



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE TOXICIDAD DE UNA SOLUCIÓN
ELECTROLIZADA DE SELECTIVIDAD IÓNICA (SESI) CON
PH NEUTRO POR EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA EN EL
MODELO DE RATA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

FERNANDO AGUILERA NAVARRO



**DIRECTORA DE TESIS:
REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA
MÉXICO D.F. 2014**



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres. Inés (Ma) y Fernando (Pa), sería imposible expresar el agradecimiento y el amor que les tengo, ustedes que me han dado mucho más que el apoyo, la confianza, la fuerza, las ganas, los abrazos, los besos, las risas, ustedes me han dado la vida y el amor. Por ustedes estoy, por ustedes soy y por ustedes seré, desde el día que nací y para siempre.

A la doctora Regina, quien me recibió en su laboratorio, me enseñó a hacer ciencia, no sólo a imaginarla. Por todo el tiempo y el espacio que me dio, porque gracias a eso aprendí mucho más de lo que jamás creí que aprendería. Siempre agradecido con usted, porque la admiro y la respeto ya que me enseñó que un científico no sólo es aquel que hace ciencia, un científico siempre es más y yo siempre veré en usted mucho más. Gracias.

A el laboratorio C-236 del IIB, el lugar en donde aprendí. Gracias a Luis Serrano, que no sólo es un técnico es una excelente persona en todos los sentidos y que siempre tiene una mano extra para todos. A Javier A. Belmont, quien me recibió en el laboratorio y quien me quitó el miedo a pensar en grande, siempre me apoyó y siempre tenía una sonrisa. A Pau, quien me enseñó muchísimo más de lo que cree y fue un pilar importante para la realización del presente trabajo. A todos los integrantes del laboratorio que día a día no sólo se esfuerzan por hacer algo por México y la sociedad, sino que además día a día dan una enseñanza a los que compartimos espacio con ustedes. Muchas Gracias a todos: Karen, Sol, Nancy, Fátima, Toño, Laura y Omar...(y los que lleguen).

A mis sinodales. A la doctora Patricia Ramos, a la doctora Julieta Rubio, al doctor Jorge H. Limón y al doctor Rodolfo Omar Arellano. Por todas sus correcciones y comentarios, que le ayudaron de sobremanera a ésta tesis, que no sería lo mismo sin las cirugías realizadas bajo el bisturí de su experiencia y su conocimiento. Un agradecimiento en especial al doctor Omar Arellano quien además de mostrarme previamente su amistad, su gran personalidad y su increíble hospitalidad, me ayudó con la parte

estadística del presente trabajo, a pesar de mi lento aprendizaje fue muy paciente. Gracias por enseñarme que el chiste es, no dejar de aprender.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segunda casa. Por ser siempre libre y autónoma, porque no sería lo mismo si faltara alguien en la universidad. Todos los laboratoristas, los de ventanillas, sindicato, choferes, mantenimiento, profesores, investigadores, directores, rector y principalmente alumnos, hacen a la UNIVERSIDAD. Agradezco a todos por hacer de un lugar, la máxima casa de estudios.

A la Facultad de Ciencias, por ser siempre rebelde. La que nunca calla, cuando todos los demás callaron y la que siempre nos dará fuerza para seguir adelante como estudiantes libres. A todos mis profesores a todos mis amigos que añadieron día a día elementos a mi persona. Todos somos Prometeo en esa facultad y el simple hecho de asistir nos da el fuego de los dioses.

A mi hermano quien estuvo desde el día que vi luz y ha estado ahí para cuidarme, por todo. Por ser mí hermano Ricardo.

A Richi por darnos todo el amor, sólo sonrisas, sólo alegrías. Mi niño amado que siempre voy a cuidar.

A Ita por su apoyo, por su amistad, por las enseñanzas por ser parte importante de mi familia y parte de mi núcleo.

A mis amigos y mis primos. Los que estuvieron desde el inicio, los que estarán hasta el final. Frayo, Chico, Chavito, Paco, Yaho, Jahir, Omar, Maris, Piru, Nany, Kuku, Raque y Clari. Pido una disculpa si se me olvidó alguien. Su amistad es imprescindible, invaluable, incalculable, infinita. Gracias amigos.

A los pilares de mis familias mi abuela Elodia y mi abuela Raquel. Los valores, la tradición, la cultura, la familia. Sin ellas nada, con ellas siempre mucho más.

A todos mis tíos a mis tías, a todos los que forman parte de la familia. Por ser parte del conjunto que nos hace más fuertes cuando estamos todos.

A ella. A mi chaparrita, a mi Kuku, a mi Ale. Por el apoyo incondicional sin importar el mundo. Por el amor. Por ser siempre tú y por siempre estar.

“No era más que un zorro semejante a cien mil otros. Pero yo le hice mi amigo y ahora es único en el mundo.”
Antoine de Saint-Exupéry

“Sólo si nos detenemos a pensar en las pequeñas cosas llegaremos a comprender las grandes.”
José Saramago

“La lucha del hombre contra el poder es la lucha de la memoria contra el olvido.”
Milán Kundera

“El amor da sentido a la vida. ¡Cuando se ama, se es más fuerte! ¡Se es más grande! ¡Se llega más lejos!”
Joël Dicker

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN. 1

Antecedentes.

I.I La esterilización y la desinfección

I.II Soluciones de superoxidación

I.III Solución Electrolizada de Selectividad Iónica

I.IV Usos y aplicaciones

I.V Efectos biológicos diversos

II. HIPÓTESIS 10

III. OBJETIVOS 10

III.I General

III.II Particulares

IV. MATERIAL Y MÉTODOS 11

IV.I Animales

IV.II Reactivos

IV.III Metodología

IV.IV Fracciones citosólica y microsomal

IV.V Pesos

IV.VI Medición de glutatión

IV.VII Medición de peroxidación lipídica (TBARS)

IV.VIII Medición de citocromos-P450 totales (CYP450)

IV.IX Medición de citocromo P450-2E1 (CYP2E1)

IV.X Medición de catalasa (CAT)

- IV.XI Medición de glutatión reductasa (Gred)
- IV.XII Medición de glutatión transferasa (GST)
- IV.XIII Medición de glutatión peroxidasa (GPx)
- IV.XIV Medición de superóxido dismutasa (SOD)
- IV.XV Evaluación de micronúcleos en médula ósea (MNPCE)
- IV.XVI Análisis

V. **RESULTADOS** **25**

- V.I Evaluación de consumo de alimento y ganancia de peso
- V.II Evaluación de estrés oxidante: GSH/GSSG y peroxidación lipídica (TBARS)
- V.III Metabolismo – Fase I: Cuantificación de citocromos P450 totales y actividad CYP2E1
- V.IV Metabolismo – Fase II: Actividad de glutatión S-transferasas
- V.V Enzimas antioxidantes: CAT, SOD, GPx y Gred
- V.VI Genotoxicidad: MNPCE
- V.VII Citotoxicidad: %PCE

VI. **DISCUSIÓN**³⁵

VII. **CONCLUSIONES**⁴²

VIII. **REFERENCIAS**⁴³

I. INTRODUCCIÓN

Antecedentes.

I.I La esterilización y la desinfección

La esterilización es la acción por medio de la cual se logra la completa eliminación de microorganismos inclusive las esporas (Borja, 2002). Por lo que un esterilizante ideal es aquél que logra eliminar: bacterias, esporas, tubérculos, hongos y virus en corto lapso de tiempo sin presentar riesgos al medio ambiente o a la salud humana (Esteripharma).

Por otro lado, la desinfección es un proceso fisicoquímico por el cual se logra eliminar microorganismos de formas vegetativas en objetos o tejidos, sin que se asegure la eliminación de esporas bacterianas (Borja, 2002).

“Los desinfectantes tienen una función importante en la prevención de infecciones nosocomiales” (Turner, 1994) y no nosocomiales. Para lograr una desinfección y/o esterilización es necesario utilizar agentes desinfectantes.

Dependiendo de la capacidad del agente para eliminar microorganismos, se pueden definir tres niveles de desinfección: alto, intermedio y bajo (Borja, 2002).

Desinfección de nivel alto (DNA): proceso en el cual se eliminan casi todos los microorganismos, excepto gran cantidad de esporas, *M. tuberculosis* y algunos virus como los virus lipofílicos e hidrofílicos. Se utilizan sobre aquellos materiales en contacto con mucosas íntegras, como el material quirúrgico. Algunos de estos agentes son: glutaraldehído, ácido peracético y orto-ftalaldehído.

Desinfección de nivel intermedio (DNI): proceso en el cual se eliminan las formas vegetativas de bacterias, incluyendo *M. tuberculosis*, hongos y virus, pero no siempre se eliminan las esporas bacterianas. Se les dice tuberculicidas. Algunos de estos agentes son: compuestos clorados (hipoclorito de sodio), compuestos iodados y compuestos fenólicos, alcoholes y clorhexidina.

Desinfección de nivel bajo (DNB): proceso en el cual se elimina la mayoría de las bacterias, algunos virus y algunos hongos, pero no siempre microorganismos resistentes como el bacilo de la tuberculosis o esporas bacterianas. Algunos de estos agentes son: amonio y compuestos mercuriales (Esteripharma 17/09/2013).

I.II Soluciones de superoxidación

Las soluciones de superoxidación (SSO), consideradas agentes químicos de DAN y DNI, son conocidas por su eficiencia en la desinfección, esterilización de productos y por ser auxiliares en el tratamiento de infecciones en tejidos (Durán, 2010). Las SSO por principio son soluciones fuertemente ácidas, incoloras y con un alto potencial de óxido-reducción. La solución es preparada principalmente utilizando agua y sal en un electrolizador que tiene una membrana de intercambio iónico (Fig. 1) (Tanaka, 1996).

Cabe recordar que el potencial de óxido-reducción es un gran parámetro para la restricción de organismos como lo son las bacterias, ya que bajo potenciales de óxido-reducción positivos encontramos únicamente organismos cuya respiración es aerobia, otro parámetro que se modifica es el metabolismo de todos los organismos debido a que el potencial redox determina la valencia mediante la cual trabajarán ciertos elementos en el organismo y esto puede afectar su solubilidad, restricción, inmovilización y disponibilidad (Lynch y Poole, 1979)

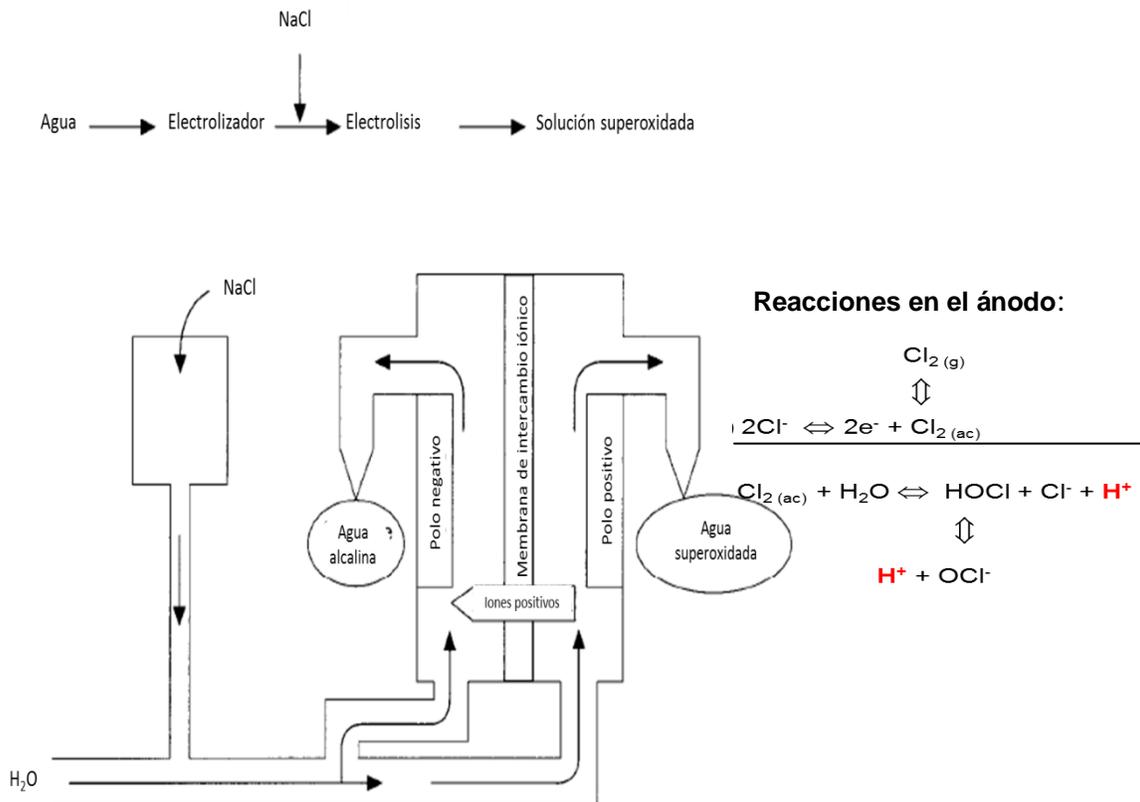


Figura 1. Esquema que representa el proceso de producción de una solución de superoxidación (SSO) y representación de las reacciones que ocurren en el ánodo, la formación de ácido hipocloroso y ion hipoclorito a partir del cloro acuoso. Tomado de Tanaka, 1996.

El potencial de óxido-reducción para estas SSO van de 1000 a 1100 mV, sin embargo como lo menciona Sampson (2002), no todas las SSO son iguales, a pesar de realizarse bajo el mismo principio que es la electrólisis de una solución

salina y de que las especies químicas activas son las mismas: ácido hipocloroso (HOCl) e hipoclorito (OCl^-) y éstas a su vez aportan una cantidad disponible de cloro libre (Tanaka 1996, Selkon 1999). Las concentraciones activas de las diferentes SSO pueden variar de acuerdo con la concentración inicial de NaCl que se agregue y el voltaje que se genere en el electrolizador. Las concentraciones activas de las diferentes SSO reportadas varían entre 7 ppm, 30 ppm, 70 ppm y 180 ppm. De igual forma se modifica el pH que tiene gran influencia en la capacidad desinfectante, ya que un medio muy ácido o muy básico es un medio adverso para los diferentes microorganismos (Cánepa de Vargas, 2004); los valores reportados de SSO se encuentran entre $\text{pH}=2.3-2.7$, $\text{pH}=5.6-6.5$ y $\text{pH}=9-10$ (Sampson, 2002).

Junto con el potencial óxido-reducción, el cloro libre y el pH determinan la actividad germicida, la vida útil de la solución, así como el potencial corrosivo de cada SSO (Landa-Solis, 2005).

Para mantener la actividad microbicida en áreas hospitalarias, la compatibilidad con los tejidos, así como la vida útil, y que fuera menor la corrosión en metales principalmente material quirúrgico, se intentaron desarrollar SSO de pH's neutros (Horiba, 1999, Nagamatsu, 2002), y hoy en día existen diferentes marcas que manejan SSO de pHs neutros: Dermacyn, Myrocyn, Qx, Varul, Esterilife, Estericide, EstericideQx, etc.

I.III Solución Electrolizada de Selectividad Iónica

En la evolución de las SSO se denominaron SESI (Solución Electrolizada de Selectividad Iónica) a todas aquellas SSO que mantenían un pH neutro y una composición más estable, técnicamente hablando no se considera que una SESI y una SSO sean lo mismo, dado su forma de producción así como las características que tiene cada una.

La producción de SESI, aunque es un proceso similar, requiere de agua tratada con características fisicoquímicas muy específicas y una solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) grado reactivo. Al realizar la electrólisis, los iones generados son posteriormente ordenados por medio de un proceso de electrodiálisis bipolar, y se seleccionan a través de un proceso de electrodiálisis inducido, así se consiguen iones controlados y estables. Posteriormente se realiza una concentración controlada de volúmenes obteniendo la neutralidad del pH. Al final resulta una solución con un pH neutro de 6.4 a 7.5 con un Potencial de óxido-reducción de +800 a +900mV y una estabilidad mayor ante condiciones ambientales (Duran, 2010).

Dado que en el presente trabajo se evaluará la SESI EstericideQx de la farmacéutica Esteripharma es necesario conocer las propiedades de esta solución (Tabla 1.)

Tabla 1. Conjunto de propiedades de las Soluciones electrolizadas de selectividad iónica (SESI), anexando valores de ión hipoclorito y ácido hipocloroso específicamente de Estericide Qx medidos en el laboratorio. Tomado y modificado de García, 2011

Características	Solución electrolizada con pH neutro
Algunas características fisicoquímicas	pH: 6.4-7.3 Sólidos Totales Disueltos: <180 ppm (principalmente NaCl) HOCl: 0.62 mM OCl ⁻ : 0.374 mM Cloro activo: 40 ppm Vehículo: H ₂ O (100 mL)
Toxicidad	No tóxica como irrigante en boca
Uso en tejidos vivos	Aplica
Irritabilidad tisular como irrigante	Produce menor quimio-atracción leucocitaria en tejido peritoneal
Efecto esterilizante	Sí
Efecto antiséptico	Sí
Efecto hemostático en hemostasia	Sí
Efecto analgésico	Sí, equiparable al ketorolaco en prueba de formalina
Efecto antiinflamatorio	Sí, modula liberación de citocinas proinflamatorias
Curación de heridas	Sí, aumenta la velocidad regenerativa Quimioatractor de fibroblastos

I.IV Usos y aplicaciones

Las SSO y las SESI se han utilizado para desinfección debido a su amplio espectro antimicrobiano y han mostrado una actividad microbicida contra: *Pseudomonasaeruginosa*, *Escherichiacoli*, *Enterococcushirae*, *Acinetobacterbaumanni*, *Acinetobactersp*, *Bacteroidesfragilis*, *Enterobacteraerogenes*, *Enterococcusfaecalis*, *Enterococcusresistentes* a vancomicina, *Haemophilusinfluenzae*, *Klebsiellaoxytoca*, *Klebsiellapneumoniae*, *Micrococcusluteus*, *Proteusmirabilis*, *Serratiamarcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcusepidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcuspyogenes*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacteriumchelonae*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Candidaalbicans*. Destruye bacterias de *Bacillusatrophaeus*, *Bacilluscereusy Bacillussubtillis* al igual que virus de hepatitis B, poliovirus, norovirus, VIH, adenovirus y virus de influenza tipo A (Duran, 2010; Cabello, 2009). El espectro de tiempo de desinfección varía de acuerdo con el nivel de desinfección que se desea tener, puede ir de 30 segundos en el que se eliminan una gran cantidad de bacterias, hongos y virus, a 15 minutos en que se asegura una eliminación de esporas (Esteripharma2013).

Las SSO y las SESI se utilizan para desinfección de superficies lisas y para el tratamiento de tejidos, principalmente como soluciones bucales y en pie diabético, ya que se ha demostrado que estas soluciones tienen un efecto benéfico en la cicatrización mayor que la solución fisiológica y no se tienen los efectos adversos del etanol, la clorhexidina y la iodopovidona (Rebollar, 2010). EstericideQx es aplicado en una gran variedad de zonas para desinfección pero principalmente su aplicación es en clínicas y en hospitales para desinfección de quirófanos y esterilización de instrumental quirúrgico al realizar estas desinfecciones se debe aplicar sin diluir, en frío y antes de su aplicación se deben eliminar los residuos de polvo y tierra ya que puede interactuar con ellos, el producto se debe proteger de la luz solar (Esteripharma 2013).

I.V Efectos biológicos diversos

El cloro se ha utilizado como desinfectante desde hace más de doscientos años, su uso y aplicación han evolucionado a través del tiempo como germicida de alto nivel, dado sus niveles de hipoclorito y de ácido hipocloroso (García, 2011; Stanley, 2010). Acerca de los efectos biológicos que el ion hipoclorito y el ácido hipocloroso pueden tener, ya sea para el humano u otros organismos, existen algunos reportes epidemiológicos sobre riesgo de cáncer asociado con agua clorada -que contiene estos compuestos-, y su actividad genotóxica y carcinogénica se atribuyen directamente al OCl^- mientras que la actividad citotóxica es atribuida al HOCl (Shiho, 2001; Zavodnik, 2004).

Las soluciones con un pH sumamente ácido o alcalino son corrosivas y su estabilidad es muy corta. A través de desarrollo y las investigaciones enfocado en estas soluciones se han producido las soluciones electrolizadas por selectividad iónica de pH neutro, que han mejorado su estabilidad iónica y actualmente se utilizan en tejidos, para su profilaxis (Flores, 2009).

No obstante y a pesar de tener un pH neutro, contienen ácido hipocloroso y también ion hipoclorito, lo cual les confiere un potencial de toxicidad –que depende de la concentración de las dosis y el tiempo de administración- para los pacientes al ser usados como desinfectantes y antisépticos. No obstante, aún es necesario estudiar ciertos factores de estas soluciones: como lo son la resistencia bacteriana, fúngica y protista de cada especie o un ambiente con mucha materia orgánica en donde su efecto pudiera ser inactivado o lo contrario, que se pudieran generar trihalometanos (THMs) u otros compuestos tóxicos, los cuales se ha demostrado son dañinos para el ambiente acuático y están clasificados en el grupo 2B de la IARC, probables cancerígenos para el humano (Rebollar, 2010; Buschini, 2004; Emmanuel, 2004, IARC, 2014). Se ha realizado un estudio toxicológico *in vitro* en el que se demuestra que estas soluciones no interfieren en el proceso de cicatrización al igual que no inducen citotoxicidad en fibroblastos *in vitro*. Se tiene un único registro de genotoxicidad al realizar un ensayo de micronúcleos en ratones de acuerdo a la OECD en el que se evaluó la SES

denominada Myrocyn (nombre comercial) y no se observó un efecto genotóxico (Gutiérrez, 2006)

Se ha reportado su uso como analgésico en el tratamiento de osteonecrosis mandibular secundaria que junto a una pasta dental que contenga clorhidrato de bencidamina puede llegar a disminuir hasta en 100% el dolor en algunos pacientes (Ibieta, 2008). En el tratamiento de la enfermedad periodontal se ha utilizado como desinfectante (Flores, 2009) e igualmente se ha aplicado a personas con úlceras provocadas por pie diabético y se comprobaron mejoras en la cicatrización de las lesiones (Dalla, 2006) y en la reducción de infecciones bacterianas en heridas por quemaduras (Miranda, 2006) (Tabla 2).

Tabla 2. Estudios realizados sobre SSOs y SESIs sobre algunos organismos así como su pH. Elaboración propia.

Autor	SSO o SESI	Estudio	pH de la solución	Efecto
Morita et al.	No comercial	Potencial de desinfección ante virus de la hepatitis B (HBV) y virus de inmunodeficiencia humana (HIV)	2.34	(+)
Cabello et al.	Proporcionada por Esteripharma	Potencial de desinfección sobre el virus de influenza A	7.45	(+)
Tanaka et al.	No comercial	Actividad antimicrobial contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> .	2.3-2.7	(+)
Paz García et al.	No específica	Sustitución de solución fisiológica con efecto antiséptico, analgésico, hemostático y regenerador tisular	6.4-7.3	(+)
Landa-Solis et al.	Microcyn	Actividad antimicrobial contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> y <i>Candida albicans</i> .	6.2-7.8	(+)
Kiura et al.	No comercial	Actividad bactericida contra <i>Mycobacterium</i> y esporas de <i>Bacillus subtilis</i> con diferentes concentraciones de NaCl al momento de preparar la solución	2.16-2.32 y 6.78-6.83	(+)
Middleton et al.	Sterilox	Eficacia bactericida de Sterilox contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> en comparación con glutaraldehído	No específica	(+)
Nakagawara et al.	No comercial	Evaluar la actividad bactericida de una agua electrolizada en rangos de pH de 2 - 9 contra <i>Escherichia coli</i> K12 y <i>Bacillus subtilis</i> PC1219	2.7-9.0	(+)

El efecto (+) es de acuerdo al estudio realizado. Como se puede ver todos los resultados en este tipo de soluciones son positivos en cuanto a potencial desinfectante se refiere.

No se tienen reportes acerca de los efectos ambientales que pudieran tener estas soluciones. Sin embargo, se conocen algunos efectos que pueden presentar los compuestos activos de estas soluciones como el ácido hipocloroso (HOCl) y el ion hipoclorito (OCl⁻).

Retomando un punto anterior estos compuestos pueden halogenar elementos celulares al unirse a materia orgánica y hacer factible la formación de trialometanos y cloraminas (Dychdala, 1977) Con el HOCl se sabe que las reacciones más favorecidas son con las aminas para formar monocloroaminas y dicloroaminas (Pullar, 2000) y en estudios *in-vivo* en rata el hipoclorito de sodio puede ser metabolizado a trialometanos o compuestos organoclorados al unirse a otras biomoléculas como son: ácido tricloroetanoico, ácido dicloroetanoico, cloroformo y dicloroacetnitrilo (Mink, 1983) compuestos que son metabolizados principalmente por los citocromos CYP450 principalmente la isofórmula CYP2E1 en el hígado. Aunque otra posible consecuencia de la formación de cloraminas es la generación de radicales libres que pudieran unirse a proteínas y desfragmentarlas o provocar peroxidación lipídica en lipoproteínas de baja densidad (Hawkins, 1999; Hazell, 1994)

Pero estas no son las únicas reacciones que se pueden formar con estos compuestos de hecho, la forma más común de reaccionar del HOCl al ser un agente oxidante es con grupos tiol y tioeteres tales como la cisteína y la metionina (Winterbourn, 1985) Por lo que el GSH, la tiorredoxina y otras proteínas con grupos tiol son afectadas principalmente por el HOCl (Pullar, 1999; Vissers, 1995)

En un estudio realizado por Aruoma y Halliwell en 1987, se demostró *in-vitro* que el HOCl que producen los neutrófilos por acción de la mieloperoxidasa afecta a la catalasa así como a la glutatión peroxidasa, inactivándolas rápidamente, mientras que el efecto sobre la superóxido dismutasa es más lento, aunque también disminuye su actividad. La conclusión fue que el ácido hipocloroso pudiese contribuir al daño tisular a consecuencia de heridas. Pero no se sabe si esto ocurre de manera *in-vivo* y si afecta a otras enzimas como la glutatión reductasa.

Se describió el efecto que tiene el ácido hipocloroso (HOCl) a diferentes concentraciones en cultivos de células endoteliales de cordón umbilical, concentraciones entre 20-40 nmol de HOCl por 1.2×10^5 células provocaban apoptosis caracterizada por cambios en la morfología nuclear, fragmentación del ADN y actividad de las caspasas, concentraciones superiores a 50 nmol de HOCl por 1.2×10^5 células provocaban un efecto necrótico (Vissers, 1999)

El OCI^- se encuentra asociado a daño oxidante del ADN, en el que se observa una oxidación en los productos pirimidínicos pero no en los púricos, y se considera que este ion influye de manera importante en la carcinogénesis (Shiho, 2002), ya que al ser un oxidante muy fuerte puede reaccionar con grupos amino (NH_2) y grupos sulfhidrilo (SH), se considera que puede inducir principalmente a la peroxidación lipídica de lipoproteínas (Oleg, 1994) (Tabla 3).

Tabla 3. Estudios toxicológicos realizados sobre ion hipoclorito y ácido hipocloroso. Elaboración propia.

	Autor	Muestra	Sustancia a evaluar	Estudio	Resultado
Genotoxicidad					
	Süleyman <i>et al.</i> (2009)	Linfocitos de sangre periférica de humanos	NaOCl (OCI ⁻)	Micronúcleos y aberraciones cromosómicas	(+,+)
	Zavodnik <i>et al.</i> (2003)	Células B14 de hamster chino	HOCl	Viabilidad celular y Ensayo cometa	(+,+)
	Güngör <i>et al.</i> (2010)	Células epiteliales de pulmón A549	HOCl	Rompimiento de cadena sencilla de ADN por ensayo cometa, aductos de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina	(+,+)
	Monarca <i>et al.</i> (2005)	Células de raíz de <i>Allium cepa</i> , células de raíz de <i>Vicia faba</i> , células de polen de <i>Tradescantia</i> .	NaOCl (OCI ⁻)	Aberraciones cromosómicas en anafase (<i>Allium cepa</i>), inducción de micronúcleos (<i>Vicia faba</i> y <i>Tradescantia</i>)	(+,+,-)
	Maffei <i>et al.</i> (2005)	Leucocitos de sangre humana	NaOCl (OCI ⁻)	Ensayo cometa y prueba de micronúcleos	(+,-)
	Guzzella <i>et al.</i> (2004)	<i>S. typhimurium</i> cepas TA98 y TA100, <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio fischeri</i> , <i>Saccharomyceterevisiae</i> cepa D7.	NaOCl (OCI ⁻)	SOS Chromotest, Microtox - Mutatox y conversión génica, mutación puntual y mutabilidad de ADN mitocondrial, Ensayo de mutagenesis en <i>Salmonella</i>	(+,+,+,-)
	Hasegawa <i>et al.</i> (1985)	Ratas F344	NaOCl (OCI ⁻)	Diferencias en ganancia de peso, examinación hematológica y bioquímica, examinación tumoral.	(-,-,-)
	Hagiwara <i>et al.</i> (2006)	Células de embrión de hamster Sirio (Células SHE)	NaOCl (OCI ⁻)	Aberraciones cromosómicas, %poliploidia y endorreproducción	(-,+)
Toxicidad					
	Ju-Xiang <i>et al.</i> (2004)	Núcleos aislados de hepatocitos de rata	HOCl	Exposición de núcleos hepáticos a HOCl con y sin taurina. Registro de actividad de NTPasa con ATP y GTP como sustrato	(+)
	E. Scully Jr. <i>et al.</i> (1986)	Fluido estomacal de rata	OCI ⁻	Determinación de <i>N</i> -cloraminas orgánicas por medio de ácido sulfónico dansilo y separado por HPLC	(+)
	Cotter <i>et al.</i> (1985)	Análisis in vitro de agar, piel cadavérica, y heridas inducidas en	NaOCl (OCI ⁻)	Efectividad de eliminación de <i>Staphylococcus aureus</i>	(+,+,+)

	Autor	Muestra	Sustancia a evaluar	Estudio	Resultado
		conejillo de indias		in vitro, descontaminación de <i>S.aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> o <i>Candida albicans</i> en cadáveres colonizados y viabilidad de células basales en piel de conejillo de Indias.	
	Murakami <i>et al.</i> (1995)	Tejidos gástricos de rata in vitro	HOCl	Relación entre el ácido hipocloroso, el amonio y la monocloramina	(+,+)
	Miyamoto <i>et al.</i> (1997)	Estudio in-vitro y microsomas de rata	HOCl	Identificación de 2,2'-dihidroxiazobenceno u otros metabolitos reactivos en presencia de diclofenaco y HOCl por medio HPLC y espectrometría de masas	(-,+)
	Krasowska <i>et al.</i> (2004)	Cortes histológicos de cerebro de rata en un modelo in-vitro	HOCl	Incorporación de leucina en el total de proteínas analizadas, síntesis de lípidos en presencia y ausencia de mielina	(+,+)
	Stanley <i>et al.</i> (2010)	Estudio in-vitro	HOCl y N-cloramina s	Determinación por la reacción con ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB)	(+,+)

El efecto (+) es de acuerdo al estudio realizado. Se hace evidente que estos compuestos tienen un efecto toxico bajo ciertas condiciones.

Se hace evidente en las recopilaciones y ejemplos anteriores que la mayoría de los estudios únicamente si han realizado de manera *in-vitro* y se tiene muy poca información bajo estudios *in-vivo*. Los cuales requieren de mayor cuidado al llevarse a cabo ya que la cantidad de factores que pudiesen alterar los resultados son demasiados y están determinados por muchas variables. Y se tienen factores de protección adicional debido a la nutrición de los organismos como lo es la albumina (Stenvinkel, 2002)

Otro factor que se debe tomar en cuenta en la realización de estudios *in-vivo* es el sexo ya que se tiene noción de que existen diferencias entre sexos pero debido a que la gran mayoría de los protocolos no permiten el uso de muchos animales y se restringe a los controles positivos en pocos estudios se reflejan esas diferencias. De hecho se sabe que las hormonas sexuales femeninas tienen una función importante en la función del sistema inmune por lo que otorga mayor resistencia ante enfermedades de cualquier índole a las hembras (Diodato, 2001).

Justificación del trabajo.

Se deben realizar una mayor cantidad de estudios con las SSO y particularmente con las SESI que se están utilizando en el ámbito médico de manera más recurrente, ya sea como enjuague bucal, como tratamiento en heridas o incluso en lavados estomacales tras una sepsis, se deben conocer las restricciones que pudiesen tener las SESI, y en particular Estericide Qx. El cual se comercializa en México.

Como lo menciona Sampson (2002), “No todas las aguas súper oxidadas son iguales”, varían las cantidades de HOCl y de OCl⁻ al igual que la cantidad de cloro libre disponible, además de la variación en el pH.

Al Incluir la complejidad de un modelo *in vivo* y el tener las variables de los sexos, se puede tener una mejor visualización del efecto que Estericide Qx pudiese provocar en las condiciones que recetan los especialistas del ámbito médico. Y Al realizar el estudio durante 30 días se puede determinar si una exposición prologada provoca alguna respuesta en el organismo.

II. HIPÓTESIS

- Estericide Qx contiene en su mayoría HOCl el cual es capaz de ionizarse a pH=6 en OCl⁻ y produce daño oxidante *in vitro*, por lo que se espera un daño oxidante que podría provocar efectos en diferentes pruebas *in vivo* en el modelo murino de rata Wistar.
- El HClO disminuye la actividad de varias enzimas antioxidantes *in vitro*; esperamos una respuesta menos notoria *in-vivo*.
- Ensayos con HClO *in vitro* producen citotoxicidad, por lo tanto *in vivo* podría haber un efecto citotóxico leve.
- El ión hipoclorito ClO⁻ al estar presente en menor cantidad no tendría efecto en la evaluación del producto. El efecto sería amortiguado por el sistema.

III. OBJETIVOS

General

- Determinar si Estericide Qx altera parámetros de; estrés oxidante, relación GSH/GSSG, peroxidación lipídica (TBARS); así como algunas de las principales enzimas del metabolismo (P450 totales, específicamente CYP2E1 y glutatión S-transferasas totales); si afecta enzimas antioxidantes

(CAT, Gpx, Gred, SOD);y si genera daño genotóxico (micronúcleos de médula ósea) o citotóxico (%PCE) en rata.

Particulares

- Evaluar cambios en los pesos y alimentación de las ratas al utilizar Estericide Qx.
- Determinar el estrés oxidante provocado por Estericide Qx en rata (razón GSH/GSSG y peroxidación lipídica).
- Identificar alteraciones al metabolismo (concentraciones de P450 totales y CYP2E1) producidas por la ingestión de Estericide Qx en rata.
- Evaluar el daño genotóxico y citotóxico de eritrocitos (PCE y NCE) en médula ósea al utilizar Estericide Qx en rata.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.I Animales

Se utilizaron ratas Wistar de 4 semanas de edad del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. En la quinta semana se aplicó el tratamiento. Las ratas se mantuvieron bajo las siguientes condiciones en el bioterio: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Hidratación y alimentación *at libitum*, el alimento y el agua eran aquellos utilizados en el bioterio del instituto de investigaciones biomédicas, y que cumplía con la norma NOM-062-ZOO-1999 de “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Las ratas fueron marcadas por una muesca en la oreja de acuerdo a la figura 2 para su identificación.

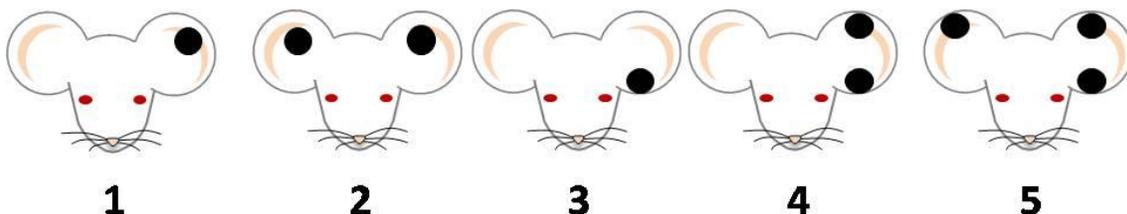


Figura 2. Representación del muesqueo de ratas para su identificación.

IV.II Reactivos

EstericideQx (Esteripharma), solución Salina 0.9% (Baxter international Inc.), ciclofosfamida (Sigma-aldrich), Etanol (alcohol etílico-C₂H₅OH-, 99.5%, Reasol MR), benceno (Fluka), tetracloruro de carbono (Sigma-aldrich)

IV.III Metodología

Se utilizaron 5 ratas macho y 5 hembra por tratamiento y controles negativos y 3 ratas macho para controles positivos, únicamente machos de acuerdo a los protocolos de la organización para la cooperación y el desarrollo económicos por sus siglas en inglés OECD, en la que se deben utilizar la menor cantidad de controles positivos y únicamente machos, debido a la variabilidad que pudieran presentar las hembras y considerando que el control positivo únicamente es un punto de referencia ya preestablecido que asegura la calidad de la experimentación. El tratamiento se dio durante 28 días diariamente, por lo que la exposición fue subcrónica para tratar de observar un efecto a largo plazo ya que las concentraciones de compuestos activos de Estericide Qx son mínimas. Las ratas fueron tratadas bajo 4 diferentes concentraciones de Estericide Qx por vía oral con una sonda: 2.0 mL de solución de Estericide Qx/100 g de peso corporal (p.c.); las soluciones estaban al 100%, 50%, 25% y 5%. Las diluciones fueron realizadas con solución salina al 0.9%. Los controles negativos fueron tratados únicamente con el mismo volumen de solución salina al 0.9%. Los controles positivos fueron tratados con benceno (C₆H₆), tetracloruro de carbono (CCl₄) y óxido de trans-estilbeno (tSO) por vía intraperitoneal de acuerdo a las especificaciones dictaminadas por la OECD. Se dictaminó utilizar estos controles positivos debido a que su potencial y respuesta ya ha sido evaluada con anterioridad en el laboratorio y muestra una constancia en los resultados.

Para CCl₄, C₆H₆ y tSO el tratamiento fue durante 3 días (exposición aguda) ya que el protocolo de la OECD únicamente manejaba estos compuestos bajo estas condiciones debido a que los animales no soportarían una exposición subcrónica de los controles positivos y la vía de exposición oral mediante sonda aún no ha sido evaluada como un control positivo. Se dieron las dosis máximas de acuerdo con la OECD para controles positivos que es de 2.0 mg/Kg de p.c. y 2.0 mL/Kg de p.c (OECD 1995).

Las ratas fueron sacrificadas por dislocamiento cervical, se fijaron en la zona de operación y se extrajo únicamente el hígado evitando el maltrato del mismo. El hígado se dividió en 5 partes iguales, para realizar las siguientes mediciones:

- a) Niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado(GSSG)
- b) Niveles de CYP450 y actividad de CYP2E1 y GST
- c) Niveles de TBARS (indicador de peroxidación lipídica)
- d) Actividad de enzimas antioxidantes

El hígado se colocó en un amortiguador TRIS/EDTA/KCl a las siguientes concentraciones: TRIS 20 mM, KCl 150 mM y EDTA 1 mM y se almacenó a -70°C para la obtención posterior de fracciones citosólica y microsomal.

Al momento de extraer el hígado se extrajo también el fémur y la tibia (de ambas patas) por dislocación de las articulaciones eliminando la mayoría de los ligamentos y músculos, y fueron utilizados para extraer la médula ósea y realizar la prueba de micronúcleos en eritrocitos policromáticos.

Tabla 4. Grupos de exposición y la cantidad administrada

Grupo de exposición	Régimen de exposición	Número de animales
Controles negativos (CT)	2 mL/100 g de solución salina estéril	5♂ + 5♀
Estericide® Qx	2 mL/100 g de las diluciones a 100, 50, 25 y 5%	5♂ + 5♀ por cada dilución
Controles positivos	Tetracloruro de carbono (CCl ₄) como control positivo de estrés oxidante tSO como inductor de CYP2E1 Benceno como control positivo de daño genotóxico	3♂ por cada tratamiento

IV.IV Fracciones citosólica y microsomal

Una vez obtenidos los hígados de las ratas, se obtuvieron las fracciones citosólica y microsomal de cada individuo para la realización de los diferentes experimentos. Se siguieron los protocolos de Guengerich *et.al* (2010) y Dávila et al (2007) como se describe a continuación. Primero se obtuvo la fracción S9, los hígados fueron pesados y colocados en 4 mL/g de una solución Tris-HCl 20 mM, KCl 150 mM y EDTA 1 mM con un pH 7.4. Los tejidos fueron homogenizados utilizando un pistilo

de teflón y fueron centrifugados a 9,000 gravedades (g) durante 10 minutos; se separó el sobrenadante correspondiente a la fracción S9 en la que se realizarían las pruebas para algunas de las enzimas antioxidantes. Esta fracción fue almacenada entre -70°C y -80°C hasta su uso.

Para la obtención de la fracción microsomal y citosólica se centrifugó la fracción S9 a 100,000 g durante 60 minutos, el sobrenadante de la centrifugación es la fracción citosólica, se recuperó y fue almacenada hasta su uso a -80°C. Los botones fueron resuspendidos a su volumen inicial con amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M con 0.25 M de sacarosa a un pH=7.4 y centrifugados bajo las mismas condiciones, 100,000 g, durante 60 minutos; se retiró el sobrenadante y los botones fueron resuspendidos en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M con 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT y 20% de glicerol a un pH=7.4; ésta es la fracción microsomal de las muestras, y se almacenó entre -70°C y -80°C hasta su uso.

Para la determinación proteica de las muestras en las diferentes fracciones extraídas se utilizó reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate).

IV.V Pesos

El peso de los animales fue registrado diariamente una vez iniciado el tratamiento al igual que su consumo de alimento. El peso de los animales fue registrado de manera individual mientras el consumo de alimento fue registrado por grupo de tratamiento.

El alimento consumido se registraba por tratamiento de la siguiente manera: cada día se pesaba el alimento de la caja y se dividía entre el número de ratas que contenía, la bandeja de alimento se dejaba todos los días con 500 kilogramos del mismo, para saber cuánto alimento consumían.

IV.VI Medición de glutatión

- **Material**

Amortiguador de fosfatos de sodio 143 mM con EDTA 6.3 mM, DTNB 6 mM pH=7.5 (solución de trabajo). NADPH 0.3 mM preparado en la solución de trabajo, GSH reductasa 50 U/mL, 2-vinilpiridina, trietanolamina, hidróxido de amonio (NH₄OH),

- **Metodología**

La metodología utilizada fue el ensayo enzimático descrito por Anderson (1985). Se agregó ácido 5-sulfosalicílico en las muestras designadas para la medición de glutatión en una proporción de 1:5 con respecto a su volumen, se homogenizó con un sonicador Microson ultrasonic cell disruptor a potencia 4. El volumen final de la muestra fue 333 μL , se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos, y se recuperó el sobrenadante como muestra a analizar. Para la determinación de GSH total se agregó a cada muestra 420 μL de NADPH, 120 μL de amortiguador, 60 μL de DTNB y 3 μL de muestra. Las muestras se pusieron a incubar a baño maría durante 10 minutos a 30°C. Se transfirieron las mezclas a una placa de 96 pozos, se añadieron 2 μL de GSH reductasa para iniciar la reacción e inmediatamente se midieron en multidetector de microplaca a 410 nm.

Para la determinación de GSSG fue realizada una derivatización del glutatión reducido (GSH). En la reacción de derivatización se agregaron 60 μL de la muestra más 1.2 μL de 2-vinilpiridina y se agitó, se añadió trietanolamina lentamente ~10 mg y por último se añadieron 4 μL de NH_4OH , se midió el pH de la muestra para verificar que estuviera entre 6 y 7. Se dejaron reposar las muestras durante 60 minutos, se agregaron 420 μL de NADPH, 120 μL de solución de trabajo, 60 μL de DTNB y 60 μL de muestra. Las muestras se pusieron a incubar a baño maría durante un lapso de 10 a 15 minutos a 30°C. Se transfirieron las mezclas a una placa de 96 pozos, se añadieron 10 μL de la dilución de GSH reductasa para iniciar la reacción e inmediatamente se miden en multidetector de microplaca a 410 nm (fig. 3).

El GSH fue determinado al hacer una substracción del GSSG a la cantidad de glutatión total. Las unidades fueron reportadas como nmol de GSH o GSSG/g hígado.

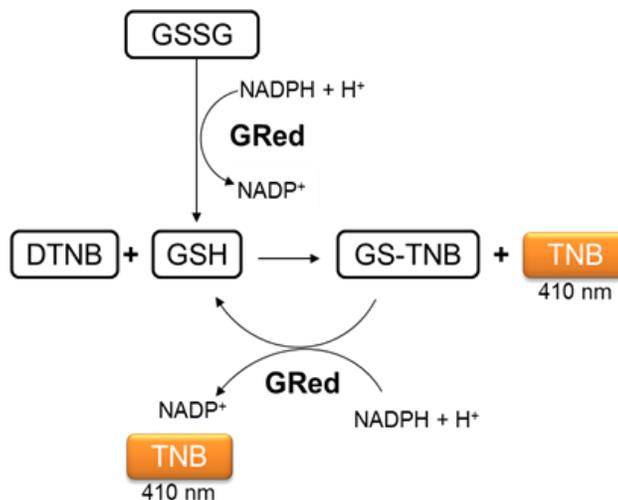


Figura 3. Reacciones de la técnica de glutación total (GSH-total) y glutación oxidado (GSSG), DTNB se une a GSH para formar GS-TNB y al reducirse este compuesto se libera TNB que es el compuesto a evaluar.

IV.VII Medición de Peroxidación Lipídica (TBARS)

- **Material**

Amortiguador de hidroxitolueno butilado BHT 0.1 M disuelto en buffer de fosfatos 0.1 M y metanol en una relación 1:1 pH=7.0; solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) 26 mM con ácido clorhídrico 0.2 M y 6.66% de ácido tricloroacético (TCA), solución: n-butanol/piridina (15:1)

- **Metodología**

El método para la cuantificación de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) fue el descrito por Janero y Burghardt (1989). Se agregó al hígado fresco 800 μ L de amortiguador de hidroxitolueno butilado BHT y se homogenizó con el sonicador Microson ultrasonic cell disruptor a potencia 4, se centrifugaron las muestras a 3,000 g durante 10 minutos. Para la reacción de derivatización se recuperaron 200 μ L del sobrenadante en un tubo de ensaye de 3 mL y se le agregó 1 mL de ácido tiobarbiturico (TBA), se pusieron los tubos a baño maría hirviendo durante 30 minutos. Se agregó 1 mL de la solución n-butanol/piridina se pasaron las muestras a tubos eppendorf de 2 mL, se centrifugó a 3,000 g durante 15 minutos, se recupera el sobrenadante y se lee a 532 nm (fig. 4).

Los resultados fueron expresados como nmol TBARS/mg proteína. En la elaboración de los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar ϵ para TBARS= 156,000 $M^{-1}cm^{-1}$.

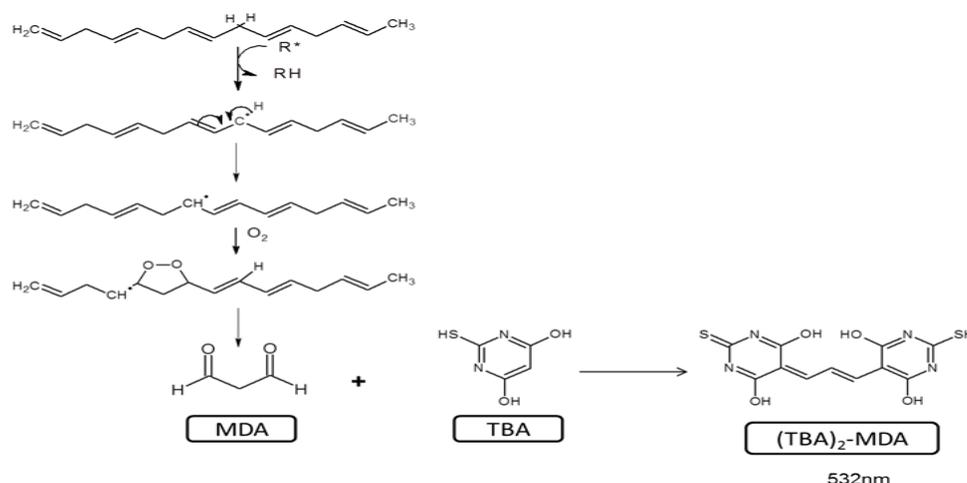


Figura 4. Representación de lípidos al unirse a radicales libres principalmente especies reactivas de oxígeno, dando como resultado malondialdehído (MDA) que puede unirse al ácido tiobarbitúrico (TBA) y formar el complejo que podemos evaluar.

IV.VIII Medición de Citocromos-P450 totales

- **Material**

Amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M con 20% de glicerol (v/v), EDTA 1 mM y 0.4% de tritón X-100 (v/v) a pH=7.0, fracción microsomal de hígado de rata (0.5-1 mg/mL), ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

- **Metodología**

Para citocromos P450 se utilizó el método descrito por Omura y Sato (1964) y Guengerich (2001). Se agregaron 200 μL de cada muestra a 2 mL del amortiguador de fosfatos de potasio, se homogenizó bien y de cada uno de los tubos se separaron 1 mL para el blanco y 1 mL de muestra (microsomas) y se midió una línea basal entre 400 y 500 nm. Al blanco se agregaron unos pocos miligramos (una espátula pequeña) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ y a la muestra se le agregaron burbujas de monóxido de carbono (CO) y de la misma manera algunos miligramos de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, se tapó muy bien para que el gas no se escapara y ocurrieran las reacciones y se realizó una segunda lectura entre 400 a 500 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 de doble haz de luz colocando el blanco y la muestra (fig. 5).

El coeficiente de extinción molar utilizado del complejo monóxido hierro-carbono fue de $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El contenido de citocromos P450 fue expresado como nmol/mg proteína.

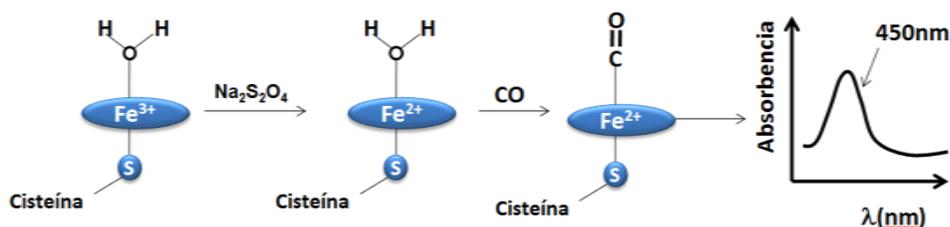


Figura 5. Representación de la técnica de evaluación de citocromos-P450 totales. Al agregar la ditionita de sodio ocurre una reacción de fenton en el grupo Hierro (Fe), que permite que se pueda acoplar en un enlace doble el monóxido de carbono y pueda ser evaluado a 450nm.

IV.IX Medición de citocromo P450-2E1

- **Material**

Amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH=7.2, solución Stock de sustrato: 4-nitrofenol 2 mM disuelto en amortiguador, 4-nitrocatecol 2 mM disuelto en amortiguador, NADPH 50 mM disuelto en amortiguador, microsomas hepáticos de rata disueltos a una concentración final de 0.5 mg/mL, ácido perclórico 1.5 M, NaOH 10 M.

- **Metodología**

Para determinar la actividad de CYP2E1 se midió la concentración de 4 nitrocatecol, la metodología fue tomada de Koop (1986). Se prepararon tubos para la curva patrón y las muestras problema, para la curva patrón se preparó una solución de 4 nitrocatecol 2 mM que se llevó a una concentración final de 0.1 mM para la realización de la curva patrón en la que se usaron los siguientes volúmenes:

Amortiguador (μL)	4-nitrocatecol (μL)	[4-nitrocatecol] (nmol/mL)
1000	0	0
980	20	2
960	40	4
920	80	8
880	120	12
840	160	16
800	200	20

Para las muestras de tratamiento de Estericide Qx se agregaron 895 μL de amortiguador, 50 μL de 4-nitrofenol, 15 μL de NADPH, 40 μL de microsomas. Se preparó una reacción blanco con 950 μL de amortiguador 50 μL de 4-nitrofenol. Una vez agregados los volúmenes correspondientes de microsomas y nitrofenol se preincubó por 5 minutos a 37°C en baño María, se agregaron 15 μL de la solución de NADPH sólo a las muestras en lapsos de 15 segundos entre los tubos de la muestra se dejó en incubación por 10 minutos a 37°C en oscuridad. Una vez terminada la incubación se agregaron 200 μL de ácido perclórico, se mezcló con vórtex y colocaron en hielo, se pasaron las reacciones a tubos eppendorf de 2 mL

y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 100 μL de NaOH, se mezcló con vórtex y se midió la muestra en espectrofotómetro a 510 nm. Se obtuvo la absorbancia neta al restar la absorbancia de la muestra menos la absorbancia del blanco, se grafica la curva patrón para conocer la ecuación de la recta de la concentración de nitrocatecol y se determina la concentración de las muestras.

La actividad fue expresada con las unidades mU/mg de proteína o mU/nmol CYP.

IV.X Medición de catalasa (CAT)

- **Material**

Amortiguador de fosfatos 50 mM pH: 7.0 (se disolvieron 6.81 gramos de fosfatos de potasio monobásico KH_2PO_4 Marca J.T. Baxter, y 8.90 gramos de fosfato disódico dihidratado $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Marca J.T. Baxter en agua destilada; se preparó 1 litro de cada una. Se mezclaron ambas soluciones en una proporción 1:1.5 v/v); peróxido de hidrógeno 30 mM (H_2O_2) 30% de pureza (Marca: J.T. Baxter), Espectrofotómetro Shimadzu UV-1800120V.

- **Metodología**

Basado en el método de Aebi (1984) que mide la disminución del peróxido de hidrógeno, por la acción enzimática de la catalasa. La longitud de onda, 240nm, camino de luz 10mm; volumen final, 3.00mL. Leer el contenido de la muestra 2.00 μL solución enzimática o hemolizado y 1mL de H_2O_2 a temperatura ambiente, en contra de un blanco que contenga 1mL de amortiguador de fosfatos en lugar del sustrato y 2mL de la solución enzimática o el hemolizado. La reacción inicia con la adición de H_2O_2 (fig. 6). La absorbancia inicial debe aproximarse a $A=0.500$. Mezclar bien con un pistilo de plástico y seguir la disminución de la absorbancia durante 30 segundos.

Para evitar la inactivación de la enzima durante el ensayo o formación de burbujas en el tubo debido a la liberación de O_2 , es necesario utilizar una concentración relativamente baja de H_2O_2 (30 mM). Su medición puede llevarse a cabo entre los 0 y los 37°; sin embargo, se recomienda utilizar 20° con un pH=7.0

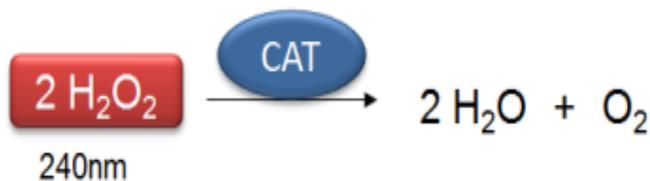


Figura 6. Representación de la reacción. Se evalúa el decremento del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al agregar la enzima. Los productos formados se pueden presentar como burbujas en el tubo de reacción por lo que es necesario ser cuidadoso con los volúmenes.

IV.XI Medición de glutatión reductasa (Gred)

- **Material**

Amortiguador de fosfatos de potasio 0.2 M con EDTA 2 mM (solución de trabajo) a pH=7.0, NADPH 2 mM preparado en amortiguador Tris HCl 10 mM a pH=7.0, GSSG 20 mM

- **Metodología**

El ensayo fue el mismo realizado por Carlberg y Mannervik (1985) en el que se utiliza glutatión oxidado (GSSG) como sustrato y se mide la disminución de NADPH al transformarse en $NADP^+$. En un tubo de 1 mL se agregaron 500 μ L de amortiguador de fosfatos a 30°C, 50 μ L de NADPH, 50 μ L de GSSG y por último se agregó agua desionizada hasta alcanzar el volumen final de 1mL. La reacción se inició al añadir una concentración de la enzima de 0.4 mg/mL, se homogenizó con micropipeta de 200 μ L y se agregaron 200 μ L de la mezcla de reacción en un pozo de una placa de 96 pozos, por triplicado, se siguió la disminución de la absorbancia a 340 nm a 30°C(fig. 7). Una unidad de la actividad de glutatión reductasa es definida como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 μ mol de NADPH en un minuto.

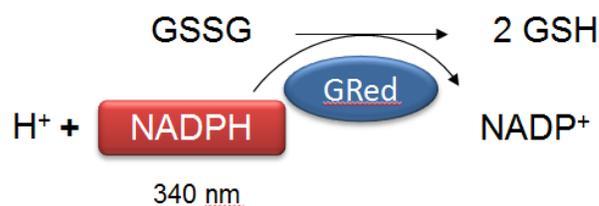


Figura 7. Se mide la transformación de NADPH a $NADP^+$ al ser utilizada como cofactor por la glutatión reductasa. Se utiliza una saturación de GSSG para observar toda la actividad de la enzima GRed.

IV.XII Medición de glutatión transferasa (GST)

- **Material**

Amortiguador de fosfatos a pH=6.5, stock de glutatión (GSH) 0.05 mM, 2,4-dinitroclorobenceno(CDNB) 0.125 mM, muestra citosólica 0.03-0.05 mg/mL de proteína.

- **Metodología**

Al utilizar la técnica utilizada por Habig y Jakob (1981) se determinó la actividad de glutatión S-transferasas totales. Se agregaron 890 μ L de amortiguador de fosfatos en un tubo eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se agregaron 100 μ L de GSH, se agregaron 50 μ L de CDNB. Se realizó un blanco con todas las sustancias menos la enzima para restarlo a los resultados.

La reacción se inició al agregar 10 μ L de proteína citosólica, se registró la absorbancia durante 3 minutos a 340 nm (fig. 8), homogenizando bien y agregando 200 μ L por pozo en placa de 96 pozos por triplicado, la actividad enzimática es calculada utilizando el coeficiente de extinción molar de 9.6 mM⁻¹cm⁻¹ y expresada como U/mg proteína.

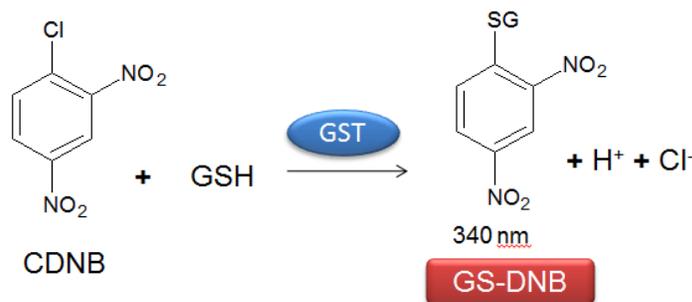


Figura 8. Representación de la reacción. El CDNB (2,4-dinitroclorobenceno) se une al GSH (glutatión reducido) por la acción de la GST (glutatión S-transferasa) para formar el complejo GS-DNB el cual es el que evaluamos para determinar la actividad de la enzima. Se libera cloro y un protón de la reacción.

IV.XIII Medición de glutatión peroxidasa (GPx)

- **Material**

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 2.5 mM, EDTA 1.1 mM, azida de sodio (NaN₃) 1.1 mM, NaCl 1.14 M, Mezcla de amortiguador de fosfatos 55.6 mM a pH=7.0, NADPH 0.2 mM, Gred 25 U/mL, GSH 1 mM.

- **Metodología**

La evaluación de GPx se realizó de acuerdo al método descrito Lawrence y Burk (1976). Se perfundieron los hígados de las ratas con NaCl al 1.14 M posteriormente se homogenizaron en sacarosa al 0.25 M, se centrifugó el sobrenadante a 105,000 gravedades durante 1 minuto.

Por otro lado se combinaron el EDTA, la azida de sodio, la glutatión reductasa (Gred) y el glutatión reducido (GSH), la mezcla de reacción se hizo al inicio de cada experimento calculado para 1 mL considerando que la fuente enzimática fue de 0.1 mL añadida a alrededor de 0.8 mL de la superficie de la mezcla y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de dar inicio a la reacción añadiendo 0.1 mL de la solución de peróxido de hidrógeno. Se agregaron 200 μ L por pozo en una microplaca de 96 pozos (fig. 9). Se registró la absorbancia a 340 nm durante 5 minutos, la actividad fue calculada de la pendiente de estas líneas como micromoles de NADPH oxidados por minuto. Para los blancos se sustituyó la enzima por agua destilada. Posteriormente la proteína fue medida por el método de Lowry. Y los resultados fueron expresados como μ mol/min/mg proteína.

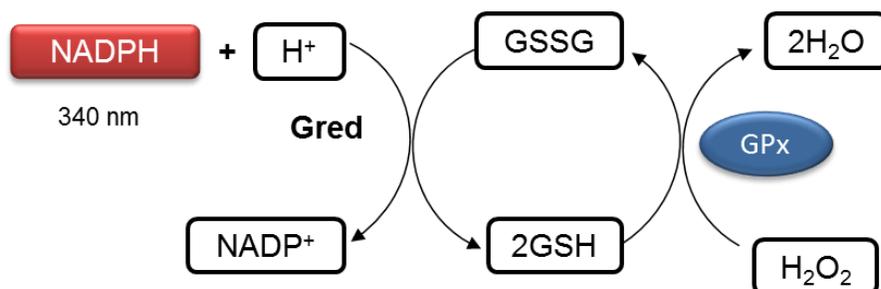


Figura 9. Representación de la reacción. Se agrega en condiciones saturadas peróxido de hidrógeno que será metabolizado por la enzima, se unirá a glutatión reducido y formará glutatión oxidado y con ayuda de la glutatión reductasa volverá a reducirse. Se evalúa la transformación del cofactor NADPH a NADP⁺.

IV.XIV Medición de superóxido dismutasa (SOD)

- **Material**

Amortiguador de fosfatos de potasio 0.05 M a pH=7.8 con EDTA a 0.122 mM, xantina oxidasa 0.122 mM, xantina 0.122 mM, azul de nitro-tetrazolio (NBT) 30.6 μ M, suero fetal bovino (SFB) 0.006%, carbonato de sodio (Na₂CO₃) 49 mM, homogenado de hígado de rata (dilución 1:50), cloruro cúprico 0.8 mM.

- **Metodología**

La metodología fue realizada de acuerdo a lo propuesto por Beauchamp y Fridovich (1971). Se homogenizó el tejido en un mezclador waring para la obtención de los extractos utilizando un volumen de 2 mL de amortiguador de fosfatos de potasio seguido por una centrifugación a 20,000 gravedades durante

10 minutos para remover las partículas sobrantes, el homogenado fue clarificado posteriormente por centrifugación.

Se agregaron 166 μL de amortiguador de fosfatos de potasio, azul de nitro-tetrazolio, xantina, suero fetal bovino, carbonato de sodio y 33 μL del homogenado. La reacción se inició agregando 30 μL de xantina oxidasa, se incubó durante 30 minutos. Se agregaron 66 μL de cloruro cúprico para detener la reacción. Una vez que se detuvo se agregaron 200 μL por pozo en una placa de 96 pozos y se repitió cada muestra por triplicado. La reducción de NBT se siguió a 560 nm (fig. 10). Se realizó un blanco en el cual no hubo enzima, se consideró como el 100% de la reducción de NBT, el porcentaje de proteína que inhibió el 50% de la reducción de NBT fue definida como una unidad de actividad de SOD. Los resultados fueron expresados como U/mg proteína.

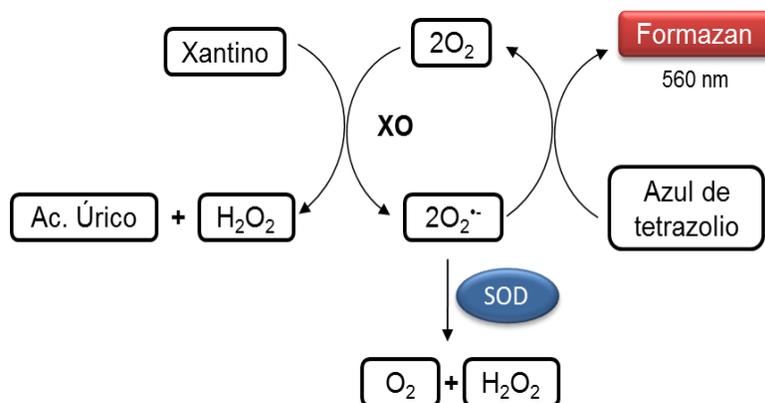


Figura 10. Representación de la reacción. Se logra la formación de 2 moléculas de anión superóxido al agregar en condiciones saturadas xantina y xantina oxidasa. Una vez que se forman las especies reactivas de oxígeno actúa nuestra enzima y forma oxígeno y peróxido de hidrógeno, 2 moléculas de oxígeno actúan con el azul de nitro-tetrazolio para dar lugar al formazan que se evalúa a 560nm.

IV.XV Evaluación de micronúcleos en médula ósea (MNPCE)

- **Material**

Material quirúrgico (2 pinzas, tijeras bisturí), jeringas de 10mL y de 20mL, sujetador y filtros de policarbonato con poro de 10 μm , celulosas: α -celulosa y Sigma cell Tipo 5, tubo vacutainer con heparina sódica (Marca: Vactuainer B-D) conteniendo 3 mL de suero fetal bovino (SFB), Wright-Giemsa modificado (Sigma-Aldrich WG16), metanol, Entellan, solución de Sörensen a $\text{pH}=7.0$, solución de Hank, portaobjetos y cubreobjetos.

- **Metodología**

La evaluación se hizo de acuerdo con el método descrito por Romagna y Staniforth (1981). Se cortó a nivel del trocánter del hueso y a la parte epicondilar se le introdujo la aguja de una jeringa de 5 mL, girándola lentamente hasta quedar dentro del hueso, se colocó el extremo del trocánter adentro del Vacutainer con 3 mL de SFB mientras del otro lado se sostuvo con la jeringa, se absorbió el SFB que pasó por el interior del hueso y su contenido se recibió en la jeringa, hasta absorber todo el SFB.

Previamente al sacrificio se habían preparado las columnas con jeringas de 20mL boca abajo a las que se les colocó en la base un círculo de papel seda para soportar la columna, se vertieron 1.5g de la mezcla de celulosas (α -celulosa + Sigma cell tipo 5 en una proporción 1:1) para empacar adecuadamente las celulosas se presionó con el émbolo de una jeringa de 10mL hasta que llegó a la marca de 4.5mL en la jeringa de 20mL. Se colocó un sujetador en la rosca de la punta de la jeringa con un filtro integrado de policarbonato de 10 μ m (Whatman) (fig.11). Se agregaron los 3mL de la médula ósea extraída, al centro de la columna de celulosas y se agregaron 25mL de solución de Hank.

Una vez que toda la solución pasó por la columna se centrifugó a 2,200 rpm durante 10 minutos, se removió el sobrenadante dejando únicamente el paquete celular, se realizó un segundo lavado bajo las mismas condiciones y nuevamente se removió el sobrenadante, dejando un volumen mínimo, se realizó un frotis utilizando 3 μ L de la suspensión de células, se fijó en una caja de Coplin con metanol durante 10 minutos. Una vez fijadas las muestras se pueden almacenar hasta su tinción. Para la tinción se prepararon 2 coplin: uno con 50mL del colorante modificado Wright-Giemsa y la otra con 50mL de la solución de Sörensen a pH=7.0, se sumergieron las laminillas en Coplin con colorante por 2.5 minutos y luego se sumergieron en el amortiguador Sörensen por 5 minutos, posteriormente se enjuagaron al chorro de agua desionizada y se dejaron secar por lo menos una noche. Para montar las laminillas se dejaron caer 3 o 4 gotas de Entellan cubriendo inmediatamente con un cubreobjetos y ejerciendo presión para que el Entellan se distribuyera homogéneamente, la laminilla se dejó secar durante 24 horas antes de su evaluación. Se evaluaron 2,000 células policromáticas por rata utilizando un microscopio óptico de campo claro, e identificando la presencia de micronúcleos con un aumento de 1000X.

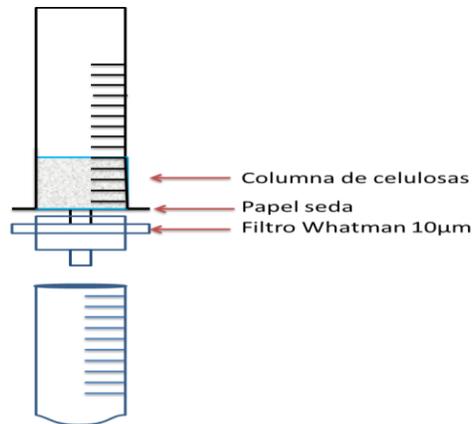


Figura 11. De éste modo debe de observarse la jeringa en la que se colocará la columna de celulosas y por la que se pasarán las células junto con la solución de Hank. Si se realiza correctamente se eliminarán una enorme cantidad de basuras y células que pudiesen causar ruido al momento de la evaluación.

IV.XVI Análisis

Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 20, se aplicó una prueba Kolmogorov-Smirnov (K-S test) para evaluar si los datos tenían una distribución normal. Los datos presentaban una distribución normal por lo que se aplicó la prueba paramétrica ANOVA de dos vías para incluir la diferencia entre sexos. Para la comparación de las medias se utilizó la prueba post hoc de Tukey, se utilizaron los promedios de los datos obtenidos de cada grupo de ratas y se consideró un $\alpha \leq 0.05$ (Mackenzie, 2005). Para el análisis de micronúcleos y la comparación de las frecuencias de controles negativos contra los tratamientos se utilizó la prueba F de Fisher, ya que al tener diversos tratamientos y estar afectadas las frecuencias por diversos factores es más confiable la evaluación en las varianzas (Adler, 1998)

V. RESULTADOS

V.I Evaluación de consumo de alimento y ganancia de peso

Al registrar el promedio de consumo de alimento diario por rata en cada tratamiento no se reportaron diferencias significativas. El consumo se mantuvo comparable al control negativo en casi todos los casos excepto para el tratamiento de 0.1mL/100 g (Gráfico 1 y 2).

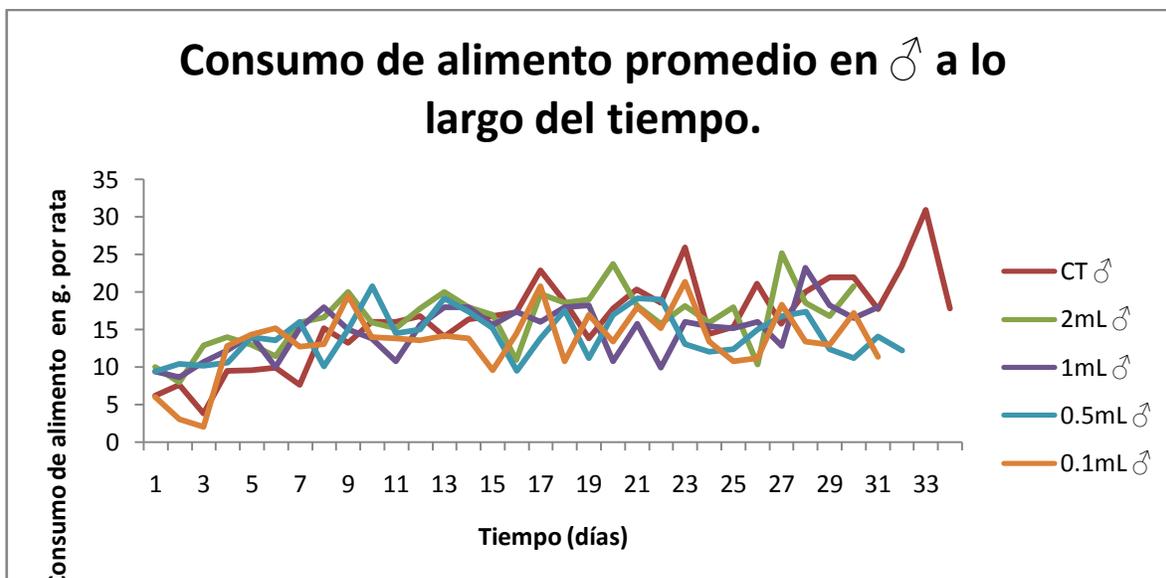


Gráfico 1. Consumo de alimento en gramos por cada tratamiento para machos. Valores de K-S prueba de normalidad $z=0.701$ y $p=0.710$. Se encontró una diferencia marginalmente significativa en el tratamiento de 0.1mL/100 g con una $p=0.058$ de significancia.

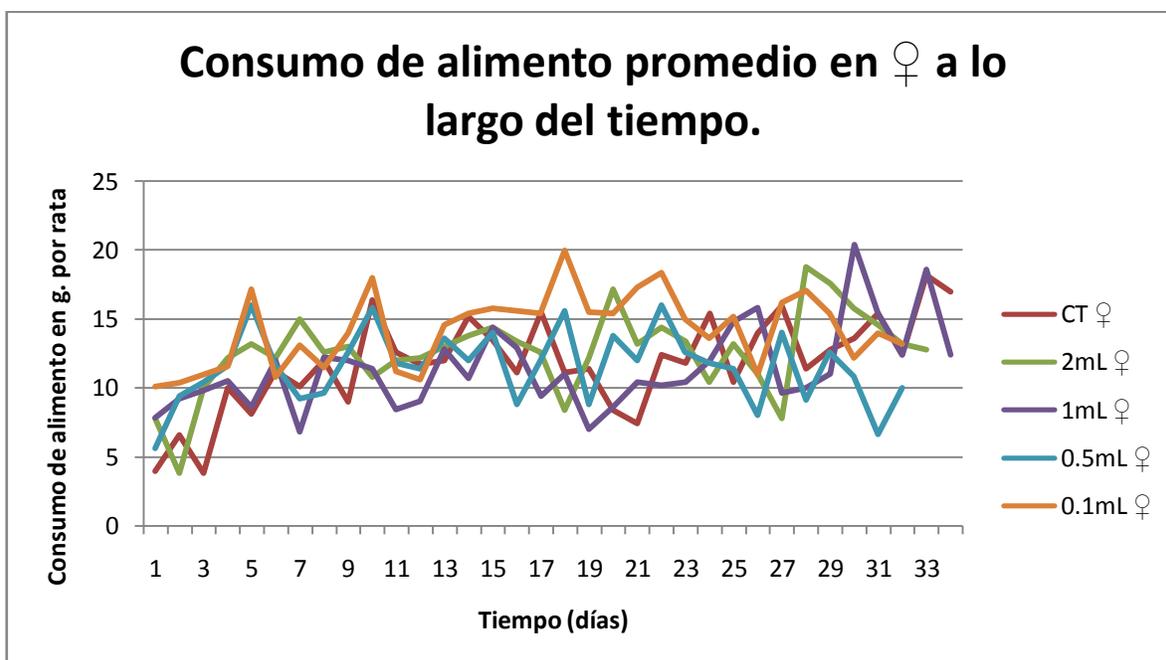


Gráfico 2. Consumo de alimento en gramos por cada tratamiento para hembras. Valores de K-S prueba de normalidad $z=0.638$ y $p=0.810$. Se encontró diferencias significativas entre el control negativo y el tratamiento de 0.1mL/100 g con una $p=0.009$ de significancia.

Sin embargo en la ganancia de peso por grupo se observaron diferencias significativas en machos con las dosis de 0.5mL/100 g ($p=0.005$) 1.0mL/100 g ($p=0.000$) y 2.0mL/100 g ($p=0.002$) y en hembras con las dosis de 0.1mL/100 g ($p=0.002$), 1.0mL/100 g ($p=0.007$) y 2.0mL/100 g ($p=0.0075$) aunque no fue el

mismo efecto, ya que en machos disminuyó la ganancia de peso, mientras en hembras, aumentó. (Gráfico 3 y 4).

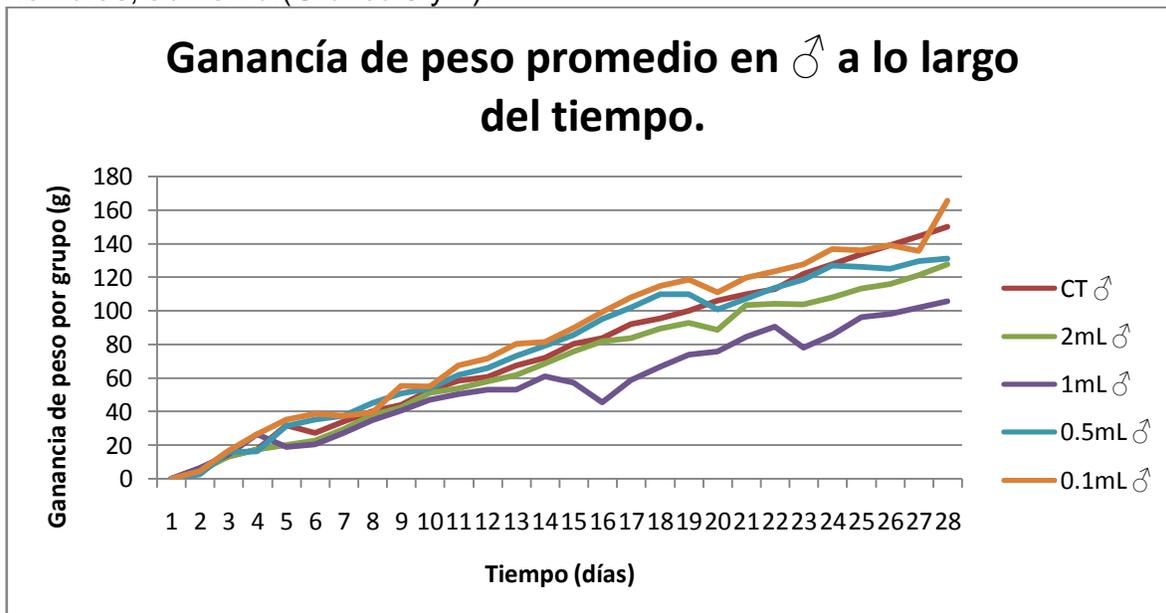


Gráfico 3. Promedio de la ganancia de peso en cada rata por cada día que duró el tratamiento para machos.

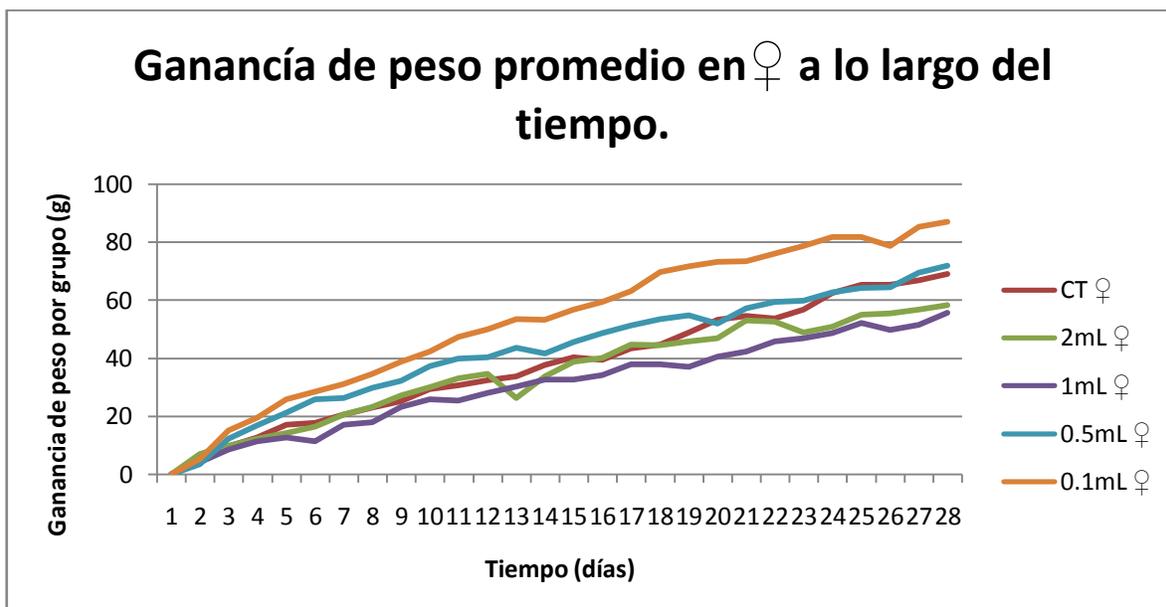


Gráfico 4. Promedio de la ganancia de peso en cada rata por cada día que duró el tratamiento para hembras.

V.II Evaluación de estrés oxidante: GSH/GSSG y peroxidación lipídica (TBARS)

Se observaron cambios significativos en la razón de GSH/GSSG así como en la peroxidación lipídica.

Las dosis más altas de tratamientos en machos (1.0 mL/100 g y 2.0 mL/100 g) y la dosis en hembras de 1.0mL/100g redujeron la razón de GSH/GSSG en comparación con los controles negativos (Gráfico 5).

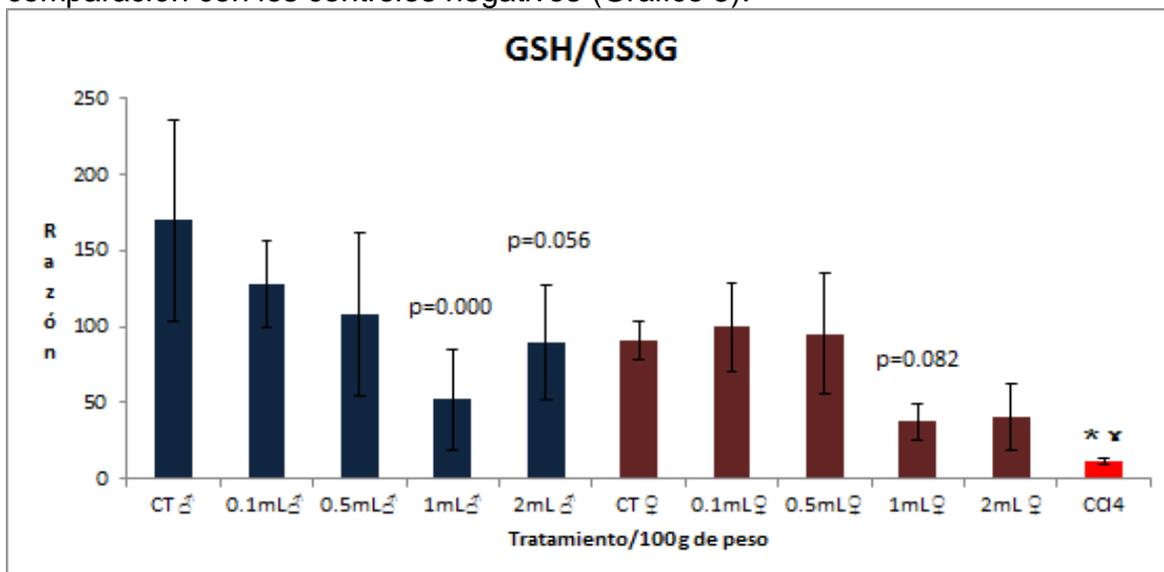


Gráfico 5. Proporción de glutatión reducido sobre el glutatión oxidado (GSH/GSSG) por tratamiento. Valores de K-S prueba de normalidad $z=0.475$ y $p=0.978$

Para TBARS se incrementó significativamente sólo en los machos en las dosis 0.1 mL/100 g, 0.5 mL/100 g y 1.0 mL/100 g (Gráfico 6).

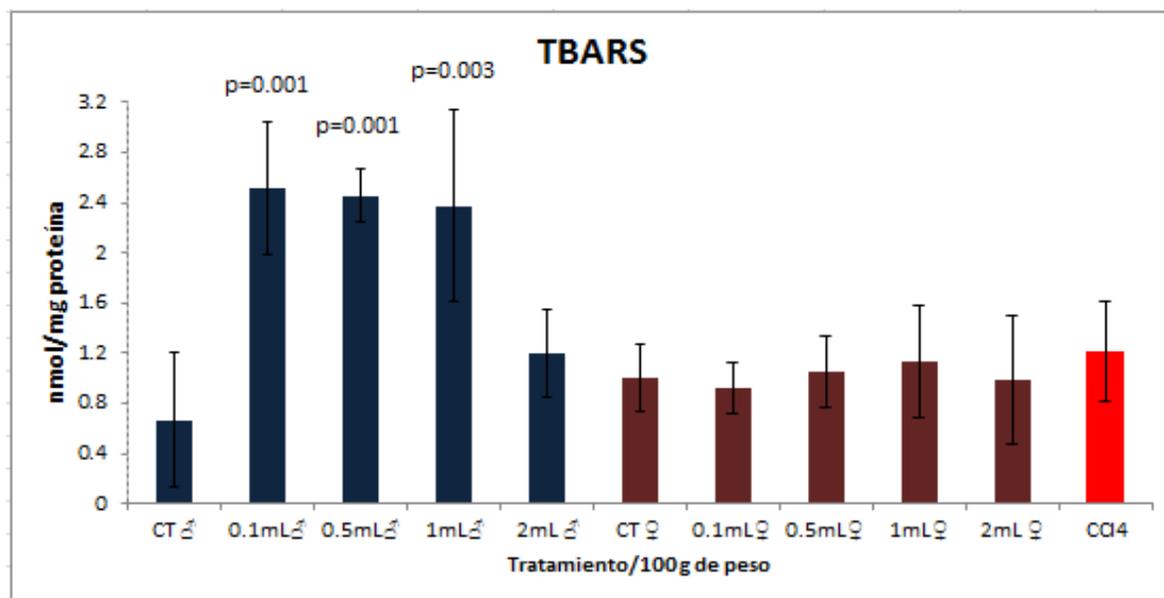


Gráfico 6. Peroxidación lipídica de cada tratamiento representada en nanomol sobre miligramo de proteína. Valores de K-S prueba de normalidad $z=0.805$ y $p=0.537$

V.III Metabolismo - Fase I: Cuantificación de P450 totales y actividad CYP2E1

Las enzimas de citocromos P450 hepáticas no mostraron cambios significativos con el tratamiento (Gráfico 7).

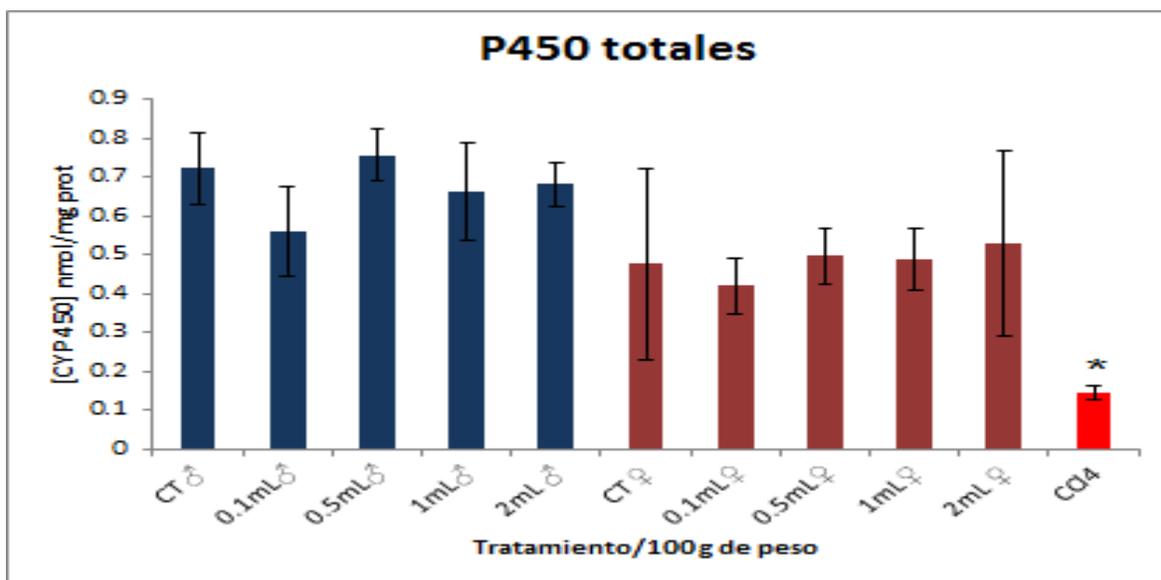


Gráfico 7. Cuantificación de citocromos P-450 totales por cada tratamiento en nanomol sobre miligramo de proteína. Valores de K-S prueba de normalidad $z=1.085$ y $p=0.190$

Al evaluar de manera individual la isoforma CYP2E1 se observó una inducción significativa con el tratamiento de la dosis más alta (2.0 mL/100 g) en machos, sin embargo esto no ocurrió en hembras (Gráfico 8). Se encontró además un incremento significativo con la dosis mediante correlación lineal ($R^2=0.97$, $p=0.0025$) (Gráfico 9).

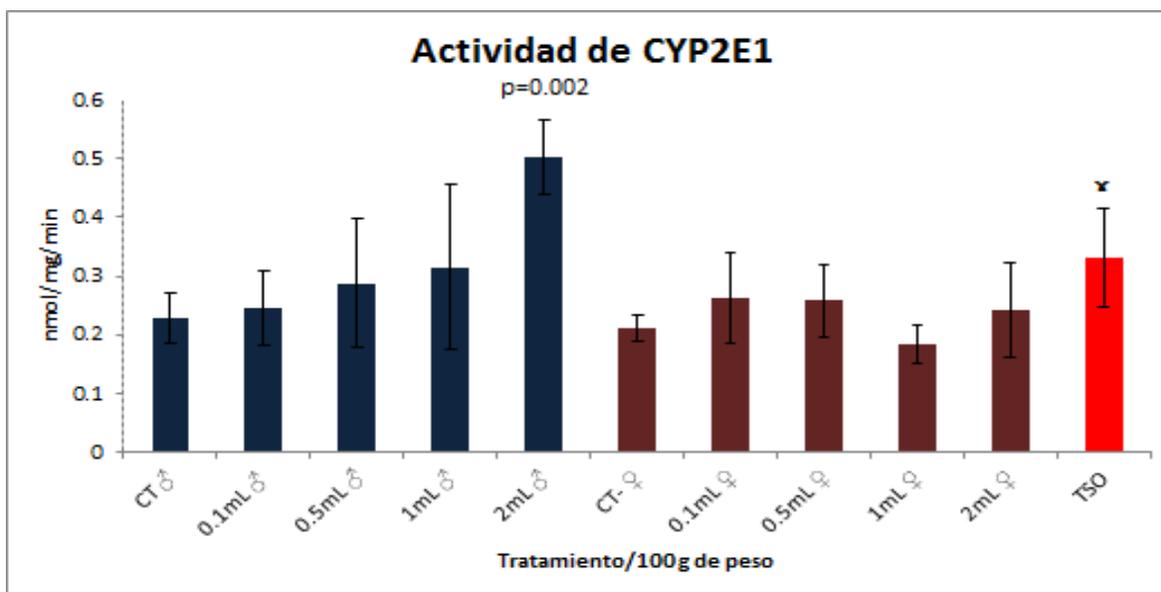


Gráfico 8. Actividad la isoforma CYP2E1 representada en nanomol sobre miligramo de proteína sobre minuto. Valores de K-S prueba de normalidad $z=0.783$ y $p=0.571$

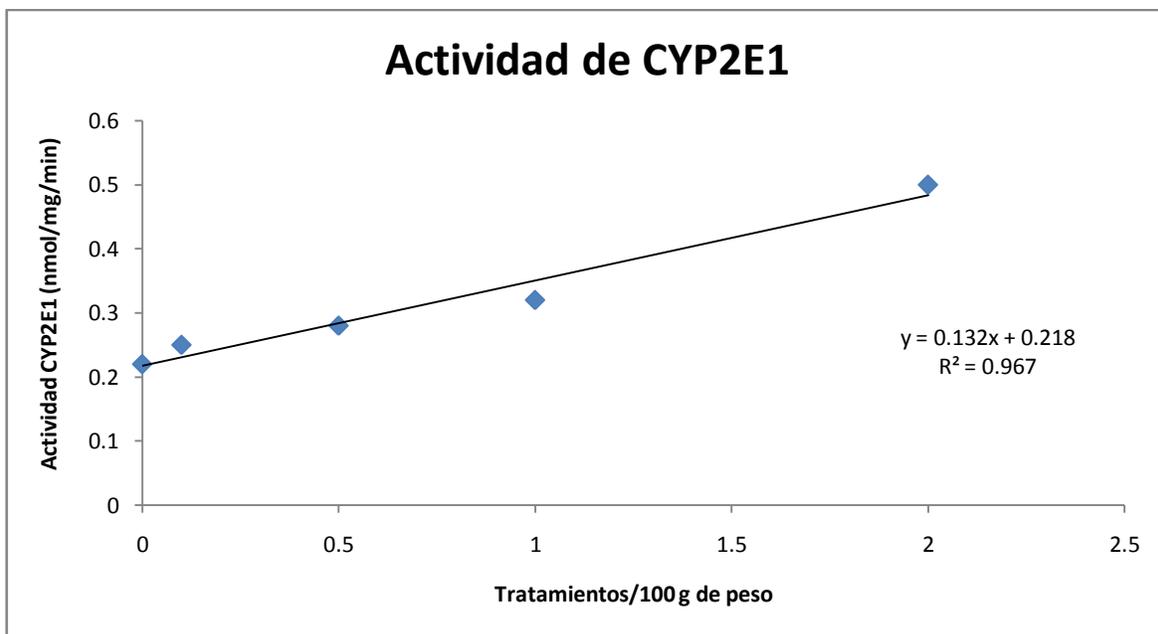


Gráfico 9. Correlación lineal de la actividad de CYP2E1 en machos.

V.IV Metabolismo - Fase II: Actividad de glutatión S-transferasas

La actividad de glutatión S-transferasas, enzimas de fase II -de conjugación-, fue muy similar entre machos y hembras, se obtuvo una aparente disminución de la actividad conforme aumentaba la dosis en machos y hembras sin llegar a ser significativa bajo las condiciones en las que se administraron (Gráfico 10).

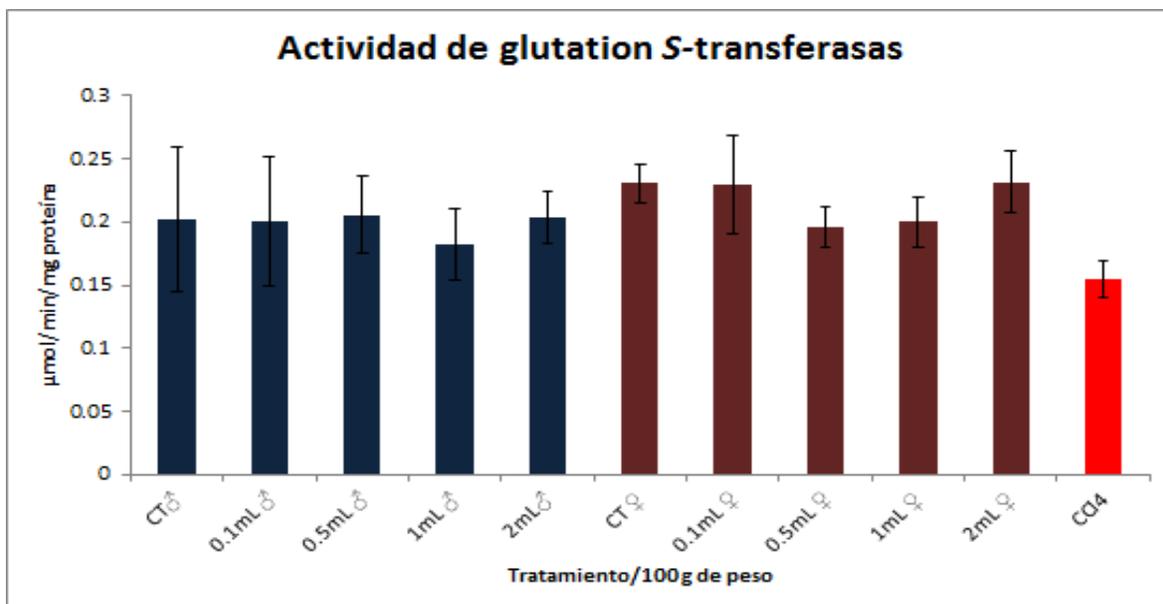


Gráfico 10. Actividad de GST representada en micromol sobre minuto sobre miligramo de proteína. Valores de K-S prueba de normalidad $z=0.837$ y $p=0.486$

V.V Enzimas antioxidantes: CAT, SOD, GPx y Gred

La actividad de enzimas antioxidantes mostró disminución en los tratamientos con el compuesto, aunque sólo algunos tratamientos fueron significativamente diferentes del control negativo.

En la actividad de catalasa se encontraron diferencias significativas en comparación con controles negativos con la dosis de 0.5 mL/100 g de Estericide Qx tanto en machos como en hembras (Gráfico 11). Y se observó una mayor actividad de esta enzima en machos que en hembras.

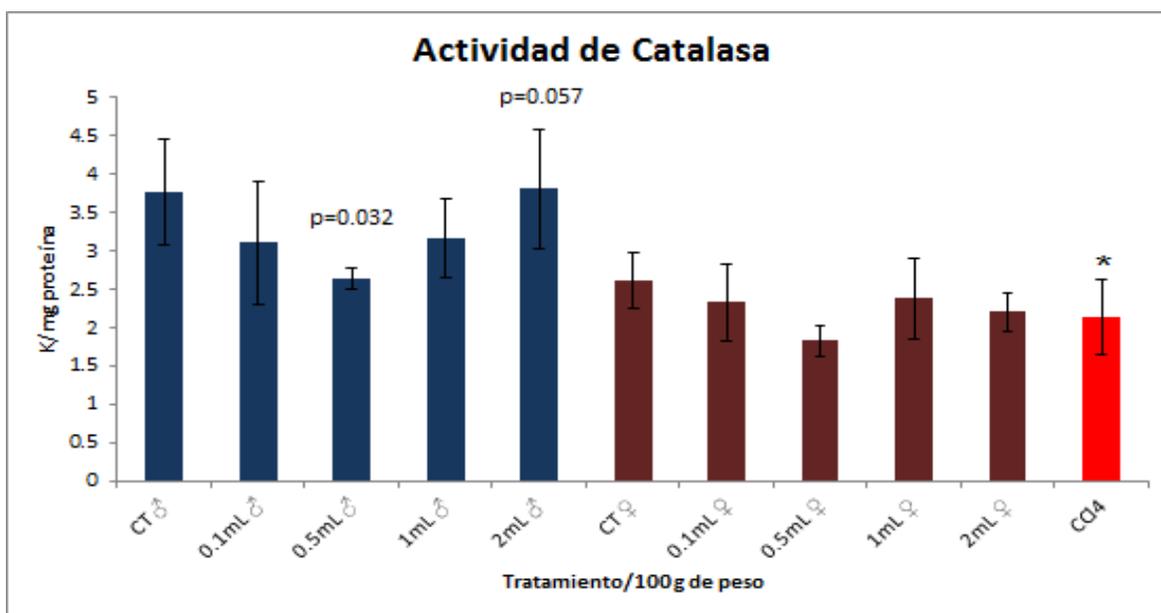


Gráfico 11. Actividad de CAT representada en constante K sobre miligramo de proteína. Valores de K-S prueba de normalidad $z=1.046$ y $p=0.224$

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) no mostró diferencias significativas en machos ni en hembras bajo los tratamientos de Estericide Qx (Gráfico 12).

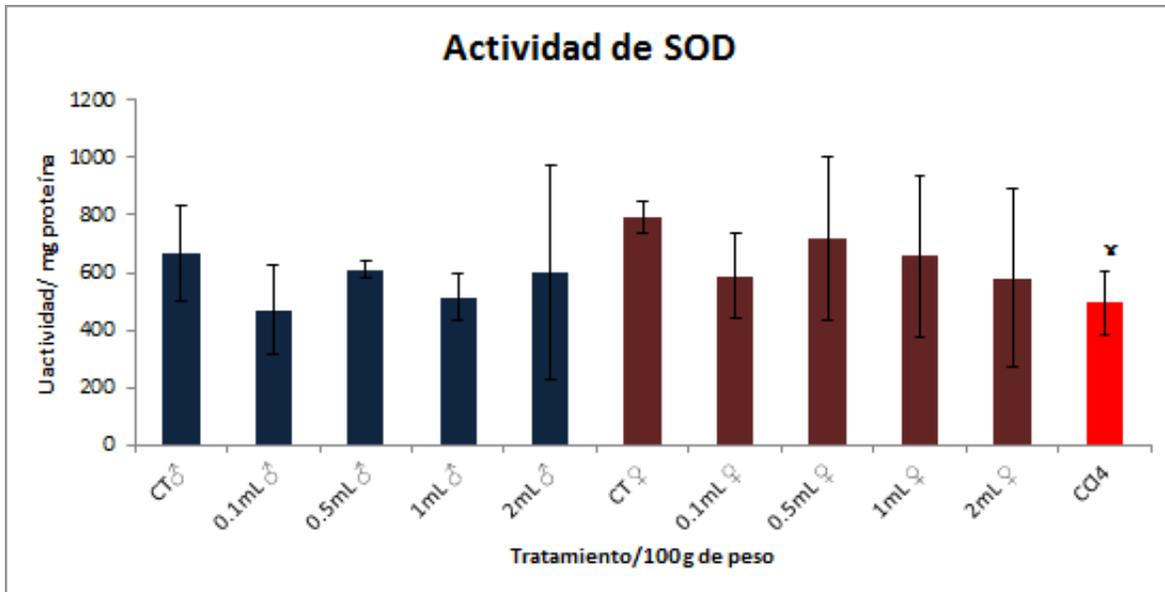


Gráfico 12. Actividad de superóxido dismutasa representada en unidades de actividad sobre miligramo de proteína. Valores de K-S prueba de normalidad $z=0.704$ y $p=0.705$

No se observaron diferencias significativas en la actividad de Glutación peroxidasa (Gpx) bajo ningún tratamiento con Estericide Qx, aunque sí se encontró una mayor actividad de esta enzima en hembras en comparación con los machos (Gráfico 13).

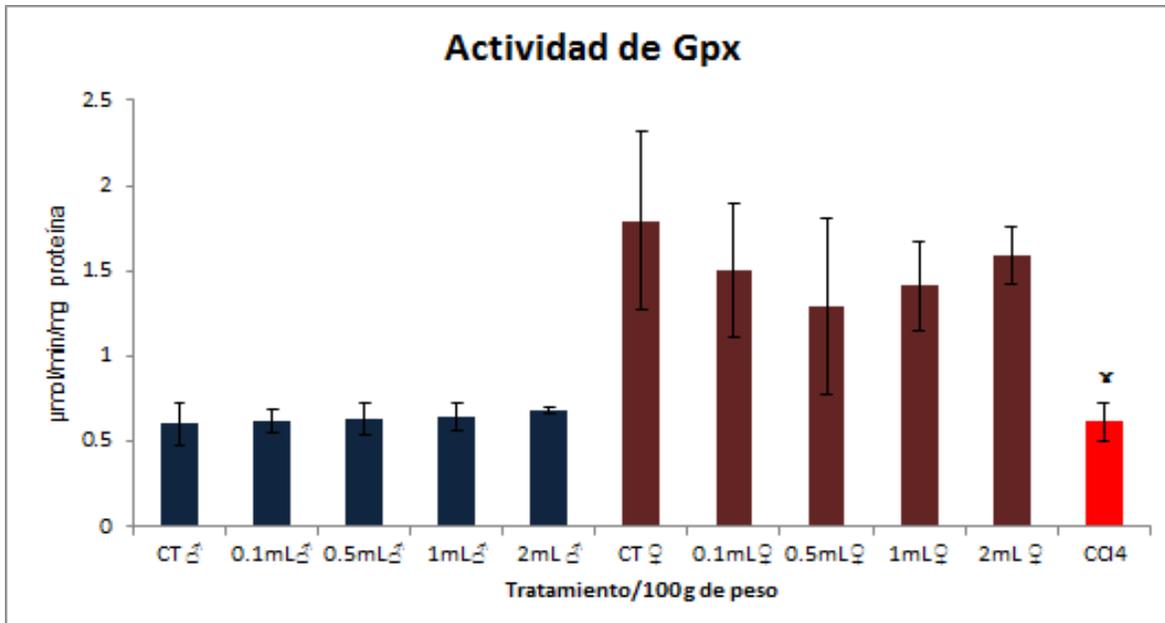


Gráfico 13. Actividad de glutación peroxidasa representada en micromol sobre minuto sobre miligramo de proteína. Valores de K-S prueba de normalidad $z=1.301$ y $p=0.680$

La actividad de glutación reductasa (Gred) no mostró diferencias significativas en ninguno de los dos sexos, bajo las condiciones en las que se trataron los animales (Gráfico 14).

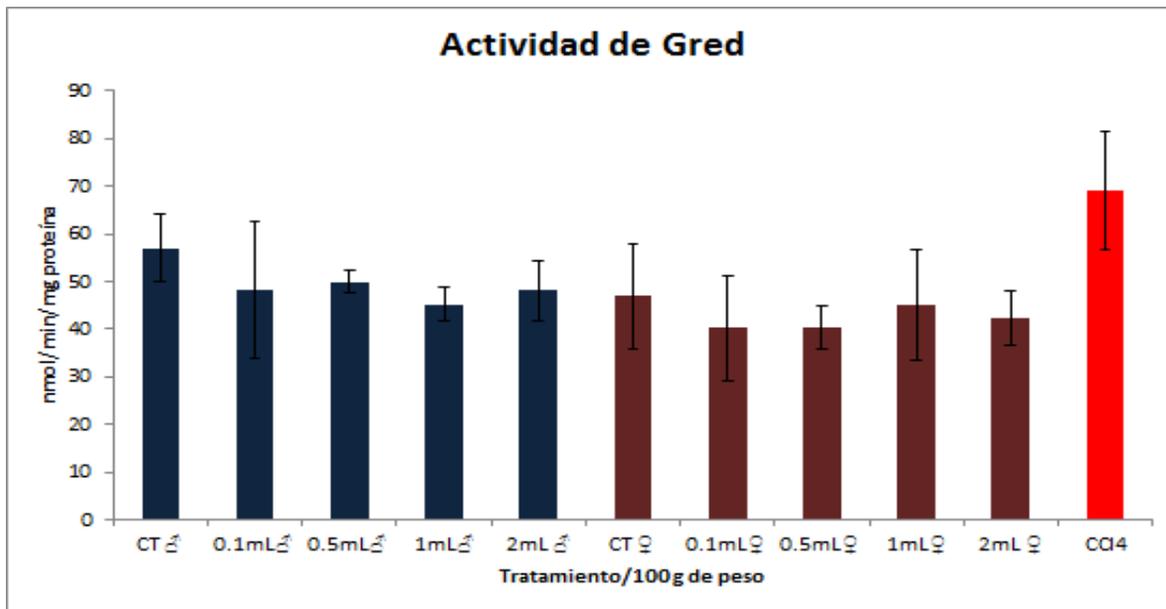


Gráfico 14. Actividad de glutación reductasa representada en nanomol sobre minuto sobre miligramo de proteína. Valores de K-S prueba de normalidad $z=0.981$ y $p=0.291$

V.VI Genotoxicidad: MNPCE

En lo que se refiere a la genotoxicidad del compuesto, no se observaron alteraciones significativas en las frecuencias de micronúcleos de eritrocitos policromáticos de médula ósea, con ninguno de los tratamientos de Estericide Qx en machos ni en hembras (Gráfico 15). En estas pruebas se utilizaron los resultados de benceno como el control positivo. Los valores de la prueba F de Fisher se muestran a continuación:

F de Fisher	Control negativo machos	Control negativo hembras
0.1 mL/100 g	0.371	0.423
0.5 mL/100 g	0.068	0.254
1.0 mL/100 g	0.076	0.814
2.0 mL/100 g	0.490	0.975
Benceno	0.012	0.005

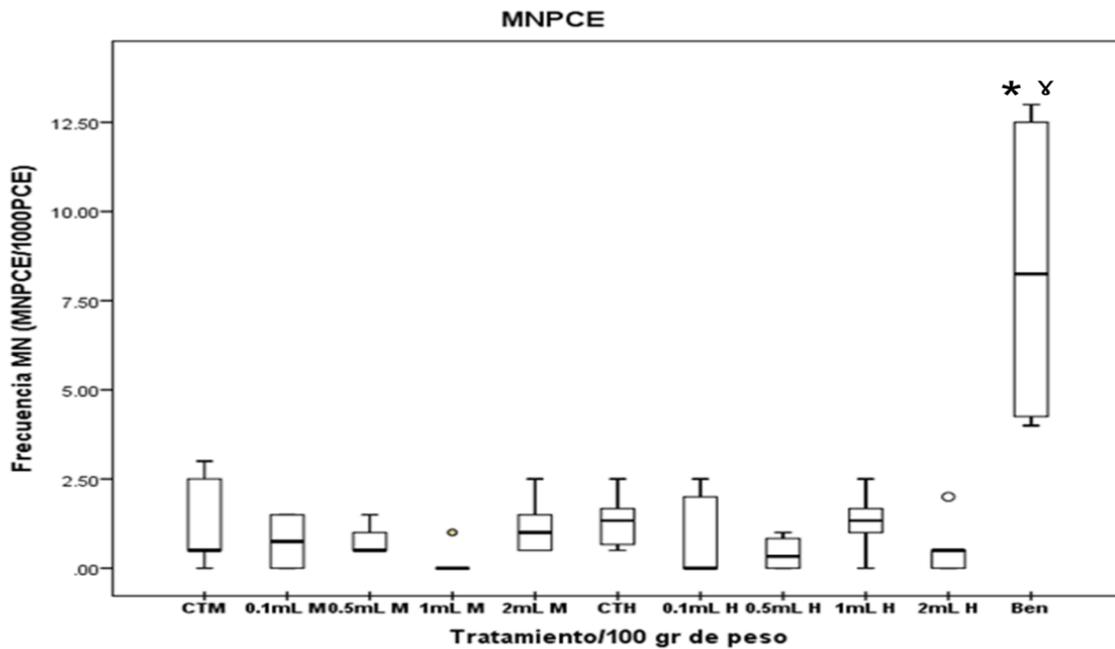


Gráfico 15. Frecuencia de micronúcleos en reticulocitos evaluados en médula ósea de rata. Valores de K-S prueba de normalidad $z=1.255$ y $p=0.86$

Al excluir el control positivo de la gráfica, se puede observar cómo la variación en la frecuencia es muy amplia, en general se encuentran en los rangos de los controles negativos e incluso aparentan una frecuencia de micronúcleos menor. Sin embargo, al comparar los machos contra las hembras, no es estadísticamente significativo ($p=0.363$) (Gráfico 16).

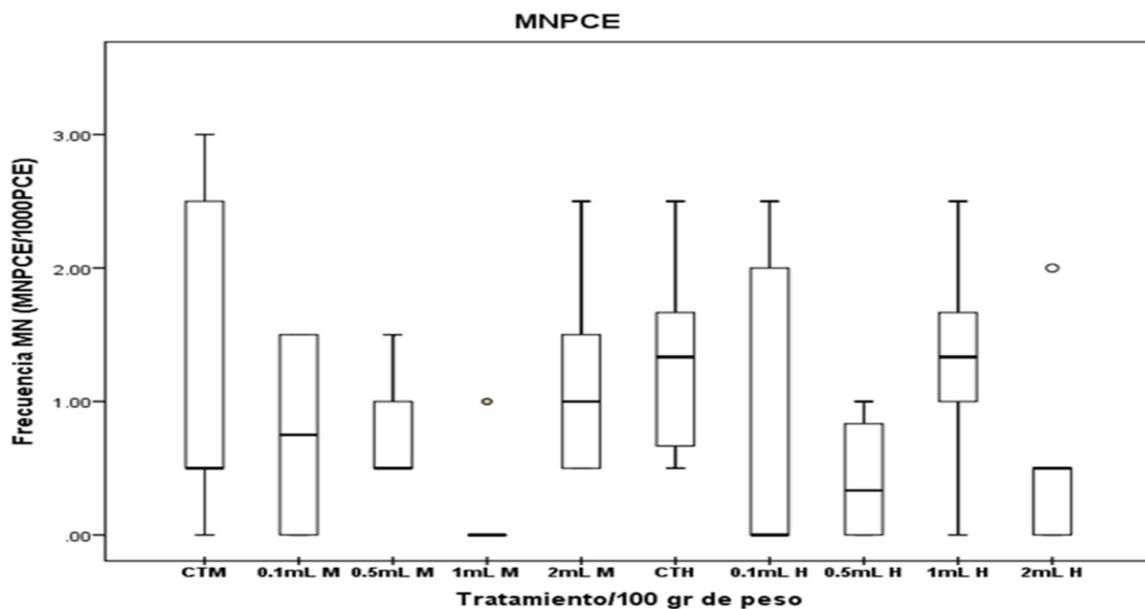


Gráfico 16. Frecuencia de micronúcleos en reticulocitos eliminando el control positivo para una mejor apreciación de la tendencia de cada tratamiento.

V.VII Citotoxicidad: %PCE

Se utilizó el porcentaje de eritrocitos policromáticos (%PCE) como medida de citotoxicidad y tampoco se observaron diferencias significativas, aunque se puede observar que los tratamientos produjeron una tendencia al incremento en este parámetro (Gráfico 17).

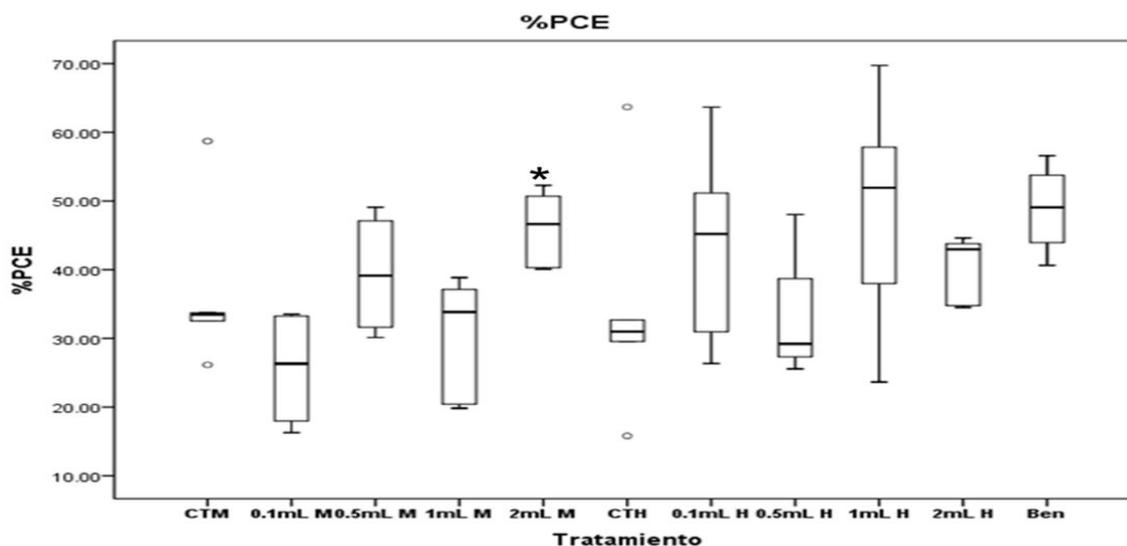


Gráfico 17. Porcentaje de reticulocitos en médula ósea de rata para cada tratamiento. Valores de K-S prueba de normalidad $z=0.869$ y $p=0.436$

Al igual que en el análisis de micronúcleos se eliminó el control positivo y se compararon los tratamientos de los machos contra los tratamientos de las hembras pero no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($p=0.129$) (Gráfico 18).

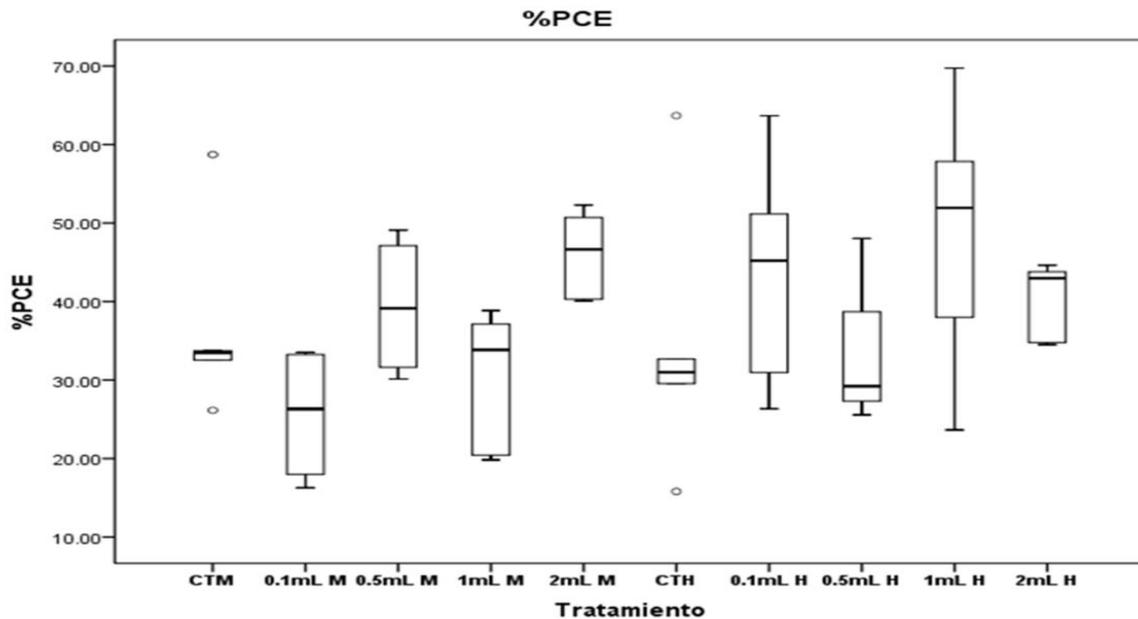


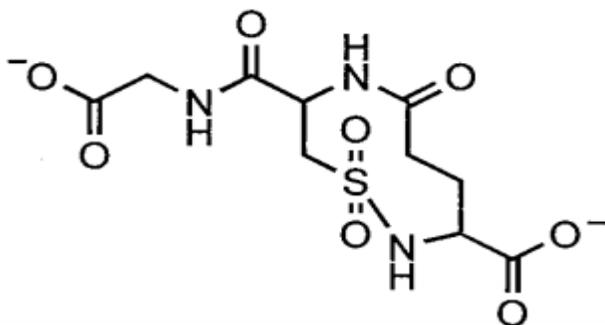
Gráfico 18. Porcentaje de reticulocitos en médula ósea de rata eliminando el control positivo para una mejor apreciación en la tendencia de cada tratamiento.

VI. DISCUSIÓN

En la evaluación de consumo de alimento y ganancia de peso, que son valores generales de los que podemos intuir la información de salud general de los animales, los animales machos y hembras tuvieron un consumo relativo de 11 gramos de alimento al día en los controles y los tratamientos, se reportó un cambio significativo para la dosis de 0.1mL/100 g, cabe destacar que en los tratamientos en machos fue ligeramente menor el consumo y en hembras fue similar excepto por la dosis 0.1mL/100 g en el que fue mayor, probablemente el pequeño decremento general en el consumo de alimento en los tratamientos se debe a que Estericide Qx pudiera eliminar los parásitos gastrointestinales o bacterias, esto generaría que la absorción de nutrientes sea igual de completa utilizando menor cantidad de alimento; sin embargo, ya que las SESI tienen un alto potencial bactericida, vermícida, virucida, etc., (Thorn *et al*, 2011) nada impediría que Estericide Qx eliminara la flora intestinal benigna y que se presentasen daños gastrointestinales. Respecto a esto, no se observó ningún efecto a causa del tratamiento. Por otro lado en la ganancia de peso sí hubo diferencias, en el caso de los machos en donde el control negativo aumentaba entre 5 y 6 g al día, con la dosis de 0.5mL/100 g, 1.0mL/100 g y 2.0mL/100 g fue significativamente menor la ganancia de peso y en el caso de las hembras en donde el control negativo ganaba cerca de los 3 g al día, la dosis de 0.1 mL/100 g

mostró un incremento significativo en la ganancia de peso y decremento en los valores de 1.0mL/100 g y 2.0mL/100 g. Los valores reportados de ganancia de peso en los controles negativos correspondieron con aquellos reportados por la OCDE, bajo las mismas condiciones de ser tratados con solución fisiológica salina al 0.9%. Los valores obtenidos en cuanto al consumo de alimento y ganancia de peso muestran algunas diferencias sobresalientes en la ganancia de peso, pero no en el consumo de alimento, por lo que probablemente existieron diferencias entre la talla de los individuos. El estado de salud general de los animales se mostraba inalterado a simple vista, no se observaron síntomas de enfermedad o descuido, como moquillo o pelaje hirsuto.

La evaluación de estrés oxidante por su parte arrojó resultados en los que se observaba un efecto significativo por la solución Estericide Qx. En machos y hembras se observó que a las dosis más altas de Estericide Qx 1.0 mL/100 g y 2.0 mL/100 g afectan la razón de GSH/GSSG, disminuyéndola lo que quiere decir que existe en el hígado de estos animales mayor cantidad de glutatión oxidado u otros compuestos conjugados como glutatión sulfonamida (Fig. 12) o glutatión tiosulfonato (Winterbourn, 1997) que glutatión reducido el cual es el que protege contra especies reactivas y sirve de sustrato para otras enzimas antioxidantes, por lo que existe estrés oxidante en estas concentraciones. Es importante resaltar que existe una diferencia basal entre machos y hembras acerca de esta razón de GSH, en machos no tratados fue mayor esta razón que en las hembras no tratadas; los tratamientos produjeron en los machos una disminución de hasta 3.2 veces en el valor de esta proporción, mientras que en las hembras, la mayor disminución causada por el tratamiento fue de 2.25 veces por lo que aparentemente los machos estarían sujetos a mayor estrés oxidante que pudo causar una mayor pérdida de glutatión reducido.



Glutathione Sulfonamide
337 Da

Figura 12. Estructura propuesta de glutatión sulfonamida, un producto conjugado de la reacción de HOCl con GSH. Tomado de Pullar M. Juliet, Vissel C.M. y Winterbourn C. Christine.

En concordancia con lo anterior, el otro parámetro de estrés evaluado, que fue la peroxidación lipídica por medio de la técnica de formación de ácido tiobarbitúrico (TBARS), únicamente fue significativo en los machos con los tratamientos de 0.1 mL/100 g, 0.5 mL/100 g y 1.0 mL/100 g. A diferencia de la razón GSH/GSSG no se observaron diferencias basales entre los controles machos y hembras, y las hembras en ninguno de sus tratamientos mostraron el incremento que se observó en los machos en las dosis ya mencionadas. Se puede observar que a una dosis baja de Estericide Qx los machos son más sensibles que las hembras a pesar de que ambos mostraron una disminución significativa en la razón de glutatión. De estos dos resultados, GSH/GSSG y TBARS se desprende que aparentemente las hembras cuentan con un factor adicional de protección contra el estrés oxidante que hace que, a pesar de que su acervo de GSH es menor que en machos, resistan mejor al daño oxidante reflejado en TBARS. El posible factor que le otorga la protección adicional a las hembras pudiera ser la albúmina que en machos se pierde de manera más rápida que en hembras (Gomi *et al*, 2007). La albúmina se caracteriza por mantener la presión en los organismos, sin embargo también realiza la función de transporte de hormonas, mantener el pH, transporte de ácidos grasos. Otra posibilidad pudiera ser alguna de las hormonas esteroideas mayormente producidas en hembras que en machos, o específicamente de ellas: estrógenos, progestágenos, hormonas tiroideas, cortisol, oxitocina, prolactina, etc. (Viña, 2005).

En un trabajo realizado por Panasenko *et al* en 1994, se determinó de manera *in-vitro* que las especies reactivas HOCl y ClO⁻ presentes en la solución Estericide Qx, pueden oxidar constituyentes lipídicos de lipoproteínas, y a su vez afectar la formación de productos primarios en la peroxidación lipídica. Algo observado en los experimentos *in-vitro* de gran relevancia para el presente estudio es que las concentraciones de hipoclorito para obtener una respuesta en peroxidación lipídica no necesariamente debe ser alta, 10 a 100 μM, que está en el rango de lo producido por neutrófilos por acción de la mieloperoxidasa como acción bactericida. Cabe recordar que las concentraciones medidas para Estericide Qx en nuestro laboratorio determinadas mediante espectrofotometría fueron de 0.62 mM de HOCl y 0.374 mM de OCl⁻ (Tabla 1), que es más de lo evaluado por Panasenko, sin embargo, no son directamente comparables las concentraciones usadas en un experimento *in-vitro* con las usadas en uno *in-vivo*.

En las determinaciones de metabolismo de fase I mediante la cuantificación de citocromos P450 no se reportaron cambios significativos bajo ningún tratamiento,

sólo se observó un nivel menor en las hembras en comparación con los machos. La variación entre las hembras, reflejada en la desviación estándar de las hembras en el grupo control fue muy alta. La variación en las hembras probablemente se deba a que los citocromos P450 no únicamente realizan funciones de oxidación para xenobióticos, también influyen en la síntesis de esteroides y en consecuencia de hormonas, se tienen reportes de diferencias de género en cuanto a la producción hormonal siendo mayor en hembras que en machos (Waxman *et al*, 1991).

La actividad de la isoforma CYP2E1 en machos mostró incrementos con cada tratamiento, siendo significativamente diferente del control sólo con el tratamiento más alto de 2mL/100 g. En las hembras, en cambio, no se observaron diferencias significativas con ningún tratamiento ni se observó un incremento con la dosis, como en los machos. Este resultado es semejante al obtenido con TBARS, en el que se observa una clara respuesta en machos, mientras las hembras no mostraron cambios significativos. Nuevamente, se refuerza la idea de que las hembras se encuentran mayormente protegidas en contra del estrés oxidante, sin importar el tratamiento administrado ya que las variaciones son amplias en todos. El incremento de peróxido de hidrógeno por parte de los microsomas a través de los citocromos P450, involucra la formación de aniones de superóxido por medio de reacciones como la de Fenton y la de Haber-Weiss, por lo mismo el estrés oxidante varía dependiendo del sustrato a oxidar al igual que los cofactores involucrados (Ingelman-Sundberg, Johansson, 1983) (Fig. 13).

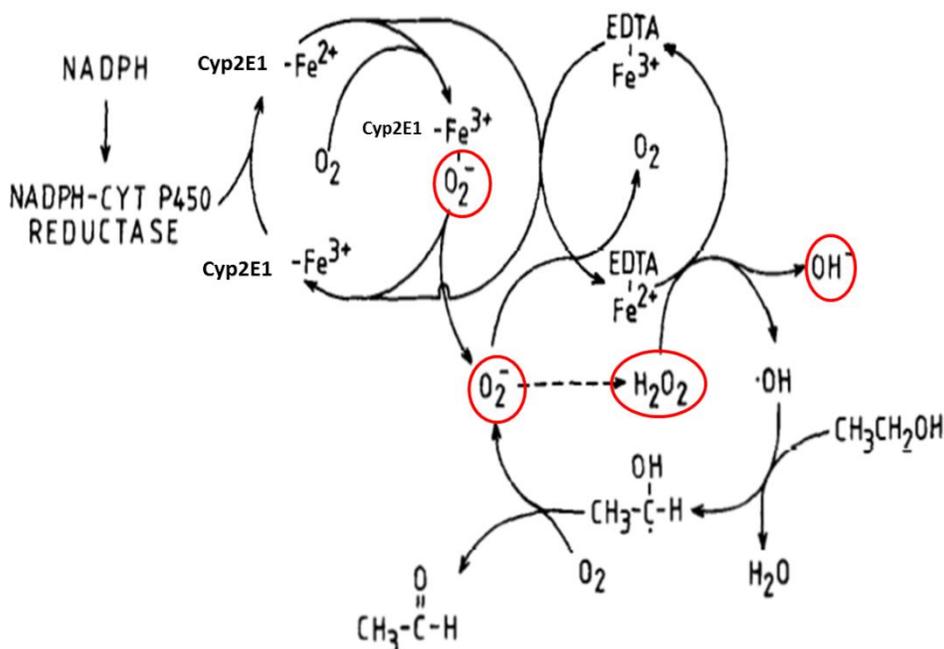


Figura 13. Tomado y modificado de Ingelman-Sundberg y Johansson. Se puede apreciar la formación de especies reactivas de oxígeno en rojo, al utilizar como ejemplo el alcohol.

El citocromo CYP2E1, tiene una preferencia por sustratos pequeños e hidrofóbicos, un incremento en el estrés oxidante puede contribuir de manera significativa con la muerte celular al igual que daña a los tejidos (Sun *et al*, 2001). La respuesta particular de la isoforma a los sustratos presentes en Estericide Qx, pudiera estar contribuyendo de manera indirecta con el estrés oxidante observado en machos. Mientras que en hembras el factor de protección adicional también se hace evidente.

Al evaluar las enzimas de fase II, la actividad de glutatión S-transferasa no presentó significativamente diferencias, sin embargo se observa que la tendencia en machos y hembras es similar en los tratamientos.

La actividad de enzimas antioxidantes se vio alterada de diferente manera, de acuerdo con la enzima que se evaluó. Así, la actividad de catalasa disminuyó significativamente sólo con la dosis de 0.5mL/100g tanto en machos como en hembras, pero en dosis más elevadas no se volvió a observar este efecto. Algo notorio es que en términos generales existe una menor actividad de la enzima catalasa en las hembras en comparación con los machos, incluso en los controles negativos que fueron tratados con solución salina, esto pudiera representar dos cosas: que las hembras se encuentran mejor protegidas en contra de especies reactivas como el peróxido de hidrógeno por la acción de otras enzimas o moléculas antioxidantes, mientras que los machos requieren que esta enzima tenga mayor actividad para estar protegidos, o bien que los machos tienen mayor producción endógena de peróxido de hidrógeno por medio de los microsomas y por lo tanto requieren mayor actividad de esta enzima. En cualquiera de los dos casos, el resultado coincide con lo previamente observado en la razón de glutatión, en la que los machos se encuentran bajo mayor estrés oxidante.

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) mostró en general una disminución de actividad tanto en machos como en hembras, con respecto a los controles negativos. Sin embargo, hubo mucha variación entre individuos y no fue estadísticamente significativa. Esta enzima es de vital importancia debido a que es encargada de inactivar el anión superóxido, generando H_2O_2 que a su vez es degradado a H_2O y O_2 por la catalasa y como se observa, las dos mantuvieron su actividad a niveles normales.

La actividad de glutatión peroxidasa (Gpx) no mostró diferencias con ningún tratamiento en machos ni en hembras, sin embargo se observan claras diferencias basales en los niveles de actividad de esta enzima entre los dos sexos, siendo significativamente mayor en las hembras. Esta enzima se encuentra en el citosol

de la célula y tiene la función de catalizar la oxidación del residuo de selenocisteína en el glutatión (GSH) para formar glutatión oxidado (GSSG); esto lo hace utilizando peróxido de hidrógeno, el cual cede un oxígeno para formar agua como producto secundario (Joseph D., Mannervik B 1997). Esto podría explicar por qué la razón GSH/GSSG es menor en hembras, si ellas eliminaran el peróxido de hidrógeno utilizando en su mayoría la glutatión peroxidasa, mientras esta función en los machos estaría centrada en la catalasa. Sugiriendo nuevamente que el manejo del H_2O_2 es diferente entre machos y hembras y esto se refleja en la razón GSH/GSSG.

En el presente estudio Estericide Qx fue administrado por vía oral, de tal forma que no había herida en la que pudiesen actuar los componentes presentes en Estericide Qx. Se puede especular que tanto el ácido hipocloroso, el ion hipoclorito y el cloro libre presentes en Estericide Qx pueden atravesar las membranas celulares e irse conjugando con los antioxidantes, glutatión, lípidos, proteínas, etc. De ahí que lo primero observado sea el estrés oxidante en conjunto con la peroxidación lipídica. Sin embargo, las especies se acoplarían rápidamente a toda la maquinaria amortiguadora antioxidante antes de irrumpir de manera significativa en el metabolismo de los organismos, los resultados de un experimento *in-vitro* con uno *in-vivo* generalmente difieren, ya que no se toman en cuenta muchísimos factores, sin embargo es un primer acercamiento para saber específicamente el comportamiento de un compuesto.

En contraste, la actividad de glutatión reductasa, que reduce al glutatión oxidado (GSSG) para recuperar el glutatión reducido (GSH), no mostró diferencias entre los sexos de los animales, ni entre los tratamientos respecto a los controles negativos. Se observó que hay homogeneidad en su actividad entre los sexos, lo que contribuye a explicar las diferencias basales en la razón GSH/GSSG entre hembras y machos, ya que hay más actividad de GPx en hembras, por tanto, más producción de GSSG, mientras la actividad de GRed es la misma, lo que se traduce en menores niveles de GSH en hembras que en machos.

No se observaron resultados significativos para genotoxicidad en micronúcleos de eritrocitos de médula ósea, el resultado dio negativo en todos los tratamientos, tanto para machos como para hembras, se puede decir con seguridad que el compuesto no llega a ser genotóxico en las cantidades administradas durante el tiempo administrado, al igual que Gutiérrez y cols., (2006), quienes realizaron un estudio de micronúcleos en fibroblastos cultivados de ratones y agregaron 0.1 mL de Myrocyn que aunque es otro tipo de SESI elaborada por otra farmacéutica tiene los mismos componentes que Estericide Qx pero a diferentes proporciones, en los resultados obtenidos con Myrocyn no encontraron incremento en la frecuencia de micronúcleos.

Por otro lado, el %PCE se vio alterado en la dosis más alta en los machos sin llegar a ser significativo. No se observan tendencias para ninguno de estos parámetros por lo que las variaciones observadas se pudieran deber a otros factores y no al Estericide Qx.

Es importante considerar la vía de exposición del compuesto y la administración que se le dará en los pacientes, ya sea vía bucal o administrado directamente en las heridas desde las más superficiales o incluso en lavados estomacales después de una sepsis, ya que si se administra vía oral es muy probable que se eliminen los compuestos activos de la solución gracias a la cantidad de materia orgánica que obtenemos por la dieta. No podemos descartar la formación de *N*-cloraminas que se pudieran formar a partir de los aminoácidos y los compuestos presentes en la solución (Scully Jr, 1986), así como la inducción de lesiones gástricas como úlceras duodenales debido al ácido hipocloroso en conjunto con otros compuestos y otros organismos como *Helicobacter pylori* (Murakami, 1995).

Determinar en qué tipo de situaciones es una buena opción utilizar este tipo de sustancias, y conocer las características fisicoquímicas de las mismas, en cuestión de cómo se vaya a administrar, ya sea por la cantidad de componentes que maneje o por el pH que tenga. Sin duda es importante, una sustancia con un pH similar al fisiológico, es de mayor confianza ya que confiere una menor irritación.

Este tipo de sustancias son de gran calidad para mantener un ambiente libre de patógenos y estéril, como lo es un quirófano o un hospital, siempre y cuando la materia orgánica del lugar sea mínima. Al aplicar este tipo de sustancias en heridas de cualquier tipo, hay que considerar las reacciones fisiológicas naturales como por ejemplo la acción de la mieloperoxidasa, y que se sumarán los componentes producidos por ella así como los componentes otorgados por la SESI, en consecuencia el estrés oxidante pudiese aumentar de manera no natural y más allá de otorgar un ambiente libre patógenos, se pudiese provocar una irritación desfavorable.

El estudio de este tipo de fármacos y de cualquier sustancia elaborada para su uso comercial o restringido en el ámbito clínico necesita llevar una evaluación rigurosa para no afectar al paciente o generarle alguna enfermedad de mayor cuidado.

VII. CONCLUSIONES

Se puede concluir que en 30 días de exposición oral a Estericide Qx, no se observa daño genotóxico acumulativo en los organismos provocado por los

componentes que contiene Estericide Qx, pero a nivel de estrés oxidante, es evidente un efecto especialmente en machos.

Observamos un efecto oxidante en las concentraciones más altas utilizadas en machos y hembras, sin embargo se observa un mayor nivel de protección general en hembras que en machos.

La actividad de enzimas antioxidantes en el modelo in-vivo no obtuvo una respuesta similar a aquella actividad observada in-vitro con las concentraciones y el tiempo de exposición sugeridos.

No se observaron diferencias a nivel metabólico en la cuantificación total de CYP450 y únicamente en machos en la concentración de 2.0mL/100 g en la isóforma CYP2E1 con las concentraciones y el tiempo de exposición utilizados.

VIII. REFERENCIAS

- Aebi Hugo. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in enzymology*. 13, 121-126.
- Flores M. M. (2009) Solución electrolizada por selectividad iónica de pH neutro en el tratamiento de le enfermedad periodontal. *Revista Mexicana de odontología clínica*.12, 16-22.
- Turner J.G., Gauthier D.K., Roby J.R., Larson E., Gauthier J.J.(1994)Use of image analysis to measure hand washing effectiveness.*American Journal of Infection Control*.22, 218-223.
- Borja H.A., Burga C.P., Chang N.J., Loyola.B. W., Llanos Z. F. Rosales de Zavala R., Yagui M. M., Yeckle C. M. (2002). Manual de desinfección y esterilización hospitalaria. Perú. MINSA-USAID.
- Duran H. (2010) Soluciones de superoxidación y su evolución tecnológica. *Revista Dolor*. Foro Nacional de Investigación y Clínica Médica. 7, 4-8.

- Tanaka H., Hirakata Y., Kaku M., Yoshida H., Takemura R., Ishida K., Koga H., Kohno S., Kamihira S. (1996). Antimicrobial activity of superoxidized water. *Journal of Hospital Infection*.34:43-49
- Selkon J.B., Babb J.R., Morris R. (1999) Evaluation of the antimicrobial activity of a new super-oxidized water, Sterilox, for the disinfection of endoscopes. *Journal of Hospital Infection*. 41, 59-70.
- Sampson M. (2002) Not all super-oxidized waters are the same. *Journal Hospital Infection*.52(3), 228-9.
- Landa S., Gonzales E., Guzman S. Snyder M., Reyes T., Torres K., Gutierrez A.(2005) Micrcyn: a novel super-oxidized water with neutral pH and desinfectant activity. *Journal of Hospital Infection* 61(4):291-9
- Horiba N., Hiratsuka K., Onoe T., Yoshida T., Suzuki K., Matsumoto T., Nakamura H. (1999) Bactericidal effect of electrolyzed neutral water on bacteria isolated from infected root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*87, 83—87.
- Shiho O., Mariko M., Shosuke K. (2002) DNA damage induced by hypochlorite and hypobromite with reference to inflammation-associated carcinogenesis. *Cancer Letters*. 178, 37-42
- Nagamatsu Y., Chen K.K., Tajima K., Kakigawa H., Kozono Y. (2002). Durability of bactericidal activity in electrolyzed neutral water by storage. *Dental Materials Journal*. 21:93—104.
- Rebollar-González R.C., Torres-López E., Camacho-Peña E.E. (2010)Soluciones Superoxidadas: Una alternativa contra el manejo de las heridas infectadas. *Revista del Hospital Juárez de México*. 77, 98-100.
- Esteripharma México S.A. de C.V. Patricio Sanz 1582 Colonia del Valle Del. B. Juárez México, D.F. 03100. Tomado de <http://www.esteripharma-pharma.com/> (17 de Septiembre de 2013)
- Paz García J., Maldonado Rodríguez A., Díaz Reval I., Muñiz J., Rodríguez Hernández A. (2011) Sustitución del uso de solución salina fisiológica como irrigante en el manejo de pacientes sépticos y quirúrgicos por solución electrolizada. *Asociación Mexicana de Cirugía Bucal y Maxilofacial*. 7(2), 46-52.
- Gutiérrez A. (2006)The science behind stable superoxidized water. Exploring the various applications of super oxidized solutions. *Wounds* 18(1): 7-10.
- Dalla L. (2006) Treating diabetic foot ulcers with Super-oxidized water.A look at advances in this pH-neutral, non-toxic treatment. *Wounds*.18(1), 14-16.

- Miranda A. (2006) Reducing Bacterial infectious Complications from Burn Wounds. A look at the use of Oculus Microcyn60 to treat wounds in México. *Wounds*. 18(1), 17-19.
- Cánepa de Vargas L., Maldonado V., Barrenechea A., Aurazo M. (2004) Desinfección en: CEPIS. Tratamiento de agua para consumo humano: Plantas de filtración rápida. Manual I: Teoría tomo 2. Lima. p. 158.
- Ibieta B.R., Mervitch N., Flores M.M., Mohar A. (2008) Nueva opción analgésica en el tratamiento de osteonecrosis mandibular secundaria al uso de bisfosfonatos. *Cancerología*.3, 89-94.
- Carlberg I., Mannervik B. (1985) Glutathione Reductase. *Methods in enzymology*.113, 59.
- Habig William. H., and William B. Jakoby. (1981). Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. *Methods in enzymology* 77, 398–405.
- Janero David R., and Barbara Burghardt.(1989). Thiobarbituric acid-reactive malondialdehyde formation during superoxide-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation: influence of peroxidation conditions. *Lipids*. 24(2), 125-131.
- Romagna F., and C. D. Staniforth. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation research*. 213, 91-104.
- Guengerich F. Peter. (2001). Cap. 35: Enzyme assays and purifications. Ed. A. Wallace Hayes en *Principles and methods of toxicology 4th edition*, Boston Massachusetts: Taylor & Francis.
- Omura, Tsuneo, and Ryo Sato. (1964). The Carbon Monoxide-binding pigment of Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry*.239(7), 2370-2378.
- Thorn R. M., Lee S. W., Robinson G. M., Greenman J., Reynolds D. M. (2011). Electrochemically activated solutions: evidence for antimicrobial efficacy and applications in health care environments. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.31(5), 641-653
- Gomi I., Fukushima H. Shiraki M., Miwa Y., Ando T., Takai K., Moriwaki H. (2007) Relationship between Serum Albumin Level and Aging in Community-Dwelling Self-Supported Elderly Population. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 53, 37-42.
- Ingelman-Sundberg M., Johansson I. (1983) Mechanisms of Hydroxyl Radical Formation and Ethanol Oxidation by Ethanol-inducible and Other Forms of Rabbit

Liver Microsomal Cytochromes P-450. *The Journal of Biological Chemistry*. 259 (10), 6447-6458.

-Sun A. Y., Ingelman-Sundberg M., Neve E., Matsumoto H., Nishitani Y., Minowa Y., Fukui Y., Bailey S. M., Patel V. B., Cunningham C. C., Zima T., Fialova L., Mikulikova L., Popov P., Malbohan I., Janebova M., Nespork K., Sun G. Y. (2001) Ethanol and Oxidative Stress. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 25(5), 237- 243

-Joseph David P., Mannervik B. (1997) *Molecular Toxicology*. Oxford University: Press. New York.

-Aruoma O. I., Halliwell B. (1987). Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. *Biochemistry Journal*. (248), 973-976.

-Emmanuel E., Keck G., Blanchard J.M., Vermande P., Perrodin Y. (2004) Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environment International* 30(7), 891–900.

-Süleyman G., Savsar A., Zeynep T. (2009). Cytotoxic and genotoxic effects of sodium hypochlorite on human peripheral lymphocytes in vitro. *Cytotechnology*. 59, 113-119.

-Zavodnik I. B., Lapshina E. A., Zavodnik L. B., Labienec M., Bryszewska M., Reiter R. J. (2004) Hypochlorous acid-induced oxidative stress in Chinese hamster B14 cells: viability, DNA and protein damage and the protective action of melatonin. *Mutation Research* 559, 39-48.

-Güngör N., Knaapen Ad M., Munnia A., Peluso M., Haenen G. R., Chiu R. K., Godschalk R. W. L., van Schooten F. J. (2009) Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*. 25(2), 149-154.

-Monarca S., Feretti D., Zani C., Rizzoni M., Casarella S. and Gustavino B. (2005). Genotoxicity of disinfectants in plant Bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 46, 96-103.

-Maffei F., Buschini A., Rossi C., Poli P., Forti G. C., Hrelia P. (2005). Use of the comet test and micronucleus assay on human white blood cells for in vitro assessment of genotoxicity induced by different drinking water disinfection protocols. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 46, 116-125.

- Guzzella L., Monarca S., Zani C., Feretti D., Zerbini I., Buschini A., Poli P., Rossi C., Richardson S. D. (2004) In vitro potential genotoxic effects of Surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants. *Mutation Research*. 564, 179-193.
- Hasegawa R., Takahashi M., Kokubo T., Furukawa F., Toyoda K., Sato H., Kurokawa Y., Hayashi Y.(1986) Carcinogenicity study of sodium hypochlorite in F344 rats.*Food and Chemical Toxicology*. 24(12), 1295-1302.
- Hagiwara M., Watanabe E., Carl Barrett J., Tsutsui T. (2006). Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: Ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells.*Mutation Research*. 603, 111-120.
- Ju-Xiang Li, Yong-Zheng Pang, Chao-Shu Tang, Zai-Quan Li. (2004). Protective effect of taurine on hypochlorous acid toxicity to nuclear nucleoside triphosphatase in isolated nuclei from rat liver.*World Journal Gastroenterology*. 10(5), 694-698.
- E. Scully Jr. F., Mazina K., Sonenshine D., Kopfler F. (1986). Quantitation and Identification of organic N-Chloramines formed in stomach fluid on ingestion of aqueous hypochlorite.*Environmental Health Perspectives*.(69), 259-265.
- Cotter J. L., Fader R. C., Lilley C., Herndon D. N. (1985).Chemical parameters, antimicrobial activities, and tissue toxicity of 0.1 and 0.5% sodium hypochlorite solutions.*Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 28(1),118-122.
- Murakami M., Asagoe K., Dekigai H., Kusaka S., Saita H., Kita T.(1995) Products of neutrophil Metabolism Increase ammonia-induced gastric mucosal damage. *Digestive diseases and sciences*. 40(2), 268-273.
- Miyamoto G., Zahid N., Uetrecht J. P. (1997) Oxidation of diclofenac to reactive intermediates by neutrophils, myeloperoxidase, and hypochlorous acid.*Chemical Research in Toxicology*. 10, 414-419.
- Stanley N. R., Pattison D. I., Hawkins C. L. (2010). Ability of hypochlorous acid and N-chloramines to chlorinate DNA and its constituents.*Chemical Research in Toxicology*. 23,1293-1302.
- Morita C., Sano K., Morimatsu S., Kiura H., Toshiyuki G., Takehiro K., Hong W., Miyoshi H., Iwasawa A., Nakamura Y., Tagawa M., Yokosuka O., Saisho H Maeda T., Katsuoka Y.(2000) Desinfection potential of electrolyzed solutions containing sodium chloride at low concentrations. *Journal of Virological Methods*. 85, 163-174.

- Cabello Gutiérrez C., Rosete Olvera D. P., Manjarrez Zavala M. E. (2009). Efecto de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro sobre la infección del virus de influenza A en células MDCK. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*.22(4),280-287.
- Kiura H., Sano K., Morimatsu S. Nakano T., Morita C., Yamaguchi M., Maeda T., Katsuoka Y.(2002) Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration.*Journal of Microbiological methods*. 45, 285-293.
- Middleton A.M., Chadwick M. V., Sanderson J. L., Gaya H. (2000). Comparison of a solution of super-oxidized water (Sterilox®)with gluteraldehyde for the disinfection of bronchoscopes, contaminated *in vitro* with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* in septum. *Journal of Hospital Infection*. 45, 278-282.
- Nakagawara S., Goto T., Nara M., Ozawa Y., Hotta K., Arata Y. (1998).Spectroscopic Characterization and the pH dependence of Bactericidal Activiy of the aqueous Chlorine Solution.*Analytical sciences*. 14, 691-698.
- Lawrence, Richard A., and Raymond F. Burk. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver.*Biochemical and Biophysical Research Communications*. 71(4), 952–958.
- Beauchamp, C., and I. Fridovich. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44(1), 276–287.
- Viña J., Borrás C., Gambini J., Sastre J., Pallardó F. V. (2005) Why females live longer than males: Control of Longevity by Sex Hormones. *Science of Aging Knowledge Environment*.2005(23), 17.
- Winterbourn C. C., Brennan S. O., (1997) Characterisation of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *BiochemistryJournal*. 327, 275-281.
- Mackenzie A. (2005) *Mathematics & Statistics for Life Scientists*. University of Essex, Colchester, UK.Taylor & Francis.
- Lynch J. M., Poole N. J., (1979) *Microbial ecology: a conceptual approach*.Oxford, London. Blackwell Scientific Publications.
- Vissers M. C. M., Pullar J. M., Hampton M. B. (1999) Low-level exposure to hypochlorous acid causes apoptosis or growth arrest in human endothelial cells. *Biochemistry Journal*. 344, 443-449.

- Pullar J. M., Winterbourn C. C., Vissers M. C. M. (1999) Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid. *American Journal of Physiology*.277, H1505-1512.
- Pullar J. M., Vissers M. C. M., Winterbourn C. (2000) Living with a Killer: The effects of Hypochlorous Acid on Mammalian Cells. *IUBMB Life*.50, 259-266.
- Hawkins C. L., Davies M. J. (1999) Hypochlorite- induced oxidation of proteins in plasma: Formation of chloramines and nitrogen-centred radicals and their role in protein fragmentation. *Biochemistry Journal*. 340, 539-548.
- Winterbourn C. C. (1985) Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase- hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite. *Biochemical Biophysics*. 840, 204-210.
- Vissers M. C. M., Winterbourn C. C. (1995) Oxidation of intracellular glutathione after exposure of red cells to hypochlorous acid. *Biochemistry Journal*. 307, 57-62.
- Dychdala G. R. (1977) *Chlorine and Chlorine compounds*.In: Black SS, Ed. Desinfection, Sterilization and Preservation 2ed. Philadelphia, PA. Lea and Fabinger.
- Mink F. L., Coleman W. E., Munch J. W. Kaylor W. H., Ringhand H. P. (1983) *In vivo* formation of halogenated reaction products following peroral sodium hypochlorite. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 30, 394-399.
- Hazell L. J., van den Berg J. J., Stocker R., (1994) Oxidation of low-density lipoprotein by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. *Biochemistry Journal*. 15(302), 297-304.
- Stenvinkel P., Barany P., Chung S. H., Lindholm B., Heimbürger O. (2002) A comparative analysis of nutritional parameters as predictors of outcome in male and female ESRD patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 17, 1266-1274.
- Diodato M. D. Knoferl M. W., Schwacha M. G., Bland K. I., Chaudry I. H. (2001) Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. *Cytokine*. 14(3), 162-169.
- Adler I. D., Bootman J., Favor J., Hook G., Schwemmer G. S., Welzl G., Whorton E., Yoshimura I., Hayashi M. (1998) Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutation Research*. 417(1998), 19-30.