoquímico (de acuerdo a la dosis y a la vía) y posteriormente la dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{g}$ de CrO_3 vía *i.p.*

**GRUPO
TESTIGO**



Administración de 0.25 ml de
vehículo de acuerdo a la vía de
administración

**GRUPO
FITOQUIMICO**



Administración tratamientos con
fitoquímicos. De acuerdo a las
dosis y vías antes mencionadas

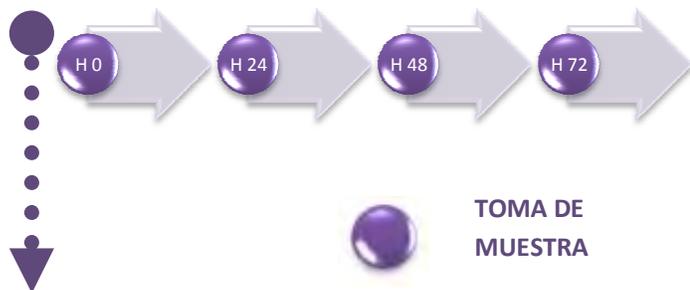
**GRUPO
CROMO (VI)**



Administración
de CrO_3 vía *ip*

Administración
de CrO_3 vía *i.p.*

**GRUPO
EXPERIMENTAL**



4 horas antes.
Administración tratamientos
con fitoquímicos previo a la
administración con CrO_3 .

Figura 7. Protocolos de administración.

5.4 Preparación de laminillas con naranja de acridina

La naranja de acridina se disolvió en agua destilada una concentración de 1 mg/ml. Se tomaron 10 µl de esta solución y se colocaron sobre las laminillas precalentadas (con una placa de calentamiento) a 70 °C aproximadamente, con ayuda de otro porta objetos se extendió el colorante. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente en oscuridad, así se almacenaron hasta su uso (Hayashi, *et al.*, 1990).

5.5 Obtención de sangre periférica

La evaluación de la frecuencia EPC y de MN se llevo a cabo obteniendo sangre periférica de la vena caudal de los ratones, a partir del día en que fueron administrados los tratamientos. Las muestras se colocaron directamente en las laminillas previamente tratadas con naranja de acridina, y se les colocó un cubreobjetos y posteriormente se sellaron de las orillas. Las laminillas preparadas se guardaron en cajas de plástico a 4 °C durante 12 h. El análisis de las laminillas se hizo lo más pronto posible, procurando no analizar laminillas que tuvieran un periodo de tiempo mayor a 5 días, ya que el material podía empezar a degradarse. Se prepararon 2 laminillas por muestra (Fig. 8).

5.6 Evaluación de micronúcleos

Con ayuda de un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2) con filtros DIA-ILL y TRIPLE D-F-T y un objetivo de 100X se contabilizaron 1000 eritrocitos normocromáticos (ENC). Para evaluar el daño citotóxico, se contabilizaron 1000 eritrocitos con los que se obtuvo la frecuencia de los EPC respecto a los ENC. Al haber contabilizado 2000 EPC se distinguió la presencia de micronúcleos (EPCMN) o ausencia de éstos. Se tomo como referencia la coloración de las células para su identificación: las células en color oscuro son ENC, las de color rojizo son EPC y las células de color rojizo con un punto en el centro color amarillo es un EPC micronucleado (EPCMN).

5.7 Análisis estadístico

Los valores obtenidos por la frecuencia de la Inducción de MN y la frecuencia de los EPC respecto a los ENC se presentan en forma de media \pm desviación estándar. A estos datos se les comparo mediante un análisis de varianza seguida de una prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico de SPSS versión 16. Para los casos de NIF y DIF se les aplico una prueba de de Chi cuadrada (χ^2) para determinar la significancia de las frecuencias con el paquete estadístico STATISTICA versión 7. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$ para todos los casos (Adler, *et al.*, 1998).



Figura 8. Administración de tratamientos, toma de muestras y evaluación de laminillas.

6. RESULTADOS

Efecto del I3C sobre daño genotóxico del CrO₃

En el cuadro 1 se muestran los promedios de las frecuencias de MN \pm la desviación estándar (d.e.) de las muestras de sangre periférica tomadas a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la administración de los tratamientos. Se puede observar que la administración sola por vía *i.p.* de 100 $\mu\text{g/g}$ del I3C no incrementó de forma estadísticamente significativa las frecuencias de MN al compararse con el grupo testigo y contra su propia hora 0 (es decir antes de la administración del tratamiento). Cuando se administraron por vía *i.p.* 20 $\mu\text{g/g}$ de CrO₃ se incrementaron los promedios de las frecuencias de MN de forma estadísticamente significativa desde la hora 24 (alrededor de 2 MN) hasta la hora 72 (alrededor 5 MN) siendo mayor el incremento a la hora 48 (alrededor de 6 MN). Mientras que, al administrar la misma dosis del I3C previa a la aplicación del CrO₃ se observa una disminución de las frecuencias de MN al comparar con el grupo tratado solo con el CrO₃, mismas que ya no resultaron estadísticamente significativas al comparar con el grupo testigo y contra su hora 0.

Dado que las frecuencias de MN cuando aún no se habían administrado los tratamientos (hora 0) fueron diferentes en todos los grupos estudiados, se calculó la Frecuencia de la Inducción Neta de MN (NIF, por sus siglas en inglés) con la finalidad de contabilizar solo los MN que se indujeron una vez administrados los tratamientos, ya que este parámetro consiste en restar el valor observado a la hora 0 a las siguientes evaluaciones:

$$NIF = MN_a x_i - MN_a x_0$$

Donde:

a= grupo

x_i = tiempo de evaluación (24, 48 ó 72 h)

x_0 = tiempo 0

Cuadro 1. Promedios de la frecuencia de la inducción de MN en el tratamiento de Índole-3-carbinol con vehículo de agua inyectable.

Tratamiento	Dosis (µg/g)	n	Hora	MN/2000 cel. ($\bar{x} \pm s$)
Testigo	0	5	0	2.4±1.1
			24	1.0±0.7
			48	1.0±1.2
			72	1.4±0.8
Índole-3-carbinol	100	5	0	0.8±0.8
			24	1.4±0.8
			48	1.4±1.1
			72	1.8±1.9
CrO ₃	20	5	0	1.2±1.6
			24	3.6±2.3 ^{a, b}
			48	7.4±1.6 ^{a, b}
			72	6.0±1.2 ^{a, b}
Índole-3-carbinol/CrO ₃	100-20	5	0	1.0±1.0
			24	2.4±0.5
			48	1.8±1.78
			72	1.0±1.0

^a p<0.05 vs testigo h 0; ^b p<0.05 vs CrO₃ h 0

En la figura 9 se muestra el NIF de MN para los diferentes tratamientos administrados en el estudio, en donde se puede observar más claramente la reducción de las frecuencias de MN (48%, 87% y 100% a las 24, 48 y 72 horas respectivamente) al comparar con el grupo tratado con CrO₃, lo que corrobora la protección del daño al ADN del I3C. Sin embargo, cabe señalar que al analizar con este parámetro las frecuencias de MN estas resultaron estadísticamente significativas a las 24 y 48 horas al compararlos con el grupo testigo, por lo que si bien hay una protección del daño al ADN, esta solo fue parcial.

De igual manera, se calculó la Frecuencia Diferencial de Inducción de MN (DIF, por sus siglas en inglés) la cual consistió en restar las frecuencias de MN observadas en cada hora de evaluación del grupo testigo a las respectivas frecuencias de MN de los grupos tratados de la siguiente forma (García, 2006):

$$DIF = MN_a x_i - MN_t x_i$$

Dónde:

a= grupo

t= grupo testigo

x_i= tiempo de evaluación (24,48 o 72 hrs.)

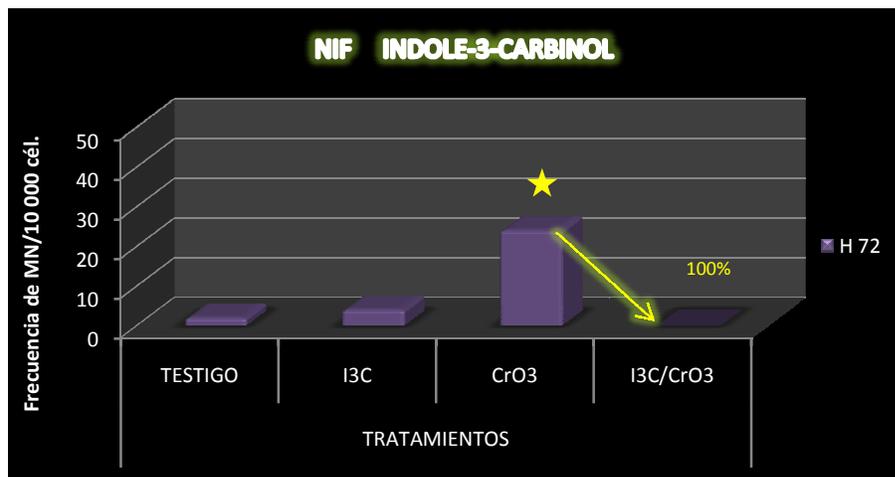
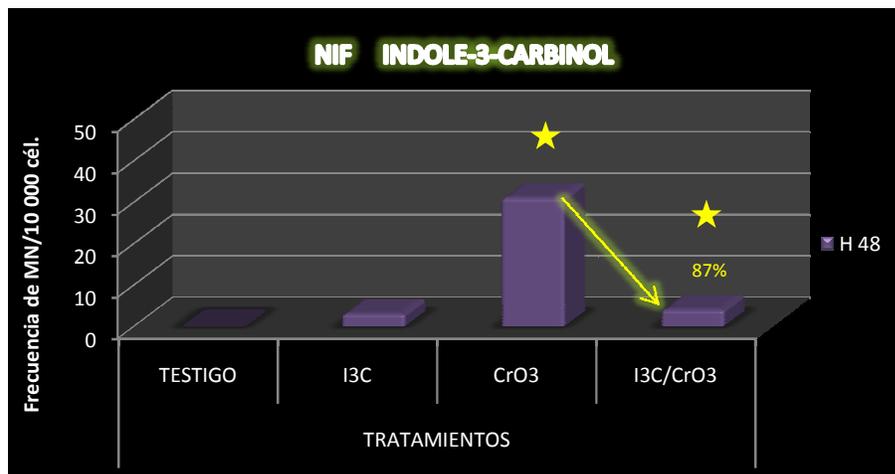
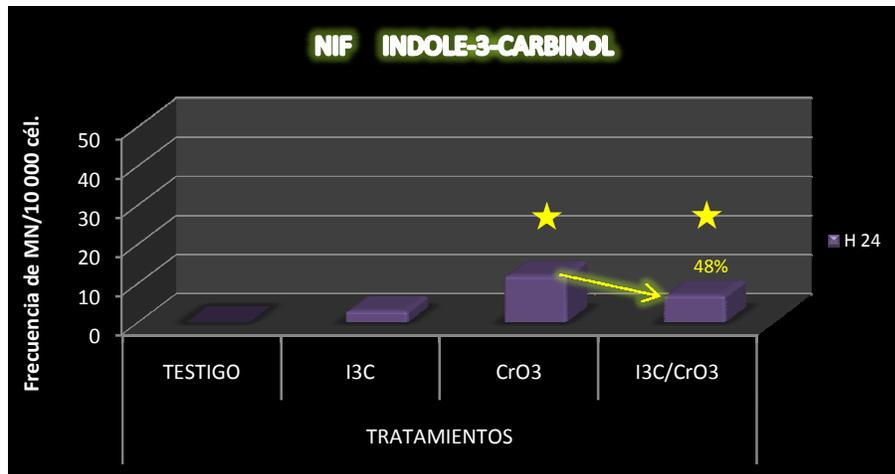


Fig. 9. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administro una dosis de 100 $\mu\text{g/g}$ vía *i.p.* de índole-3-carbinol con vehículo de agua inyectable. (★ . Estadísticamente significativos $p < 0.05$)

Como se muestra en la figura 10 al igual que para el cálculo del NIF, se observa un comportamiento similar entre los grupos tratados con I3C (línea azul) e I3C-CrO₃ (línea verde), lo cual corrobora que el tratamiento con I3C protege del daño inducido por el CrO₃. Al realizar este análisis solo resultó estadísticamente significativo el tratamiento con el CrO₃.

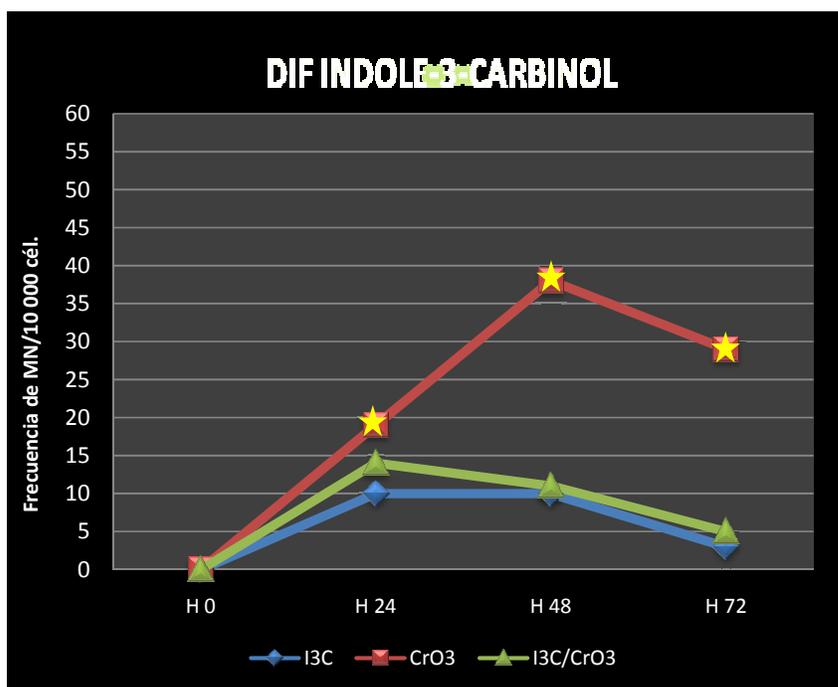


Fig. 10. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administro una dosis vía *i.p.* de 100 µg/g de índole-3-carbinol con vehículo de agua inyectable. (★ . Estadísticamente significativos $p < 0.05$)

Como se mencionó anteriormente la protección observada del I3C no fue total, esto puede estar relacionado con la poca solubilidad del I3C en agua, por lo que se optó emplear otro vehículo, en este caso el aceite de oliva. En el cuadro 2 se muestran los promedios de la inducción de MN ± la d.e. de las evaluaciones realizadas durante 72 horas después de la administración del tratamiento. Al grupo testigo se le administró solo el vehículo por vía *i.p.* (0.25 ml de aceite de oliva), se puede observar que no se incrementó la frecuencia de MN, al compara con los datos obtenidos durante la administración del vehículo de agua (cuadro 1). De igual forma se observa que al administrar solo el I3C vía *i.p.* (100 µg/g) no se aumentaron las frecuencias de MN. El efecto genotóxico del CrO₃ se corroboró, al incrementarse las frecuencias de MN. Sin embargo, al administrar el I3C empleando el aceite de oliva como vehículo previo a la aplicación del CrO₃ se

observa una mayor disminución en la inducción de las frecuencias de MN solo en la hora 24 respecto al grupo I3C-CrO3 con vehículo de agua inyectable (cuadro 1). Este efecto se puede ver más claramente en el análisis del NIF y DIF (figura 11 y 12 respectivamente), al obtener reducciones de las frecuencias de MN del 86%, 72% y 100% a las 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Cuadro 2. Promedios de la frecuencia de la inducción de MN en el tratamiento de Índole-3-carbinol con vehículo de aceite de oliva.

Tratamiento	Dosis (µg/g)	n	Hora	MN/10000 cel. (̄ ± ̄)
Testigo	0.25 ml de vehículo vía <i>i.p.</i>	5	0	2.4±0.8
			24	1.4±1.5
			48	1.4±1.5
			72	1.8±0.8
Índole-3-carbinol	100	5	0	1.6±1.1
			24	1.8±1.3
			48	1.0±1.0
			72	1.0±0.7
CrO ₃	20	5	0	1.6±1.1
			24	6.8±1.9 ^{a, b}
			48	9.8±2.8 ^{a, b}
			72	4.4±1.1 ^{a, b}
Índole-3-carbinol/CrO ₃	100-20	5	0	2.2±0.8
			24	1.8±1.4
			48	5.4±0.8 ^{a, c}
			72	1.0±1.0

^a p<0.05 vs testigo h 0; ^b p<0.05 vs CrO₃ h 0; ^c p<0.05 vs I3C-CrO₃ h 0

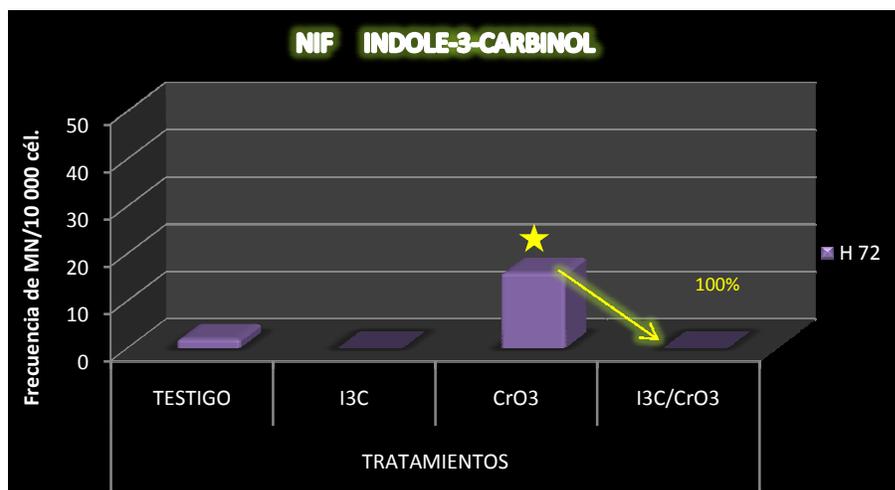
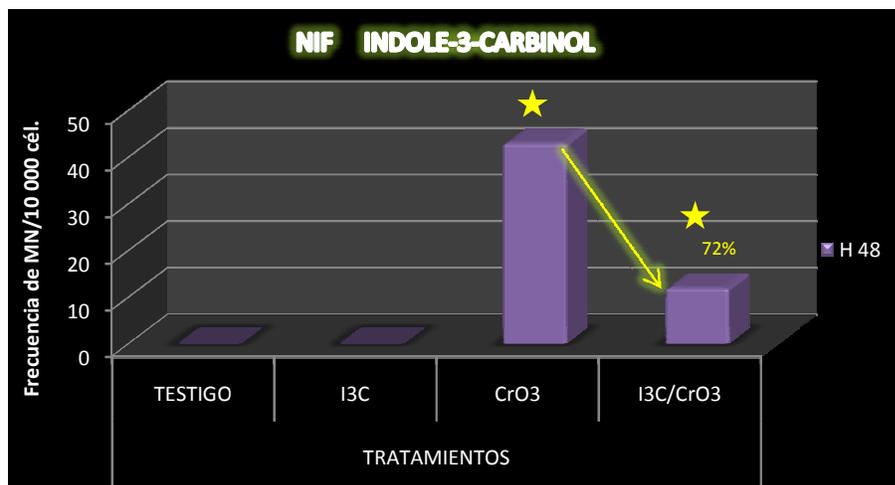
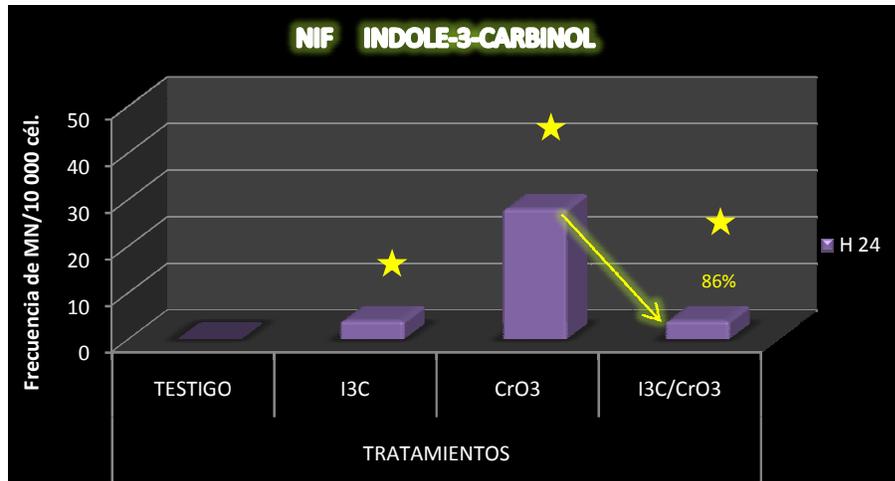


Fig. 11. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administro una dosis de 100 µg/g vía *i.p.* de índole-3-carbinol con vehículo de aceite de oliva (★). Estadísticamente significativos $p < 0.05$

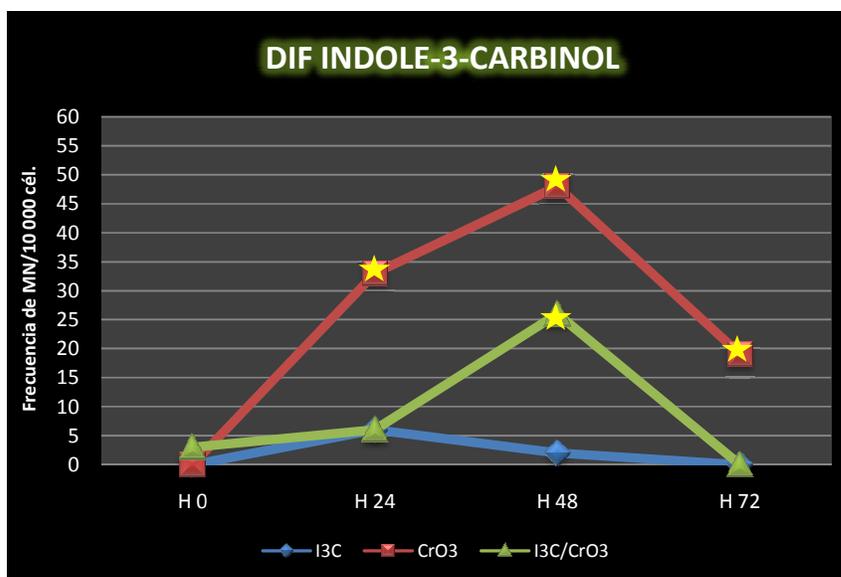


Fig. 12. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administro una dosis de 100 µg/g vía *i.p.* de índole-3-carbinol con vehículo de aceite de oliva. (★. Estadísticamente significativos $p < 0.05$)

Efecto de la antraquinona sobre daño genotóxico del CrO₃

En el cuadro 3 se muestran los promedios de las frecuencias de MN ± la d.e. de las muestras de sangre periférica tomadas cada 24 horas, hasta la hora 72 después de la administración vía *oral* de 20 µg/g de la antraquinona. Se puede observar que no hay un incremento en las frecuencias de MN estadísticamente significativo al administrar solo la antraquinona al compararse con el grupo testigo y contra su propia hora 0. Por el contrario, al administrar vía *i.p.* 20 µg/g de CrO₃ se incrementaron los promedios de las frecuencias de MN en todas las horas evaluadas (entre 2 y 6 MN). Sin embargo cuando se administró la antraquinona previamente a la aplicación del CrO₃, el incremento de MN solo se observó a la hora 24 (alrededor de 3) respecto su propia hora 0 y al grupo testigo el cual resultó estadísticamente significativo, mientras que, a las 48 y 72 horas se presentó una disminución en las frecuencias de MN respecto al grupo CrO₃ en sus respectivas horas, las cuales no resultaron estadísticamente significativas al compararlas con el grupo testigo y con su propia hora 0.

Cuadro 3. Promedios de la frecuencia de la inducción de MN en el tratamiento de antraquinona vehículo de agua inyectable.

Tratamiento	Dosis (µg/g)	n	Hora	MN/2000 cel. (±)
Testigo	0	5	0	2.4±1.1
			24	1.0±0.7
			48	1.0±1.2
			72	1.4±0.8
Antraquinona	20	5	0	2.4±1.1
			24	2.4±1.6
			48	1.4±1.3
			72	2.0±0.7
CrO₃	20	5	0	1.2±1.6
			24	3.6±2.3 ^{a, b}
			48	7.4±1.6 ^{a, b}
			72	6.0±1.2 ^{a, b}
Antraquinona/CrO₃	20-20	5	0	1.6±1.9
			24	4.0±0.8 ^{a, c}
			48	2.4±1.1
			72	2.8±0.6

^a p>0.05 vs testigo h 0; ^b p<0.05 vs CrO₃ h 0; ^c p<0.05 vs antraquinona-CrO₃ h 0

En la figura 13 se muestra el NIF de MN, donde se corrobora la reducción de las frecuencias de MN a las 48 y 72 horas (75% y 87% respectivamente) del grupo tratado con antraquinona-CrO₃ al compararlas con el grupo tratado solo con CrO₃. Sin embargo, cabe señalar que al analizar con este parámetro las frecuencias de MN, éstas resultaron estadísticamente significativas a las 24 y 48 horas al compararlas con el grupo testigo. Al realizar el análisis del DIF de MN como se muestra en la figura 14 al igual que para el cálculo del NIF, se observa un comportamiento similar entre los grupos tratados con antraquinona (línea azul) y antraquinona-CrO₃ (línea verde). Las frecuencias de MN resultaron estadísticamente significativas en todas las evaluaciones del grupo tratado con ambos compuestos.

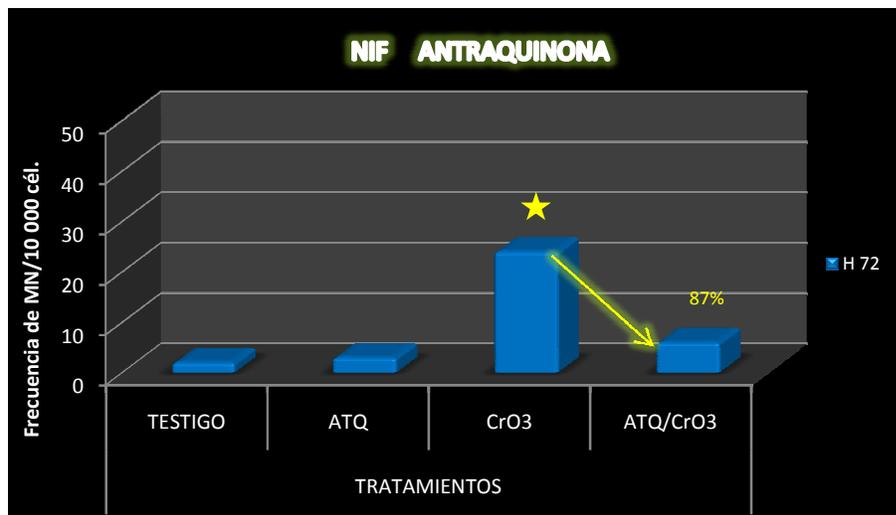
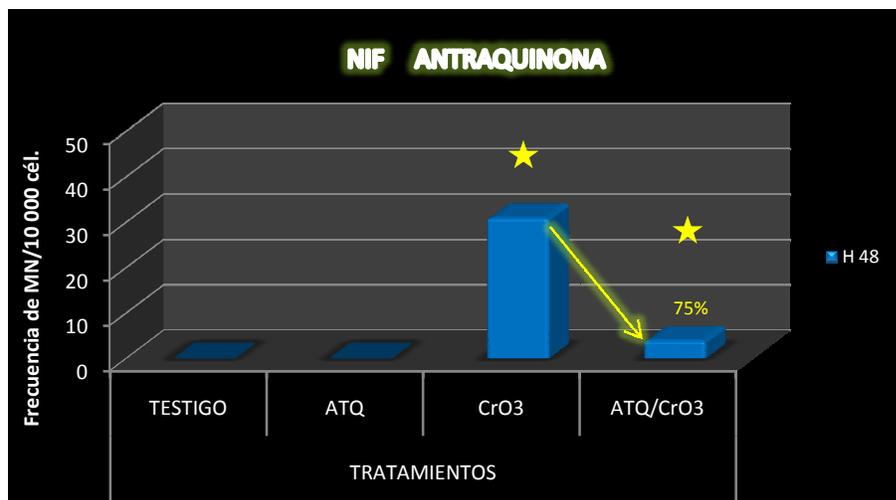
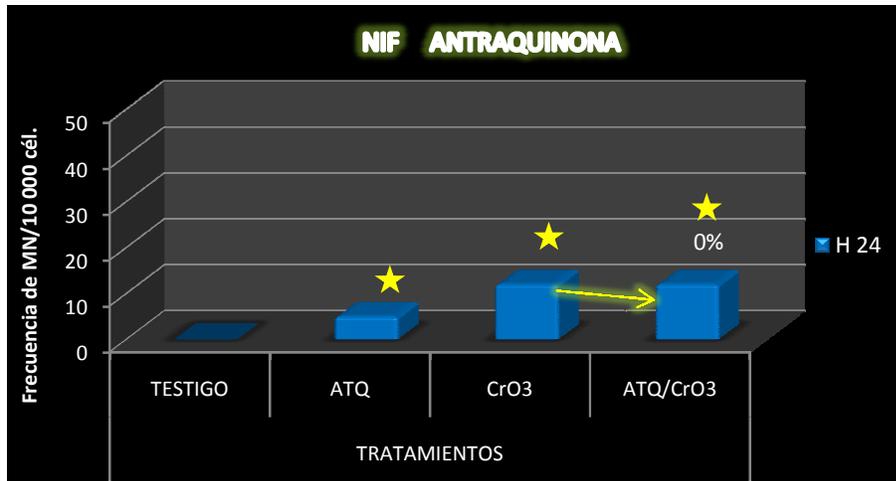


Fig.13 . Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administro una dosis de 20 µg/g vía *i.p.* de antraquinona con vehículo de agua inyectable.

(★) . Estadísticamente significativos $p < 0.05$

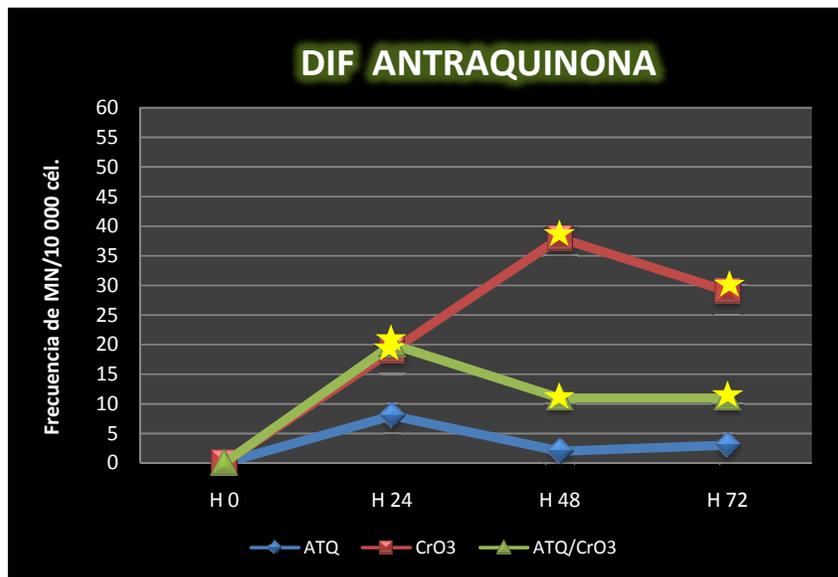


Fig. 14 . Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administro una dosis de 20 $\mu\text{g/g}$ vía *i.p.* de antraquinona con vehículo de agua inyectable.
(★. Estadísticamente significativos $p < 0.05$)

Dado que el tratamiento de antraquinona (20 $\mu\text{g/g}$ vía *oral*) no redujo el 100% del efecto genotóxico del CrO_3 , se cambió el vehículo (aceite de oliva). En el cuadro 4 se muestran los promedios de la inducción de MN \pm la d.e. de las evaluaciones realizadas durante 72 horas después de la administración de los tratamientos empleando aceite de oliva como vehículo. Se puede observar que no se incrementó la frecuencia de MN en grupo testigo al administrar solo el vehículo (aceite de oliva) con respecto al grupo testigo que solo se le administró solución inyectable estéril. De igual forma, se observa que al administrar solo la antraquinona vía *oral* (100 $\mu\text{g/g}$) no se aumentaron las frecuencias de MN. Mientras que, se corroboró el incremento en las frecuencias de MN (entre 3 y 8 MN) en el grupo tratado solo con el CrO_3 . En el grupo tratado con la antraquinona previamente a la aplicación del CrO_3 , se observa una disminución en la inducción de las frecuencias de MN en todas las horas respecto al grupo tratado solo con CrO_3 , además de que la disminución fue mayor que en el grupo antraquinona- CrO_3 en el que se empleó el vehículo de agua inyectable (cuadro 3).

Cuadro 4. Promedios de la frecuencia de la inducción de MN en el tratamiento de antraquinona con vehículo de aceite de oliva.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Hora	MN/10000 cel. (±)
Testigo	0.25 ml de aceite de oliva <i>vía i.p.</i>	5	0	2.4±0.8
			24	1.4±1.5
			48	1.4±1.5
			72	1.8±0.8
Antraquinona	20	5	0	1.6±0.8
			24	2.0±1.5
			48	1.0±1.0
			72	1.8±0.8
CrO₃	20	5	0	1.6±1.1
			24	6.8±1.9 ^{a, b}
			48	9.8±2.8 ^{a, b}
			72	4.4±1.1 ^{a, b}
Antraquinona/CrO₃	20-20	5	0	2.0±1.2
			24	2.8±1.4
			48	3.8±1.3 ^{a, c}
			72	2.9±0.7

^a p<0.05 vs testigo h 0; ^b p<0.05 vs CrO₃ h 0; ^c p<0.05 vs antraquinona-CrO₃ h 0.

Al realizar el análisis del NIF (figura 15) se observan más claramente reducciones de las frecuencias de MN 82%, 76% y 94% a las 24, 48 y 72 horas respectivamente en comparación con la disminución observada cuando se empleó el vehículo de la solución inyectable (figura 13). Sin embargo, aunque disminuyen las frecuencias de MN, éstas aún resultan estadísticamente significativas en las horas 24 y 48 al compararlas con el grupo testigo. Al realizar el análisis del DIF de MN como se muestra en la figura 16, se observa un comportamiento similar entre los grupos tratados con antraquinona (línea azul) y antraquinona-CrO₃ (línea verde), las cuales resultan estadísticamente significativas a la hora 48.

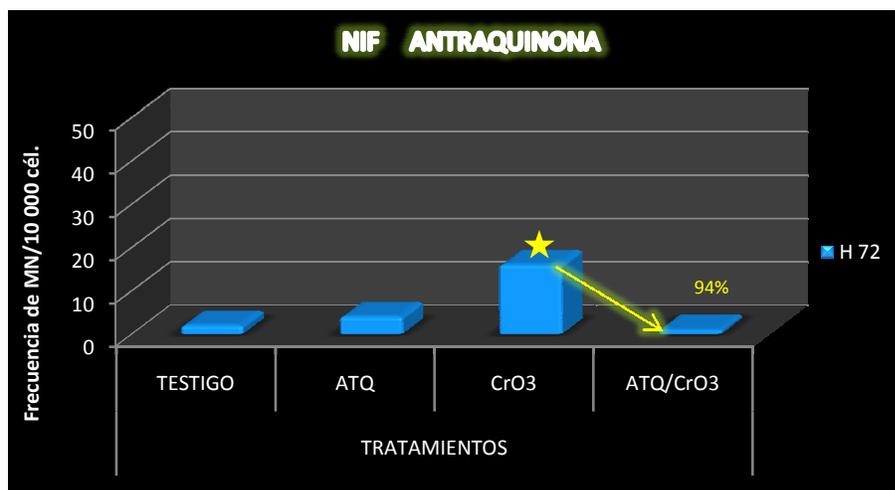
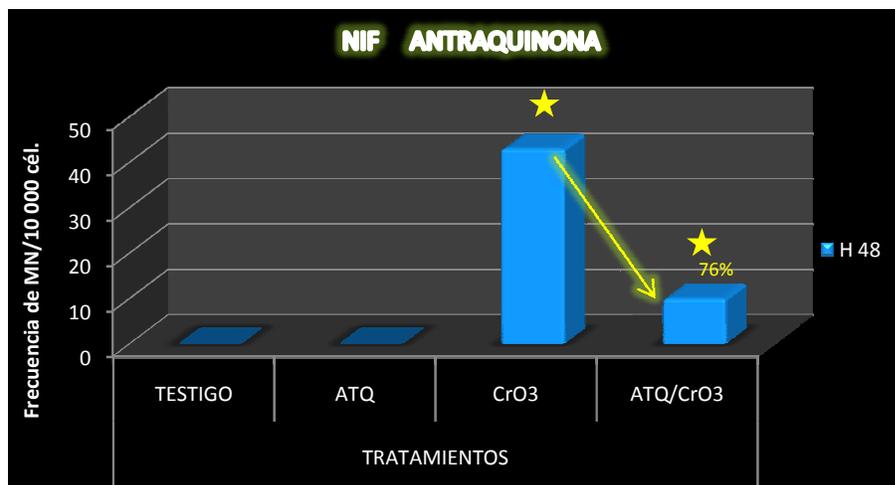
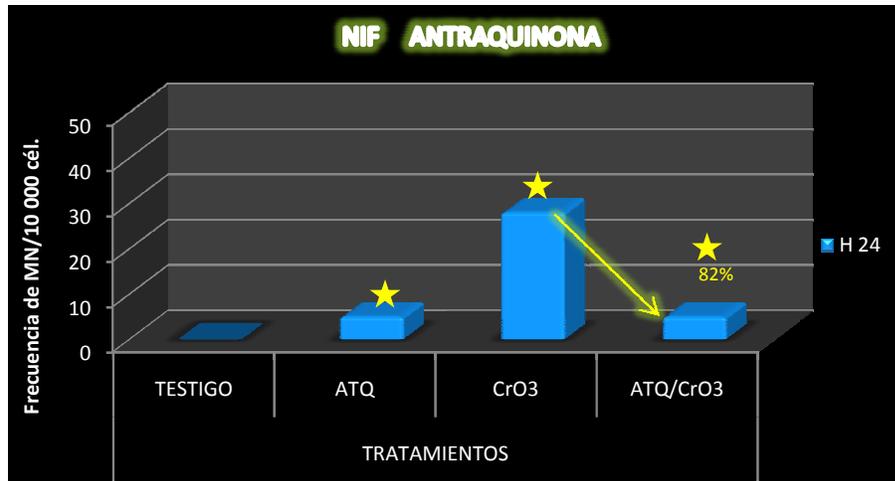


Fig. 15. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administra una dosis de 20 $\mu\text{g/g}$ vía *i.p.* de antraquinona con vehículo de aceite de oliva.

(★). Estadísticamente significativos $p < 0.05$

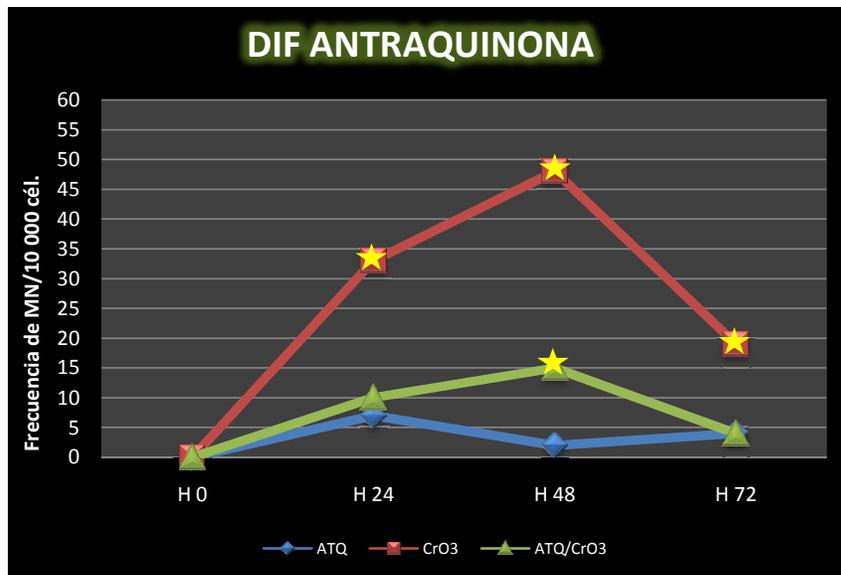


Fig. 16 . Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administro una dosis de 20 $\mu\text{g/g}$ vía *i.p.* de antraquinona con vehículo de aceite de oliva.
 (★) . Estadísticamente significativos $p < 0.05$)

Efecto de la capsaicina sobre daño genotóxico del CrO_3

En el cuadro 5 se muestran los promedios de MN \pm la d.e. que fueron evaluados después de la administración de 2 $\mu\text{g/g}$ de capsaicina por vía *i.p.* Se observa que el tratamiento solo de la capsaicina no incrementó de forma estadísticamente significativa las frecuencias de MN al ser comparadas con el grupo testigo y con su propia hora 0. La administración de 20 $\mu\text{g/g}$ de CrO_3 por vía *i.p.* incrementa los promedios de MN desde las 24 horas después de su administración (entre 2 y 6 MN) los cuales resultaron estadísticamente significativas al comparar con el grupo testigo y con la hora 0. Cuando se administró la capsaicina previamente a la aplicación del CrO_3 , solo se disminuyeron las frecuencias de MN a las 72 horas (alrededor de 2 MN). Sin embargo, aún resultaron estadísticamente significativas al compararlas con el grupo testigo y la hora 0.

Cuadro 5. Promedios de la frecuencia de la inducción de MN en el tratamiento de capsaicina con vehículo de agua inyectable.

Tratamiento	Dosis (µg/g)	n	Hora	MN/10 000 cel. (M± M)
Testigo	0	5	0	2.4±1.1
			24	1.0±0.7
			48	1.0±1.2
			72	1.4±0.8
Capsaicina	2	5	0	2.2±0.8
			24	1.2±1.3
			48	1.2±0.8
			72	1.8±1.3
CrO₃	20	5	0	1.2±1.6
			24	3.6±2.3 ^{a, b}
			48	7.4±1.6 ^{a, b}
			72	6.0±1.2 ^{a, b}
Capsaicina/CrO₃	2-20	5	0	2.6±1.1
			24	4.2±1.4 ^{a, c}
			48	6.8±2.0 ^{a, c}
			72	4.2±0.8 ^{a, c}

^a p<0.05 vs testigo h 0; ^b p<0.05 vs CrO₃ h 0; ^c p<0.05 vs capsaicina-CrO₃ h 0

Al realizar el análisis del NIF de MN (fig. 17), se observa que hay un decremento de las frecuencias de MN en el grupo donde se administro la capsaicina previamente al CrO₃ a las 48 y 72 horas (32% y 67% respectivamente). Sin embargo, las frecuencias de MN resultaron estadísticamente significativas a las 24 y 48 horas al compararlos con el grupo testigo. Por otra parte, al calcular el DIF de MN (fig. 18) se observa que el comportamiento del grupo tratado con capsaicina-CrO₃ (línea verde) es más similar al del CrO₃ (línea roja) que al del grupo testigo (línea azul), pese a la disminución de la frecuencia de MN a la hora 72 (capsaicina-CrO₃).

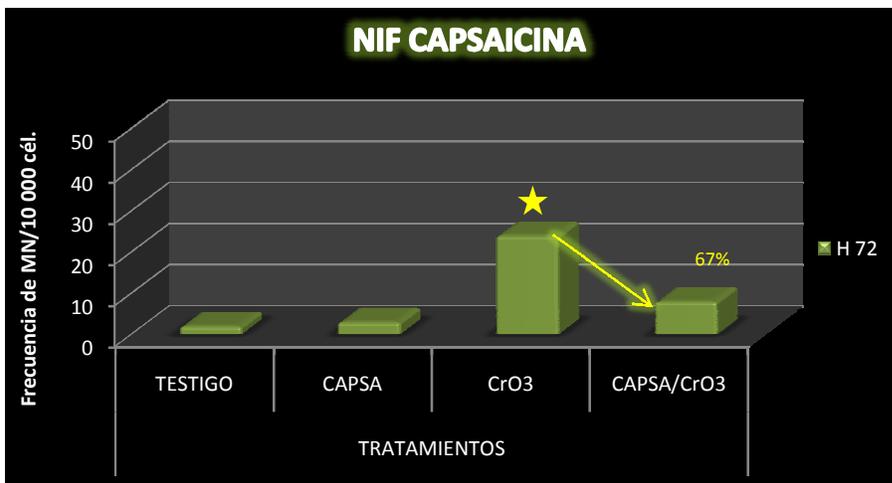
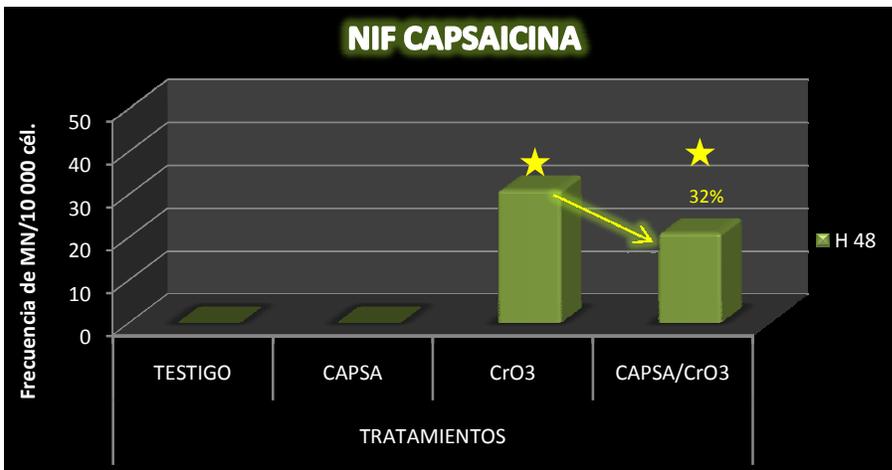
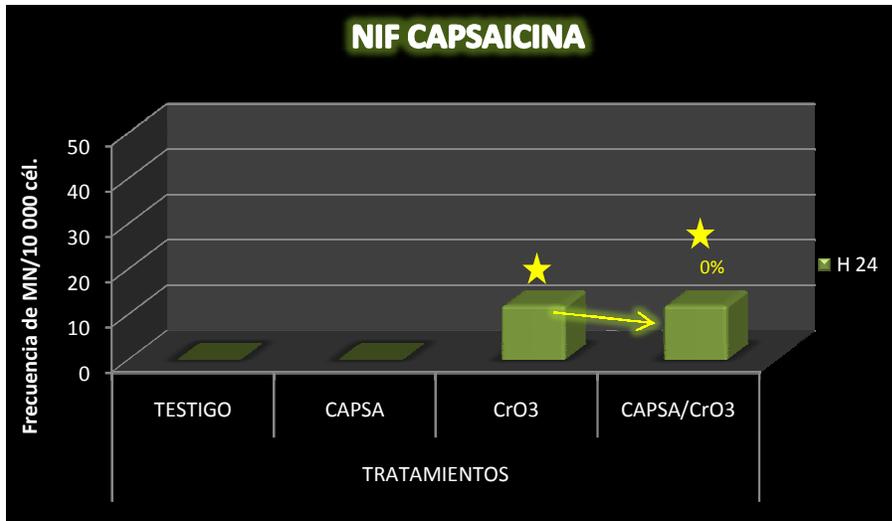


Fig. 17. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administro una dosis de 2 $\mu\text{g/g}$ vía *i.p.* de capsaicina con vehículo de agua inyectable.
 (★. Estadísticamente significativos $p < 0.05$)

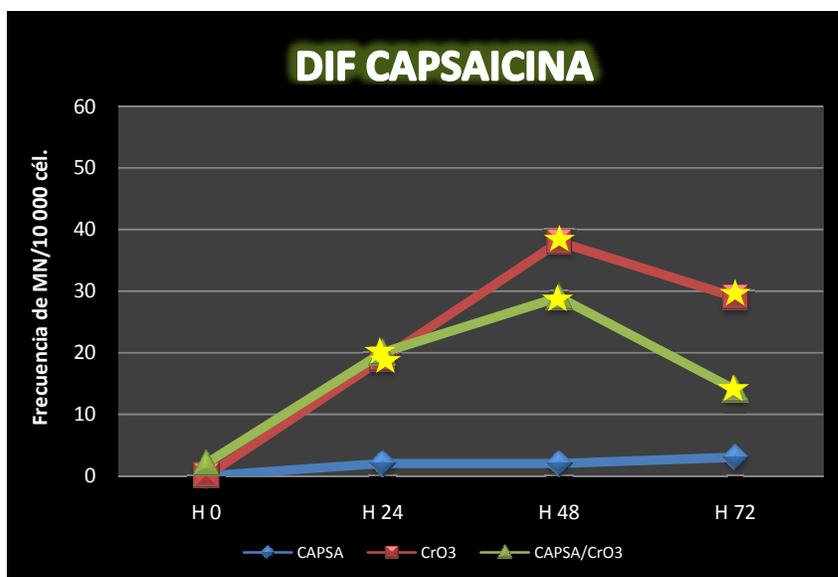


Fig. 18 . Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administro una dosis de 2 µg/g vía *i.p.* de capsaicína con vehículo de agua inyectable.
 (★ . Estadísticamente significativos $p < 0.05$)

Dado que no se observó una disminución total de las frecuencias de MN al administrar el tratamiento de capsaicína previamente al del CrO₃, se cambio el vehículo a aceite de oliva y se duplicó la dosis. En el cuadro 6 se muestran los promedios de la inducción de MN ± la d.e. de las evaluaciones realizadas durante 72 horas después de la administración del tratamiento. En el grupo testigo al administrar solo el vehículo por vía *i.p.* (aceite de oliva), no se incrementaron las frecuencias de MN. Al administrar solo la capsaicína (4 µg/g) por vía *i.p.* tampoco se aumentaron las frecuencias de MN. El tratamiento del CrO₃ incrementó las frecuencias de MN. Mientras que, la dosis de 4 µg/g de la capsaicína disminuye los promedios de MN inducidos por la aplicación del CrO₃ en todas las horas evaluadas e incluso a la hora 72 la protección es total, al comparar con el grupo capsaicína-CrO₃ al que se le administro con el vehículo de agua inyectable (cuadro 5).

Cuadro 6. Promedios de la frecuencia de la inducción de MN en el tratamiento de capsaicina con vehículo de aceite de oliva.

Tratamiento	Dosis (µg/g)	n	Hora	MN/10000 cel. (±)
Testigo	0.25 ml de vehículo vía ip	5	0	2.4±0.8
			24	1.4±1.5
			48	1.4±1.5
			72	1.8±0.8
Capsaicina	4	5	0	1.4±0.8
			24	2.0±1.5
			48	2.0±1.0
			72	1.6±1.5
CrO₃	20	5	0	1.6±1.1
			24	6.8±1.9 ^{a, b}
			48	9.8±2.8 ^{a, b}
			72	4.4±1.1 ^{a, b}
Capsaicina/CrO₃	4-20	5	0	1.4±1.1
			24	3.8±0.8 ^{a, c}
			48	7.8±1.3 ^{a, c}
			72	2.6±0.5

^a p<0.05 vs testigo h 0; ^b p<0.05 vs CrO₃ h 0; ^c p<0.05 vs capsaicina-CrO₃ h 0

Al realizar el análisis del NIF (figura 19) se observan las disminuciones de las frecuencias de MN 57%, 26% y 63% a las 24, 48 y 72 horas respectivamente, estas disminuciones son mayores en comparación con la disminución observada al utilizar el vehículo de la solución inyectable (figura 17). Sin embargo, aunque con la aplicación de este vehículo y el incremento en la dosis de la capsaicina se disminuyeron las frecuencias de MN, éstas aún resultan estadísticamente significativas a las 24 y 48 horas de evaluación al compararlas con el grupo testigo y con su propia hora 0. Al realizar el análisis del DIF de MN (fig. 20) se puede observar nuevamente un comportamiento similar en el grupo capsaicina-CrO₃ (línea verde) con el CrO₃ (línea roja), las frecuencias de MN resultan estadísticamente significativas al comparar con el grupo testigo.

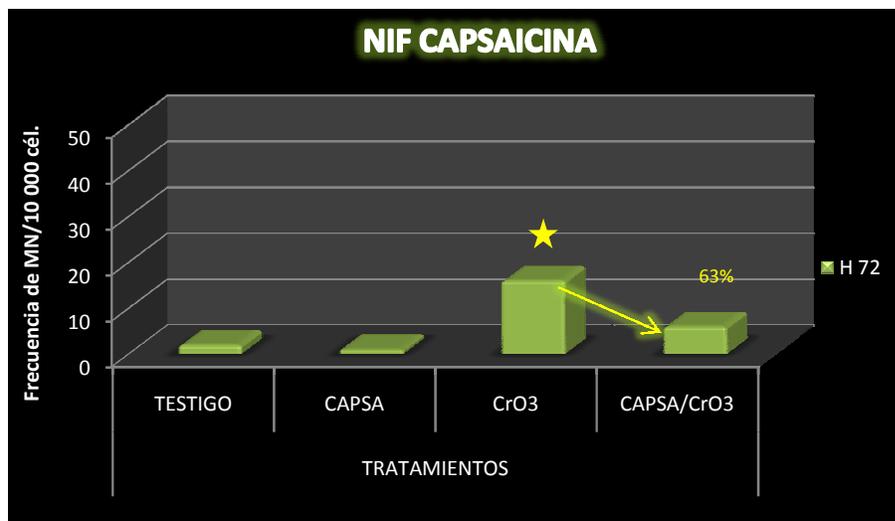
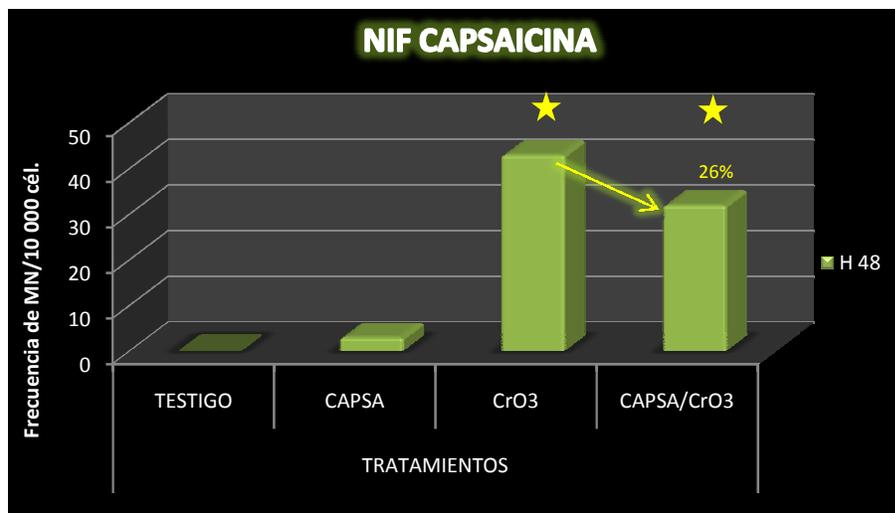
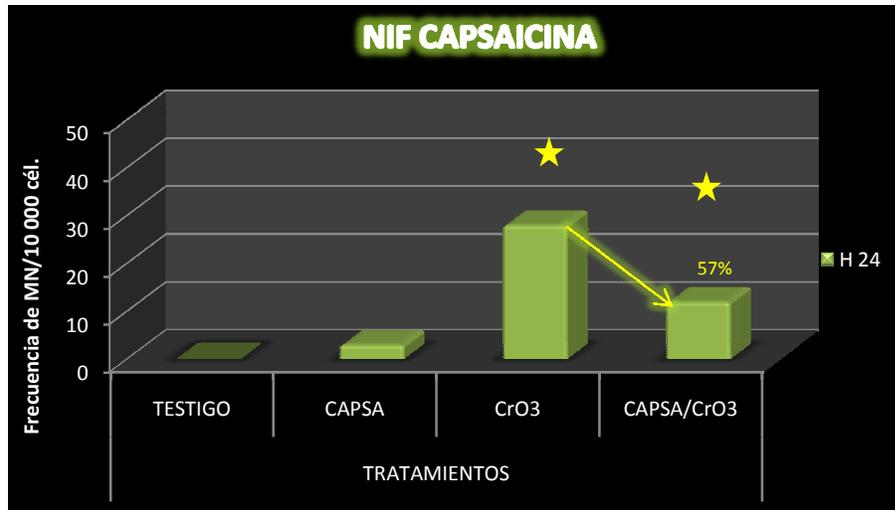


Fig. 19. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administro una dosis de 4 $\mu\text{g/g}$ vía *i.p.* de capsaicina con vehículo de aceite de oliva.
 (★ . Estadísticamente significativos $p < 0.05$)

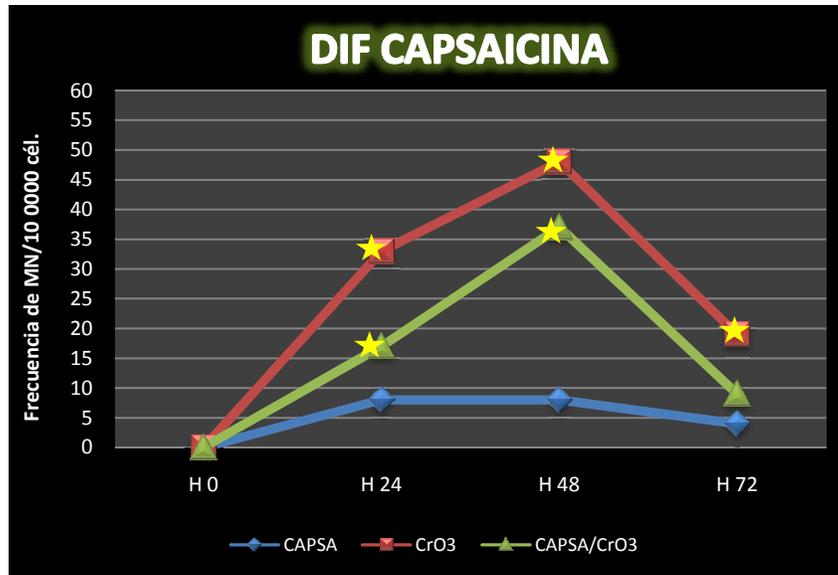


Fig. 20 . Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administro una dosis de 4 $\mu\text{g/g}$ vía *i.p.* de capsaicina con vehiculo de aceite de oliva.
 (★ . Estadísticamente significativos $p < 0.05$)

Efecto del I3C, de la antraquinona y de la capsaicina sobre daño genotóxico del CrO₃

En el cuadro 7 se muestra a manera de resumen los porcentajes de disminución de MN a las 24, 48 y 72 horas de evaluación con cada uno de los fitoquímicos empleados en el estudio cuando se combinaron con el CrO₃. Se puede observar que el porcentaje de disminución presentó el siguiente orden: I3C (vehículo; agua inyectable) > I3C (vehículo; aceite de oliva) > antraquinona (vehículo; aceite de oliva) > antraquinona (vehículo; agua inyectable) > capsaicina (vehículo; aceite de oliva-dosis de 4 $\mu\text{g/g}$) > capsaicina (vehículo; agua inyectable-dosis de 2 $\mu\text{g/g}$).

Cuadro 7. Comparación de la protección de los diferentes tratamientos al ser administrados con diferentes vehículos y dosis previamente a la administración vía i.p. de 20 µg/g de CrO₃.

Hora	I3C (100 µg/g) vía i.p. vehículo agua inyec.	I3C (100 µg/g) vía i.p. vehículo ac. oliva	Antraquinona (20 µg/g) vía oral vehículo agua inyec.	Antraquinona (20 µg/g) vía oral vehículo ac. oliva	Capsaicína (2 µg/g) vía i.p. vehículo agua inyec.	Capsaicína (4 µg/g) vía i.p. vehículo ac. oliva
24	48 %	86 %	0 %	82 %	0 %	57 %
48	87 %	72 %	75 %	76 %	32 %	26 %
72	100 %	100 %	87 %	94 %	67 %	63 %

Efecto del I3C, de la antraquinona, de la capsaicina y del CrO₃ sobre las frecuencias de EPC respecto a las frecuencias de ENC

En el cuadro 8 se muestran los promedios de las frecuencias de los EPC respecto a los ENC en ratones macho tratados con I3C, antraquinona y capsaicina empleando ambos vehículos (solución inyectable y aceite de oliva), se observa que no se presentaron modificaciones en las frecuencias de EPC con respecto a las de ENC estadísticamente significativas al comparar con el grupo testigo y contra sus propias horas cero.

Cuadro 8. Promedios de la frecuencia de la inducción de EPC respecto a los ENC en los diferentes tratamientos al ser administrados con diferentes vehículos y dosis.

TRATAMIENTO	DOSIS ($\mu\text{g/g}$)	n	HORA	I3C (100 $\mu\text{g/g}$) vía i.p. vehículo agua inyec.	I3C (100 $\mu\text{g/g}$) vía i.p. vehículo ac. oliva	Antraquinona (20 $\mu\text{g/g}$) vía oral vehículo agua inyec.	Antraquinona (20 $\mu\text{g/g}$) vía oral vehículo ac. oliva	Capsaicina (2 $\mu\text{g/g}$) vía i.p. vehículo agua inyec.	Capsaicina (4 $\mu\text{g/g}$) vía i.p. vehículo ac. oliva
Testigo	0.25 ml de vehículo vía i.p.	5	0	64.2 \pm 7.5	64.2 \pm 7.5	64.2 \pm 7.5	66.2 \pm 6.9	66.2 \pm 6.9	66.2 \pm 6.9
			24	60.8 \pm 5.0	60.8 \pm 5.0	60.8 \pm 5.0	60.8 \pm 4.1	60.8 \pm 4.1	60.8 \pm 4.1
			48	73 \pm 10.1	73.0 \pm 10.1	73.0 \pm 10.1	68.0 \pm 8.0	68.0 \pm 8.0	68.0 \pm 8.0
			72	64 \pm 8.6	64.0 \pm 8.6	64.0 \pm 8.6	63.2 \pm 7.8	63.2 \pm 7.8	63.2 \pm 7.8
Fitoquímico	100,20,2-4	5	0	66.6 \pm 7.8	65.4 \pm 7.9	73.2 \pm 8.3	61.4 \pm 6.4	67.0 \pm 7.8	55.0 \pm 6.3
			24	55.4 \pm 10.8	64.6 \pm 11.8	73.2 \pm 7.1	74.2 \pm 11.6	71.8 \pm 7.6	55.1 \pm 7.7
			48	61 \pm 11.3	61.0 \pm 11.8	77.6 \pm 11.1	68.6 \pm 10.3	68.0 \pm 5.1	65.8 \pm 11.1
			72	71 \pm 3.9	69.4 \pm 7.9	69.6 \pm 8.1	74.8 \pm 14.5	63.0 \pm 12.4	66.8 \pm 9.6
CrO₃	20	5	0	71.2 \pm 8.5	71.2 \pm 8.5	71.2 \pm 8.5	70.8 \pm 8.0	70.8 \pm 8.0	70.8 \pm 8.0
			24	63.0 \pm 5.5	63.0 \pm 5.5	63.0 \pm 5.5	63.4 \pm 10.9	63.4 \pm 10.9	63.4 \pm 10.9
			48	56.4 \pm 5.3	56.4 \pm 5.3	56.4 \pm 5.3	57.4 \pm 8.6	57.4 \pm 8.6	57.4 \pm 8.6
			72	67.4 \pm 7.8	67.4 \pm 7.8	67.4 \pm 7.8	68.2 \pm 4.9	68.2 \pm 4.9	68.2 \pm 4.9
Fitoquímico /CrO₃	100,20,2-4/20	5	0	66.2 \pm 7.2	61.4 \pm 5.1	75.2 \pm 9.7	65.8 \pm 8.0	67.2 \pm 8.4	70.0 \pm 11.8
			24	61.4 \pm 8.7	64.4 \pm 7.0	74.8 \pm 12.0	71.2 \pm 5.5	70.2 \pm 4.2	60.8 \pm 10.8
			48	59.2 \pm 10.4	63.8 \pm 7.3	65.4 \pm 4.9	66.6 \pm 13.6	66.8 \pm 7.19	63.4 \pm 8.7
			72	72.6 \pm 8.5	71.2 \pm 8.4	68.5 \pm 9.0	62.8 \pm 12.6	55.8 \pm 10.54	70.0 \pm 8.9

DISCUSIÓN

La quimiopreención consiste en la aplicación de agentes que tienen el potencial para prevenir o retrasar el daño de mutágenos. Se ha planteado el uso de los agentes quimiopreventivos en las personas que por su actividad o estilo de vida están en alto riesgo de desarrollar alteraciones relacionadas con el daño al ADN. El estudio de agentes quimiopreventivos debe incluir la realización de rigurosos pruebas *in vitro* e *in vivo*, seguidos por ensayos clínicos. En la actualidad se le ha dado importancia al estudio de la quimiopreención a los fitoquímicos presentes en las plantas por su baja toxicidad. Algunos de los antimutágenos que han sido identificados en la actualidad son el α -tocoferol que se encuentra principalmente en aceites vegetales, en las partes verdes de algunas plantas y en el tejido adiposo de los animales (Sayago *et al.*, 2007); el β -caroteno que se encuentra en zanahorias, pimiento morrón, espinacas y calabaza entre otros (National Cancer Institute, 2010); el índole-3-cairbinol (I3C) que se encuentra en los vegetales crucíferos como la col, la coliflor, la col de bruselas y el brócoli (Oganesian, *et al.*, 1997); el ácido ascórbico que se le puede encontrar principalmente en el pimiento morrón, los cítricos (Halliwell y Poulsen, 2006); la antraquinona que se encuentra en las familias de plantas *Rubiaceae*, *Rhamnaceae*, *Poligonaceae* y *Leguminosae* (Borroto, 2005) y la capsaicina que la contienen los pimientos del género *Capsicum*, que son los que le dan el sabor “pico” a los alimentos (Morán-Bañuelos, 2008). Éstos agentes quimiopreventivos pueden actuar como moduladores de enzimas, antioxidantes, inhibidores de la formación de aductos entre otros (Ames, 1983; Paolini, *et al.*, 1998). En el presente estudio se evaluó el efecto del I3C, la antraquinona y la capsaicina sobre el daño genotóxico inducido por el CrO_3 en ratones macho de la cepa CD-1.

Como se observa en los resultados; la administración sola de los fitoquímicos I3C, antraquinona y capsaicina no indujeron efectos tóxicos aparentes en los animales (pelaje, peso y comportamiento normales), daño genotóxico (incremento de las frecuencias de MN), ni citotóxicos (modificación de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC). Se ha propuesto que un agente quimiopreventivo no debe ser tóxico, de modo que pueda ser administrado de forma segura y no promover el desarrollo de mutaciones (Stan, *et al.*, 2010). De ahí que se prefiera el estudio de los componentes de las frutas y los vegetales, los cuales además de ser parte de la dieta se ha observado que también pueden poseer propiedades antioxidantes, a las cuales se les ha relacionado con protección de daño al ADN (Diplock *et al.*, 1994; Halliwell *et al.*, 1995a; Surh y Ferguson, 2003).

En estudios previos realizados en ratones en los que se administraron dosis mayores de I3C (250 mg) a la empleada en este estudio (100 $\mu\text{g/g}$) de forma tópica no se reportaron efectos tóxicos, se

observó una disminución del daño inducido por el DMBA (7,12-Dimetilbenzantraceno) (Srivastava y Shukla, 1998). También, durante la administración crónica (100 ó 300 ppm durante 10 semanas) de I3C a ratones no se han reportado efectos tóxicos (Dae *et al.*, 2003). En evaluaciones realizadas en humanos se observó que el consumo de 250 g/día de brócoli y 250 g/día de col de Bruselas no induce efectos tóxicos, sino por el contrario se incrementó la excreción urinaria de aminoácidos heterocíclicos PhIP (mutágeno que se encuentra en la carne asada) (Walters, *et al.*, 2004).

En el presente estudio, cuando se administraron 20 µg/g por vía *oral* de antraquinona a los ratones no se observaron efectos tóxicos. A partir de un estudio epidemiológico se sugirió una que existe una estrecha relación entre las personas que consumen aloe y el bajo riesgo de padecer enfermedades relacionadas con daño al ADN (Sakai, 1989). Se ha reportado que la administración de antracenos presenta actividad antígenotóxica en *Drosophila*, al ser tratadas con N-metil-N-nitrosourea (MNU) (Takahashi *et al.*, 2001). Sin embargo, en estudios *in vitro* con células de linfoma de ratón L5178Y empleando dosis de 500 µM/ml se han reportado efectos tóxicos, atribuido a la generación de ERO's (Mueller y Stopper, 1999; Li *et al.*, 2010).

De igual manera, en este estudio se observó que la administración de capsaicina vía *i.p.* (2 y 4 µg/g) a ratones tampoco presentaba efectos tóxicos aparentes. Estudios realizados en hamsters, en los que, se administraron dosis similares de capsaicina a la que empleamos (2 mg/kg y 10 mg/kg) tampoco se reportó toxicidad (Zhang, *et al.*, 1997), al igual que al administrar por vía *i.p.* 10 mg/kg de capsaicina (Anandakumar *et al.*, 2008). Aunque la capsaicina es considerada un agente perjudicial para la mucosa gástrica, en un estudio *in vitro* con células gástricas epiteliales (MKN45) infectadas con *Helicobacter pylori* tampoco se reportó toxicidad, por el contrario al administrar una dosis de 100 microM/L se inhibió la liberación de citoquina pro-inflamatoria (Lee *et al.*, 2007).

Las evaluaciones del daño genotóxico se realizaron mediante el empleo del ensayo de MN en sangre periférica basado en los lineamientos de la FDA (Hayashi *et al.*, 1990; FDA, 2000). La administración sola de 100 mg/kg de I3C no incrementó las frecuencias de MN, lo cual concuerda con lo reportado en estudios previos realizados en ratones, en los se emplearon inclusive dosis mayores y tampoco se observó daño genotóxico mediante el incremento de las frecuencias de MN y aberraciones cromosómicas en médula ósea (Agrawal y Kumar, 1998; 1999).

Cuando se administraron vía *oral* 20 mg/kg de antraquinona tampoco observó un incremento de las frecuencias de MN. Sin embargo, en estudios previos realizados *in vitro* con células de linfoma de ratón L5178Y empleando dosis de 500 µM/ml de antraquinonas observaron rompimientos de

cadena doble, los cuales siguieron que se debieron a la desestabilización de la topoisomerasa II y la formación de complejos topo II-ADN (Mueller y Stopper, 1999; Li *et al.*, 2010). Estudios epidemiológicos en Japón han mostrado que existe una correlación entre la inducción de cáncer en pulmón (por fumar cigarrillos) y la dieta (ingesta de áloe) (Sakai, 1989).

Al administrar vía *i.p.* 2 y 4 $\mu\text{g/g}$ de capsaicina no se observó un incremento en las frecuencias de MN. Con relación a este compuesto no es limitada la información de evaluaciones genotóxicas. Sin embargo en estudios *in vitro* se ha reportado que la capsaicina daña la membrana mitocondrial, induciendo la formación de ERO's, los que inducen fragmentación del ADN (Shin *et al.*, 2003).

Cuando se administraron 20 $\mu\text{g/g}$ de CrO_3 por vía *i.p.*, 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; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2006; Henkler *et al.*, 2010). 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 establecidas las dosis de los fitoquímicos que no resultaron genotóxicas y la dosis genotóxica del CrO_3 , se combinaron los tratamientos (fitoquímico+ CrO_3) con la finalidad de evaluar la posible protección de los fitoquímicos sobre el daño genotóxico inducido por el CrO_3 . La evaluación del daño genotóxico se llevó a cabo mediante la cuantificación de las frecuencias de MN. Como se observó en los resultados la administración previa de los antioxidantes redujo las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 , esto puede estar relacionado con el potencial de los fitoquímicos para neutralizar las ERO's y RL generadas por la reducción del Cr (VI) a Cr (III) (Padayatty *et al.*, 2003).

La administración de 100 µg/g de I3C redujo la inducción de MN a pesar de la administración de 20 µg/g de CrO₃. En estudios previos realizados en ratones se observó que al administrar dosis de hasta 1000 mg/kg de I3C en las que evaluaron formación de MN y aberraciones cromosómicas en medula ósea de ratón, también se presentó una disminución en el porcentaje de aberraciones cromosómicas y MN inducidos por ciclofosfamida (Agrawal y Kumar, 1998; 1999). También, al analizar la formación de aductos inducidos por PhIP en diversos órganos de ratas, se observó que la administración de 0.1% de I3C en la dieta durante 2 semanas redujo significativamente los niveles de aductos en el páncreas, el estómago, el colon, el bazo, los glóbulos blancos, el intestino delgado, el corazón, el hígado, el pulmón y los riñones, siendo en todos los casos la reducción mayor al 70% (He *et al.*, 2000). Por otra parte, al evaluar los posibles mecanismos de acción inhibitoria de daño genotóxico frente a los efectos de un potente hepatocarcinógeno como la aflatoxina B₁ (AFB₁) en trucha arcoíris, se observó que un metabolito activo del I3C (diindolmetano) es un agente que inhibe la formación de aductos además de proponer que el diindolmetano inhibe la bioactivación de la AFB₁ y captura sus productos intermedios que interviene en la fase I y II de la metabolización enzimática de xenobioticos (Baldwin *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 1995; Arnao *et al.*, 1996). En cuanto a sus posibles efectos hormonodependientes del I3C, se realizó un estudio en ratas Donryu, en el que se les administraron 200, 500 y 1000 ppm durante 660 días para examinar la inhibición de la aparición espontánea de adenocarcinoma de endometrio. Este efecto quimiopreventivo de I3C puede ser debido a la inducción de hidroxilación del estradiol 2 (17β- estradiol) (Kojima *et al.*, 1994). También en un estudio con ratones transgénicos K14-HPV16 a los que se les dio una dieta de 2000 ppm diindolmetano durante 12 semanas y un control a los que se les dio una dieta regular, en donde se evaluó la transformación cervical mediante cortes histopatológicos de cérvix, mostrando una marcada disminución en la displasia de cuello uterino en los ratones control y los ratones transgénicos, lo que indica que el diindolmetano retrasa o inhibe la progresión de la displasia cervical y en consecuencia el cáncer cervical (Sepkovic *et al.*, 2009).

Cuando se combinaron los tratamientos de 20 µg/g de antraquinona y 20 µg/g 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 la antraquinona protegió del daño genotóxico inducido por el CrO₃. En un estudio *in vitro* con células hepáticas de ratón se estudio el efecto de la administración de hasta 180 µg/ml de pulpa de aloe (tiene una alta concentración de antraquinonas) sobre la inducción de aductos por el BP. La dosis antes mencionada fue la más efectiva en inhibir la formación de aductos de BP-ADN, lo que sugiere que plantas como el aloe presentan actividad anti-genotóxica, por lo que se podría considerar como una agente

potencialmente quimiopreventivo (Hyung *et al.*, 1999). En estudios *in vitro* mediante la prueba de Ames sobre la mutagenicidad de 5.0 µg 1-nitropireno (1-NP) en salmonella typhimurium TA98, donde se concluyó que la antraquinona actúa como un agente de bloqueo y / o reduce la acción mutágena del 1-NP (Hsueh-Yueh *et al.*, 1995). Para tratar de esclarecer el posible mecanismo de acción de la antraquinona se realizó un estudio *in vitro* mediante la prueba de la inhibición de la peroxidación del ácido linoléico, en el que se agregó al sistema 0.25 mg/ml de antraquinona y crisofanol (en el sistema forma radicales hidroxilo). La antraquinona inhibe la formación de radicales hidroxilo, sugiriendo que el mecanismo antioxidante de la antraquinona posiblemente esté relacionado con la captura de radicales hidroxilo (Gow-Chin *et al.*, 2000). También en estudios previos realizados *in vitro* al utilizar dosis de hasta 500 nmol/ml mediante la prueba de Ames con *S. typhimurium* TA98, se reportó la inhibición de las mutaciones inducidas por 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline (IQ), sugiriendo que existen al menos dos mecanismos de acción sobre inhibición de la mutagenicidad de la antraquinona: la mediación a través de la interacción de las enzimas microsomales y la interacción directa con los metabolitos, bloqueando su interacción con el ADN (Jyu *et al.*, 1995). Aunque las propiedades quimiopreventivas de la antraquinona no han sido ampliamente estudiadas, se puede especular sobre su capacidad como antioxidante, atribuible a que a su estructura antraceno-quinona, puede interferir con el proceso de transporte de electrones y en la alteración de estado redox celular (Srinivas *et al.*, 2007).

Finalmente, cuando se administraron 2 y 4 µg/g de capsaicina previo a la administración de 20 mg/kg de CrO₃ se observó una reducción en las frecuencias de MN. Se ha reportado que la administración de hasta 3.5 mg/kg previo a la administración de 20mg/kg de ciclofosfamida en ratones, reduce la inducción de aberraciones cromosómicas en médula ósea, además de disminuir el porcentaje de rompimientos de ADN (Krishna *et al.*, 1995). Por otra parte en un estudio previo en hígado de rata, al administrar dosis de hasta 100 µM de capsaicina se observó una disminución de hasta un 71% en la formación de aductos inducidos por aflatoxina, lo que sugiere que la capsaicina inhibe la biotransformación de AFB1 mediante la modificación de la fase I de la actividad enzimática (Teel, 1991). Por su parte, Miller *et al.* (1993) en un estudio *in vitro* con células hepáticas de hámster también observaron que una dosis de 0.5 mM de capsaicina inhibe la formación de todos los metabolitos de 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), sugiriendo que el posible mecanismo de acción antimutágena de la capsaicina sea a través de la inhibición de enzimas de metabolización de los xenobióticos. En particular con el citocromo P450 que está involucrado en la activación, así como la desintoxicación de químicos diversos mutágenos (Surh y Lee, 1995). Así mismo, en un estudio al administrar una sola dosis por vía *oral* de capsaicina de 2 y 10 mg/kg en hamsters machos se alteró el metabolismo de NNK en el hígado

y los microsomas de pulmón, lo que sugiere el efecto quimiopreventivo de la capsaicina (Zhang *et al.*, 1997). También, en un estudio con ratones albinos, al administrar por vía *i.p.* 10 mg/kg de capsaicina antes y después de la administración de 50 mg / kg de BP inhibió el estrés oxidante indicado por las alteraciones en la peroxidación lipídica y los niveles antioxidantes intracelulares basales de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Anandakumar *et al.*, 2008). Con la finalidad de inferir en posibles mecanismos de acción involucrados con los efectos antioxidantes de la capsaicina en ensayos *in vitro* mediante la inhibición de la peroxidación lipídica de las mitocondrias de hígado de rata (RLM) y propone que la capsaicina captura los radicales libres en la superficie y en el interior de la membrana (Kogure *et al.*, 2002).

La dieta humana contiene tanto mutagenos como agentes quimiopreventivos naturales. La mayoría de los quimiopreventivos bloquean agentes que han sido asignados en una o más de las siguientes categorías: inhibidores de enzimas CYP, inductores de enzimas CYP y metabolizan enzimas de fase I y II. El sistema de enzimas de fase I (por ejemplo las enzimas CYP) se considera la mejor maquinaria de activación, que es capaz por convertir a los premutágenos en las últimas formas de mutagenos que pueden dañar al ADN, proteínas y lípidos, mientras que la fase II representa la mejor maquinaria detoxificante. Muchos mutagenos actúan en la generación de radicales de oxígeno (Lee *et al.*, 1998). Se ha observado que la probabilidad de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con el daño al ADN se puede incrementar por la exposición a agentes mutágenos, las deficiencias nutricionales, así como el estilo de vida (Kohimeier *et al.*, 1995; Vitale *et al.*, 2010).

La información acerca de los mecanismos de los agentes quimiopreventivos como inhibidores de la mutagénesis aun no se han concluido ni esclarecido. En cuanto al uso de micronutrientes específicos así como suplementos dietéticos para la población general, se destaca la necesidad de las evaluaciones globales de la evidencia científica disponible en las diversas disciplinas, es decir, la biología celular, la farmacología, la toxicología, la epidemiología y de estudios clínicos acerca del potencial de los agentes quimiopreventivos (Lee *et al.*, 2003).

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) (Garcia-Rodriguez, 2006; Macedo, 2010) ni con los tratamientos de los fitoquímicos empleados en el presente estudio (Konopacka, 1998).

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 de los fitoquímicos (índole-3-carbinol, antraquinona y capsaicina) a ratones macho 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 previa de los fitoquímicos (índole-3-carbinol, antraquinona y capsaicina) 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: I3C (vehículo; agua inyectable) > I3C (vehículo; aceite de oliva) > antraquinona (vehículo; aceite de oliva) > antraquinona (vehículo; agua inyectable) > capsaicina (vehículo; aceite de oliva-dosis de 4µg/g) > capsaicina (vehículo; agua inyectable-dosis de 2µg/g).
- Al administrar la antraquinona y la capsaicina con el vehículo de aceite de oliva se aumentó la protección del daño al ADN, ya que se disminuyeron las frecuencias de MN con respecto a los valores observados cuando se usó el agua inyectable como vehículo, por lo que sugiere que la solubilidad y absorción son factores importantes en el efecto protector de estos fitoquímicos.
- La administración de los tratamientos de los fitoquímicos 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.

REFERENCIAS

- Adler I D, Bootman J, Favor J, Hook G, Schriever G, Welzl G, Whorton E, Yoshimura I y Hayashi M. (1998). Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutation Reserch*. 417: 19-30.
- Aggarwal B B, Shishodia S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*. 71: 1397– 1421
- Agrawal R C and Kumar S. (1998). Prevention of Cyclophosphamide-induced Micronucleus Formation in Mouse Bone Marrow by Índole-3-carbinol. *Food and Chemical Toxicology* 36: 975-977.
- Agrawal R C, Kumar S. (1999). Prevention of chromosomal aberration in mouse bone marrow by indole-3-carbinol. *Toxicology Letters* 106: 137–141.
- Ames B N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, Vol. 221, Issue 4617: 1256-1264.
- Anandakumar P, Kamaraj S, Jagan S, Ramakrishnan G, Vinodhkumar R, Devaki T. (2008). Capsaicin modulates pulmonary antioxidant defense system during benzo(a)pyrene-induced lung cancer in Swiss albino mice. *Phytother Reserch*. 22: 529-33.
- Arnao M B, Sanchez-Bravo J, Acosta M. (1996). Indole-3-carbinol as a scavenger of free radicals, *Biochem. Molecular Biology. Int*. 39: 1125–1134.
- Bailey M M., Sawyer R D, Behling J E, Boohaker J G, Hicks J G, O'Donnell M A, Stringer K R, Rasco J F, Hood R D. (2005). Prior exposure to indole-3-carbinol decreases the incidence of specific cyclophosphamide-induced developmental defects in mice. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 74(3):261-7.
- Baldwin W S, LeBlanc G A. (1992). The anti-carcinogenic plant compound indole-3-carbinol differentially modulates P450-mediated steroid hydroxylase activities in mice, *Chemico-Biological Interactions*. 83: 155–169.
- Bender M. (1980). Relationship of DNA lesion and their repair to chromosomal aberration production, en: Generoso W, Shelby F, De Serres F. *DNA repair and mutagenensis in aukaryotes* Plenum, New York. pp. 245-265.
- Block G, Patterson B, Subar A. (1992). Frutas, hortalizas, y la prevención del cáncer: Una revisión de la evidencia epidemiológica. *Nutrición y Cáncer*, 18(1), 1-29.
- Boller K, Schmid W. (1970) Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an *in vivo* test system. Hematological findings after treatment with trenimon. *Humangenetik*.11(1):35-54.

- Bonose-Crosnier B M, Nowik W, Tchaplá A, Heron S. (2011). Separation of 9,10-anthraquinone derivatives: Evaluation of C18 stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1218: 778–786.
- Boone C W, Kelloff G J, Malone W E. (1990). Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Research*, 50: 2-9.
- Boroto B J, Blanco J M A, Rivas P M, Hernández T M, Concepción L O, Trujillo S R. (2005). Meroterpenos (Antraquinonas) en diferentes partes de la Planta de *Morinda Royoc L.*, *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 36.
- Bronzetti G, Hayatsu H, De Flora S, Waters M D, Shankel D M. (1993) Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms 111, Plenum Press, New York, pp. 1-16. En: Dorette T H, Verhoeven H V, Goldbohm R A, Van den Brandt P A, Van Poppel G. (1997). A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. Mini review. *Chemico-Biological Interactions* 103: 79-129
- Brown J P. (1980). A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Research*, 75 (1980) 243--277
- Cole J, Skopek T. (1994). International commission for protection against environmental mutagens and carcinogenesis, working paper 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutation Res.* 304:33-106.
- Dae J K, Hwan S D, Byeongwoo A, Kang J S, Ki T N, Cheol B P, Cheul K K, Jin T H, Yun-Bae K, Young W Y, Dong D J, Ki-Hwa Y. (2003). Chemoprevention of colon cancer by Korean food plant components. *Mutation Research* 523–524: 99–107.
- Dashwood R H. (2002). Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutation Research* 511 : 89–112.
- De Flora, S. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.*, 402, 151-158.
- Diplock A T, Rice-Evans C A, Burdon R H. (1994). Is there a significant role for lipid peroxidation in the causation of malignancy and for antioxidants in cancer prevention. *Cancer Research Suppl.* 54: 1952–1956.
- Djamgoz M B A, Isbilen B. (2006). Dietary compounds as anti-cancer agents: a preliminary evaluation of ion channels and membrane excitability as possible target mechanisms. *Turkish Biochem.* 31: 57-68. En: Morán-Bañuelos S. H. (2008). Capsaicinoids in chile pepper landraces of Puebla, México. *Agrociencia* 42: 807-816.
- Dorette T H, Verhoeven H V, Goldbohm R A, Van den Brandt P A, Van Poppel G. (1997). A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. Mini review. *Chemico-Biological Interactions* 103: 79-129.

- 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.
- FDA. Food and Drug Administration (2000). IVC. 1 Short-Them test for genetic toxicity. Redbook.
- FDA. Food and Drug Administration. (2000) Redbook. IV.C.1.d. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. pp. 1-6.
- Fenech M, Crott J W. (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. *Mutat Reserch*. 504(1-2):131-6.
- Ferguson L R. (1994). Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. Review. *Mutation Research* 307: 395-410.
- García-Rodríguez M C, Altamirano-Lozano M A. (2001).Sales de sodio y cobre de la clorofila: usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígena. *TIP Revista especializada en Ciencias*.
- García-Rodríguez M C, Altamirano-Lozano M A. (2006) Estudios de los efectos de la clorofilina sobre la acción genotóxica y teratogena del cromo VI. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, FES Zaragoza, UNAM.
- Gow-Chin Y, Pin-Der D, Da-Yon C. (2000). Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chemistry* 70: 437-441.
- Greenwald P, Clifford C K, Milner J A. (2001). Diet and cancerprevention. *EuropeanJournal of Cancer*; 37: 948-965
- Grose K R, Bjeldanes L F. (1992). Oligomerization of indole-3-carbinol in aqueous acid. *Chemical Reserch Toxicology*. 5 (2):188-93.
- Halliwell B, Poulsen H. (2006). *Cigarette Smoke and Oxidative Stress*. Editorial Springer-Verlag. Berlin.
- Halliwell B, Murcia M A, Chirico S, Aruoma O I. (1995a). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 35: 7–20.
- Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma O I. (1995). The Characterization of Antioxidants . *Food Chemical. Toxicology*. Vol. 33, No. 7: 601-617.
- Halliwell B. Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and In Vivo. En: Enrique Cadenas, Lester Packer. *Handbook of Antioxidants*. Second edition. Ed. Marcel Dekker, Inc United States 2008
- Hayashi M, MacGregor J T, Gatehouse D G, Adler I, Blakey D H, Dertinger S D, Krishna G, Morita T, Russo A, Sutuo S. (2000). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35: 234–252.

- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M Jr. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Reserch.* 245:245–249.
- He Y-H, Friesen M D, Ruch R J, Schut A J.(2000). Indole-3-carbinol as a Chemopreventive Agent in 2-Amino-1-methyl-6- phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) Carcinogenesis: Inhibition of PhIP±DNA Adduct Formation, Acceleration of PhIP Metabolism, and Induction of Cytochrome P450 in Female F344 Rats. *Food and Chemical Toxicology* 38: 15-23.
- Heddle A, Hite M, Kirkhart M, Salamone F. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity , Ed. Elsevier Science publisher, 83: 165-1110.
- Hemmink K, Dipple A, Shuker D, Fadlubar F, Segerback D, Bartsch H. (1994). Adducts identification and biological significance. International Agency Research on Cancer Lyons. IARC Scientific Publications 125:478.
- Henkler F, Brinkmann J y Luch A (2010) The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis Induced by Metals and Xenobiotics .*Cancers* , 2: 376-396.
- Hernández-García D, Wood C D, Castro-Obregón S, Covarrubias L. (2010). Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radical Biology and Medicine.* 49(2):130-43.
- Hsueh-Yueh S, Shur-Hueih C, Chien-Chung C, Huei L. (1995). Emodin inhibits the mutagenicity and DNA adducts induced by 1-nitropyrene. *Mutation Research* 329: 205-212.
- Huang H C, Chang J H, Tung S F, Wu R T, Foegh M L. (1992). Immunosuppressive effect of emodin, a free radical generator. *European Journal of Pharmacology*, 211, 359-364.
- Huang H C, Lee C R, Lee C P D, Chen C C, Chu S H. (1991). Vaso relaxant effect of emodin, and anthraquinone from a Chinese herb. *Journal of Pharmacology*, 205, 289-294.
- Hyung S K, Kacew S, Lee B M. (1999). In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (Aloe barbadensis Miller, Lentinus edodes, Ganoderma lucidum and Coriolus versicolor) *Carcinogenesis*20: 1637-1640.
- IARC (1972–2004). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vols 1–80. International Agency for Research on Cancer: Lyon.
- Jyu H N, Pei H M, Lee H. (1995). Structure-activity relationships of anthraquinones as inhibitors of 7-ethoxycoumarin O-deethylase and mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5f]quinolinoline. *Mutation Research* 328: 183-191.
- Kada T. (1984). Environmental desmutagens and antimutagenic agents. *Environ. Mut;* 240:135-151. En: Arrebola D. F. A. Las plantas, fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. *RETEL* 2003; 37-51.
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M , Albertini S, Eastmond D, Fenech M ,Ishidate M Jr., Kirchner S, Lorge E, Morita T , Norppa H, Surrallés J, Vanhauwaert A, Wakata A. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Reserch.* 540(2):153-63.

- Kogure K, Goto S, Nishimura M, Yasumoto M, Abe K, Ohiwa C, Sassa H, Kusumi T, Terada H. (2002). Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *Biochim Biophys Acta*; 1573(1):84-92.
- Kohimeier L, Simonsen N y Mottus K. (1995) Dietary Modifiers of Carcinogenesis. *Environmental Health perspectives*. 103: 177-184.
- Kojima T, Tanaka T, Mori H.(1994). Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donryu rats by dietary indole-3-carbinol. *Cancer Res*. 54(6):1446-9.
- Konigsberg M. Radicales libres y Estrés Oxidante. Ed. El manual moderno. México. 2008
- 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.
- Krishna D A, Agarwal K, Mukherjee A, Sengupta D. (1995). Environmental Mutagenesis Inhibition by capsaicin against cyclophosphamide-induced clastogenicity and DNA damage in mice. *Mutation Research* 335: 253-258.
- Krishna G, Nath J y Ong T. (1986) Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C Inhibition *Cancer Res*; 46:2670-2674.
- Kuroda Y, Shankel D M. (1990), M.D. Waters (Eds.), *Proceedings of the 2nd International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis*, Plenum Press, New York , pp. 1–22. En. Roderick H. Dashwood (2002). *Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models*. *Mutation Research* 511: 89–112
- Kuroda Y, Naoko S, Kazunaga Y, Kazuhiko K. (2001). Desmutagenic and bio-antimutagenic activity of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in cultured Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research* 497: 123–130.
- Lee B M, Lee S K, Kim H S. (1998). Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (Vitamin E, Vitamin C, beta-carotene and red ginseng, *Cancer Lett*. 132: 219–227.
- Lee I O, Lee K H, Pyo J H, Kim J H, Choi Y J, Lee Y C. (2007). Anti-inflammatory effect of capsaicin in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Helicobacter*, 12(5):510-7.
- Lee M B, Kwang-Kyun P, 2003. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents Review. *Mutation Research* 523–524 , 265–278
- Li Y, Luan Y, Qi X , Li M, Gong L , Xue X, Wu X , Wu Y, Chen M, Xing G , Yao J, Ren J . (2010). Emodin Triggers DNA Double-Strand Breaks by Stabilizing Topoisomerase II-DNA Cleavage Complexes and by Inhibiting ATP Hydrolysis of Topoisomerase II. *Toxicology Science*. 118 :435-43.

- Li Y, Li X, Fazlul H S. (2003). Gene Expression Profiles of I3C- and DIM-Treated PC3 Human Prostate Cancer Cells Determined by cDNA Microarray Analysis. American Society for Nutritional Sciences. 1011-1019.
- 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.
- Mavournin K H, Blakey D H, Cimino M C, Salamone M F, Heddle J A. (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Reserch*. 239(1):29-80.
- Maxwell S R, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter M A, Thorpe G H, *et al.* (1997). Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Annual Clinical. Biochemistry*. 34(6):638-44.
- Miller CH, Zhang Z, Hamilton SM, Teel RW. (1993). Effects of capsaicin on liver microsomal metabolism of the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett.*;75:45-52.
- Modly C E, Das M, Don P S, Marcelo C S, Mukhtar H, Bickers DR. (1986). Capsaicin as an *in vitro* inhibitor of benzo[a]pyrene metabolism and its DNA binding in human and murine keratinocytes. *Drug Metabolism. Diposition*. 14: 413–416.
- Morán-Bañuelos S H. (2008). Capsaicinoids in chile pepper landraces of Puebla, México. *Agrociencia* 42: 807-816.
- Mueller S O, Stopper H. (1999) Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica* 1428:406-414
- Müller L., Kikuchi Y., Probst G., Schechtman L., Shimada H., Sofuni T. and Tweats D. (1999). ICH-harmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution reasoning and impact. *Mutation Research*. 436:195-225.
- Murcia T M A. (2001). Importancia de las frutas como alimentos con alta actividad antioxidante. *Memorias del V Congreso Internacional Alimentación, Nutrición y Dietética, Madrid* 14, 15 y 16 de noviembre. Páginas: 33-36.
- Nacional Cancer Institute. U.S National institutes of health (2010). www.cancer.gov.
- O'Brien C S, Patierni S. (2003) Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms *Mutation Research* 533: 3–36.
- Oganesian A, Hendricks J D, Williams D E. (1997). Long term dietary indole-3-carbinol inhibits diethylnitrosamineinitiated hepatocarcinogenesis in the infant mouse model. *Cancer Letters* 118: 87-94.
- Oyagbemi A A, Saba A B, Azeez O I. (2010). Capsaicin: a novel chemopreventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action. *Indian Journal Cancer*; 47:53-8.

- 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.
- Paolini M, Mesirca R, Pozzetti L, Gialluca N, Bauer C, Biagi G L, Cantelli-Forti G. (1998). Cancer chemoprevention: some complications and limitations, *Cancer Detect. Prev.* 22: 68–74.
- Peto R, Doll R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* Jun; 66(6):1191-308.
- Powis G. (1989). Free radical formation by antitumor quinones. *Free Rad. Biol. Med.*; 6: 63-101. Citado en: D'Errico María Lucía, *et. al.*, (2000). Efectos toxicos de Rheina y Naftazarina en neutrofilos humanos in vitro. Vol 4 N° 1
- Reitter R J. (1995). Oxidative processes and antioxidative mechanisms. *FASEB J*; 9:256-33.
- Sakai R. (1989). Epidemiologic survey on lung cancer with respect to cigarette smoking and plant diet. *Jpn J Cancer Res.* 80: 513-20.
- Salnikow K, Zhitkovich A. (2008). Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic and Chromium. *Chem Res Toxicol.* January ; 21(1): 28–44.
- Sayago A, Marín M, Aparicio I, Morales R, María T. (2007) Vitamina E y aceites vegetales. *GRASAS Y ACEITES*, 58 (1), 74-86.
- Schmid W, V. Ledbur M. (1973). The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Res.* 19: 109-117.
- Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy Y S R, De B. (2010) Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 3:91-100.
- Sepkovic D W, Stein J, Carlisle A D, Ksieski H B, Auburn K, Bradlow H L. (2009). Diindolylmethane inhibits cervical dysplasia, alters estrogen metabolism, and enhances immune response in the K14-HPV16 transgenic mouse model. *Cancer Epidemiol Biomarkers rev.* 18(11):2957-64.
- Shin C Y, Shin J, Kim B M, Wang M H, Jang J H, Surh Y J, Oh U. (2003). Essential role of mitochondrial permeability transition in vanilloid receptor 1-dependent cell death of sensory neurons. *Molecular Cellular Neuroscience.* 24, 57–68.
- Simic D , Vukovic-Gacic B, Knezevic-Vukcevic J. (1998). Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mutation Research* 402 1998 51–57
- Snow E T. (1991). A possible role for chromium (III) in genotoxicity. *Environmental. Health Perspective.* 92, 75–81.

- Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan PP, Srinivas P. (2007). Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Med Res Rev.* 27(5):591-608.
- Srivastava B, Shukla Y. (1998). Antitumour promoting activity of indole-3-carbinol in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Letters* 134: 91-95.
- Stan S D, Shivendra V S, Randall E M. (2010). Chemoprevention strategies for pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7: 347-356.
- Steinmetz K A, Potter J D. (1991). Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes & Control*, 2: 325-357.
- Steinmetz K A, Potter J D. (1996). Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention: A Review. *Journal of the American Dietetic Association*. Vol. 96, Issue 10, Pages 1027-1039.
- Su H S, Young-Sam K, Hyo-Joung S, Kyung-Soo C, Sang S L, Young-Joon S. (2001) Capsaicin suppresses phorbol ester-induced activation of NF-kB/Rel and AP-1 transcription factors in mouse epidermis. *Cancer Letters* 164:119-126.
- Surh Y J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* 3: 768–780.
- Surh Y J, Lee S S. (1995). Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sci.* 56: 1845-55.
- Surh Y J, Ferguson L. (2003) Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential highlights of a symposium *Mutat. Res.* 523-524: 1-8.
- Tachino N, Dexin G, Dashwood W M, Shane Y R L, Dashwood R. (1994). Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: Studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. *Mutation Research* 308: 191-203.
- Takahashi N, Dashwood R H, Bjeldanes L F. (1995). Mechanisms of Indole-3-Carbinol (I3C) Anticarcinogenesis: Inhibition of Aflatoxin B1-DNA Adduction and Mutagenesis by I3C Acid Condensation Products. *Food Chemical Toxicology*. Vol. 33: 851-857.
- Teel R W. (1991). Effects of capsaicin on rat liver S9-mediated metabolism and DNA binding of aflatoxin. *Nutrition Cancer*. 15:27-32.
- Thiidus P. (1991). Effects of vitamine E deprivation and training on indices of tissue lipid peroxidation in rats. *Med. Sci. Rep. Exerc.*; 23:221.
- Thomas J A. (1994). Oxidative stress, oxidant defense and dietary constituents. *Modern nutrition of healt and disease*. 8ed. Wilians and Wilkins; Philadelphia:501-12.
- Valko M, Rhodes C J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1–40.

- Vallarino-Kelly T, Morales-Ramírez P. (2001) Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast in vivo. *Mutation Research* 495 51–59.
- Vitale A, Bernatene E y Pomilio A. (2010) Carotenoides en quimioprevención: Licopeno. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 44 (2): 195-238.
- Walters D G, Young P J, Agus C, Knize M G, Boobis A R, Gooderham N J, Lake B G. (2004). Cruciferous vegetable consumption alters the metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in humans. *Carcinogenesis.* 25(9):1659-69.
- Wattenberg L W. (1985). Chemoprevention of Cancer, *Cancer Research*;45:1-8.
- Wayner D D M, Joyce A, Ingold K U, Locke S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters*; 187:2090-5.
- Zhang Z, Huynh H, Teel R W. (1997). Effects of orally administered capsaicin, the principal component of capsicum fruits, on the in vitro metabolism of the tobacco-specific nitrosamine NNK in hamster lung and liver microsomes. *Anticancer Research.* 17 (2A) :1093-8.
- Zhitkovich A. (2005). Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium (VI). *Chemical Research Toxicology*, 18, 3–11.
- Zorrilla-García A E. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Revista Cubana Investigación Biomédica.* 21: 178-185.

10. ANEXOS

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

Evento: VI Foro de Investigación Escolar En Biología.

Título de la ponencia: "ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DEL INDOLE-3-CARBINOL, LA ANTRAQUINONA Y LA CAPSAICÍNA SOBRE LAS FRECUENCIAS DE MICRONÚCLEOS INDUCIDOS POR EL TRIÓXIDO DE CROMO EN RATONES DE LA CEPA CD-1".

Autores: Nancy Sánchez Nájera Y Ma. del Carmen García Rodríguez.

Organizador: La carrera de biología de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM.

Lugar y fecha: Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM. México D. F. del 11 al 13 de agosto de 2010.

Tipo de participación: Ponente.

Evento: "Annual Meetings Society For Free Radical Research (Europe) "Free Radicals and the Environment" and The European Environmental Mutagen Society (EEMS) "Environmental Mutagenesis In The North"

Título de la ponencia: "Effects of indole-3-Carbinol on genotoxicity of hexavalent chromium (CrO_3) in mice *in vivo*".

AUTORES: GARCÍA-RODRÍGUEZ MC, SÁNCHEZ-NÁJERA N, LÓPEZ-SALINAS GV, MENDOZA-NÚÑEZ VM.

Organizador: Society for Free Radical Research (SFRR Europe) y The European Environmental Mutagen Society (EEMS)

Lugar y fecha: Oslo, Noruega. Del 11 al 13 de agosto de 2010.

Tipo de participación: Coautor.

Evento: XIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

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.

Organizador: La Universidad Autónoma de Zacatecas.

Lugar y fecha: Zacatecas, Zacatecas, México. Celebrado del 26 al 27 de mayo de 2011.

Tipo de participación: Ponente.

Evento: VII Congreso de Investigación y I de Posgrado de la FES ZARAGOZA.

Título de la ponencia: efecto de los fitoquímicos presentes en la dieta (ácido ascórbico, alfa tocoferol, beta caroteno, indole-3-carbinol, antraquinona y capsaicina) sobre la frecuencia de micronúcleos inducidos por el trióxido de cromo en ratones de la cepa CD-1.

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

Organizador: La carrera de biología de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM.

Lugar y fecha: Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”, UNAM. México D. F.
del 25 al 28 de octubre de 2011.

Tipo de participación: Ponente.

Los resultados del presente trabajo fueron incluidos en la siguiente publicación internacional:

Publicación: Annual Meetings Society for Free Radical Research (Europe) “Free Radicals and The Environment” and The European Environmental Mutagen Society (EEMS) “Environmental Mutagenesis in The North”

Título: “Effects of indole-3-carbinol on genotoxicity of hexavalent chromium (CrO₃) in mice *in vivo*”.

Autores: García-Rodríguez MC, Sánchez-Nájera N, López-Salinas GV, Mendoza-Núñez VM.

Editorial: GRØSET NORDIC ECOLABEL.

ISBN DOCUMENTO IMPRESO: 978 82 8082 428 8.

ISBN ELECTRÓNICO: 978-82-8082-429-5.

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,
XXIX 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.

¡Trabajos con reconocimiento!

Hacer clic en un trabajo para ver su resumen.



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



ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DEL INDOLE-3-CARBINOL, LA ANTRAQUINONA Y LA CAPSAICINA SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS INDUCIDOS POR EL TRIÓXIDO DE CROMO RATONES CD-1

Nancy Sánchez Najera¹ y Ma. del Carmen García-Rodríguez²

Modalidad Ciclo

Por favor marque con una x

X	Oral		Básico
	Cartel		Intermedio
	Video	X	Terminal

Resumen:

Se ha descrito que la dieta humana está compuesta de agentes con propiedades antimutágenas y anticancerígenas. Los mecanismos descritos de protección son: 1) modulación de enzimas, 2) actividad antioxidante, 3) inhibición de la formación de aductos, 4) inhibición de la activación de oncogenes y 5) modulación de la cascada de señalización asociados a la carcinogénesis. Particularmente, se ha observado que compuestos como el indole-3-carbinol (que se encuentra en los crucíferos), la antraquinona (componente de plantas del género aloe) y la capsaicina (compuesto que le da el sabor picante a los chiles), están relacionados con una posible prevención de la inducción del cáncer, por lo que en el presente estudio se evaluaron los efectos de indole-3-carbinol, la capsaicina y la antraquinona sobre el daño al ADN inducidos por CrO₃ (agente cancerígeno), mediante las evaluaciones de las frecuencias de micronúcleos (MN). Ratones de la cepa CD-1 fueron tratados con indole-3-carbinol (100 mg/kg), capsaicina (2 mg/kg) y antraquinona (20 mg/kg) antes de administrar CrO₃ (20 mg/kg). Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos. En los resultados obtenidos se observó que el indole-3-carbinol presentó una mayor disminución en el número de MN (100%) en comparación de los otros compuestos administrados, siendo la capsaisina la que presentó la menor protección del daño al ADN (alrededor del 50%). El hecho de que el cromo (VI) induzca daño al ADN mediante la generación de radicales de oxígeno durante su reducción a Cr (III), sugiere que el posible mecanismo de protección de los compuestos empleados en el estudio sea a través de la captura de radicales libres. *Proyecto financiado por PAPIIT IN209309.*

Palabras clave: (3-5 palabras)

Indole-3-carbinol, antraquinona, capsaicina, micronúcleos, antimutágenos.

Programme & Abstracts

Annual Meetings

Society for Free Radical Research (SFRR Europe)

"Free Radicals and the Environment"

September 12-15th



The European Environmental Mutagen Society (EEMS)

"Environmental Mutagenesis in the North"

September 15-18th



2010

Oslo

Norway



and 2.5 µg/mL), doxorubicin (0.5 µg/mL), or both, for 24h. Afterwards, cells were stained with Annexin V-FITC and PI (propidium iodide) and analyzed by flow cytometry. The combination of Annexin V-FITC with PI was performed to identify early apoptotic cells (annexin V + / PI -) and necrotic cells (annexin V + / PI +). Cells treated with bixin presented increased frequency of apoptosis. Doxorubicin also induced apoptotic cell death, but a significant increase in the number of necrotic cells was observed when compared to the negative control. It is known that doxorubicin can induce apoptosis in particular conditions of doses and treatments; however, in our study it was observed that doxorubicin induced a higher frequency of necrosis in HL60 cells. The simultaneous treatment of HL60 cells with bixin and doxorubicin increased the frequency of apoptotic and necrotic cells when compared to doxorubicin treatment. These results suggest that doxorubicin induces cell death by necrosis, but when combined with bixin there is a tendency to cause apoptosis. According to these results, we suggest that bixin increases the frequency of cell death induced by doxorubicin in HL60 cells, which would be of great relevance in clinical practice, since doxorubicin treatment may be limited by drug resistance. Further studies are being conducted in our laboratory to evaluate the activity of bixin in normal cells and to determine its cellular selectivity.

Financial support: CNPq.

Poster presentation P190

EEMS

EFFECT OF INDOLE-3-CARBINOL ON GENOTOXICITY OF HEXAVALENT CHROMIUM (CrO3) IN MICE IN VIVO

M. C. García-Rodríguez¹; N. Sanchez-Najera¹; G. V. López-Salinas¹; V. M. Mendoza-Núñez²

¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, PO Box 9-020, C.P. 15000, D.F., México; ²Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" UNAM, PO Box 9-020, C.P. 15000, D.F., México

Presenting author: M. C. García-Rodríguez; grmc@puma2.zaragoza.unam.mx

The human diet is composed of many natural chemopreventive agents. The vast majority of chemopreventive blocking agents have been assigned to one or more of the following categories: enzyme inhibitors, enzyme inducers, and phase II metabolizing enzyme inducers. Indole-3-carbinol is found in edible cruciferous vegetables and has been reported to inhibit tumorigenesis in various animal models. Several possible chemopreventive mechanisms of protection by indole-3-carbinol that have been suggested are via inhibition of glutathione S-transferase-mediated steroid binding activity, modulation of multidrug resistance activity, alteration of the expression of various phase I and II drug metabolizing enzymes and as scavenger of free radicals [1]. As part of our research program to evaluate chemopreventive or chemoprotective potential components of diet, in the present study, the ability of indole-3-carbinol to reduce the micronucleous (MN) induction by CrO₃ in peripheral blood polychromatic erythrocytes of mice was evaluated. Mice (CD-1) were treated with indole-3-carbinol (100 mg/kg), CrO₃ (20 mg/kg) or with both compounds. The indole-3-carbinol and CrO₃ were administrated intraperitoneally. DNA damage was evaluated by the analysis of MN using the acridine orange technique. Blood samples were obtained from the tail vein at 0, 24, 48 and 72 h after treatment. The results obtained in present

303

and 2.5 µg/mL), doxorubicin (0.5 µg/mL), or both, for 24h. Afterwards, cells were stained with Annexin V-FITC and PI (propidium iodide) and analyzed by flow cytometry. The combination of Annexin V-FITC with PI was performed to identify early apoptotic cells (annexin V + / PI -) and necrotic cells (annexin V + / PI +). Cells treated with bixin presented increased frequency of apoptosis. Doxorubicin also induced apoptotic cell death, but a significant increase in the number of necrotic cells was observed when compared to the negative control. It is known that doxorubicin can induce apoptosis in particular conditions of doses and treatments; however, in our study it was observed that doxorubicin induced a higher frequency of necrosis in HL60 cells. The simultaneous treatment of HL60 cells with bixin and doxorubicin increased the frequency of apoptotic and necrotic cells when compared to doxorubicin treatment. These results suggest that doxorubicin induces cell death by necrosis, but when combined with bixin there is a tendency to cause apoptosis. According to these results, we suggest that bixin increases the frequency of cell death induced by doxorubicin in HL60 cells, which would be of great relevance in clinical practice, since doxorubicin treatment may be limited by drug resistance. Further studies are being conducted in our laboratory to evaluate the activity of bixin in normal cells and to determine its cellular selectivity.

Financial support: CNPq.

Poster presentation P190

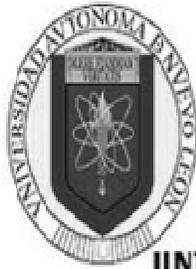
EEMS

EFFECT OF INDOLE-3-CARBINOL ON GENOTOXICITY OF HEXAVALENT CHROMIUM (CrO₃) IN MICE IN VIVO

M. C. Garcia-Rodríguez¹, N. Sanchez-Najera¹, G. V. López-Salinas¹, V. M. Mendoza-Núñez²
¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, PO Box 9-020, C.P. 15000, D.F., México; ²Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" UNAM, PO Box 9-020, C.P. 15000, D.F., México
Presenting author: M. C. Garcia-Rodríguez: grmc@puma2.zaragoza.unam.mx

The human diet is composed of many natural chemopreventive agents. The vast majority of chemopreventive blocking agents have been assigned to one or more of the following categories: enzyme inhibitors, enzyme inducers, and phase II metabolizing enzyme inducers. Indole-3-carbinol is found in edible cruciferous vegetables and has been reported to inhibit tumorigenesis in various animal models. Several possible chemopreventive mechanisms of protection by indole-3-carbinol that have been suggested are via inhibition of glutathione S-transferase-mediated steroid binding activity, modulation of multidrug resistance activity, alteration of the expression of various phase I and II drug metabolizing enzymes and as scavenger of free radicals [1]. As part of our research program to evaluate chemopreventive or chemoprotective potential components of diet, in the present study, the ability of indole-3-carbinol to reduce the micronucleous (MN) induction by CrO₃ in peripheral blood polychromatic erythrocytes of mice was evaluated. Mice (CD-1) were treated with indole-3-carbinol (100 mg/kg), CrO₃ (20 mg/kg) or with both compounds. The indole-3-carbinol and CrO₃ were administrated intraperitoneally. DNA damage was evaluated by the analysis of MN using the acridine orange technique. Blood samples were obtained from the tail vein at 0, 24, 48 and 72 h after treatment. The results obtained in present

303



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
Organizan el:

XIII CONGRESO **NACIONAL**



DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
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 TRÍOXIDO 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.

* grmc@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-carbinol (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-carbinol, 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.

INTRODUCCIÓN

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 (Peto y Doll, 1981, Sen, *et al.*, 2010). En contraparte, en estudios epidemiológicos se ha observado que los componentes de frutas y vegetales están son un factor importante en la modulación de enfermedades relacionadas con el daño al ADN y algunos tipos de cáncer (Surh, 2003). El estudio de sustancias con propiedades antimutágenas está relacionado con los agentes anticancerígenos, ya que los mecanismos de acción inhibitoria pueden estar relacionados (Simic, *et al.*, 1998). Dada la actividad antioxidante de algunos componentes de la dieta, se ha propuesto como principal mecanismo de protección la inhibición del estrés oxidante, ya que pueden evitar la formación, propagación y aumento de radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (ERO's) (Gonzales *et al.*, 2000). De ahí que se proponga que el consumo de antioxidantes puede estimular los mecanismos endógenos (activación de enzimas) y proteger al material genético del daño causado por agentes mutágenos y cancerígenos oxidantes (García-Rodríguez, *et al.*, 2010). Algunos de los antioxidantes exógenos que han sido identificados son el α -tocoferol que se encuentra principalmente en aceites vegetales, en las partes verdes de algunas plantas y en el tejido adiposo de los animales (Sayago *et al.*, 2007); el β -caroteno que se encuentra en zanahorias, pimiento morrón, espinacas y calabaza entre otros (National Cancer Institute, 2010); el indole-3-carbinol (I3C) que se encuentra en los vegetales crucíferos como la col, la coliflor, la col de bruselas y el brócoli (Oganessian, *et al.*, 1997); el ácido ascórbico que se le puede encontrar principalmente en el pimiento morrón, los cítricos (Halliwell y Poulsen, 2003); la antraquinona que se encuentra en las familias de plantas *Rubiaceae*, *Rhamnaceae*, *Polygonaceae* y *Leguminoceae* (Boroto, 2005) y la capsacina que la contienen los pimientos del género *Capsicum*, que son los que le dan el sabor "pico" a los alimentos (Morán-Bañuelos, 2003). En contraparte, a los compuestos de cromo (VI) se les ha relacionado con daño genotóxico y con la inducción de cáncer, ya que durante la reducción del cromo (VI) en las células genera especies reactivas de oxígeno (ERO's), que contribuyen al daño al ADN y por lo tanto a la actividad carcinógena (Wu *et al.*, 2000). En el presente trabajo se estudió el posible efecto protector de los fitoquímicos con propiedades antioxidantes frente a sustancias ampliamente reconocidas como inductores de daño genotóxico (inducción de MN) y cancerígeno, como el Cr_3 para lo cual se emplearon ratones *in vivo* de la cepa CD-1 como modelo.

METODOLOGÍA

Se emplearon ratones de la cepa CD-1 (8-10 semanas), obtenidos del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Se mantuvieron bajo condiciones estériles, con temperatura y humedad controladas, fotoperiodo de 12-12 horas y libre acceso al agua. Se conformaron grupos experimentales de 5 ratones, divididos de la siguiente forma: a) Grupo testigo (solo se le administró el vehículo); b) Grupo fitoquímicos, a los cuales se les administró por vía oral α -tocoferol (20mg/kg); β -caroteno (50mg/kg) o antraquinona (20mg/kg) y por vía

intraperitoneal ácido ascórbico (100mg/kg); indole-3-cairbinol (100mg/kg) o capsaicina (2mg/kg); c) Grupo CrO₃ se le aplicaron 20mg/kg por vía i.p.; y d)

Grupo experimental, en el cual se administraron los tratamientos combinados de los fitoquímicos previo a la aplicación del CrO₃, utilizando las mismas dosis y vías de los grupos anteriormente mencionados. Para la evaluación del daño al ADN se siguió la técnica de Micronúcleos propuesta por Hayashi *et al.* (1990). Se prepararon laminillas cubiertas con naranja de acridina. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena caudal y se guardaron en una caja de plástico en la oscuridad a 4 °C durante mínimo 12 horas. Las evaluaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia. Se cuantificaron los eritrocitos policromáticos con formación de MN (EPC- MN) en 2000 eritrocitos policromáticos (EPC) por ratón; y para la evaluación de la citotoxicidad se cuantificó la frecuencia de EPC de 1000 eritrocitos totales. 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 observó que la administración sola de los fitoquímicos (la antraquinona, el indole-3-carbinol, el ácido ascórbico, el α -tocoferol, la capsaicina y el β -caroteno) no incrementa la frecuencia de MN, con respecto al grupo testigo, lo que sugiere que éstos compuestos *per se* no causan daño al ADN. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en estudios previos, ya que incluso se ha asociado el consumo de frutas y verduras con la baja incidencia de algunos tipos de cáncer y otras enfermedades (Aggarwal y Shishodia, 2006). También, se ha observado que la administración en humanos como tratamientos experimentales anticancerígenos de estos fitoquímicos en dosis altas no induce efectos tóxicos aparentes (Levine *et al.*, 1996).

Por su parte, la administración de CrO₃ indujo la formación de MN de forma estadísticamente significativa al compararlo con el grupo testigo, lo que corrobora su actividad genotóxica. Cuando se administraron los tratamientos combinados se disminuyeron las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO₃. En el caso de la antraquinona la disminución fue del 77%, estos datos pueden estar relacionados con lo observado por Hsueh-Yueh *et al.* (1995) quienes atribuyen su efecto protector sobre agentes mutágenos (prueba de Ames) a su capacidad para suprimir y/o bloquear éstos agentes. Takahashi *et al.* (2001) usando el ensayo de reparación de ADN *in vivo* con *Drosophila*, observaron que la antraquinona suprime el daño al ADN por inactivación enzimática. Con relación al I3C también se observó una disminución del 72% en la frecuencia de MN al comparar con el grupo CrO₃, estos datos pueden estar relacionados con lo reportado por Verhoeven *et al.* (1997) quienes en modelos *in vitro* e *in vivo*, observaron un efecto anticancerígeno del I3C, al igual que Li *et al.* (2003) quienes al estudiar en modelos *in vitro* también observaron la inhibición del crecimiento de células cancerosas de próstata. Cuando se administraron los tratamientos del ácido ascórbico y del α -tocoferol se presentaron disminuciones de las frecuencias de MN del 57% y del 48% respectivamente, lo cual apoya el efecto protector de estos fitoquímicos mismos que en estudios previos ya habían sido reportados como antimutágenos debido a su potencial antioxidante (Konopacka *et al.* 1998;

Xu, 2003). El tratamiento de la capsaicina presentó una menor protección del daño al material genotóxico con relación a los otros fitoquímicos estudiados en el presente trabajo, ya que la disminución de las frecuencias de MN fue del 26%, en

estudios previos realizados con ratones se habían encontrado una inhibición de aberraciones cromosómicas y rompimientos de ADN (Krishna *et al.* 1995). Particularmente, el tratamiento de β -caroteno mostró un efecto dual, ya que a la hora 24 se disminuyó la frecuencia de MN y a la hora 72 se incrementó la frecuencia de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 , esto puede atribuirse al carácter que los β -caroteno pueden actuar como antioxidante y prooxidante (Dias *et al.*, 2009).

Con respecto al daño citotóxico, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos (evaluado mediante las frecuencias de EPC con respecto a las frecuencias de ENC), por lo que se infiere que ninguno de los tratamientos presentó efectos citotóxicos, aunque, este parámetro debe tomarse con restricción debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, al mismo tiempo puede activar los mecanismos de división y enmascarar dicho efecto (Krishna *et al.* 2000).

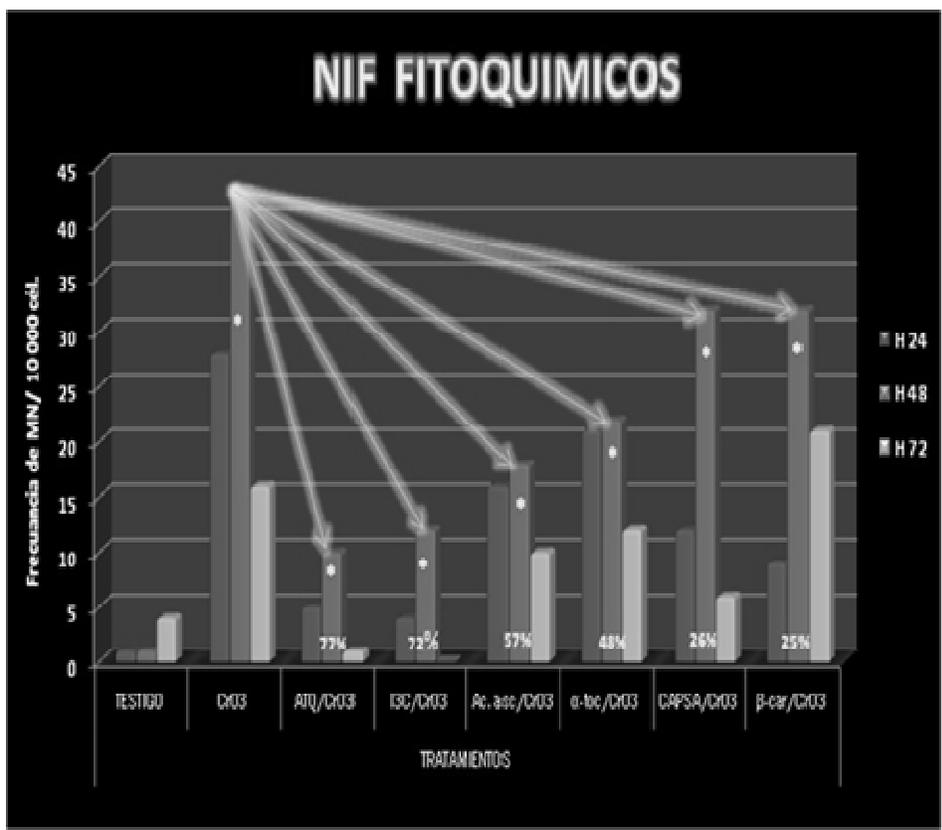


Figura 1. Análisis de NIF por tiempo y por grupo, calculado para 10 000 EPC cuando se administraron tratamientos de fitoquímicos y sus combinaciones con CrO_3 . Estadísticamente significativo $p < 0.05$

CONCLUSIONES

1. La administración de 20 $\mu\text{g/g}$ de CrO_3 por *vía i.p.* incrementa la frecuencia de MN de manera estadísticamente significativa, lo cual corrobora el daño genotóxico del compuesto.
2. La administración de la antraquinona, el indole-3-carbinol, el ácido ascórbico, el α -tocoferol, la capsaicina y el β -caroteno administrado a ratones de la cepa CD-1 por diferentes vías no presenta efecto genotóxico, al no incrementar de manera estadísticamente significativa la frecuencia de MN.
3. La administración previa de los fitoquímicos al CrO_3 muestra una disminución en la frecuencia de MN a la hora 48 en el siguiente orden: antraquinona (77%) > indole-3-carbinol (73%) > ácido ascórbico (57%) > α -tocoferol (48%) > capsaicina (26%) > β -caroteno (25%), lo que sugiere que los fitoquímicos protegen del daño al material genético inducido por el CrO_3 .

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), mediante la DGAPA con el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), No. de Proyecto IN209309. También agradecemos al M. en C. Alejandro Gordillo Martínez por su apoyo técnico y por las sugerencias en la revisión del trabajo.

REFERENCIAS

- Aggarwal Bharat B, Shishir Shishodia. 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*. 71: 1397– 1421
- Agrawal RC, Kumar S. 1998. Prevention of cyclophosphamide-induced micronucleus formation in mouse bone marrow by indole-3-carbinol. *Food. Chem. Toxicol.* 36(11):975-7.
- Borroto Blanco Janetsy, María A. Blanco Jerez, Maribel Rivas Paneca, Martha, Hernández de la Torre, Oscar Concepción Laffite, Reinaldo Trujillo Sánchez. 2005. Meroterpenos (Antraquinonas) en diferentes partes de la Planta de *Morinda Royoc L.*, Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 36, No. Especial.
- Dias CD, Araújo BC, Dutra ES, Nepomuceno JC. 2009. Protective effects of β -carotene against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Res.* 8 (4): 1367-1375.
- García-Rodríguez MC, Serrano-Reyes G., Altamirano-Lozano M. 2010. Efecto de las vitaminas (ácido ascórbico, alfa-tocoferol) y del beta-caroteno (precursor de la vitamina a) sobre el material genético. Memorias del XII congreso nacional de ciencia y tecnología de alimentos. Mayo de 2010. Gto. México.
- 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 Químico- Biológicas. 4: 77-86.

-García-Rodríguez M.C., Lopez-Santiago V. and Altamirano-Lozano M. 2001. Effect of Chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Res.* 496: 145-151.

- Halliwell B y Poulsen H. 2006. Cigarette Smoke and Oxidative Stress. Editorial Springer-Verlag. Berlin.

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

-Hsueh-Yueh S, Shur-Hueih C, Chien-Chung C, Huei L. 1995. Emodin inhibits the mutagenicity and DNA adducts induced by 1-nitropyrene. *Mutat. Res.* 329:205-212.

-Konopacka M, WideL M, Rzeszowka-Wolny J. 1998. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutat. Res.* 417(2-3):85-94.

-Krishna A, Agarwal K, Mukherjee A, Sengupta D. 1995. Inhibition by capsaicin against cyclophosphamide-induced clastogenicity and DNA damage in mice. *Mutat. Res.* 335: 253-258.

-Krishna G, Hayashi M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* 455(1-2):155-66.

-Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, Park JB. 1996. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *PNAS* vol. 93 no. 8 3704-3709.

-Li Y, Li X and Fazlul, Sarkar FH. 2003. Gene Expression Profiles of I3C- and DIM-Treated PC3 Human Prostate Cancer Cells Determined by cDNA Microarray Analysis. *J. Nutr.* 133(4):1011-9.

-Morán-Bañuelos S. Hirán 2008. Capsaicinoids in chile pepper landraces of Puebla, México. *Agrociencia* 42: 807-816.

-Nacional Cancer Institute. U.S National institutes of health. 2010. www.cancer.gov.

-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

-Oganesian Aram, Jerry D. Hendricks, David E. Williams. 1997. Long term dietary indole-3-carbinol inhibits diethylnitrosamine initiated hepatocarcinogenesis in the infant mouse model. *Cancer Letters* 118: 87-94.

-Peto R., Doll R. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer. Inst.* Jun; 66(6):1191-308.

-Sayago A, Marín M, Aparicio I, Morales R y María T. 2007. Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceites.* 58 (1) 74-86,

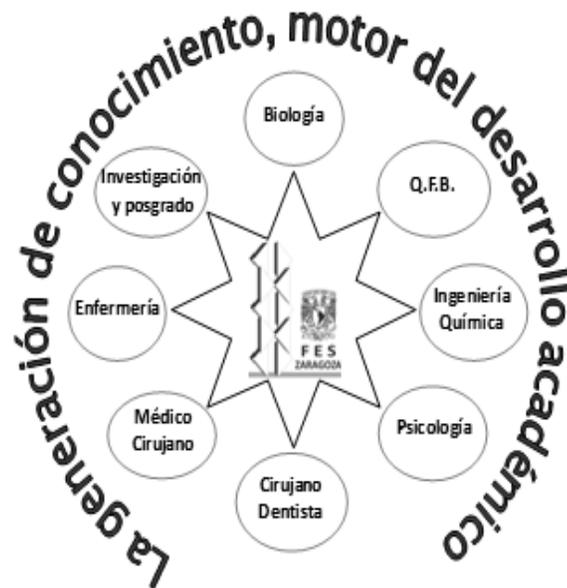
-Sen Saikat, Raja Chakraborty, C. Sridhar, Y. S. R. Reddy, Biplab De. 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* Volume 3, Issue 1, July – August; Article 021, Pages: 91-100.

-Simic Draga, Branka Vukovic-Gacic, Jelena Knezevic-Vukcevic. 1998. Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mutat. Res.* 402 51-57

-Surh Y. J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* 3: 768-780

- Takahashi E, Marczylo TH, Watanabe T, Nagai S, Hayatsu H, Negishi T. 2001. Preventive effects of anthraquinone food pigments on the DNA damage induced by carcinogens in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 480-481:139-45.
- Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA, van den Brandt PA, van Poppel G. 1997. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem. Biol. Interact.* 103(2):79-129.
- Xu Xiang-Rong, Hua-Bin Li, Xiao-Yan Li b, Ji-Dong Gu. 2004. Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid. *Chemosphere* 57 609–613.

VII CONGRESO DE INVESTIGACIÓN Y I DE POSGRADO DE LA FES ZARAGOZA



OBJETIVOS

- Difundir los trabajos de investigación en las Ciencias Químico-Biológicas, de la Salud y del Comportamiento.
- Estimular la vinculación Pregrado-Posgrado a través del acercamiento de los grupos de investigación para potenciar y fortalecer el trabajo inter y multidisciplinario.
- Propiciar un espacio de discusión, intercambio de experiencias y colaboración entre los grupos de investigación dentro y fuera de la FES Zaragoza.

PROGRAMA
25 AL 28 DE OCTUBRE DE 2011
AUDITORIOS CAMPO I y II



EFFECTO DE LOS FITOQUÍMICOS PRESENTES EN LA DIETA (ÁCIDO ASCÓRBICO, α -TOCOFEROL, β -CAROTENO, ÍNDOLE-3-CARBINOL, ANTRAQUINONA Y CAPSAICÍNA) SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS INDUCIDOS POR EL TRIÓXIDO DE CROMO EN RATONES DE LA CEPA CD-1

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

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. carmen.garcia@unam.mx. C.P. 09230, México D.F. Tel (55)56230772.

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 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 CrO₃. 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-carbinol (2, 20 y 100 mg/kg). Al grupo CrO₃ se le aplicaron 20 mg/kg por vía i.p. Para evaluar la protección de los fitoquímicos, estos se combinaron con el CrO₃. El daño al 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 CrO₃. Los porcentajes de disminución de daño al ADN fueron del 75% para la antraquinona y el índole-3-carbinol, del 50% para el ácido ascórbico y α -tocoferol; y del 25% para el β -caroteno y la capsaicina.

Proyecto financiado por PAPIIT IN209309.

Palabras clave: Genotóxico, antioxidantes, antimutágeno, trióxido de cromo, fitoquímicos.

Programme & Abstracts

Annual Meetings

Society for Free Radical Research (SFRR Europe)

"Free Radicals and the Environment"

September 12-15th



The European Environmental Mutagen Society (EEMS)

"Environmental Mutagenesis in the North"

September 15-18th



2010

Oslo

Norway



and 2.5 µg/mL), doxorubicin (0.5 µg/mL), or both, for 24h. Afterwards, cells were stained with Annexin V-FITC and PI (propidium iodide) and analyzed by flow cytometry. The combination of Annexin V-FITC with PI was performed to identify early apoptotic cells (annexin V + / PI -) and necrotic cells (annexin V + / PI +). Cells treated with bixin presented increased frequency of apoptosis. Doxorubicin also induced apoptotic cell death, but a significant increase in the number of necrotic cells was observed when compared to the negative control. It is known that doxorubicin can induce apoptosis in particular conditions of doses and treatments; however, in our study it was observed that doxorubicin induced a higher frequency of necrosis in HL60 cells. The simultaneous treatment of HL60 cells with bixin and doxorubicin increased the frequency of apoptotic and necrotic cells when compared to doxorubicin treatment. These results suggest that doxorubicin induces cell death by necrosis, but when combined with bixin there is a tendency to cause apoptosis. According to these results, we suggest that bixin increases the frequency of cell death induced by doxorubicin in HL60 cells, which would be of great relevance in clinical practice, since doxorubicin treatment may be limited by drug resistance. Further studies are being conducted in our laboratory to evaluate the activity of bixin in normal cells and to determine its cellular selectivity.

Financial support: CNPq.

Poster presentation P190

EEMS

EFFECT OF INDOLE-3-CARBINOL ON GENOTOXICITY OF HEXAVALENT CHROMIUM (CrO3) IN MICE IN VIVO

M. C. García-Rodríguez¹; N. Sanchez-Najera¹; G. V. López-Salinas¹; V. M. Mendoza-Núñez²

¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, PO Box 9-020, C.P. 15000, D.F., México; ²Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" UNAM, PO Box 9-020, C.P. 15000, D.F., México

Presenting author: M. C. García-Rodríguez; grmc@puma2.zaragoza.unam.mx

The human diet is composed of many natural chemopreventive agents. The vast majority of chemopreventive blocking agents have been assigned to one or more of the following categories: enzyme inhibitors, enzyme inducers, and phase II metabolizing enzyme inducers. Indole-3-carbinol is found in edible cruciferous vegetables and has been reported to inhibit tumorigenesis in various animal models. Several possible chemopreventive mechanisms of protection by indole-3-carbinol that have been suggested are via inhibition of glutathione S-transferase-mediated steroid binding activity, modulation of multidrug resistance activity, alteration of the expression of various phase I and II drug metabolizing enzymes and as scavenger of free radicals [1]. As part of our research program to evaluate chemopreventive or chemoprotective potential components of diet, in the present study, the ability of indole-3-carbinol to reduce the micronucleous (MN) induction by CrO₃ in peripheral blood polychromatic erythrocytes of mice was evaluated. Mice (CD-1) were treated with indole-3-carbinol (100 mg/kg), CrO₃ (20 mg/kg) or with both compounds. The indole-3-carbinol and CrO₃ were administrated intraperitoneally. DNA damage was evaluated by the analysis of MN using the acridine orange technique. Blood samples were obtained from the tail vein at 0, 24, 48 and 72 h after treatment. The results obtained in present

303

and 2.5 µg/mL), doxorubicin (0.5 µg/mL), or both, for 24h. Afterwards, cells were stained with Annexin V-FITC and PI (propidium iodide) and analyzed by flow cytometry. The combination of Annexin V-FITC with PI was performed to identify early apoptotic cells (annexin V + / PI -) and necrotic cells (annexin V + / PI +). Cells treated with bixin presented increased frequency of apoptosis. Doxorubicin also induced apoptotic cell death, but a significant increase in the number of necrotic cells was observed when compared to the negative control. It is known that doxorubicin can induce apoptosis in particular conditions of doses and treatments; however, in our study it was observed that doxorubicin induced a higher frequency of necrosis in HL60 cells. The simultaneous treatment of HL60 cells with bixin and doxorubicin increased the frequency of apoptotic and necrotic cells when compared to doxorubicin treatment. These results suggest that doxorubicin induces cell death by necrosis, but when combined with bixin there is a tendency to cause apoptosis. According to these results, we suggest that bixin increases the frequency of cell death induced by doxorubicin in HL60 cells, which would be of great relevance in clinical practice, since doxorubicin treatment may be limited by drug resistance. Further studies are being conducted in our laboratory to evaluate the activity of bixin in normal cells and to determine its cellular selectivity.

Financial support: CNPq.

Poster presentation P190

EEMS

EFFECT OF INDOLE-3-CARBINOL ON GENOTOXICITY OF HEXAVALENT CHROMIUM (CrO₃) IN MICE IN VIVO

M. C. Garcia-Rodríguez¹, N. Sanchez-Najera¹, G. V. López-Salinas¹, V. M. Mendoza-Núñez²
¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, PO Box 9-020, C.P. 15000, D.F., México; ²Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" UNAM, PO Box 9-020, C.P. 15000, D.F., México
Presenting author: M. C. Garcia-Rodríguez: grmc@puma2.zaragoza.unam.mx

The human diet is composed of many natural chemopreventive agents. The vast majority of chemopreventive blocking agents have been assigned to one or more of the following categories: enzyme inhibitors, enzyme inducers, and phase II metabolizing enzyme inducers. Indole-3-carbinol is found in edible cruciferous vegetables and has been reported to inhibit tumorigenesis in various animal models. Several possible chemopreventive mechanisms of protection by indole-3-carbinol that have been suggested are via inhibition of glutathione S-transferase-mediated steroid binding activity, modulation of multidrug resistance activity, alteration of the expression of various phase I and II drug metabolizing enzymes and as scavenger of free radicals [1]. As part of our research program to evaluate chemopreventive or chemoprotective potential components of diet, in the present study, the ability of indole-3-carbinol to reduce the micronucleous (MN) induction by CrO₃ in peripheral blood polychromatic erythrocytes of mice was evaluated. Mice (CD-1) were treated with indole-3-carbinol (100 mg/kg), CrO₃ (20 mg/kg) or with both compounds. The indole-3-carbinol and CrO₃ were administrated intraperitoneally. DNA damage was evaluated by the analysis of MN using the acridine orange technique. Blood samples were obtained from the tail vein at 0, 24, 48 and 72 h after treatment. The results obtained in present

303

Trykt ISBN: 978-82-8082-428-8

Elektronisk ISBN: 978-82-8082-429-5

Print: GRØSET™



License no 241 148