



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y LA (-)-EPIGALOCATEQUINA-3-
GALATO SOBRE EL DAÑO OXIDANTE DEL ADN INDUCIDO POR
COMPUESTOS DE CROMO HEXAVALENTE EN RATONES DE LA
CEPA Hsd:ICR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GABRIELA SERRANO REYES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ
Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM
DRA. MARÍA DEL CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ
Universidad Autónoma de Querétaro, UAQ

CIUDAD DE MÉXICO

MAYO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CIENCIAS EXPERIMENTALES

**EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y LA (-)-EPIGALOCATEQUINA-3-
GALATO SOBRE EL DAÑO OXIDANTE DEL ADN INDUCIDO POR
COMPUESTOS DE CROMO HEXAVALENTE EN RATONES DE LA
CEPA Hsd:ICR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GABRIELA SERRANO REYES

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
DRA. MARÍA DEL CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ
Universidad Autónoma de Querétaro, UAQ**

CIUDAD DE MÉXICO

MAYO, 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 15 de febrero de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **SERRANO REYES GABRIELA** con número de cuenta 302273726 con la tesis titulada "Efecto del ácido ascórbico y la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre el daño oxidante del ADN inducido por compuestos de cromo hexavalente en ratones de la cepa Hsd:ICR", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRIGUEZ**:

Presidente:	DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ
Vocal:	DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Secretario:	DRA. MARÍA DEL CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ
Suplente:	DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
Suplente:	DRA. ROCIO ORTIZ MUÑOZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de febrero de 2016.



M. del Coro Arizmendi Arriaga

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado de Ciencias Biológicas**, UNAM, por procurar un espacio de excelencia en el que tuve la oportunidad de iniciarme en la investigación científica y porque bajo su cobijo tuve la experiencia invaluable de confrontarme a mí misma.

Al apoyo recibido por el **CONACYT** (número de becario 587299/306119), a la **DGAPA-UNAM** por el financiamiento al proyecto en el que desarrolle mi trabajo de tesis (PAPIIT IN217712; IN219216) y al **PAEP** por el apoyo recibido para participación en congresos (2015).

A la **Dra. María del Carmen García Rodríguez** por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por el interés que siempre mostró en mi trabajo, por compartir su conocimiento, por su experiencia y su admirable ética profesional.

A mi comité tutorial, la **Dra. Raquel Retana Ugalde** y la **Dra. María del Carmen Mejía Vázquez** por sus valiosas aportaciones y asesoría, por su paciencia, por su confianza y por ser un modelo de referencia, pues me han mostrado cuanto se puede lograr en la ciencia.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES



La lista es larga y aun así sepan que las palabras son pocas para expresarles mi profunda gratitud.

A **María del Carmen García Rodríguez**, por tu amistad, por brindarme tu confianza, por ser impulso y ejemplo para emprender nuevos viajes.

A **mis padres** porque teniéndolos lejos comprendí el significado de “La familia es incondicional”. Gracias porque no hubo problema pequeño o grande en el que no estuvieran, para darme su apoyo, para ayudarme e incluso para armar un rescate..., los amo, este día no hubiera sido posible sin ustedes.

A **Miguel Ángel Serrano**, porque mi infancia estuvo llena de libros y experimentos. Gracias por tu asesoría con las regresiones lineales, por esas anécdotas repetidas, por los cuentos, por las cenas en la madrugada, gracias porque esta vocación fue una semilla que se sembró en casa, por todo papá, te amo.

A **Olga Reyes Cedillo**, por las horas que pude dormir gracias a ti, y es que como me ayudaron esas visitas de ropa limpia y comida para la semana, a fin de cuenta, esos son los mayores actos de amor. Gracias por tu tiempo, por romper paradigmas, por mostrarme que cuando crees que has llegado al límite tienen la oportunidad de descubrir que ese no era tu límite y que no hay caída que no sea pasajera. Gracias por ser la alquimista de mi vida, mamá te amo.

A **Liliana Serrano**, por los helados y las películas, por ser el único ser capaz de entender mis pasiones y preocupaciones, por ser fuente de inspiración y sitio de consejo. Por escuchar mis ensayos pre tutorial, y porque sé que entenderás que cada vez se vuelve más difícil expresar con palabras lo importante que es para mí nuestra “fuerza de hermanas”. Te amo infinitamente.

A **la familia Suarez Serrano** y mi abuela **Francis** porque en nuestra pequeña familia el que lucha no lucha solo y el que celebra convida.

A la familia **Reyes Cedillo**, especialmente a mis tíos: Guadalupe, María de los Ángeles, Raúl Antonio, Sergio Yoni, Hugo Alberto y a mi abuela Guadalupe por sus enseñanzas y sus muestras de cariño, también a mi abuelo Joaquin quien intercede por mí desde el cielo.

Continúa...

A **Costeño**, porque juntos aprendimos que la familia también se construye, por ayudarme a hacer un hogar, ese refugio del día a día, por esos desayunos después de una desvelada, por la cacería de tacos en la madrugada, por mostrarme que es posible escuchar al otro, por ser mi hermano y estar cada vez, por enseñarme a creer en el futuro...“Lo mejor está por venir Joshis”.

A **Cristina** por enseñarme que cuando la amistad no puede ser más fuerte lo es, por las llamadas, por tener la palabra precisa entre -cometes un error- y -estoy contigo-, por mostrarte tal cual eres, sin pretensiones y porque de alguna forma siempre consigues que ría en los momentos más adversos.

A **Nanci** por ser una inspiración, por ser mi hermana mayor, por mostrarme que no estaba equivocada al dedicarme a la ciencia, por abrir el camino, por las incontables carcajadas, por compartirme de tu paz y tu alegría que no es de este mundo.

A **Tonancy** por estar conmigo en este viaje, pero no como espectadora, si no desde dentro, viviendo cada momento de cerca. Gracias por mostrarme que la buena voluntad y la constancia son infalibles, por tu honestidad, tu cariño y tu confianza. Tona eres la persona más valiente que conozco y tu amistad ha sido una mano sobre mi hombro.

A **Lulu**, por tu fortaleza, por las salidas tarde del laboratorio, por leerme la mente en cada experimento, por ser mi mano derecha, por cuidar de mí en los pequeños detalles, por estar a mi lado con risas, con el día a día, gracias porque a tu lado y con tu cariño todo fue más sencillo.. . te quiero hermanita.

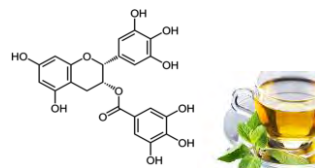
A **Fany, Julio y Javier** por su apoyo como compañeros y su honestidad como amigos.

A **ti...** porque me mostraste que los momento más difíciles también son motivo de alegría por el solo hecho de estar vivo, que el día menos pensado te vas de este mundo y que no hay mañana. Me acompañas desde entonces ya no como una herida si no como una cura... gracias por ser una luz que me acompaña desde el cielo.

A **mis alumnos de CCH**, por su entusiasmo y su crítica, porque me hacen creer en el poder de la educación y en que puede haber un futuro mejor. Gracias porque acompañarlos en su aprendizaje ha sido una de mis mayores alegrías.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por “Todo”.

DEDICATORIA



A **Olga Reyes y Miguel Ángel Serrano**, sus historias son
mi raíz y sus virtudes mis fortalezas

A **Liliana Serrano**... mi hermana, que desde que fue
consciente de mi existencia, creyó en mí

A **Gaby** de seis años, cuando con orgullo decía que de
grande iba a ser científica.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	1
2.1. Genotoxicidad.....	1
2.2. Metales como inductores de daño genotóxico	2
2.2.1. Estrés oxidante	5
2.2.2. Radicales libres y especies reactivas	6
2.3. Evaluación de daño genotóxico	7
2.3.1. Micronúcleos.....	7
2.3.2. 8-hidroxi-2'deoxiguanosina	9
2.3.3. Apoptosis	9
2.4. Agentes antimutágenos	11
2.5. Antioxidantes	12
2.5.1. Ácido ascórbico.....	14
2.5.2. Polifenoles.....	16
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
IV. HIPÓTESIS.....	19
V. OBJETIVOS.....	20
5.1. Objetivo General.....	20
5.2. Objetivos Particulares	20
VI. MATERIAL Y MÉTODO	21
6.1. Animales	21
6.2. Reactivos.....	21
6.3. Tratamientos	21
6.4. Evaluación de micronúcleos y relación de eritrocitos policromáticos /eritrocitos normocromáticos	24
6.5. Determinación de 8-hidroxi-2'deoxiguanosina.....	24

6.6.	Evaluación de apoptosis y necrosis	25
6.7.	Determinación de la capacidad antioxidante total	25
6.8.	Determinación de la concentración intracelular de glutatión	26
6.9.	Determinación de la concentración intracelular de superóxido dismutasa	26
6.10.	Análisis estadístico	27
VII.	RESULTADOS	27
7.1.	Efecto del ácido ascórbico y la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre el daño genotóxico inducido por CrO ₃	27
7.1.1.	<i>Micronúcleos</i>	27
7.1.2.	<i>8-hidroxi-2'deoxiguanosina</i>	32
7.1.3.	<i>Apoptosis</i>	32
7.2.	Efecto del ácido ascórbico y la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre el daño citotóxico inducido por CrO ₃	35
7.2.1.	<i>Relación de eritrocitos policromáticos / eritrocitos normocromáticos</i>	35
7.2.2.	<i>Viabilidad celular</i>	37
7.3.	Efecto del ácido ascórbico y la (-)-epigallocatequina-3-galato y CrO ₃ sobre el sistema antioxidante	39
VIII.	DISCUSIÓN	42
IX.	CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES	53
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
XI.	ANEXOS	66

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
A ^{•-}	Radical ascorbilo
ABTS	3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato
ABTS ^{•+}	Catión radical 3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CAT	Catalasa
BE	Bromuro de Etidio
BER	Reparación por escisión de bases
Cr	Cromo
Cr (VI)	Cromo hexavalente
Cr (III)	Cromo trivalente
CrO ₃	Trióxido de cromo
DHA	Ácido dehidroascórbico
EGCG	(-)-Epigallocatequina-3-galato
ENC	Eritrocitos Normocromáticos
EPA	“Environmental Protection Agency”
EPC	Eritrocitos Policromáticos
ERs	Especies Reactivas
ERCs	Especies Reactivas de Cobre
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
ERIs	Especies Reactivas de Hierro
ERNs	Especies Reactivas de Nitrógeno

FDA	“Food and Drug Administration”
GSH	Glutación reducido
GSSH	Glutación oxidado
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
IARC	“International Agency for Research on Cancer”
ICH	“Intercambio de Cromátidas Hermanas”
i.p.	Intraperitoneal
LD ₅₀	Dosis Letal 50
MN	Micronúcleo (s)
NA	Naranja de Acridina
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NIF	Frecuencia Neta de la Inducción de MN
OECD	“Organisation for Economic Cooperation and Development”
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
¹ O ₂	Oxígeno singulete
OH [•]	Radical hidroxilo
8-oxo-Gua	8-oxo-7,8,-dihidroguanina
8-OHdG	8-hidroxi-2'deoxiguanosina
Pb	Pares de bases
RL	Radicales Libres
SOD	Superóxido dismutasa
WHO	“World Health Organization”

RESUMEN

La exposición a metales pesados como los compuestos de Cr (VI) está relacionada con la inducción de algunos tipos de cáncer y con daño genotóxico. Una de las vías por las cuales inducen el daño al ADN es mediante la generación de radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (EROs) durante su reducción a Cr (III). En contraparte, estudios previos realizados en nuestro laboratorio muestran que antioxidantes como el ácido ascórbico (AA) y los flavonoides reducen el daño genotóxico inducido por compuestos de Cr (VI), sugiriendo que el mecanismo de protección es mediante la regulación del estrés oxidante (EOx). Este mecanismo podría estar relacionado con más de una vía, ya que los antioxidantes no solo son capaces de neutralizar RL, sino que también pueden estimular la producción de los antioxidantes endógenos e incluso se ha descrito que pueden sensibilizar a las células a la apoptosis como un mecanismo para eliminar células dañadas. En el presente estudio se evaluó el efecto *in vivo* del AA y de la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) sobre el daño genotóxico y citotóxico, así como su relación con la actividad apoptótica y los niveles de antioxidantes en ratones expuestos a cromo hexavalente. Grupos de 5 ratones Hsd:ICR fueron tratados de la siguiente forma: a) Grupo testigo, solo se le administró el vehículo, b) Grupo Cr (VI), se le administró 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p., c) Grupos de antioxidantes, se les administraron 100 mg/kg de AA vía i.p. o 10 mg/kg de EGCG vía oral (sonda intragástrica) y d) Grupos experimentales, a los que se les administró el tratamiento de antioxidantes y 4 horas después el CrO₃. Las evaluaciones de micronúcleos (MN) y la relación entre eritrocitos policromáticos/normocromáticos (EPC/ENC), se realizaron a las 0, 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos y el resto de las evaluaciones a la hora 48. El tratamiento de CrO₃ incrementó los MN, las células apoptóticas, las células no viables y los niveles de glutatión (GSH), además de que disminuyó la actividad de superóxido dismutasa (SOD). En este grupo también se presentó una disminución de 8-hidroxi-2'deoxiguanosina (8-OHdG) posiblemente debido a que el cromo abate los mecanismos implicados en su reparación. La administración de AA y EGCG previa al tratamiento de CrO₃ disminuyó las frecuencias de MN a la hora 48 en el siguiente orden: AA (48.2 %) > EGCG (28.2%), disminuyó también las células no viables y apoptóticas, además de que recuperó los niveles de 8-OHdG y SOD. La administración de los tratamientos combinados también disminuyó los niveles de GSH probablemente debido a un incremento de su utilización para contrarrestar el EOx inducido por el CrO₃. El tratamiento EGCG-CrO₃ tuvo un efecto dual ya que incrementó los MN a las 24 y 72 horas. Nuestros resultados muestran un efecto protector del AA y de la EGCG contra el daño genotóxico y citotóxico inducido por el Cr (VI), que podrían estar relacionados con sus propiedades de supresión de EROs generadas durante su reducción a Cr (III) y con una posible modulación de los antioxidantes endógenos SOD y GSH.

ABSTRACT

Exposure to heavy metals such as Cr (VI) compounds has been associated with the induction of some cancers and genotoxic damage. One of the ways which induce DNA damage is by generating free radicals (FR) and reactive oxygen species (ROS) during reduction of Cr (VI) to Cr (III). On the other hand, previous studies in our laboratory show that antioxidants such ascorbic acid (AA) and flavonoids reduce damage induced by genotoxic compounds of Cr (VI), suggesting that protection mechanism is by regulating the oxidative stress. This mechanism could be related to more than one via because antioxidants are not only able to neutralize FR, it can also stimulate the endogenous antioxidants production and even has been described that it can sensitize cells to apoptosis as a mechanism to eliminate damaged cells. In the present study, the *in vivo* effects of AA and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the genotoxic and cytotoxic damage, and their relation with apoptotic activity and antioxidant levels were evaluated in mice exposed to hexavalent chromium. Groups of five Hsd:ICR mice were divided and treated as follows: a) Control group, only treated whit vehicle, b) Group Cr (VI), treated whit 20 mg/kg of CrO₃ ip, c) groups of antioxidants, treated whit 100 mg/kg AA ip or 10 mg/kg of EGCG by gavage and d) Experimental groups, treated whit antioxidants and four hours after the CrO₃. The evaluations of micronucleus (MN), and relation between the polychromatic/normochromatic erythrocyte (PCE/NCE) were performed at 0, 24, 48 and 72 hours after treatments, the remaining evaluations only were performed at 48 hour. CrO₃ treatment increased MN, apoptotic cells, non-viable cells and glutathione (GSH) levels and, decrease superoxide dismutase (SOD) activity. This group also showed a decrease of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) possibly because the chromium abbe the mechanisms involved in its reparation. The AA and EGCG administration before the treatment with CrO₃, decreased MN frequencies at 48h in the following order: AA (48.2%) > EGCG (28.2%) and decreased nonviable and apoptotic cells, but recovered levels of 8-OHdG and SOD. The phytochemicals treatment prior to CrO₃ also decreased levels of GSH levels probably due to increased use to counteract oxidative stress induced CrO₃. EGCG-CrO₃ treatment had a dual effect as it increased the MN to hours 24 and 72. Our results show a protective effect of AA and EGCG against genotoxic damage and cytotoxic induced metal compounds of Cr (VI) which could be related to their suppression properties ROS generated during reduction of Cr (VI) to Cr (III) and a possible modulation of endogenous antioxidants SOD and GSH.

I. INTRODUCCIÓN

La exposición a agentes mutágenos así como el estilo de vida y las deficiencias nutricionales, incrementan la probabilidad de desarrollar enfermedades relacionadas con el daño al ADN tales como algunos tipos de cáncer (Sloczyńska *et al.*, 2014). Particularmente, se ha descrito que algunos de los agentes mutágenos a los que estamos expuestos inducen daño mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y radicales libres (RL) (Surh, 2003; Tian *et al.*, 2012) por lo que la eliminación de las moléculas reactivas podría representar una estrategia importante en el proceso de antimutagénesis (García-Rodríguez *et al.*, 2010). Dentro de los componentes de la dieta con potencial antimutágeno destacan los antioxidantes, tales como el ácido ascórbico (AA) y los polifenoles. Estos antioxidantes exógenos no sólo son capaces de inhibir el estrés oxidante (EOx) mediante la captura de RL, sino que también pueden prevenir su formación y reparar las lesiones que ocasionan, además de estimular la producción de los antioxidantes endógenos (Kondo *et al.*, 2001). En contraparte, se ha encontrado que compuestos metálicos como los del Cr (VI) que tienen actividad cancerígena y genotóxica, pueden actuar mediante la generación de EOx como uno de sus principales mecanismos (Valko *et al.*, 2005), de ahí que surge el interés por determinar si antioxidantes como el AA y los polifenoles, pueden actuar como protectores o moduladores de los efectos genotóxicos de compuestos como el cromo hexavalente.

II. ANTECEDENTES

2.1. Genotoxicidad

El término genotoxicidad describe la capacidad de los compuestos para afectar la estructura del ADN, el aparato del huso mitótico, las topoisomerasas, los sistemas de reparación del ADN y ADN polimerasas que son los responsables de la fidelidad del genoma. En muchos casos, los agentes genotóxicos actúan también como mutágenos capaces de inducir cambios

permanentes en el material genético, lo cual puede conducir a cambios heredables en su función, y que incluyen mutaciones de genes, así como alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas (Eastmond *et al.*, 2009).

Los agentes genotóxicos se clasifican por su naturaleza en agentes físicos, biológicos y químicos. Estos últimos son los principales contaminantes y pueden actuar como alquilantes, análogos de bases, agentes de intercalación e inductores de EOX, entre otros (Teaf y Middendorf, 2000). Los agentes alquilantes son capaces de reaccionar directamente con las bases del ADN y transferirles un grupo alquilo para formar monoadductos en el material genético y en consecuencia rupturas en la cadena de ADN. Con frecuencia, los adductos en el ADN se localizan en la guanina y conduce a la formación del 8-hidroxi-2'deoxiguanosina (8-OHdG) (Ralhan y Kaur, 2007). Por su parte los análogos de bases son aquellos que tienen una estructura similar a las bases de ADN normales y, por lo tanto, pueden sustituir a una base en el material genético, lo que lleva a transiciones y tautomerización. Los agentes intercalantes como la acridina son capaces de insertarse entre las bases de ADN, lo cual se traduce en muchas ocasiones en inserciones y deleciones. Los metales pesados por su parte, también pueden inducir daño al ADN (Teaf y Middendorf, 2000; Sloczyńska *et al.*, 2014).

2.2. Metales como inductores de daño genotóxico

Los metales pesados son agentes altamente genotóxicos que salvo algunas excepciones, presentan una densidad igual o mayor a 5 g/cm³. Entre los principales metales pesados catalogados como tóxicos están el cromo, arsénico, cobalto, níquel, cobre, zinc, cadmio, mercurio, titanio, selenio y plomo (EPA, 1998). La gravedad tóxica de estos elementos se debe a su capacidad de bioacumularse y a la facilidad con que reaccionan con moléculas orgánicas, específicamente con sus grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El resultado de estas uniones ocasiona principalmente alteración metabólica, incremento de EOX y genotoxicidad (Navarro-Aviñón, *et al.*, 2007).

El estudio de toxicidad y del comportamiento oxidante de los metales pesados en las células está determinado por la reacción química de Fenton y el ciclo de Haber-Weiss, en las que participan el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la formación del radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) (Figura 1) (Valko *et al.*, 2005).

Reacción de Fenton



Reacción de Haber-Weiss

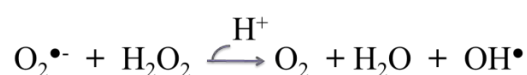


Fig. 1. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss, en las que se produce el radical hidroxilo (Shi y Dalal, 1992).

El cromo presenta distintos estados de oxidación, de los cuales el cromo trivalente [Cr (III)] y el cromo hexavalente [Cr (VI)] son los más estables y sus compuestos son los de mayor importancia biológica. El Cr (III) es necesario para los humanos en bajas concentraciones para el metabolismo de los azúcares y otros carbohidratos. Es inocuo debido a su baja permeabilidad en las membranas celulares y a que no es corrosivo (Valko *et al.*, 2005). Por su parte los compuestos de Cr (VI) han sido designados por la OSHA y la EPA como una de las 17 sustancias químicas que representan la mayor amenaza para la salud humana, debido a que tienen actividad genotóxica y cancerígena, además de que son utilizados ampliamente en la industria (OSHA, 2006; Myers, 2012).

En las aplicaciones industriales se utilizan los compuestos de cromo (VI), debido a sus propiedades ácidas y oxidantes en procesos de cromado, pigmentos, ferrocromos, curtido de cuero y soldaduras (EPA, 1998). Se estima que más de dos millones de personas en el mundo están ocupacionalmente expuestas a cromo hexavalente, además de las personas que están expuestas por agua, suelo y aire contaminado, así como por el contacto con el humo de cigarro y con las emisiones atmosféricas de los convertidores catalíticos de los automóviles (Nriagu, 1988; O'Brien *et al.*, 2003; Sakhila *et al.*, 2011).

En México uno de los casos más conocidos de contaminación por las malas prácticas de disposición de residuos, es el de Cromatos de México. Esta empresa se ubicó en el Estado de México, para producir pigmentos y sustancias empleadas en el curtido de pieles a partir de cromita, durante sus veinte años de operación emitió al ambiente un gran número de toneladas de cromo hexavalente, hasta 1978 cuando fue clausurada por haberse detectado contaminación en el terreno circundante. Actualmente se sigue determinando el grado de afectación al ambiente (suelo y acuíferos) y en el estado de salud de los vecinos y ex trabajadores de la planta (Pérez, 2006; SEMARNAT, 2012). Algunos de los principales efectos adversos para la salud causados por el Cr (VI) son: dermatitis, infertilidad y cáncer de piel, pulmón y garganta (BMI. 2007).

El Cr (VI), a diferencia del cromo (III) es capaz de atravesar la membrana celular, a través de canales aniónicos no específicos, debido a su similitud estructural con aniones como SO_4^{2-} y HPO_4^{2-} . Una vez dentro de la célula se reduce rápidamente a cromo (V), (IV) y (III) por la interacción con moléculas citoplasmáticas como NADPH, glutatión (GSH) y citocromo P450, entre otros. El Cr (III) tiene gran afinidad con las bases y fosfatos de la cadena de ADN y puede formar aductos de ADN-Cr, así como entrecruzamientos e interacción con proteínas. Además del daño genotóxico que se genera por la interacción directa del Cr (III) con el ADN, la exposición a Cr (VI) también puede desencadenar la generación de EROs como el radical glutatión tiol ($\text{GS}^\bullet$) y otras EROs que se generan a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. El Cr (V) y el Cr (IV) son intermediarios reactivos de la reducción de Cr (VI) que participan en reacciones Fenton y generan $\text{OH}^\bullet$, el cual es altamente reactivo y capaz de dañar al ADN. La generación de $\text{OH}^\bullet$ también puede darse por reacciones Haber-Weiss en la que el Cr (VI) es reducido por $\text{O}_2^{\bullet-}$ para generar Cr (V), este a su vez reacciona con H_2O_2 para producir el radical $\text{OH}^\bullet$ y generar nuevamente Cr (VI). Por lo cual, se ha planteado que el principal mecanismo de inducción del daño genotóxico del Cr (VI), es la inducción de EROs y RL que interaccionan con el ADN (Figura 2) (Shi y Dalal, 1992; O'Brien *et al.*, 2003).

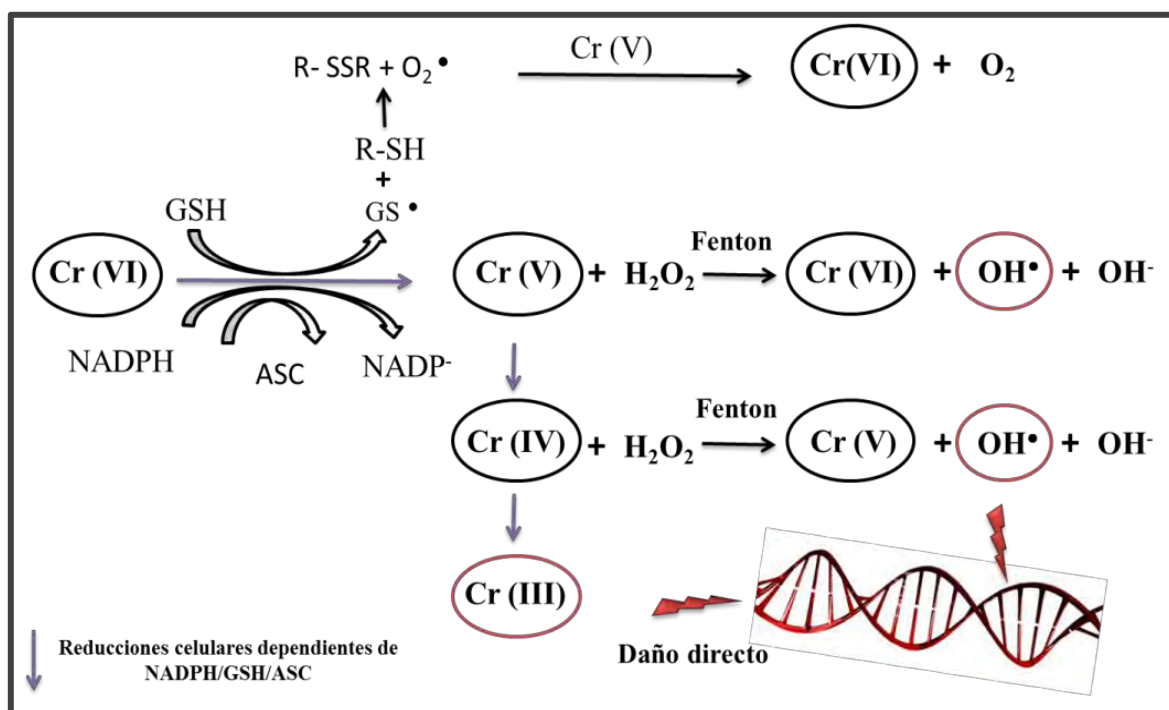


Fig. 2. Principales rutas involucradas en el daño al ADN causado durante la reducción intracelular de Cr(VI) (Modificado de Valko et al., 2006).

2.2.1. Estrés oxidante

El EOX se define como la alteración de la señalización y el control redox, por lo que cuando el contenido intracelular de EROs y RL sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula, se produce un estado de desequilibrio bioquímico que puede alterar las proteínas, lípidos y ADN presentes en los distintos componentes celulares (Jones, 2006). Se ha mostrado que en las células con EOX se genera daño directamente al ADN, por el incremento de EROs y RL que interactúan con el material genético e indirectamente mediante alteraciones en los componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad de los cromosomas. En ambos casos, la acumulación del daño al material genético puede llegar a ocasionar progresión descontrolada del ciclo celular y contribuir a la generación de neoplasias (Ward, 1985). Por lo que el EOX se ha asociado con diversos estados patológicos como el cáncer, entre otros, en los cuales se altera la función celular, contribuyendo al

desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como Alzheimer, esclerosis múltiple, diabetes, hipertensión, asma, glaucoma y cataratas (Halliwell y Gutteridge, 1999).

2.2.2. Radicales libres y especies reactivas

Los RL son especies químicas que contienen un electrón no apareado en su órbita externa, ésta característica los hace sumamente reactivos y capaces de provocar una reacción en cadena que causa daño oxidante a las distintas estructuras celulares. Las especies reactivas (ERs) por otra parte incluyen radicales y no radicales; puede haberlas de oxígeno (EROs), de hierro (ERIs), de cobre (ERCs) y de nitrógeno (ERNs). Estas moléculas poseen al menos un electrón de mayor contenido energético que el correspondiente en su estado fundamental, lo que las hace moléculas oxidantes que pueden generar RL. Las ERs se forman como productos metabólicos de los RL, aunque no todas tienen ese origen (Ramos *et al.*, 2006).

Uno de los componentes de la molécula de ADN susceptible a ser dañado por RL, especialmente por el $\text{OH}^\bullet$, es la desoxirribosa. Cuando está se oxida, desencadena el rompimiento de su enlace con el grupo fosfato del siguiente nucleótido, mecanismo mediante el cual se generan rompimientos de cadena sencilla y de cadena doble (González-Torres *et al.*, 2000). Las EROs y RL también pueden interaccionar con las bases nitrogenadas del ADN. La alteración de este tipo que se observa con más frecuencias es la oxidación del carbono 8 (C-8) de la guanosina, que produce el aducto 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxo-Gua) y que puede conducir a mutaciones por la transversión del nucleótido timina por citosina durante la replicación (Ock *et al.*, 2012). Las células evitan la acumulación de este aducto y sus efectos mutagénicos, mediante proteínas de reparación del ADN, que pueden eliminar el 8-OHdG mediante distintos mecanismos de reparación como la escisión de bases (BER) y la escisión de nucleótidos (NER) (Shibutani *et al.*, 1992; Marnett, 2000).

2.3. Evaluación de daño genotóxico

La evaluación de daño genotóxico se realiza para identificar agentes contaminantes que representan un riesgo para la estabilidad del material genético, así como compuestos candidatos para uso terapéutico y agentes que podrían ser capaces de modular o reducir los efectos mutagénicos de algunos productos químicos (Sloczyńska *et al.*, 2014).

En general, las evaluaciones de mutagenicidad se pueden dividir en tres fases. Las pruebas en fase 1 son estudios *in vitro* que se realizan ya sea en células bacterianas o en cultivos celulares; la fase 2 consiste en la evaluación de la actividad mutagénica *in vivo* en células somáticas y por último, la fase 3 corresponde a ensayos para mutágenos en células germinales. Agencias reguladoras como la “Organisation for Economic Cooperation and Development” (OECD), “International Workshops on Genotoxicity Testing” (IWGT) y “Food and Drug Administration” (FDA) establecieron las pruebas y protocolos a seguir en cada una de dichas fases (Eastmond *et al.*, 2009; Valdiglesias *et al.*, 2010).

Particularmente para la evaluación en fase 2, se recomienda la prueba *in vivo* de aberración cromosómica en mamíferos, que permite identificar alteraciones cromosómicas estructurales inducidas en células de la médula ósea, mientras que el ensayo *in vivo* de micronúcleos (MN), se utiliza para la identificación de daño inducido en los cromosomas o el aparato mitótico y puede realizarse en eritrocitos tomados de la médula ósea o células de sangre periférica de los animales. Otros ensayos *in vivo* utilizados en la fase 2, son el ensayo cometa y pruebas en animales transgénicos para mutaciones puntuales (Combes *et al.*, 2007).

2.3.1. Micronúcleos

El ensayo de MN ha sido recomendado como batería de prueba para la evaluación genotóxica en la “International Conference on Harmonization (ICH) of Genotoxicity Guidelines”, así como otras agencias reguladoras tales como la “Environmental Protection

Agency” (EPA), la FDA y la “International Agency for Research on Cancer” (IARC). El propósito del ensayo es identificar sustancias que causan daño citogenético, originado por clastogénesis o aneuploidogénesis (Müller *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 2000). La técnica de MN fue desarrollada por Schmid y Boller en 1970 y es utilizada como ensayo de corto plazo. Detecta daño citogenético asociado con la frecuencia de AC, evalúa el daño en cromosomas enteros o en fragmentos y también puede identificar daño citotóxico (Von Ledebur y Schmid, 1973; Hayashi *et al.*, 2000). Los MN son pequeños cuerpos de cromatina que se originan de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que no son incorporados dentro del núcleo después de la mitosis, por lo que se identifican en el citoplasma como pequeños núcleos adicionales (Von Ledebur y Schmid, 1973).

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

- a) Aberraciones cromosómicas que conllevan a la formación de fragmentos acéntricos (daño clastógeno).
- b) Daño a nivel de las proteínas involucradas, directa o indirectamente, en la segregación de cromosomas, esto incluye inhibición en el ensamble o desensamble de microtúbulos, remoción de cinetocoros, daños al centriolo, centrómero inactivado, entre otros (daño aneuploidógeno) (Fenech y Crott, 2002; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

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

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

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

2.3.2. 8-hidroxi-2'deoxiguanosina

Además del ensayo de MN y pruebas recomendadas como batería de prueba para la evaluación genotóxica, muchos estudios han demostrado que la 8-OHdG se puede utilizar como un biomarcador para evaluar el daño oxidante al ADN, causado por RL *in vivo* e *in vitro*. El daño oxidante a la guanina puede medirse directamente como aducto en el ADN (8-oxo-Gua) o como 8-OHdG en la sangre, plasma y saliva cuando la lesión ya fue reparada, mediante técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) así como por métodos inmunoquímicos (Marnett, 2000; Ock *et al.*, 2012).

2.3.3. Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular que se presenta en los organismos multicelulares como un mecanismo para eliminar células anómalas de una forma controlada, sin afectar a las células vecinas. Los restos celulares resultantes, que están siempre rodeados de membrana plasmática, son eliminados mediante fagocitosis, evitando la inflamación en esa zona. Además de que la apoptosis es un proceso celular importante para el desarrollo y para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos, juega un papel fundamental como mecanismo de protección contra la carcinogénesis mediante la eliminación de las células dañadas genéticamente, por lo cual también se ha considerada como un marcador de daño al ADN (Hayashi *et al.*, 1990; Blankenberg, 2008).

Durante el desarrollo embrionario la apoptosis es esencial, especialmente en el desarrollo del sistema nervioso, donde el número de neuronas depende de la muerte de muchas células mediante este proceso y para la eliminación de células en las regiones interdigitales para dar lugar a los dedos. En el organismo adulto la apoptosis es necesaria para mantener la homeostasis de los tejidos ya que elimina células dañadas que podrían causar efectos adversos en el organismo. Cuando los mecanismos que regulan la apoptosis fallan, tanto por exceso como por defecto pueden originarse diversas patologías, por ejemplo, la resistencia a la apoptosis es una de las características que contribuyen a la generación de un tumor y también puede ser la causa de algunas enfermedades autoinmunes. En el caso contrario, un exceso de apoptosis podría estar relacionado con enfermedades neurodegenerativas (Sancar *et al.*, 2004).

El proceso de la apoptosis es dependiente de ATP e implica la programación genética de la célula. Una de las características más importantes de la apoptosis es la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN en fragmentos de 200 pb (pares de bases) o múltiplos de ellos. Además, muchas proteínas celulares sufren una ruptura o proteólisis, generalmente catalizada por proteínas con actividad enzimática denominadas caspasas. Todas las caspasas (proteasas de cisteína) tienen una cisteína en su centro activo y producen cortes en las proteínas, justo detrás del aminoácido aspartato. Cuando se inicia el proceso de apoptosis, se activan las caspasas, se fragmentan las proteínas y finalmente el ADN. Existen dos rutas principales de activación de la apoptosis. Una extracelular que se inicia en la membrana a nivel de unas proteínas denominadas receptores de muerte, que al unirse a sus ligandos, desencadenan la activación de las caspasas. La otra vía (intracelular) se inicia en respuesta al daño celular causado por radiación o determinados compuestos tóxicos directamente sobre la mitocondria (Hengartner, 2000).

Durante la apoptosis las mitocondrias liberan al citosol proteínas como el citocromo c, el cual produce la activación de algunas caspasas. La liberación de proteínas de la mitocondria va acompañada de una pérdida de su función como organelo generador de energía, ya que se afecta el proceso de transporte electrónico. Por su parte en la

membrana plasmática se producen cambios en la distribución de lípidos, entre ellos la fosfatidilserina. Este fosfolípido presente sólo en la cara interna de la bicapa lipídica, se transloca a la cara externa, donde actúa como señal para que la célula apoptótica sea reconocida y eliminada por los fagocitos, lo que impide que se produzca una reacción inflamatoria en el resto del tejido (White, 1996; Taylor *et al.*, 2008).

2.4. Agentes antimutágenos

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

- a) Desmutagénesis: comprende a la actividad que se presenta en el organismo para excretar los agentes mutagénicos, desactivarlos ya sea por medio de mecanismos físicos o químicos, inhibir su activación enzimática e inhibir la entrada de éstos a la célula, así como impedir su formación endógena.
- b) Bioantimutagénesis: consisten en disminuir la frecuencia de mutaciones, mediante la reparación del ADN, inhibición y control de la replicación celular y el control de la expresión génica (Kada *et al.*, 1987; De Flora, 1998).

En este sentido la dieta es reconocida como un factor importante en la modulación de distintas enfermedades relacionadas con el daño al ADN. En estudios epidemiológicos y experimentales, se ha mostrado que algunas plantas comestibles o sus componentes, presentan actividad como antimutágenos y tienen efectos protectores en la carcinogénesis humana (Surh y Ferguson, 2003).

Dentro de los componentes vegetales con mayor actividad se encuentran algunos pigmentos como la clorofila y sus sales, los flavonoides y los β -carotenos, así como el AA y la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) (Konopacka, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2010).

Particularmente, se ha observado que las poblaciones del mediterráneo que llevan una dieta a base de aceite de oliva, pescado, frutas, verduras y vino tinto, presentan alrededor de un 50% menos en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer en comparación con las poblaciones occidentales o las que no llevan este tipo de dieta. También, se ha observado una disminución de algunos tipos de cáncer en las poblaciones asiáticas, que se ha asociado al consumo de soya, té verde, ajo y ginseng, entre otros (Lindsay y Astley, 2002; Surh, 2003).

Se ha propuesto como principal vía de protección de los componentes de la dieta a su actividad antioxidante, ya que al interaccionar con los RL evitan que dañen el material genético. El AA, α -tocoferoles y los flavonoides (principalmente las catequinas) se encuentran entre los componentes de la dieta que han mostrado un mayor potencial antioxidante (González-Torres *et al.*, 2000).

2.5. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias sintetizadas en las células (endógenos) o provenientes de la dieta (exógenos), que tienen la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación celular. Estos compuestos protegen principalmente a los lípidos y las proteínas, además de que disminuyen la tasa de mutación en las células, mediante la disminución de los daños oxidantes al ADN. Los antioxidantes actúan no solo mediante la captura directa de los RL, sino que también participan en la prevención de su formación y en la inhibición de su propagación así como en la reparación de lesiones oxidativas. Los antioxidantes exógenos también pueden activar el sistema antioxidante endógeno (González-Torres *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2001).

Los antioxidantes endógenos se clasifican según su naturaleza química en enzimáticos y no enzimáticos (Rahman, 2007; Lobo *et al.*, 2010). Dentro de los antioxidantes enzimáticos se encuentran principalmente la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT). La SOD es una de las enzimas que participan en la transformación de EROs catalizando la transformación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . Esta enzima se encuentra en el citosol y en la matriz mitocondrial. Por su parte la GPx, que también se encuentra en el citosol y en las mitocondrias, cataliza la reducción de H_2O_2 y lipoperóxidos, para lo cual utiliza como agente reductor al GSH. Como resultado de esta reacción el glutatión se transforma a su forma oxidada (GSSG). Por su parte la CAT se localiza predominantemente en los peroxisomas, donde el H_2O_2 se genera a una velocidad relativamente alta. Esta enzima cataliza la conversión de H_2O_2 en agua y oxígeno molecular. Otras sustancias de naturaleza enzimática que también tienen actividad antioxidante son la glutatión reductasa, glutatión S-transferasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Forman *et al.*, 2009; Rizzo *et al.*, 2010).

Entre los antioxidantes no enzimáticos, el GSH junto con las enzimas que intervienen en su ciclo redox forman uno de los principales sistemas de la defensa celular antioxidante. El GSH es un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys) y es el tiol no proteico más abundante a nivel intracelular (Martínez-Sarrasague *et al.*, 2006).

El GSH interviene en la protección celular contra el daño oxidante tanto de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Esta molécula actúa mediante la interacción con radicales como el $O_2^{\bullet-}$, el $OH^{\bullet}$ y el óxido nítrico, además, de presentar una interacción sinérgica con otros agentes antioxidantes como el AA, la vitamina E y la SOD. Así mismo, el GSH protege contra el daño oxidante reduciendo las concentraciones de H_2O_2 e incluso proporcionando un electrón para la reducción de peróxidos en la reacción catalizada por la GPx. El producto final de la oxidación de GSH, el GSSG, (constituido por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro) es regenerado por la glutatión reductasa (GR), ésta enzima le transfiere electrones de NADPH, de esta manera el GSSG es reducido a GSH, de modo que durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR, el glutatión no es

consumido sino reciclado. Además de sus funciones como antioxidante, el GSH es parte importante de la detoxificación de xenobióticos, es esencial para la proliferación celular y tiene un papel importante en la apoptosis, ya que su disminución promueve la activación de caspasas y la progresión de los mecanismos de apoptosis (Konigsberg, 2008; Martínez-Sámano *et al.*, 2011).

Dentro de las células el GSH se encuentra principalmente en las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el núcleo, donde se observa un aumento de su concentración durante la apoptosis. Una técnica común para medir los niveles intracelulares de este antioxidante es la adición de 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) a células en las que en presencia de GSH se forma ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), el cual puede ser medido fluorométricamente a 412 nm. (Griffith, 1980).

Por otra parte, los antioxidantes exógenos también pueden agruparse dentro de los antioxidantes no enzimáticos, entre los que destacan por su alto potencial antioxidante, el AA y los polifenoles (Padayatty *et al.*, 2003, Manach *et al.*, 2004).

2.5.1. Ácido ascórbico

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

La ingesta diaria recomendada de AA para personas sanas es de 75 a 90 mg/día, lo cual puede obtenerse con el consumo de cinco porciones de frutas o verduras, estos requerimientos aumentan en caso de embarazo, intensa actividad física, tabaquismo y en estados patológicos. Una dieta deficiente en este nutrimento ocasiona escorbuto (Levine *et al.*, 2001; Lee, 2009).

La mayoría de las funciones fisiológicas del AA dependen de su potencial de óxido reducción. Participa en la biosíntesis de colágeno, carnitina y neurotransmisores, actúa como un cofactor de las enzimas hidroxilasas y oxigenasas, aumenta la actividad de los linfocitos, la producción de interferón y la integridad de las membranas, además de que transforma el hierro no hémico a su forma férrica para favorecer su absorción intestinal. Sin embargo la función del AA a la que se les ha dado mayor importancia en la actualidad, es a su función como antioxidante (FAO/ WHO, 2001; Konigsberg, 2008).

Se ha propuesto como mecanismo antioxidante del AA, la neutralización en fase acuosa de las ERs, así como la regeneración de otros antioxidantes como el α -tocoferol, el GSH, el ácido úrico y los β -carotenos. Tanto el AA como el ascorbato (forma aniónica del AA) puede donar sus electrones a ERs potencialmente dañinas para neutralizarlas, como producto de esta interacción se forma el radical ascorbilo ($A^\bullet$). El $A^\bullet$ es una molécula radical de baja reactividad, debido a que su electrón desapareado se encuentra estabilizado por resonancia y a su capacidad para regenerarse hasta formar nuevamente AA o donar un segundo electrón y formar ácido dehidroascórbico (DHA). La molécula de DHA puede reducirse y formar nuevamente AA mediante reacciones enzimáticas o de forma directa (Figura 3) (May, 2012).

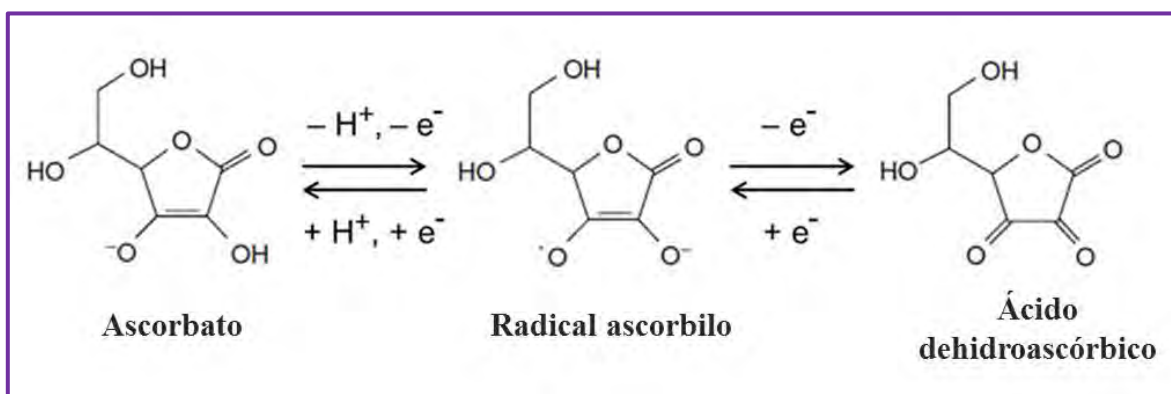


Fig. 3. Regeneración del AA (Bors y Buettner, 1997).

La mayoría de los trabajos experimentales en relación con el AA, atribuyen los efectos benéficos encontrados en distintos modelos experimentales a sus propiedades como antioxidante, sin embargo este mecanismo aún no ha sido claramente descrito. La

utilización del AA tanto en la medicina tradicional como en tratamientos experimentales, se debe en gran parte a que no se han observado efectos adversos después de su administración. Actualmente la dosis segura tolerable de AA se considera de 1000 mg/día (Oro y Donnamaría, 2006).

2.5.2. Polifenoles

Los polifenoles se caracterizan por la presencia de un grupo fenol en su estructura. Estos compuestos constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuos de las plantas, en las que son esenciales para su fisiología, crecimiento y reproducción y están involucrados en los mecanismos de defensa frente a agentes externos como la radiación ultravioleta, la agresión de patógenos y predadores. Se ha descrito que los flavonoides tienen propiedades antioxidantes que pueden resultar benéficos a la salud, mediante reacciones de transferencia de electrones y formación de un intermediario estable que los ayuda a unirse a RL (Fuhrmanand y Aviram, 2002; Manach *et al.*, 2004).

Se han descrito más de 8000 polifenoles que pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y el tipo de sustituyente unido a estos anillos. Las principales clases de polifenoles por ser los más ampliamente distribuidos en los alimentos son: flavonoides, ácidos y alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos; de los cuales, los flavonoides son el grupo más estudiado, en la actualidad, se han identificado más de 4000 compuestos diferentes (Bravo 1998; Tasao, 2010).

Los flavonoides contienen numerosos grupos funcionales OH^- ubicados en estructuras en forma de anillo, las cuales consisten en 2 anillos aromáticos denominados A y B, que se unen mediante tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado, el anillo C. Las variaciones estructurales dentro de los anillos permite la subdivisión de los flavonoides en diferentes familias (Figura 4) (Martínez-Flóres *et al.*, 2002).

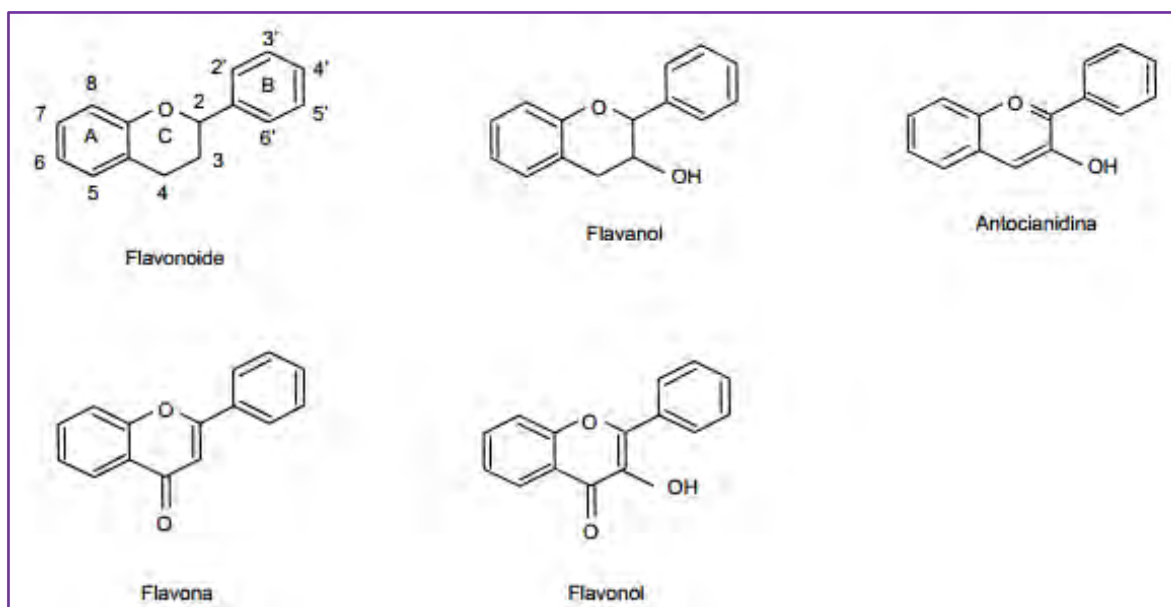


Fig. 4. Estructura y tipos de Flavonoides (McNaught y Wilkinson, 1997).

Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima en 23 mg/día. Se encuentran en muchos tipos de plantas comestibles y también en bebidas como el vino tinto; sin embargo, el chocolate y el té verde (*Camellia sinensis*), al que se le han atribuido efectos benéficos para la salud como quimiopreventivo, antiangiogénico y antimutageno, son las fuentes más ricas. El té verde es la bebida más popular después del agua y sus efectos protectores se han asociado a su contenido de compuestos fenólicos principalmente a las catequinas (Graham, 1992; Cabrera *et al* 2006).

Algunas de las catequinas más estudiadas son la epigallocatequina (EGCG), la epigallocatequina (EGC), la galatoepicatequina (ECG) y epicatequina (EC). La epigallocatequina-3-galato (EGCG) es el compuesto polifenólico perteneciente a las catequinas más abundante en el té verde (59% del total de catequinas) (Cabrera *et al.*, 2006). Una taza de esta bebida puede contener en promedio 80 y hasta 200 mg de EGCG, según la USDA (2007); sin embargo, el contenido de catequinas en el té verde varía dependiendo de cómo se procesan las hojas antes de secar, de las condiciones de cultivo (suelo, clima, prácticas agrícolas, fertilizantes), las propiedades de la planta (variedad, edad, etc.) y la preparación de la infusión (cantidad de producto utilizado, tiempo de

preparación, temperatura, etc.) (Hakim *et al.*, 2000; Wu, 2002). Se ha observado que la EGCG posee propiedades antioxidante, antiinflamatorias y anticarcinogénicas y se ha descrito que posiblemente su potente efecto antioxidante se debe a que posee ocho grupos hidroxilo distribuidos en sus anillos A y B y a su grupo galato, el cual le confiere un alto potencial antioxidante (Konigsberg, 2008, Legeay *et al.*, 2015).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La exposición de las poblaciones humanas a metales pesados como los compuestos del Cr (VI) están relacionadas con la inducción de algunos tipos de cáncer y con daño genotóxico. Una de las vías por las cuales inducen el daño al ADN es mediante la generación de RL y EROs durante su reducción de Cr (VI) a Cr (III). Estudios previos en nuestro laboratorio, muestran que antioxidantes como el AA y los flavonoides reducen el daño genotóxico inducido por compuestos de Cr (VI) sugiriendo que la vía de protección es mediante la regulación del EOx. Se ha observado que los antioxidantes exógenos son capaces de activar el sistema antioxidante endógeno. Por lo que resulta de interés estudiar el efecto de los antioxidantes AA y EGCG sobre el daño oxidante al ADN inducido por compuestos Cr (VI) *in vivo*, mediante la evaluación la cinética de inducción de MN, niveles de 8-OHdG, relación de EPC/ENC y la viabilidad celular. Así como sus efectos sobre la actividad antioxidante evaluando los antioxidantes totales, el GSH y la SOD.

Por otra parte, se ha mostrado que el AA y la EGCG pueden inducir apoptosis y necrosis en distintas líneas de células tumorales, por lo que es de interés determinar si estos tratamientos antioxidantes pueden activar o sensibilizar a las células a la apoptosis, como un mecanismo para eliminar células dañadas por el CrO₃.

IV. HIPÓTESIS

Si el AA y la EGCG tienen una alta capacidad antioxidante y los compuestos de Cr (VI) son capaces de generar EOx, entonces se espera que la administración *in vivo* del AA y la EGCG a ratones tratados con CrO₃ disminuyan las frecuencias de MN mediado por la apoptosis, y que restablezcan los niveles del 8-OHdG, los antioxidantes totales, el GSH y la SOD.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Estudiar el efecto de los antioxidantes ácido ascórbico y (-)-epigallocatequina-3-galato, sobre el daño oxidante al ADN inducido por compuestos de cromo hexavalente en ratones de la cepa Hsd:ICR

5.2. Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico del CrO_3 mediante la cinética de inducción de MN, apoptosis, niveles de 8-OHdG, relación de EPC/ENC y la viabilidad celular.
- Determinar las dosis no genotóxicas, ni citotóxicas del AA y de la EGCG mediante la cinética de inducción de MN, apoptosis, niveles de 8-OHdG, relación de EPC/ENC y la viabilidad celular.
- Evaluar el efecto del CrO_3 , AA y EGCG sobre los niveles de antioxidantes totales, GSH y SOD mediante el método del ABTS (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]), reciclaje enzimático de Griffith y reducción de NBT (nitroazul de tetrazolio).
- Evaluar el efecto del AA y EGCG sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por CrO_3 mediante la cinética de inducción de MN, apoptosis, niveles de 8-OHdG, relación de EPC/ENC y la viabilidad celular.
- Evaluar el efecto de la administración del AA y EGCG sobre los niveles de antioxidantes totales, GSH y SOD en ratones tratados con CrO_3 mediante el método del ABTS (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfónico]), reciclaje enzimático de Griffith y reducción de NBT (nitroazul de tetrazolio).

VI. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. Animales

Se emplearon ratones de la cepa Hsd:ICR de entre 45 y 60 días de edad con un peso variable entre los 28 a 35 g provenientes del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Estos se mantuvieron en cajas de plástico, con alimentación de nutricubos, libre acceso al agua, en condiciones estériles, a una temperatura y humedad controladas, con fotoperiodo de 12 - 12 horas luz -oscuridad. Para los protocolos y condiciones de trabajo se siguieron los criterios de la GENOTOX, la EPA, la ECETOC y la FDA (Heddle, 1983; FDA 2000).

6.2. Reactivos

Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Como colorantes en la técnica de MN, apoptosis y viabilidad celular se utilizó Naranja de Acridina (NA) [CAS No. 10127-02-3] y Bromuro de Etidio (BE) [CAS No. 1239-45-8]. Para los tratamientos fitoquímicos se empleó EGCG [989-51-5] y AA [50-81-7] y como agente inductor de MN se empleó CrO_3 [CAS No. 1333-82-0]. Para la evaluación de niveles de 8-OHdG se empleó el Kit comercial II 8-oxo-dG ELISA de Trevigen [No. 4380-192-K], para la determinación de antioxidantes totales se utilizó el Kit para antioxidantes de Sigma Aldrich [No. Catálogo CS0790], para medir los niveles de GSH se empleó el Kit HT glutatión de Trevigen [No. 7511-100-K] y para medir la actividad de SOD el Kit Superóxido Dismutasa de Trevigen [No. 7501-500-K].

6.3. Tratamientos

El AA, EGCG y el CrO_3 fueron preparados en una solución mediante su disolución en agua destilada estéril, una vez preparados los reactivos se administraron inmediatamente por vía

oral (sonda intragástrica) o vía i.p. según el protocolo establecido (Figura 5) en un volumen de alrededor de 0.25 ml por ratón.

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

- I) Grupo testigo, se les administró solo el vehículo.
- II) Grupo Cr (VI), se les administró una dosis de 20 mg/kg de CrO₃.
- III) Grupos de antioxidantes, se les administraron 100 mg/kg de AA o 10 mg/kg de EGCG
- IV) Grupos experimentales, a los que se les administró el tratamiento de los antioxidantes previo al tratamiento con CrO₃.

Las dosis administradas fueron seleccionadas con base en los resultados obtenidos en estudios previamente realizados en nuestro grupo de trabajo y en lo reportado bibliográficamente (García-Rodríguez *et al.*, 2010, 2011, 2012 y 2013).

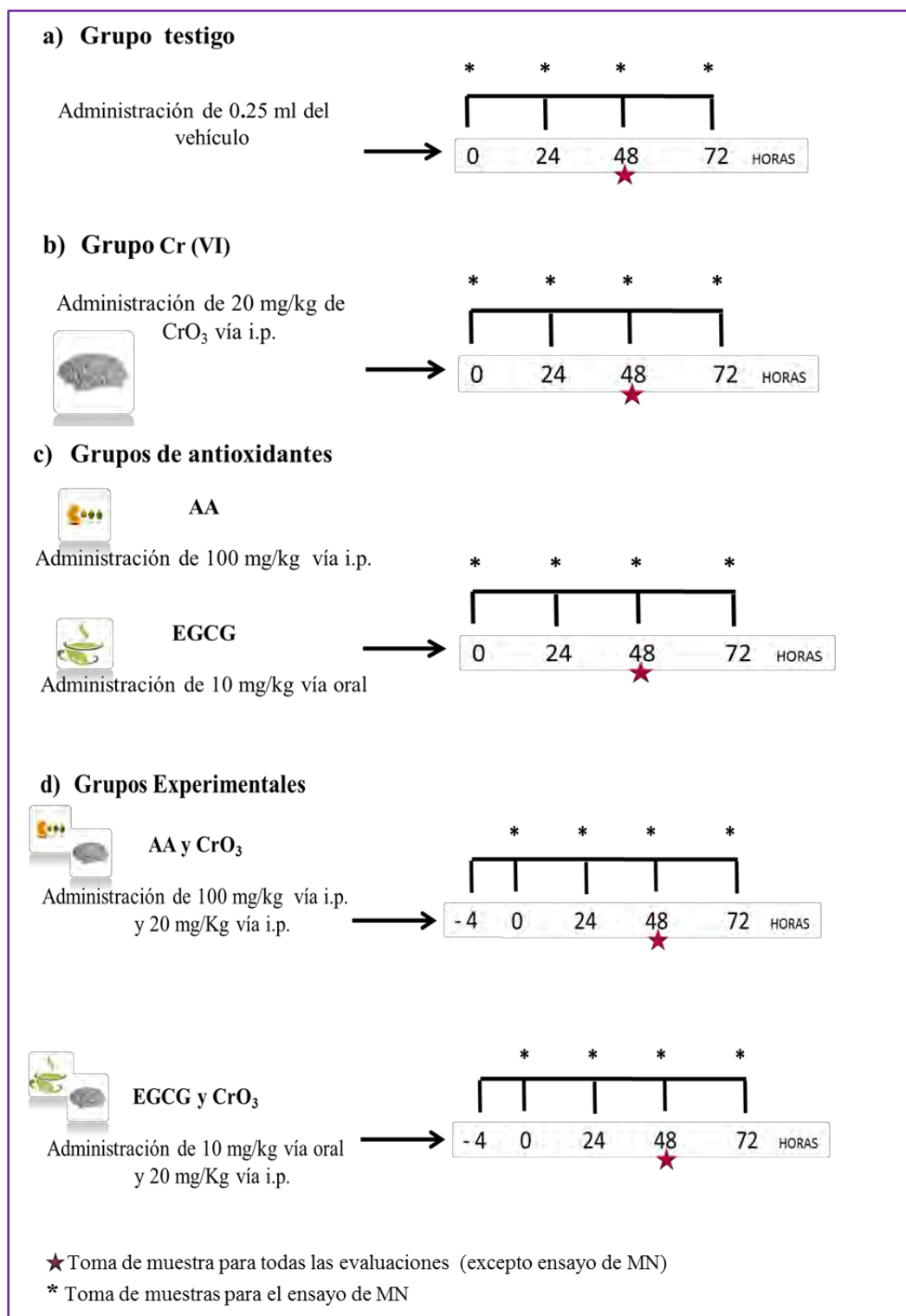


Fig. 5. Protocolo empleado para las evaluaciones de: MN, 8-OHdG, relación de EPC/ENC, apoptosis, necrosis, viabilidad celular, antioxidantes totales, GSH y SOD.

6.4. Evaluación de micronúcleos y relación de eritrocitos policromáticos /eritrocitos normocromáticos

Las evaluaciones de MN y la relación de EPC/ENC se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Hayashi *et al.*, (1990). Las muestras se tomaron de sangre periférica de ratón, se colocaron en laminillas previamente tratadas con naranja de acridina y se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2) 24 horas después de su preparación, procurando no exceder de 8 días. La tinción de los eritrocitos con NA, permite diferenciar a los ENC de los EPC, ya que estos últimos se tiñen de color rojo debido a la presencia de ARN-ribosomal. Con esta tinción también se puede identificar la presencia de MN ya que el ADN se tiñe de color amarillo fluorescente. Para la evaluación del daño genotóxico se cuantificaron los EPC con formación de MN (EPC-MN) que hay en 2000 EPC por ratón y para la evaluación de daño citotóxico la frecuencia de EPC que se encuentren en 1000 eritrocitos totales (EPC + ENC). Se calculó también la Frecuencia de Inducción Neta (NIF) y la Frecuencia Diferencial de Inducción de micronúcleos (DIF) (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

6.5. Determinación de 8-hidroxi-2'deoxiguanosina

Para la determinación de 8-OHdG en plasma se utilizó un ensayo inmuno-enzimático ELISA (Kit de Trevigen) de acuerdo a Asami *et al.*, (1998). La 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), se elimina del ADN y posteriormente es transportada a la saliva, la orina y plasma donde puede ser detectada. Se emplearon placas de 96 pozos previamente recubiertas con 8-OHdG, un anticuerpo anti-8-OHdG monoclonal de ratón, un anticuerpo secundario conjugado con HRP, y el sustrato colorimétrico de detección. El anticuerpo monoclonal 8-OHdG se une competitivamente a 8-OHdG inmovilizado en pocillos pre-revestidos y en solución. El anticuerpo unido a la 8-OHdG en la muestra se elimina por lavado, mientras que el anticuerpo unido a la 8-OHdG en la placa permanece en el pozo. La detección del anticuerpo retenido se realiza usando un conjugado de HRP y un sustrato

colorimétrico. La absorbancia se midió a 450nm. La formación del producto es inversamente proporcional a la cantidad de 8-OHdG presente en la muestra.

6.6. Evaluación de apoptosis y necrosis

Las evaluaciones de viabilidad, apoptosis y necrosis se realizaron de acuerdo a la técnica de McGahon *et al.* (1995). Las muestras obtenidas de sangre periférica de ratón (100 µl) se colocaron en tubos para microcentrifuga y se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm. Se retiró el sobrenadante e inmediatamente después se agregó la mezcla de colorantes de NA/BE en una proporción de 5 µl de colorante por cada 25 µl de muestra. Posteriormente, se colocaron 10 µl de la muestra teñida sobre laminillas limpias y se cubrieron con cubreobjetos. Las preparaciones fueron evaluadas inmediatamente después de su elaboración mediante la observación de las muestras bajo un microscopio de fluorescencia con una emisión de luz azul y un filtro de luz amarilla (Olympus Fluoled). Se evaluaron 300 células por ratón, entre las que se cuantificó el número de células viables, células apoptóticas y células necróticas. Posteriormente se calcularon los valores porcentuales del índice apoptótico y necrótico en cada grupo experimental.

6.7. Determinación de la capacidad antioxidante total

La determinación de antioxidantes totales se realizó en suero mediante un kit comercial basado en el método ABTS propuesto por Miller *et al.* (1993). En este ensayo, 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) se incubaba con metmioglobina y peróxido de hidrógeno para producir ABTS^{•+}. Esta especie es de color azul-verde y puede ser medido en un espectrofotómetro a 405 nm. Los antioxidantes presentes en la muestra disminuyen la concentración de ABTS^{•+}, lo cual implica una reducción en la absorción proporcional a su concentración. La curva estándar de calibración se construye con Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un análogo soluble en agua de vitamina

E, el cual se utiliza como un estándar antioxidante. El valor de los antioxidantes totales de las muestras analizadas se expresa como un equivalente de la concentración milimolar de solución Trolox.

6.8. Determinación de la concentración intracelular de glutatión

El nivel de glutatión se determinó en eritrocitos de sangre periférica utilizando un kit comercial (Kit de Trevigen) mediante el método de reciclaje enzimático de Griffith (1980), en el cual el GSH es oxidado por 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, reactivo de Ellman) y reducido por NADPH en presencia de GR. La formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) se monitorea a 412 nm. El contenido de glutatión de la muestra se determinó por comparación del valor observado con una curva estándar generada a partir de concentraciones conocidas de GSH.

6.9. Determinación de la concentración intracelular de superóxido dismutasa

La determinación de SOD se realizó en muestras de sangre, utilizando un kit comercial (Kit de Trevigen). El ensayo consiste en que los iones generados a partir de la conversión de la xantina en ácido úrico, y peróxido de hidrógeno por la xantina oxidasa (XOD), convierten a NBT en NBT-diformazano el cual absorbe la luz a 450 nm. La SOD puede reducir las concentraciones de $O_2^{\bullet-}$ y por lo tanto reducir la tasa de formación de NBT-diformazano. La reducción en la aparición de NBT-diformazano es una medida de la actividad de SOD presente en las muestras experimentales (McCord y Fridovich, 1969). Mediante este ensayo se puede cuantificar la actividad de SOD-Mn²⁺ y de SOD⁻ (Cu / Zn).

6.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la inducción de MN, relación de EPC/ENC, los niveles de 8-OHdG, antioxidantes totales, GSH y SOD se presentan en los promedios con su desviación estándar, y fueron analizados mediante un análisis de varianzas, seguido de una prueba de Tukey o Dunnet empleando el programa estadístico SPSS/PC versión 15. Los resultados de la frecuencia neta de la inducción de MN (NIF), las frecuencias de viabilidad celular, apoptosis y necrosis, fueron analizados mediante la prueba de chi-cuadrada utilizando el paquete Statistica/PC V 6.0TM (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001). Para todos los análisis se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

VII. RESULTADOS

7.1. Efecto del ácido ascórbico y la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃

7.1.1. Micronúcleos

En el cuadro 1 se muestran los promedios de MN evaluados de las 0 a las 72 horas cuando se administraron los tratamientos de AA, de CrO₃ y la combinación de ambos. Se observa que la administración sola de AA disminuye los promedios de MN en comparación con los MN evaluados a la hora 0 (cuando aún no se administraban los tratamientos). Por el contrario, en el grupo tratado con CrO₃, se observó un incremento en los promedios de MN a las 24 y 48 horas, que resultaron estadísticamente significativos al compararse con el grupo testigo y con su propia hora 0. Por su parte, cuando se combinaron los tratamientos de AA y de CrO₃ se observó una disminución estadísticamente significativa de los promedios de MN a las 24 y 48 horas con respecto al grupo tratado solo con CrO₃. La frecuencia de MN observada a las 48 horas en el grupo combinado también es

estadísticamente significativa comparada con el grupo testigo, lo que sugiere que si bien hay una protección de daño genotóxico, ésta es parcial.

Cuadro 1. Promedio de MN en ratones Hsd:ICR tratados con CrO₃ y AA (media $\pm$ d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Hora	MN/ 1000 células (media $\pm$ d.e.)
testigo	0	5	0	0.8 $\pm$ 0.6
			24	0.9 $\pm$ 0.7
			48	0.8 $\pm$ 0.6
			72	0.9 $\pm$ 0.7
AA	100	5	0	1.5 $\pm$ 0.9
			24	0.6 $\pm$ 0.6
			48	1.1 $\pm$ 0.5
			72	0.8 $\pm$ 0.6
CrO ₃	20	5	0	1.4 $\pm$ 0.7
			24	3.7 $\pm$ 1.3 ^a
			48	11.5 $\pm$ 3.0 ^{a,b,c}
			72	1.2 $\pm$ 0.3
AA-CrO ₃	100-20	5	0	0.8 $\pm$ 0.4
			24	2.6 $\pm$ 1.5
			48	5.6 $\pm$ 2.5 ^{a,b}
			72	1.3 $\pm$ 0.6

^a p<0.05 vs testigo; ^b vs hora 0 del tratamiento; ^c CrO₃ vs AA- CrO₃

A las evaluaciones de MN se les calculó la Frecuencia Neta de Inducción de MN (NIF) partiendo de la premisa de que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que se les restaron los MN evaluados en la hora 0 a los valores evaluados en las siguientes horas (García-Rodríguez *et al.*, 2001). En la figura 6 se muestra el análisis del NIF para 10 000 EPC cuando se administraron los tratamientos de AA y de CrO₃. Se puede observar que en el grupo AA persiste una disminución de las frecuencias de MN, la cual resulta estadísticamente significativa en comparación con el testigo, y que esta fue del 60 y

47 % a las 24 y 72 horas respectivamente. Por otra parte cuando se administró el tratamiento combinado (AA-CrO₃) se observó que los porcentajes de disminución de las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado con Cr (VI) fueron del 16% y del 48% a las 24 y 48 horas respectivamente, por lo que se puede decir que la mayor protección del AA se presentó a las 48 horas, la cual coincide con la hora de mayor inducción de MN del CrO₃.

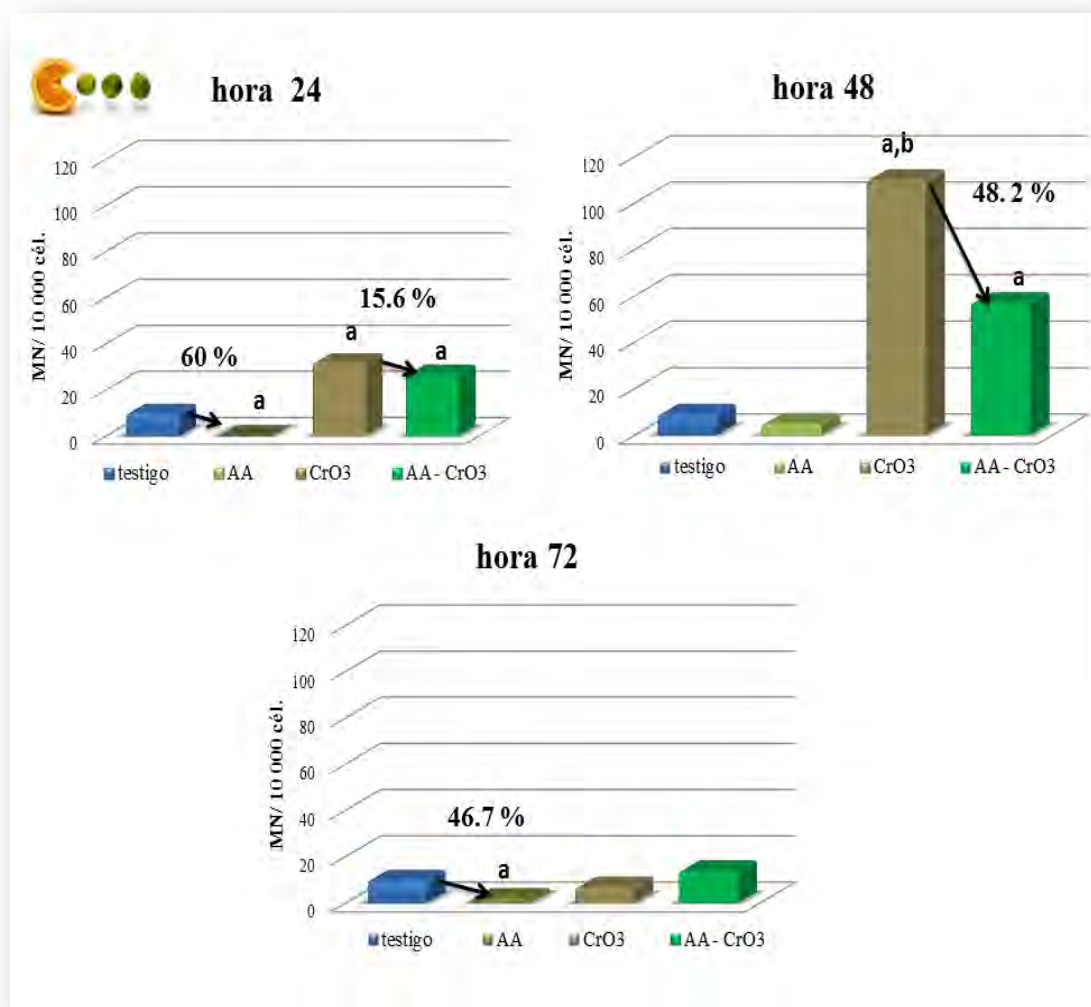


Fig. 6. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administró una dosis de 100 mg/kg de AA y 20 mg/kg de CrO₃ (^a: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs testigo; ^b: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs AA-CrO₃).

En el cuadro 2 se muestran los promedios de los MN evaluados cuando se administraron los tratamientos de EGCG, de CrO_3 y la combinación de los tratamientos. Se observó que la administración sola de EGCG al igual que la administración de AA no incrementa los promedios de MN. El grupo tratado con CrO_3 , como se describió anteriormente, incrementó significativamente los promedios de MN a las 24 y 48 horas. Por su parte el grupo al que se administró el tratamiento combinado de EGCG y CrO_3 presentó una disminución significativa de los promedios de MN a las 48 horas con respecto a los MN presentes en el grupo tratado únicamente con CrO_3 ; sin embargo, este dato sigue resultando estadísticamente significativo al comparar con el grupo testigo. En cuanto a las 24 y 72 horas del grupo combinado, se observó un aumento en los promedios de MN con respecto a los MN en el grupo cromo y testigo.

Cuadro 2. Promedio de MN en ratones Hsd:ICR tratados con CrO_3 y EGCG (media $\pm$ d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Hora	MN/ 1000 células (media $\pm$ d.e.)
testigo	0	5	0	0.8 ± 0.6
			24	0.9 ± 0.7
			48	0.8 ± 0.6
			72	0.9 ± 0.7
EGCG	10	5	0	1.2 ± 0.6
			24	0.8 ± 0.6
			48	0.9 ± 0.4
			72	0.8 ± 0.4
CrO_3	20	5	0	1.4 ± 0.6
			24	3.7 ± 1.3^a
			48	$11.5 \pm 3.0^{a,b,c}$
			72	1.2 ± 0.3
EGCG- CrO_3	10-20	5	0	0.8 ± 0.7
			24	$4.2 \pm 1.0^{a,b}$
			48	$7.80 \pm 2.0^{a,b}$
			72	1.80 ± 0.8

^a $p < 0.05$ vs testigo; ^b vs hora 0 del tratamiento; ^c CrO_3 vs EGCG- CrO_3

En la figura 7 se muestra el análisis de NIF calculado para las frecuencias de MN evaluadas en los grupos de EGCG, CrO₃ y combinado. Puede observarse que en el grupo tratado con la combinación de los tratamientos EGCG-CrO₃, hay una disminución en las frecuencias de MN del 28% a la hora 48, mientras que a las 24 y 72 horas hay un incremento en las frecuencias de MN, el cual a las 24 horas resulta estadísticamente significativo con el grupo testigo. Estos resultados indican que el EGCG presenta un efecto dual, como protector a las 48 horas y como inductor de MN a las 24 y 48 horas.

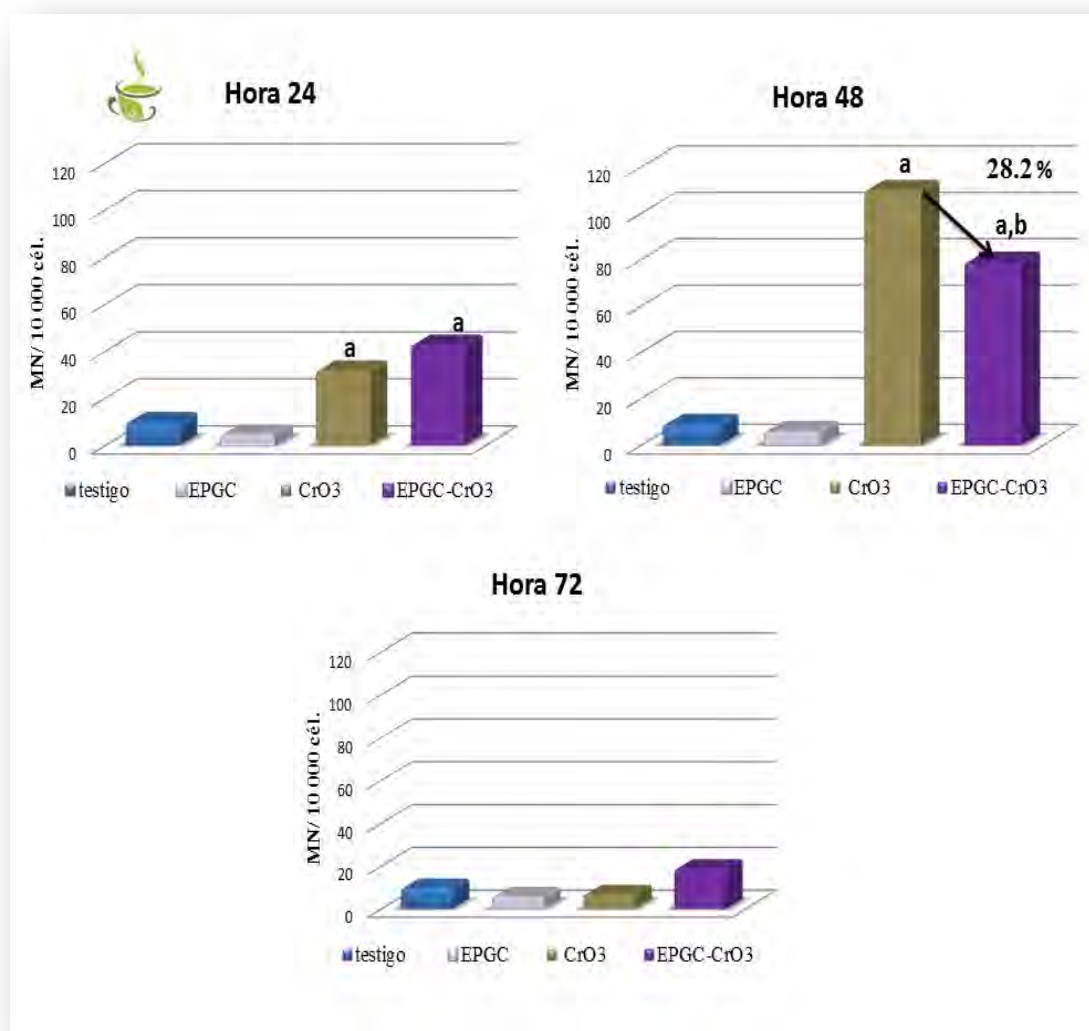


Fig.7. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10 000 EPC, cuando se administró una dosis de 10 mg/kg de EGCG y 20 mg/kg de CrO₃ (^a: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs testigo; ^b: estadísticamente significativo $p < 0.05$ vs AA-CrO₃).

7.1.2. 8-hidroxi-2'deoxiguanosina

Los niveles de 8-OHdG, se evaluaron además de las frecuencias de MN como un parámetro específico de daño oxidante en el ADN. En el cuadro 3 se muestran los niveles de 8-OHdG evaluados a la hora 48 del tratamiento, en el cual podemos observar que los grupos a los que se le administraron los tratamientos con fitoquímicos (AA y EGCG) presentaron un aumento en los niveles de 8-OHdG, que en el caso de la EGCG resulta estadísticamente significativo al comprar con el testigo. Por el contrario, en el grupo tratado con CrO₃ se observó una ligera disminución en el nivel de 8-OHdG, aunque ésta no resulta estadísticamente significativa. Cuando se administró el tratamiento combinado de AA-CrO₃ y EGCG-CrO₃ el nivel de 8-OHdG aumenta ligeramente, en comparación con el grupo tratado únicamente con CrO₃ y en el caso de AA-CrO₃ también en comparación con el grupo testigo, sin embargo este aumento no resulta estadísticamente significativo.

Cuadro 3. Promedio de las concentraciones en plasma de 8-OHdG en ratones Hsd:ICR tratados con AA, EGCG y CrO₃ (media ± d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Concentración de 8-OHdG (media ± d.e.)
testigo	0	5	8.7 ± 2.5
AA	100	5	15.8 ± 6.4
EGCG	10	5	29.8 ± 16.4*
CrO ₃	20	5	7.2 ± 3.5
AA - CrO ₃	100+20	5	9.2 ± 9.1
EGCG-CrO ₃	10+20	5	8.9 ± 6.7

*p < 0.05

7.1.3. Apoptosis

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos tras realizar el análisis de la apoptosis cuando se administraron los tratamientos de AA, CrO₃ y la combinación de los

tratamientos. Se observa que el número de células apoptóticas se incrementó de forma estadísticamente significativa tanto en el grupo AA como el grupo CrO_3 en comparación al grupo testigo. Cuando se administró el tratamiento combinado de AA- CrO_3 se observó una disminución en las frecuencias de células apoptóticas en comparación con el grupo tratado solo con CrO_3 . Ninguno de los tratamientos administrados mostró tener un efecto significativo sobre la frecuencia de células apoptóticas tardías. Por otra parte, observamos que el tratamiento individual de AA no modificó las frecuencias de células necróticas, mientras que en el grupo Cr (VI) se observó un incremento que resultó estadísticamente significativo al comparar con el grupo testigo. En el grupo combinado de AA- CrO_3 hay una disminución de las células necróticas en comparación con el grupo tratado únicamente con CrO_3 , de tal forma que este dato ya no resulta significativo.

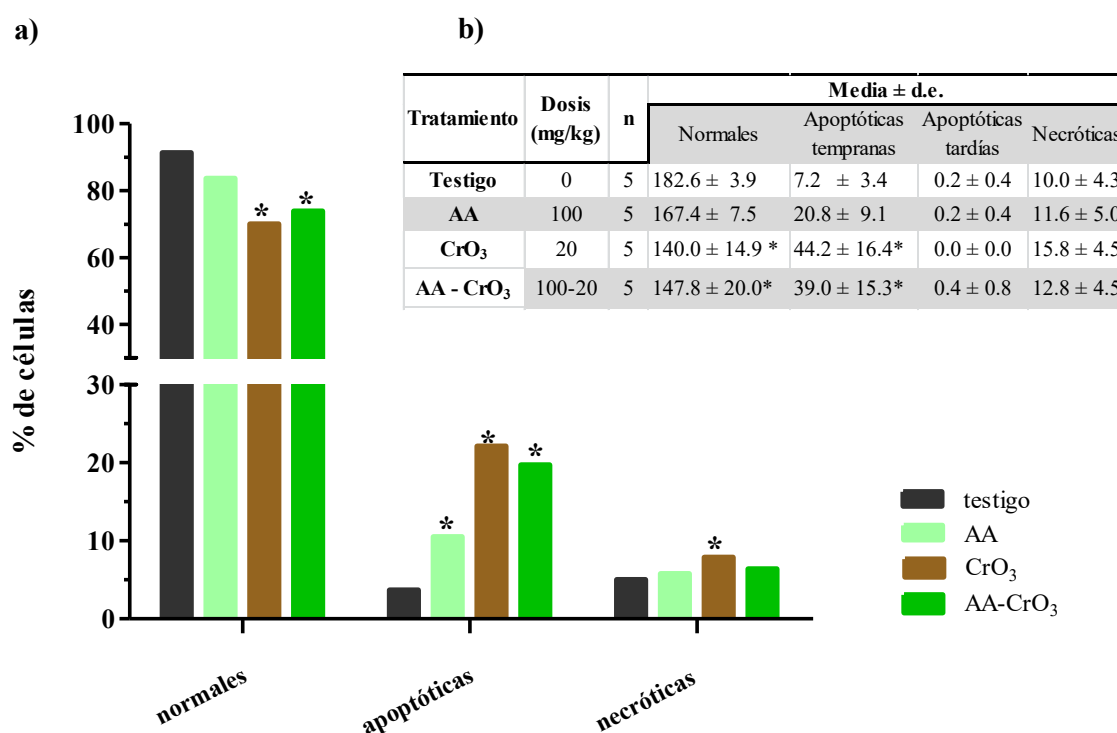


Fig. 8. a) Frecuencia de células normales y apoptóticas. b) Promedio de células apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas en sangre periférica de ratones tratados con AA y CrO_3 . * $p < 0.05$. Se evaluaron 200 células nucleadas por ratón.

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos cuando se administraron los tratamientos de EGCG y CrO_3 . Se observa que las células apoptóticas incrementaron en los grupos a los que se administraron los tratamientos individuales de EGCG y Cr (VI). En el grupo Cr (VI) el aumento resultó estadísticamente significativo. Cuando se administraron la combinación de los tratamientos EGCG y CrO_3 se observó una disminución en las frecuencias de células apoptóticas en comparación con el grupo tratado solo con CrO_3 . Esta disminución fue más notoria que la que se presentó en el grupo combinado AA- CrO_3 . Los tratamientos administrados no mostraron tener efectos significativos sobre la frecuencia de células apoptóticas tardías. En cuanto a las células necróticas, podemos observar que el tratamiento de EGCG no tiene efecto, mientras que el tratamiento de Cr incrementa significativamente la frecuencia de células necróticas. En el grupo EGCG- CrO_3 se observó que hay una disminución de las células necróticas en comparación con el grupo tratado sólo con CrO_3 .

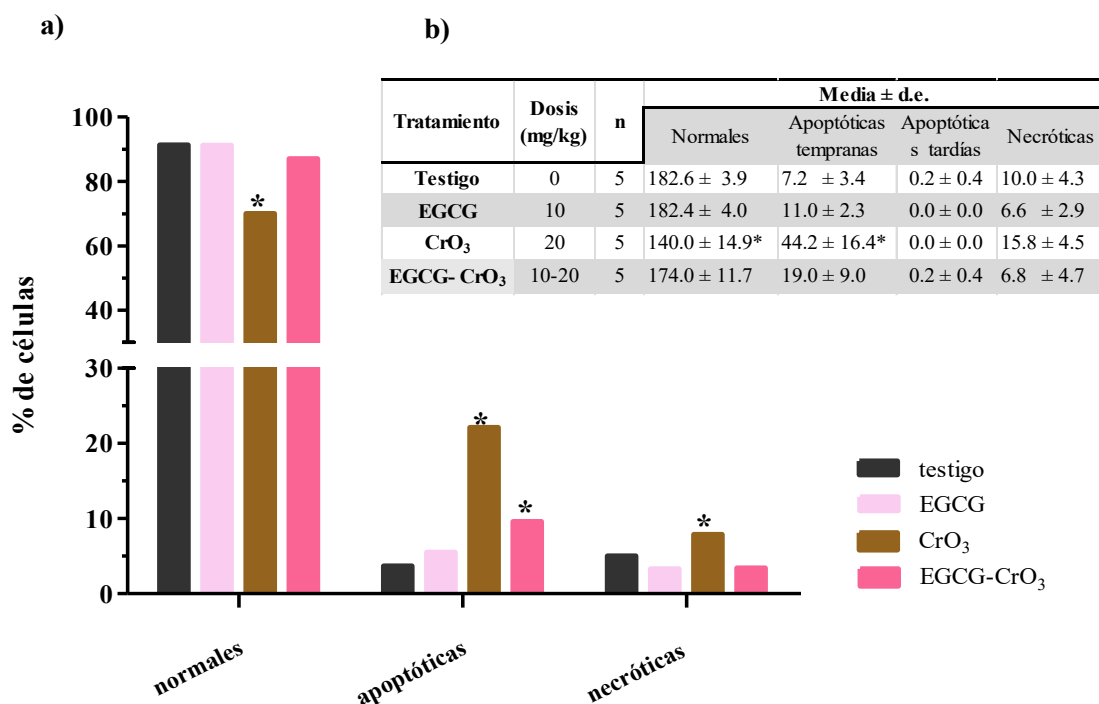


Fig. 9. a) Frecuencia de células normales y apoptóticas. b) Promedio de células apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas en sangre periférica de ratones tratados con EGCG y CrO_3 . * $p < 0.05$. Se evaluaron 200 células nucleadas por ratón.

7.2. Efecto del ácido ascórbico y la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre el daño citotóxico inducido por CrO₃

7.2.1. Relación de eritrocitos policromáticos / eritrocitos normocromáticos

En el cuadro 4 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC con respecto a la frecuencias de ENC evaluados de las 0 a las 72 horas en los grupos tratados con AA, CrO₃ y la combinación de los tratamientos. Se observa que ninguno de los tratamientos tiene efectos significativos, sin embargo en el grupo Cr (VI) los promedios de EPC son menores que los del testigo, lo cual puede ser un indicio de citotoxicidad. Para corroborar un posible efecto citotóxico del CrO₃, se realizaron evaluaciones de viabilidad celular mediante la técnica descrita por García-Rodríguez *et al.* (2013).

Cuadro 4. Promedio de EPC en ratones Hsd:ICR tratados con AA, CrO₃ y dosis combinadas (media ± d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Hora	EPC/1000 células (media ± d.e.)
Testigo	0	5	0	37.2 ± 15.6
			24	36.6 ± 15.1
			48	35.4 ± 6.8
			72	44.0 ± 12.5
AA	100	5	0	43.2 ± 11.0
			24	43.4 ± 16.6
			48	50.6 ± 13.1
			72	42.2 ± 6.3
CrO ₃	20	5	0	36.8 ± 7.7
			24	29.0 ± 6.2
			48	33.2 ± 5.8
			72	34.2 ± 10.0
AA-CrO ₃	100-20	5	0	40.4 ± 12.2
			24	33.8 ± 11.9
			48	30.2 ± 8.5
			72	31.0 ± 4.8

En el cuadro 5 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC con respecto a la frecuencias de ENC, evaluados de las 0 a las 72 horas en ratones tratados con EGCG, CrO₃ y la combinación de los tratamientos. Al igual que con el tratamiento de AA se observa que ninguno de los tratamientos incrementa significativamente los promedios de EPC con respecto a ENC, en ninguna de las horas evaluadas, sin embargo este parámetro debe tomarse con reserva.

Cuadro 5. Promedio de EPC en ratones Hsd:ICR tratados con EGCG, CrO₃ y dosis combinadas (media $\pm$ d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Hora	EPC/1000 células (media $\pm$ d.e.)
Testigo	0	5	0	37.2 $\pm$ 15.6
			24	36.6 $\pm$ 15.1
			48	35.4 $\pm$ 6.8
			72	44.0 $\pm$ 12.5
EGCG	10	5	0	29.6 $\pm$ 1.5
			24	33.4 $\pm$ 6.6
			48	35.0 $\pm$ 8.7
			72	33.4 $\pm$ 4.2
CrO ₃	20	5	0	36.8 $\pm$ 7.7
			24	29.0 $\pm$ 6.2
			48	33.2 $\pm$ 5.8
			72	34.2 $\pm$ 10.0
EGCG-CrO ₃	10-20	5	0	29.6 $\pm$ 10.4
			24	35.6 $\pm$ 7.9
			48	38.4 $\pm$ 6.2
			72	41.8 $\pm$ 11.0

7.2.2. Viabilidad celular

Los resultados obtenidos de la evaluación de EPC con respecto a los ENC mostraron una alta variabilidad en los datos y no hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados, por lo cual se realizó la evaluación del daño citotóxico mediante la técnica descrita por García-Rodríguez *et al.* (2013) para viabilidad celular. En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos del análisis de viabilidad cuando se administraron los tratamientos de AA y CrO₃. Se observa que la administración sola de AA no disminuye las células viables, mientras que en el grupo tratado con CrO₃, se presentó una disminución de células viables y un incremento de células no viables que resulta estadísticamente significativo al compararlo con el grupo testigo. Cuando se administró el tratamiento combinado de AA-CrO₃ se observó una ligera disminución de células no viables con respecto al grupo tratado solo con CrO₃, las cuales ya no resultan estadísticamente significativas al compararse con el testigo.

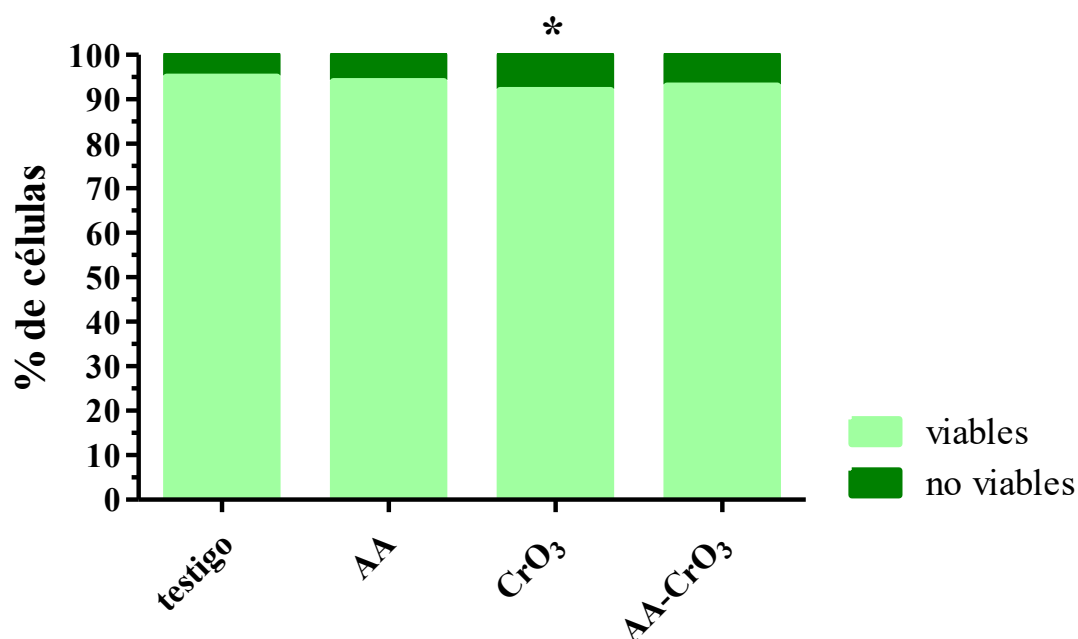


Fig.10. Porcentaje de células viables y no-viables, evaluadas en células nucleadas de sangre periférica de ratones tratados con AA y CrO₃. Significancia * $p < 0.05$. Se evaluaron 200 células nucleadas por ratón.

En la figura 11 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de los grupos EGCG y CrO_3 . Se observa que la administración sola de EGCG no disminuye las células viables, sino que por el contrario, se observa un ligero aumento en comparación con el grupo testigo. Por su parte el grupo tratado con CrO_3 , mostró una disminución de células viables y un incremento de células no viables que resulta estadísticamente significativo. Cuando se administró la combinación de los tratamientos EGCG y CrO_3 , se observó un incremento en el porcentaje de las células viables, así como una disminución de células no viables con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 las cuales ya no resultan estadísticamente significativas al compararlas con el testigo. Dicho efecto fue más notorio en el grupo combinado, EGCG- CrO_3 que en el grupo combinado AA- CrO_3 .

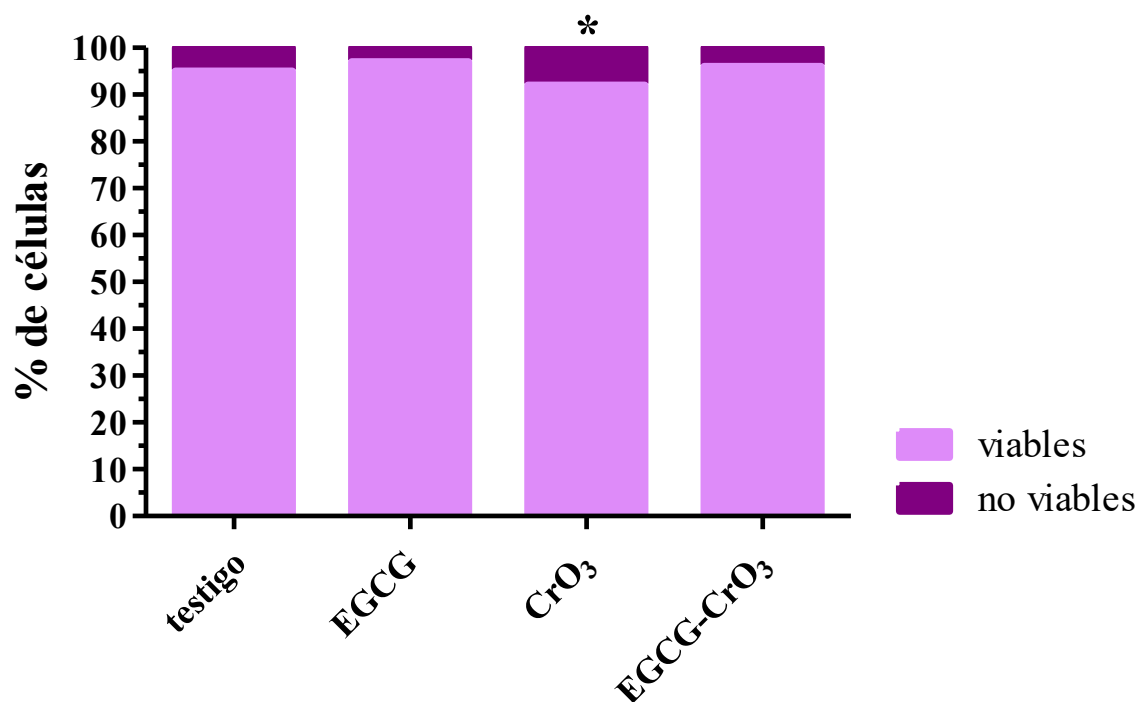


Fig. 11. Porcentaje de células viables y no-viables, evaluadas en células nucleadas de sangre periférica de ratones tratados con EGCG y CrO_3 . Significancia * $p < 0.05$. Se evaluaron 200 células nucleadas por ratón.

7.3. Efecto del ácido ascórbico y la (-)-epigallocatequina-3-galato y CrO₃ sobre el sistema antioxidante

En el cuadro 6 se muestran las concentraciones de antioxidantes totales evaluadas a las 48 horas después de la administración de los tratamientos, en el cual se observa que ninguno de los tratamientos mostró efectos significativos. Por lo cual se decidió evaluar el efecto de los tratamientos directamente sobre dos de los principales antioxidantes celulares, uno no enzimático, el GSH y la enzima antioxidante SOD.

Cuadro 6. Promedio de las concentraciones en plasma de antioxidantes totales en ratones Hsd:ICR tratados con AA, EGCG y CrO₃ (media $\pm$ d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Concentración mM de antioxidantes totales (media $\pm$ d.e.)
testigo	0	5	0.57 $\pm$ 0.05
AA	100	5	0.54 $\pm$ 0.06
EGCG	10	5	0.61 $\pm$ 0.07
CrO ₃	20	5	0.52 $\pm$ 0.05
AA - CrO ₃	100+20	5	0.53 $\pm$ 0.10
EGCG-CrO ₃	10+20	5	0.58 $\pm$ 0.03

En el cuadro 7 se muestran las concentraciones de GSH evaluadas a las 48 horas después de los tratamientos. Se observa que con el tratamiento de AA, el nivel de GSH se disminuye ligeramente en comparación con el grupo testigo, mientras en los grupos a los que se les administraron los tratamientos individuales de EGCG o CrO₃, el GSH mostró un aumento, aunque estos datos no resultaron estadísticamente significativos. Por otro lado cuando se administraron los tratamientos combinados de fitoquímicos (AA y EGCG) y CrO₃ se presentó una disminución del nivel de GSH que resulta estadísticamente significativa con el grupo tratado únicamente con CrO₃ y con el grupo testigo.

Cuadro 7. Promedio de las concentraciones en plasma de GSH en ratones Hsd:ICR

tratados con AA, EGCG y CrO₃ (media ± d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Concentración en pmol de GSH (media ± d.e.)
Testigo	0	5	228.4 ± 39.9
AA	100	5	217.6 ± 54.7
EGCG	10	5	258.6 ± 21.5
CrO ₃	20	5	267.6 ± 41.0
AA-CrO ₃	100+20	5	118.2 ± 33.2*
EGCG-CrO ₃	10+20	5	118.4 ± 48.2*

*p < 0.05

En el cuadro 8 se muestran los porcentajes de la actividad de SOD evaluados a las 48 horas después de la administración de los tratamientos. Se observa que en el grupo tratado con AA se presentó una ligera disminución de la actividad de SOD, mientras que en el grupo tratado con EGCG no se observan variaciones. Por el contrario en el grupo tratado con CrO₃ se observó un mayor porcentaje de actividad de SOD en comparación con el grupo testigo. Cuando se administró el tratamiento combinado AA-CrO₃ y EGCG-CrO₃ se observó que los porcentajes de actividad de SOD son mayores en comparación con el grupo tratado solo con CrO₃. Estos datos no resultan estadísticamente significativos.

Cuadro 8. Promedio de los porcentajes de la actividad en plasma de SOD en ratones Hsd:ICR tratados con AA, EGCG y CrO₃ (media ± d.e.)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Actividad de SOD (media ± d.e.)
Testigo	0	5	72.0 ± 9.7
AA	100	5	67.7 ± 10.8
EGCG	10	5	81.8 ± 10.0
CrO ₃	20	5	59.9 ± 10.6
AA - CrO ₃	100+20	5	63.4 ± 9.5
EGCG-CrO ₃	10+20	5	68.7 ± 14.4

Cuadro 9. Cuadro comparativo de los parámetros evaluados en ratones Hsd:ICR tratados con AA, EGCG y CrO₃ (media ± d.e.)

Tratamiento	media ± d.e.						
	MN (hora 48)	Apoptosis	8-OHdG	Células viables	Antioxidantes totales (mM)	GSH (pmol)	SOD (actividad)
Testigo	0.8 ± 0.6	7.2 ± 3.4	8.7 ± 2.5	182.6 ± 3.9	0.57 ± 0.05	228.4 ± 39.9	72.0 ± 9.7
AA	1.1 ± 0.5	20.8 ± 9.1	15.8 ± 6.4	167.4 ± 7.5	0.54 ± 0.06	217.6 ± 54.7	67.7 ± 10.8
EGCG	0.9 ± 0.4	11.0 ± 2.3	29.8 ± 16.4 *	182.4 ± 4.0	0.61 ± 0.07	258.6 ± 21.5	81.8 ± 10.0
CrO ₃	11.5 ± 3.0 *	44.2 ± 16.4*	7.2 ± 3.5	140.0 ± 14.9*	0.52 ± 0.05	267.6 ± 41.0	59.9 ± 10.6
AA- CrO ₃	5.6 ± 2.5 *	39.0 ± 15.3*	9.2 ± 9.1	147.8 ± 20.0 *	0.53 ± 0.10	118.2 ± 33.2 *	63.4 ± 9.5
EGCG-CrO ₃	7.8 ± 2.1 *	19.0 ± 9.0	8.9 ± 6.7	174.0 ± 11.7	0.58 ± 0.03	118.4 ± 48.2 *	68.7 ± 14.4

*p < 0.05

VIII. DISCUSIÓN

La exposición a agentes mutágenos incrementa la probabilidad de desarrollar enfermedades relacionadas con el daño al ADN como lo es el cáncer. En contraparte, algunos componentes de la dieta son considerados un factor importante en la modulación de procesos cancerígenos y se ha propuesto como principal vía de protección su capacidad antioxidante. De ahí que en el presente estudio se evaluó el efecto de dos potentes antioxidantes, el AA y la EGCG, sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por metales con potencial cancerígeno como lo son los compuestos de Cr (VI) y su relación con la actividad apoptótica, así como con los niveles de antioxidantes totales, de GSH y de SOD en ratones de la cepa Hsd:ICR *in vivo*. Las dosis de AA y de EGCG empleadas en el estudio fueron menores a la LD₅₀ para ratones (USP DI, 1999; NLM, 1999). Estas dosis pueden alcanzarse en humanos con la ingesta de 80 porciones de vegetales al día para AA y 12 tazas de té verde para EGCG (Levine, 2001; Kanwar *et al.*, 2012).

En estudios previos se ha observado que dosis de hasta 4 g/kg de AA en ratones y de 50 g/día en humanos, no inducen efectos tóxicos al ser empleados como tratamiento experimental anticancerígeno (Chen *et al.*, 2011; Carr *et al.*, 2014). De igual manera, para EGCG, se ha reportado que una dosis de 200 mg/kg en ratones y 857 mg en humanos no inducen efectos tóxicos (Potenza *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015). Las dosis de 100 mg/kg de AA y de 10 mg/kg de EGCG empleadas en el presente estudio tampoco mostraron signos tóxicos aparentes en los ratones.

El tratamiento de AA redujo la frecuencia basal de MN. Estos resultados corroboran estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo en los que también se había encontrado que el AA reducía los MN, proponiéndose como mecanismo la neutralización de las EROs que se generan en la células de forma espontánea (García-Rodríguez *et al.*, 2010). De igual manera, se ha observado en humanos que el tratamiento crónico de AA (100 mg/kg vía oral) disminuye los MN basales en el epitelio bucal (Abasova *et al.*, 2013). Por otra parte, el AA está implicado en los procesos antioxidantes de manera normal, por lo

que la administración exógena que se realizó en este estudio posiblemente al incrementar la concentración intracelular, pudo disminuir el daño al ADN generado por los RL que se originan de forma espontánea en el organismo, mismo que se observó mediante el decremento de MN.

Por su parte, la administración sola de EGCG tampoco incrementó las frecuencias de MN, como se esperaba al ser un compuesto presente en el té verde, el cual se asocia con efectos benéficos para la salud (Corcoran *et al.*, 2012). En estudios previos de genotoxicidad se ha observado que la administración de hasta 1200 mg de EGCG vía oral o su consumo crónico no induce daño al material genético mediante la inducción de MN en ratones (Isbrucker *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios *in vitro* han reportado que la EGCG puede tener efectos genotóxicos en altas concentraciones (10^{-3}) y antigenotóxicos en bajas (10^{-8} a 10^{-5} M) (Kanadzu *et al.*, 2006). Cabe señalar que estudios de biodisponibilidad reportan que los niveles de EGCG en el plasma humano después del consumo de té verde, están por debajo de 10^{-6} M, al igual que en animales después de la ingesta de EGCG pura (Lee *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2006).

Cuando se administró el CrO_3 se observó un incremento en las frecuencias de MN, lo cual corrobora el daño genotóxico previamente reportado para los compuestos de Cr (VI) (O'Brien *et al.*, 2003; Henkler *et al.*, 2010) y en particular para el CrO_3 (García-Rodríguez *et al.*, 2001). En el presente estudio se observó que el mayor efecto inductor de MN se presentó a las 48 horas, esto puede ser debido a que en general la mayor distribución y biotransformación de los agentes químicos se presenta en esta hora después de su administración (Heddle *et al.*, 1983; Hayashi *et al.*, 1990). El mecanismo de daño genotóxico de los compuestos de Cr (VI), se ha planteado con base en que estos tienen la capacidad de atravesar la membrana celular y dentro de la célula se reducen rápidamente por la interacción con moléculas citoplasmáticas a cromo (V), (IV) y (III) el cual tienen afinidad con las bases y fosfatos de la cadena de ADN, además de generar EROs en cada reducción que pueden inducir rupturas y aductos en la cadena de ADN así como entrecruzamientos, y por lo tanto inducir daño mutagénico y cancerígeno (O'Brien *et al.*,

2003; Jomova y Valko *et al.*, 2011).

La administración previa de AA y EGCG redujo las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO₃. En particular el AA reduce la inducción de MN en todas las horas evaluadas, mientras que la de EGCG únicamente a la hora 48. Nuestros resultados confirman el efecto protector que tiene el AA sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI) observado en estudios preliminares (García-Rodríguez *et al.*, 2010). En estudios *in vivo* en los que se ha administrado la misma dosis de AA previo a la exposición a radiación, se disminuyen las frecuencias de aberraciones cromosómicas y de MN (Mozdarani y Nazari, 2009; Zangeneh *et al.*, 2015). En humanos también se ha observado que el AA (1000 g/día) tiene un efecto protector sobre el daño inducido por anfepramona (Silva-Nunes, 2013). En particular, Xiao *et al.*, (2013) observaron *in vitro* que el AA disminuye los aductos ADN-proteína inducidos por compuestos de Cr (VI). Cabe mencionar que si bien el AA es una de las principales moléculas que participan en la reducción intracelular del Cr (VI), Wong *et al.* (2012) mostraron que la reducción de CrO₃ activada por AA se lleva a cabo más rápido y genera rendimientos de 25 a 80 % menos de moléculas oxidantes en comparación con la reducción de Cr (VI) mediada por GSH *in vivo*. Debido a que el AA es considerado un potente antioxidante por su facilidad para donar sus electrones a los RL para neutralizarlos y a que después pueden regenerarse, además de que sus moléculas intermediarias como el A[•] son de baja reactividad en comparación con otras ERs potencialmente dañinas (Levine, 1999; Padayatty *et al.*, 2003), es posible que la reducción del 48% en las frecuencias de MN que observamos, se deba a la capacidad del AA para neutralizar las EROs que se generan durante la reducción de Cr (VI) y que generan daño genotóxico.

La disminución de los MN que se presenta con el tratamiento combinado de EGCG-CrO₃, fue corroborada en el presente estudio. García-Rodríguez *et al.*, (2016) observaron que la administración de EGCG en la misma dosis y vía que la empleada en este estudio, disminuye los MN inducidos por CrO₃. Dicha protección puede deberse a la presencia de ocho grupos OH distribuidos en los anillos A y B de la EGCG y a su grupo galato que la hacen una de las catequinas con mayor capacidad de donar electrones (Legeay *et al.*, 2015),

posiblemente capaz de neutralizar las EROs generadas por Cr (VI). También se ha descrito que la EGCG tiene la capacidad de quelar iones metálicos, por lo cual también podría actuar directamente sobre el cromo (Morel *et al.*, 1994; An *et al.*, 2014). Sin embargo a las 24 y 72 horas hubo un incremento de MN por lo cual puede decirse que la EGCG tuvo un efecto dual. En estudios *in vitro*, se ha observado que la EGCG en bajas concentraciones (10^{-8} a 10^{-7}) puede disminuir el daño genotóxico inducido en linfocitos por bliomicina y H_2O_2 , mientras que en altas concentraciones (10^{-6} a 10^{-4} M) lo incrementa (Kanadzu *et al.*, 2006). Por otro lado, es posible que por su interacción con el cromo, la EGCG tuviera una menor concentración a la hora 48 que en las otras horas de evaluación (24 y 72 horas) y que debido a esto el efecto prooxidante solo se observó en las horas de menor inducción de cromo y menor concentración de EGCG. Se ha descrito que los polifenoles del té verde en cultivos celulares a 37 °C o a un pH alto, sufren reacciones auto oxidativas que resultan en la producción de EROs (Hong *et al.*, 2002; Sang *et al.*, 2005). Particularmente se ha descrito que además de la temperatura y el pH, la concentración de oxígeno, de antioxidantes y de iones metálicos en la células, pueden afectar la estabilidad de la EGCG (Byun *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). Es posible que el efecto inductor de MN que se observó a las horas 24 y 72 pueda estar relacionado con variaciones ocasionadas por el CrO_3 en la concentración de antioxidantes, el pH celular y concentración de iones metálicos que pudieron promover la autooxidación de la EGCG y generar metabolitos prooxidantes que a su vez inducen MN.

El aducto 8-oxo-Gua es una de las lesiones oxidativas más frecuentes en el ADN, además de que es altamente mutagénico. Sin embargo la mayoría de estos aductos son eliminados del ADN por mecanismos tales como BER o NER. Después de que el 8-oxo-Gua se elimina, es transportado a la sangre, saliva y orina como 8-OHdG, donde puede ser detectado y cuantificado como un producto de reparación, tal como se realizó en este estudio (Wu *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2013; Nakabeppu, 2014). Cuando se determinaron los niveles de 8-OHdG tanto el AA como la EGCG aumentaron los niveles de 8-OHdG en comparación con el grupo testigo. En estudios realizados en humanos, se ha observado que el consumo de AA aumenta los niveles de 8-OHdG tanto en el plasma como en la orina.

Por lo que AA probablemente tiene efecto sobre la regulación de las enzimas de reparación, lo cual aumenta la tasa de eliminación de 8-OHdG (Cooke *et al.*, 1998). Por otra parte, en estudios *in vitro* se ha observado que el AA aumenta la expresión de la enzima OGG1 que repara el aducto 8-oxo-Gua (Singh *et al.*, 2013). En cuanto a la EGCG no hay estudios en los que se evalúen los efectos sobre los niveles de 8-OHdG en plasma u orina, aunque se ha observado que el consumo de 400 ml de té verde al día incrementan la actividad de OGG1 en humanos (Ho *et al.*, 2014).

El incremento de los niveles de 8-OHdG que se observó con la administración de AA y EGCG, podría deberse a que estos fitoquímicos activan los mecanismos de reparación del aducto 8-OHdG, de manera que la concentración de 8-OHdG en el plasma aumentó como un producto de reparación. De ahí que se sugiere que la disminución de MN basales observados en el grupo tratado con AA, puede deberse no sólo a la capacidad del AA para neutralizar RL, sino también a su efecto sobre la reparación de 8-OHdG.

La administración del CrO₃ disminuye ligeramente los niveles del 8-OHdG en comparación con el grupo testigo. En estudios previos realizados en ratas se ha observado que agentes como el cisplatino pueden disminuir los niveles de 8-OHdG en orina (De Martinis y Bianchi, 2001). Se ha propuesto que bajas concentraciones de metales como el Ni (II), Co (II), Cd (II) y As (III) pueden inhibir los sistemas BER y NER (Hartwig *et al.*, 2002). En particular se ha observado *in vitro* que compuestos de Cr (VI) reducen la expresión de OGG1 en células de carcinoma (Hodges *et al.*, 2002). Esto podría estar relacionado con los niveles de 8-OHdG que se observaron en el grupo tratado sólo con CrO₃. Por lo que los MN observados con este tratamiento además de ser inducidos por la generación de EROs, también pueden persistir debido a la disminución de la actividad de reparación de 8-OHdG. Cabe mencionar que en distintas líneas celulares cancerígenas se ha observado que los niveles de 8-OHdG se encuentran reducidos, por lo que sería interesante estudiar si la supresión que ejercen algunos compuestos metálicos sobre la reparación, pueden constituir un mecanismo de los metales como el Cr (VI) en la inducción de carcinogénesis, además de la generación de EROs (Maeng *et al.*, 2003; Karihtala, 2011).

Cuando se administran ambos tratamientos AA-CrO₃ ó EGCG-CrO₃ no se observan efectos en los niveles de 8-OHdG respecto al testigo, pero sí hay un ligero incremento en comparación con el grupo tratado solo con el CrO₃. Esto nos permite sugerir que los antioxidantes recuperan la posible inhibición de los mecanismos de reparación del CrO₃. En estudios *in vitro* se ha observado que el AA también es capaz de recuperar los niveles de 8-OHdG que habían sido reducidos por el cisplatino (De Martinis y Bianchi, 2001).

Otro de los criterios que se evaluaron en esta investigación para determinar el efecto de los tratamientos sobre el material genético, fue la actividad apoptótica. La apoptosis, es un proceso normal en los organismos que puede ser activada como un mecanismo para eliminar las células con daño en su material genético, cuando el daño excede la capacidad de reparación celular, por lo cual al ser una de las respuestas celulares frente al daño al ADN puede ser considerada como un marcador de daño genotóxico (Hayashi *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 2012; García-Rodríguez *et al.*, 2013).

La administración de tratamientos condujo a un aumento de células apoptóticas tempranas en todos los grupos. Previamente en nuestro grupo de trabajo también se había encontrado que la administración sola de EGCG incrementa la frecuencia de células apoptóticas, proponiéndose a la apoptosis como un mecanismo de protección, mediante la eliminación de las células dañadas genéticamente (García-Rodríguez *et al.*, 2013). En estudios realizados en humanos se ha observado que también dosis altas de AA (vía intravenosa) pueden mandar a apoptosis a las células cancerígenas (Du *et al.*, 2010; Cieslak y Cullen, 2015), al igual que la EGCG en estudios *in vitro* (Roy *et al.*, 2003; Singh y Katiyar, 2013). El incremento de células apoptóticas que se observó con ambos fitoquímicos podría explicar la disminución de MN basales en el grupo AA y la disminución de células necróticas y no viables en el grupo EGCG.

Por su parte, el incremento de células apoptóticas en el grupo CrO₃ confirma las observaciones realizadas en nuestro grupo de trabajo cuando se aplicaron dosis de cromo iguales a las empleadas en este estudio (García-Rodríguez *et al.*, 2014). Resultados

similares se han observado en estudios *in vitro* en distintos tipos celulares (Hayashi *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2015). El daño al ADN y la alteración de los estados oxidativos intracelular tienen el potencial para desencadenar o sensibilizar una célula a la apoptosis. Por lo tanto, las EROs generadas a partir de Cr (VI) durante su reducción, pueden jugar un papel importante en la vía de señalización de apoptosis (Hayashi *et al.*, 2004; García-Rodríguez *et al.*, 2013). Así mismo el incremento de células con MN y la disminución de los niveles de 8-OHdG generados por el CrO₃ muestran que el cromo causa daños irreversibles en el ADN, que pueden conducir a las células a la apoptosis. Si bien la apoptosis es un mecanismo importante para el mantenimiento de una población de células funcionales y sanas, hay un margen de actividad apoptótica que si se rebasa puede conducir a errores que permiten a las células dañadas escapar de la muerte celular y proliferar, lo cual podría ser un factor importante en la carcinogénesis que se ha observado en personas expuestas al cromo.

Cuando el AA y el EGCG se administraron antes de la inyección de CrO₃, el número de células apoptóticas disminuyó en comparación con el grupo tratado solo con CrO₃. Esto puede estar relacionado con la disminución de MN que se presentó en los grupos combinados, sugiriendo que al haber menos células con daño al ADN, menos células son enviadas a apoptosis. En estudios previos *in vivo* realizados en ratas y en humanos se ha observado que la administración de AA puede disminuir las células apoptóticas inducidas por agentes genotóxicos, como el plomo y la anfepramona (Khordad *et al.*, 2013; Silva-Nunes *et al.*, 2013). Particularmente en estudios *in vitro*, el AA disminuyó la frecuencia de células apoptóticas inducidas por Cr (VI) y la translocación de p53 a la mitocondria (Banu *et al.*, 2011). Por otra parte Zou *et al.* (2014) mostraron que la EGCG disminuye las células apoptóticas inducidas por cisplatino en ratones. En estudios realizados *in vitro*, también se ha observado que la EGCG disminuye las células apoptóticas y el daño genotóxico inducido por cadmio (An *et al.*, 2014).

Cuando se evaluó la citotoxicidad mediante la relación de EPC con respecto a los ENC, a pesar de que hay una disminución de EPC solo en el grupo tratado con CrO₃ no se observan efectos significativos. Si bien la OECD (1997) indica que al realizar la prueba de MN se

determine también la frecuencia de EPC/ENC, este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (Krishna *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 2000). Para corroborar la citotoxicidad se realizó la evaluación de viabilidad celular empleando la técnica de NA/BE modificada por García-Rodríguez *et al.* (2013). Al realizar este análisis, se observa una disminución significativa en las células viables del grupo tratados con el CrO₃, que es consistente con el aumento de células necróticas que se observó en este grupo. En estudios realizados en humanos y en ratones a los cuales se les trató con hasta 100 g de AA (vía intravenosa), no se ha reportado que el AA disminuya la viabilidad celular en el tejido sano (Chen, 2008; Du *et al.*, 2012). De igual manera, en estudios *in vitro* se ha observado que concentraciones de AA, 10 veces mayores a las concentraciones fisiológicas normales (100 µM) no disminuye la viabilidad celular (Jin *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015). En cuanto a la EGCG se ha observado que la administración de dosis más altas a las que usamos en este estudio (85mg/kg, vía oral o i.p.) tampoco inducen efectos citotóxicos en ratones (Fiorini *et al.*, 2005), al igual que el tratamiento con 100 µmol/L de EGCG en cultivos de la línea celular PC12 (Crispo *et al.*, 2010).

Cuando se administraron los tratamientos combinados, AA-CrO₃ y EGCG-CrO₃ se observó un incremento en el porcentaje de las células viables con respecto al grupo tratado solo con CrO₃. En estudios previos realizados *in vitro*, también se observó que la administración de AA tiene un papel protector en la reducción de la viabilidad celular inducida por la cipermetrina y mancozeb (Cota *et al.*, 2004; Pavlovic *et al.*, 2015). Mientras que, en estudios *in vitro* se ha observado que la EGCG en concentraciones de 100 µM protege del daño citotóxico inducido por Cr (VI) (Wu *et al.*, 2012) y que puede minimizar los efectos de otros agentes como la radiación ionizante (Zhu *et al.*, 2014). De ahí que, se sugiere que el AA y la EGCG son capaces de proteger o modular no solo el daño genotóxico sino también del daño citotóxico inducido por compuestos de Cr (VI) *in vivo*.

No se observaron efectos significativos al evaluar los antioxidantes totales presentes en el plasma mediante el método ABTS. Esto pudo deberse a que la homeostasis redox se mantiene por un sistema complejo donde el cambio en la concentración de un antioxidante

puede ser compensado por otro (Benzie y Strain, 1999; Marim *et al.*, 2015). Sin embargo, al evaluar el nivel de GSH, se observó una ligera disminución con el tratamiento de AA y un ligero aumento tanto en el grupo EGCG como en el grupo Cr (VI), mientras que con los tratamientos combinados de AA-CrO₃ y EGCG-CrO₃ se observó una disminución significativa. El GSH junto con las enzimas que participan en su ciclo redox, forman uno de los principales sistemas de defensa antioxidante celular ya que disminuyen la concentración de H₂O₂ y de lipoperóxidos (L-OOH). El GSH también puede participar en la detoxificación de xenobióticos y tiene interacciones sinérgicas con otros antioxidantes. Particularmente se ha descrito que el GSH es necesario en la regeneración directa del AA a partir de DHA y en su regeneración enzimática por acción de las Trx o glutarredoxina, que son dependientes de GSH (Du *et al.*, 2012). En estudios previos realizados en eritrocitos humanos se ha observado que durante el reciclaje del AA las concentraciones de GSH, NADPH y NADH, disminuyen, sin que esta disminución cause EOX (May *et al.*, 2001), lo cual pudo haberse presentado en nuestro estudio luego de que el AA neutralizara los RL, como propusimos para explicar la disminución de MN en el grupo AA. Por su parte el aumento de GSH que se presentó con la EGCG sugiere que puede activar la síntesis de moléculas del sistema antioxidante endógeno como lo es el GSH. En estudios previos se ha observado que la administración de EGCG vía i.p. ó su consumo crónico aumenta el nivel de GSH en ratones (Fiorini *et al.*, 2005). En general se ha propuesto que el consumo de una dieta suplementada con polifenoles, aumenta los niveles de GSH y de las enzimas de este sistema (Mohan *et al.*, 2005). Por otra parte sabemos que las células cuentan con distintos mecanismos para responder a estresores químicos, uno de estos mecanismos es la síntesis de moléculas involucradas en la defensa antioxidante (Schlesinger *et al.*, 1982; Lindquist, 1986), por lo cual sugerimos que el aumento de GSH que se observó en el grupo Cr (VI) pudo ser debido a un aumento en su síntesis como respuesta al EOX inducido por el Cr O₃. En estudios previos realizados en ratas y peces se ha observado que los niveles de GSH aumentan después de la administración de otros compuestos de Cr (VI) (dicromato de sodio y dicromato de potasio) (Standeven y Wetterhahn, 1991; Kumar *et al.*, 2013). Por otra parte los niveles celulares de GSH están regulados no solo por el control de sus tasas de síntesis y de exportación, sino también por su agotamiento (Uhlig y Wendel, 1992; Bellatori *et al.*,

2009), por lo cual es posible que la disminución de los niveles de GSH que observamos en los grupos combinados se deba a que el AA y la EGCG incrementaron la utilización de GSH, llevándolo a su agotamiento.

De modo que el efecto protector del AA y la EGCG que se observó sobre el daño genotóxico y citotóxico inducidos por el CrO₃ en este estudio, pueden deberse no solo a la capacidad de estos compuestos para neutralizar RL, sino también a una activación de los mecanismos en los que participa el GSH, principalmente en la neutralización de H₂O₂, el cual junto con el Cr participa en reacciones tipo Fenton donde se produce el radical OH[•] (Assady *et al.*, 2011).

Los niveles de SOD también tuvieron efectos diferentes en el grupo AA y EGCG, ya que en el grupo AA hubo una ligera disminución, mientras que en el grupo EGCG un aumento. Por su parte los niveles de SOD disminuidos en el grupo CrO₃ se recuperaron con la administración previa de AA o EGCG. Se ha descrito que la regeneración de AA puede afectar los niveles de antioxidantes endógenos (Konigsberg, 2008) por lo cual es posible que la disminución de SOD en este estudio, al igual que la de GSH, esté relacionada con la regeneración de dicho antioxidante. En otros estudios realizados en humanos también se ha observado que el consumo crónico de AA disminuye la actividad de SOD en eritrocitos durante el periodo de suplementación (Brennan *et al.*, 2000). Cabe destacar que si bien observamos una disminución de SOD con el tratamiento de AA, esta no fue significativa, además de que se ha reportado que sólo la disminución crónica en la actividad de SOD está implicadas en estados patológicos (Weydert y Cullen, 2010). Por otra parte en estudios *in vivo* se ha mostrado que la administración crónica de EGCG aumenta la actividad de SOD en ratas (Sheng *et al.*, 2007; Ran *et al.*, 2008), al igual que como ocurrió en el presente estudio con una dosis aguda, que sugiere que la EGCG además de neutralizar RL, también puede activar las defensas antioxidantes enzimáticas (SOD) y no enzimáticas (GSH) como parte de su actividad antioxidante. En cuanto al grupo tratado con CrO₃, en estudios *in vivo* se ha observado que los compuestos de Cr (VI) en dosis incluso menores a las que se emplearon en este estudio disminuyen la actividad de SOD en sangre de ratas (Bosgelmez y Güvendik, 2004; Balakrishnan *et al.*, 2013). Sin embargo también se ha observado que la

administración crónica de Cr (VI) aumenta los niveles de SOD en el hígado (Patlolla *et al.*, 2009). La diferencia entre estos resultados y los nuestros puede deberse al tejido en el que se midió la actividad de SOD y al tiempo de exposición al Cr (VI). En otros estudios se ha observado que el consumo de metales pesados en el agua: Pb, Hg, Cd y Cu, pueden disminuir los niveles de SOD en tejidos de riñón y testículos de ratones (Al-Attar, 2011). La enzima SOD es uno de los antioxidantes enzimáticos intracelulares más importante, ya que cataliza la dismutación del radical $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 , de ahí que planteamos que la disminución de SOD en el grupo Cr (VI) puede deberse a su agotamiento durante la neutralización del $O_2^{\bullet-}$, que se genera por la reducción de Cr (VI). Así mismo la recuperación de los niveles de SOD que se observó con los tratamientos combinados, podría ser un mecanismo de protección importante ya que si bien el $O_2^{\bullet-}$ no interactúa directamente con el ADN, si puede participar junto con el Cr en la reacción de Haber-Weiss donde se genera $OH^{\bullet}$. En otros estudios *in vivo* se ha observado que la administración de AA recupera la actividad de SOD que había sido disminuida por la exposición a cisplatino y pilocarpina en ratas (Ajith *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009). Así mismo, se observó que la EGCG es capaz de restablecer la actividad de SOD que había sido disminuida por exposición a radiación en ratas y ratones (Kim *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2014). Se ha sugerido que los extractos de té verde pueden normalizar los niveles de SOD disminuidos por etanol en el hígado de ratones, debido a su alto contenido de EGCG (Skrzydłowska *et al.*, 2002).

IX. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

- La administración de CrO_3 induce daño genotóxico y citotóxico ya que incrementó la frecuencia de MN, células apoptóticas y necróticas, además de que disminuyó la viabilidad celular así como los niveles de 8-OHdG.
- La administración de AA y de EGCG no inducen daño genotóxico ni citotóxico ya que no incrementan las frecuencias de MN, células necróticas y células no viables.
- La administración de AA y de EGCG incrementaron los niveles de 8-OHdG en sangre periférica, lo que se sugiere que incrementan la reparación de los aductos 8-oxo-Gua.
- La administración sola del tratamiento con AA disminuye la frecuencia de MN, lo cual pudo deberse a la neutralización de los RL, y por la eliminación de las células dañadas que se indujeron a apoptosis.
- La administración sola de la EGCG disminuye las células no viables basales, lo cual pudo deberse a la neutralización de los RL y por lo tanto hay menor toxicidad celular.
- La administración previa de los antioxidantes protege del daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO_3 , ya que se presentó una disminución en las frecuencias de MN a las 48 horas en el siguiente orden: AA (48.2 %) > EGCG (28.2%), una disminución de células apoptóticas y necróticas así como un aumento de la viabilidad celular disminuida por el CrO_3 . El AA y la EGCG recuperaron los niveles de 8-OHdG disminuidos por el CrO_3 .
- La administración del EGCG previa al tratamiento de CrO_3 presenta un efecto dual, ya que se disminuyó la frecuencia de MN a las 48 horas y se incrementan a las 48 y 72 horas, por lo que se sugiere que la EGCG presenta un efecto anti y prooxidante.

- Ninguno de los tratamientos presentó efectos sobre los antioxidantes totales. Al administrar el CrO_3 se incrementaron los niveles de GSH, que puede deberse a un aumento en su síntesis, mientras que la actividad de la SOD disminuyó posiblemente por su agotamiento durante la neutralización de RL. El AA disminuyó los niveles de GSH y SOD, probablemente por su participación en la regeneración de DHA a AA, mientras que la EGCG los aumentó sugiriendo que puede activar ambos antioxidantes endógenos.
- La administración de los tratamientos combinados disminuyó los niveles de GSH y aumentó los niveles de SOD, posiblemente por un incremento en la utilización de GSH y a una activación de la síntesis de SOD.

HIPÓTESIS:

<< Si el AA y la EGCG tienen una alta capacidad antioxidante y los compuestos de Cr (VI) son capaces de generar EOx, entonces se espera que la administración in vivo del AA y la EGCG a ratones tratados con CrO_3 disminuyan las frecuencias de MN mediado por la apoptosis, y que restablezcan los niveles del 8-OHdG, los antioxidantes totales, el GSH y la SOD >>

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abasova Y, Reutova N, Sycheva L, Chernysheva E (2013) Studies of Antimutagenic Effects of Vitamins A and C in Humans. *Bull Exp Biol Med*; 154(5): 649-653.
- Adler L, Bootman J, Favor J, Hook G, Schriever-Schwemmer G, Welzl G, Whorton E, Yoshimura I, Hayashi M (1998) Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat Res*; 417(1): 19-30.
- Ajith T, Usha S, Nivitha V (2007) Ascorbic acid and α -tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. *Clin Chim Acta*; 375(1): 82-86.
- Al-Attar A (2011) Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice. *Saudi J Biol Sci*; 18(4): 395-401.
- An Z, Qi Y, Huang D, Gu X, Tian Y, Li P, Li H, Zhang Y (2014) EGCG inhibits Cd(2+)-induced apoptosis through scavenging ROS rather than chelating Cd (2+) in HL-7702 cells. *Toxicol Mech Methods*; 24(4): 259-267.
- Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tsurudome Y, Itoh H, Kasai H (1998) Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem Biophys Res Commun*; 243(3): 678-682.
- Assady M, Farahnak A, Golestani A, Esharghian M (2011) Superoxide Dismutase (SOD) Enzyme Activity Assay in Fasciola spp. Parasites and Liver Tissue Extract. *Iran J Parasitol*; 6(4): 17-22.
- Balakrishnan R, Kumar C, Rani M, Kavita K, Boobalan G, Reddy A (2013) Evaluation of protective action of α -tocopherol in chromium-induced oxidative stress in female reproductive system of rats. *J Nat Sci Biol Med*; 4(1): 87-93.
- Ballatori N, Krance S, Notenboom S, Shi S, Tieu K (2009) Hammond C Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*; 390(3): 191-214.
- Benzie I, Strain J (1999) Effect of vitamin C supplementation on concentrations of vitamins C and E in fasting plasma. *Asia Pac J Clin Nutr*; 8(3): 207-210.
- BMI (2007) Top 10 Worst Polluted Sites. The Blacksmith Institute; New York.
- Banu S, Stanley J, Lee J, Stephen S, Arosh J, Hoyer P, Burghardt R (2011) Hexavalent chromium-induced apoptosis of granulosa cells involves selective sub-cellular translocation of Bcl-2 members, ERK1/2 and p53. *Toxicol Appl Pharmacol*; 251(3): 253-266.
- Blankenberg F (2008) *In vivo* detection of apoptosis. *J Nucl Med*; 49(2): 81-95.
- Boşgelmez I, Güvendik G (2004) Effects of taurine on oxidative stress parameters and chromium levels altered by acute hexavalent chromium exposure in mice kidney tissue. *Biol Trace Elem Res*; 102(1-3): 209-225.
- Bors W, Buettner G (1997) The vitamin C radical and its reactions in vitamin. *Health and Disease*; Marcel

- Dekker Inc, New York. Capítulo 4: 75- 94
- Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*; 56(11): 317-333.
- Brennan L, Morris G, Wasson G, Hannigan B, Barnett Y (2000) The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H₂O₂ induced DNA damage in human lymphocytes. *Br J Nutr*; 84(2): 195-202.
- Byun E, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H (2010) TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. *J Immunol*; 185(1): 33-45.
- Carr A, Vissers M, Cook J (2014) Relief from cancer chemotherapy side effects with pharmacologic vitamin C. *N Z Med J*; 127(1388): 66-70.
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R (2006) Beneficial effects of green tea a review. *J Am Coll Nutr*; 25(2): 79-99.
- Chang Z, Huo L, Li P, Wu Y, Zhang P (2015) Ascorbic acid provides protection for human chondrocytes against oxidative stress. *Mol Med Rep*; 12 (5): 7086-7092.
- Chen I, Liu C, Chiu J, Hsu C (2015) Therapeutic effect of high-dose green tea extract on weight reduction: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clin Nutr*; En prensa: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2015.05.003>
- Chen M, Tsai C, Hsu Y, Lu F (2014) Epigallocatechin gallate eye drops protect against ultraviolet B–induced corneal oxidative damage in mice. *Mol Vis*; 20: 153-162.
- Chen P, Stone J, Sullivan G, Drisko J, Chen Q (2011) Anti-cancer effect of pharmacologic ascorbate and its interaction with supplementary parenteral glutathione in preclinical cancer models. *Free Radic Biol Med*; 51(3): 681-687.
- Chen Q, Espey M, Sun A, Pooput C, Kirk K, Krishna M, Khosh D, Drisko J, Levine M (2008) Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci*; 105(32): 11105-11109.
- Cieslak J, Cullen J. (2015) Treatment of Pancreatic Cancer with Pharmacological Ascorbate. *Curr Pharm Biotechnol*; 16(9): 759-70.
- Combes R, Grindon C, Cronin M, Roberts D, Garrod J (2007) Proposed integrated decision-tree testing strategies for mutagenicity and carcinogenicity in relation to the EU REACH legislation. *Altern Lab Anim*; 35(2): 267-287.
- Cota P, Ramírez M, Gonzáles E (2004) Vitamin C protects against *in vitro* cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*; 18(1): 9-13.
- Cooke M, Evans M, Podmore I, Herbert K, Mistry N, Mistry P, Lunec J (1998). Novel repair action of vitamin C upon *in vivo* oxidative DNA damage. *FEBS letters*; 439(3): 363-367.
- Corcoran M, McKay D, Blumberg J (2012) Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and

- safety. *J Nutr Gerontol Geriatr*; 31(3): 176-189.
- Crispo J, Ansell D, Piche M, Eibl J, Khaper N, Ross G, Tai T (2010) Protective effects of polyphenolic compounds on oxidative stress-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Can J Physiol Pharmacol*; 88(4): 429-38.
- Das J, Kang M, Kim E, Kwon D, Choi Y, Kim J (2015) Hexavalent chromium induces apoptosis in male somatic and spermatogonial stem cells via redox imbalance. *Sci Rep*; 5(1): 1-14.
- De Flora S (1998) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*; 402(1): 151-158.
- De Martinis B, Bianchi M (2001) Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. *Pharmacol Res*; 44(4): 317-320.
- Du J, Cullen J, Buettner G (2012) Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*; 1826(2): 443-457.
- Du J, Martin S, Levine M, Wagner B, Buettner G, Wang S, Taghiyev A, Du C, Knudson C, Cullen J (2010) Mechanisms Of Ascorbate-Induced Cytotoxicity In Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*; 16(2): 509-520.
- Eastmond DA, Hartwig A, Anderson D, Anwar WA, Cimino MC, Dobrev I, Douglas GR, Nohmi T, Phillips DH, Vickers C (2009) Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis*; 24(4): 341-349.
- EPA, Environmental Protection Agency (1998) Integrated Risk information System (IRIS) on Chromium VI. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- FAO/WHO (2001) Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand.
- Fenech, M y Crott, J (2002) Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes -evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res*; 504(1-2): 131-136.
- Fiorini R, Donovan J, Rodwell D, Evans Z, Cheng G, May H, Milliken C, Markowitz J, Campbell C, Haines J, Schmidt M, Chavin K (2005) Short-term administration of (-)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl*; 11(3): 298-308.
- FDA (2000) Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. Food and Drug Administration U.S.
- Forman H, Zhang H, Rinna A (2009) Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*; 30(1-2): 1-12.
- Fuhrmanand B, Aviram M (2002) Chapter 16 Polyphenols and Flavonoids Protect LDL Against atherogenic Modifications. *Handbook of Antioxidants*. 2nd ed. New York, NY Editado por Cadenas y Packer.
- García-Rodríguez M, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M (2001) Effect of chlorophyllin on chromium

- trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res*; 496(1-2): 145-215.
- García-Rodríguez M, Serrano-Reyes G, Altamirano-Lozano M (2010) Efecto de las vitaminas (ácido ascórbico, alfa-tocoferol) y del beta-caroteno (precursor de la vitamina a) sobre el material genético. *Respn*; 9: 1071-1076.
- García-Rodríguez M, Sánchez-Nájera N, Serrano-Reyes G, Altamirano-Lozano M (2011) Efecto de los fitoquímicos incluidos en la dieta (ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, índole-3-carbinol, antraquinona y capsaicina) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el trióxido de cromo en ratones de la cepa CD-1. *Respn*; 3
- García-Rodríguez M, Serrano-Reyes G, y Altamirano-Lozano M. (2012) Comparative study *in vivo* of the genotoxic damage induced by CrO_3 and the effects of the antioxidants: ascorbic acid, alfa-tocopherol and beta-carotene. *Free Radic Biol Med*; 53(1): 2-3.
- García-Rodríguez M, Carvante-Juarez M, Altamirano-Lozano M (2013) Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-Induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. *Oxid Med Cell Longev*; (2013): 1-9.
- García-Rodríguez M, Carvante-Juárez M, Serrano-Reyes G (2013) Modulation of DNA damage by phytochemicals (chlorophyllin, ascorbic acid, and polyphenols) in CD-1mice treated with hexavalent chromium. Ed. ISANH; 53.
- García-Rodríguez M, García-Cárdenas G, Montaña-Rodríguez A, Altamirano-Lozano M (2014) Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio [I]) en ratones de la cepa CD-1: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular. *Acta Universitaria*; 24(2): 91-96.
- García-Rodríguez M, García-Cárdenas G, Montaña-Rodríguez A, Altamirano-Lozano M (2016) Modulation of hexavalent chromium-induced genotoxic damage in peripheral blood of mice by epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its relationship to the apoptotic activity. *J Toxicol Environ Health A*; 79(1): 28-38.
- Graham H (1992) Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med*; 21(3):334-350.
- Griffith O (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem*; 106(1): 207-12.
- González-Torres M, Betancourt M, Ortiz R (2000) Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*; 25(1): 3-9.
- Hakim I, Harris R, Weisgerber U (2000) Tea intake and squamous cell carcinoma of the skin: Influence of type of tea beverages. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 9(7):727-731.
- Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, Herzer, U, Kostelac D, Pelzer A, Bürkle A (2002) Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ Health Perspect*; 110(5): 797-799.
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral

- blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res*; 245(4): 245-249.
- Hayashi M, Mac Gregor J, Gatehouse D, Adler I, Blaker D, Dertinger S, Krishna G, Morita T, Ruso A, Suto S (2000) *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatment, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Env Mol Mutagen*; 35: 234-252.
- Hayashi Y, Kondo T, Zhao Q, Ogawa R, Cui Z, Feril L, Kasuya M (2004) Signal transduction of p53-independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*; 197(2): 96-106.
- Heddle J, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor J, Newell G, Salamone M (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 123(1): 61-118.
- Halliwell, Gutteridge (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edición; Oxford, U.K.
- Hengartner M (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*; 407(6805): 770-776.
- Henkler F, Brinkmann J, Luch A (2010) The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis Induced by Metals and Xenobiotics. *Cancers*; 2(2): 376-396.
- Ho C, Choi S, Siu P, Benzie I (2014) Effects of single dose and regular intake of green tea (*Camellia sinensis*) on DNA damage, DNA repair, and heme oxygenase-1 expression in a randomized controlled human supplementation study. *Mole Nutr Food Res*; 58(6): 1379-1383.
- Hodges N, Chipman J (2002) Down-regulation of the DNA-repair endonuclease 8-oxo-guanine NA glycosylase1 (hOGG1) by sodium dichromate in cultured human A549 lung carcinoma cells. *Carcinogenesis*; 23(1): 55-60.
- Hong J, Lu H, Meng X, Ryu JH, Hara Y, Yang C (2002) Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res*; 62(24): 7241-7246.
- Isbrucker R, Bausch J, Edwards J, Wolz E (2006) Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: Genotoxicity. *Food Chem Toxicol*; 44(5): 626-635.
- Jin X, Song L, Liu X, Chen M, Li Z, Cheng L, Ren H (2014) Protective Efficacy of Vitamins C and E on p,p'-DDT-Induced Cytotoxicity via the ROS-Mediated Mitochondrial Pathway and NF-κB/FasL Pathway. *PLoS One*; 9(12): 1-22.
- Jomova K, Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*; 283(2-3): 65-87.
- Jones D (2006) Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*; 8(9-10): 1865-1879.
- Kada T, Shimoi K (1987) Desmutagens and bio-antimutagens-their modes of action. *Bioessays*, 7(3): 113-116.
- Kanadzu M, Lu Y, Morimoto K (2006) Dual function of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy

- human lymphocytes. *Cancer Lett*; 241(2): 250-255.
- Kanwar J, Taskeen M, Mohammad I, Huo C, Chan T, Dou Q (2012) Recent advances on tea polyphenols. *Front Biosci*; 1(4):111-131.
- Karihtala P, Kauppila S, Puistola U, Jukkola-Vuorinen A (2011) Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. *Histopathology*; 58(6): 854-862.
- Khordad E, Fazel A, Bideskan A (2013) The Effect of Ascorbic Acid and Garlic Administration on Lead-Induced Apoptosis in Rat Offspring's Eye Retina. *Iran Biomed J*; 17(4): 206-213.
- Kim B, Cho M, Kim H (2000) Statistical analysis of in vivo rodent micronucleus assay. *Mutat Res*; 469 (2): 233-241.
- Kim M, Choi J, Yang J, Kim S, Kim J, Lee J, Kim J, Rhee S (2002) Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwaves; *Nutr Res* 22(6): 733-744.
- Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, Eichenlaub-Ritter U, Decordier I (2003) Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol Lett*; 140(1):63-74.
- Kondo K, Kurihara M, Fukuhara K (2001) Mechanism of antioxidant effect of catechins. *Methods Enzymol*; 335(1): 203-217.
- Konigsberg M (2008) Radicales libres y Estrés Oxidante. El manual moderno. México.
- Konopacka M (1998) Modifying effect of vitamins C, E, and beta-carotene against gamma-rayinduced DNA damage in mouse cells. *Mutat Res*; 417(2): 85-94.
- Krishna G, Nath J y Ong T (1986) Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in mice by vitamin C. *Cancer Res*; 46(6): 2670-2674.
- Kumar P, Kumar R, Nagpure N, Nautiyal P, Kushwaha B, Dabas A (2013) Genotoxicity and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Cyprinus carpio after *in vivo* exposure. *Drug Chem Toxicol*; 36(4): 451-460.
- Lambert J, Lee M, Diamond L, Ju J, Hong J, Bose M, Newmark H, Yang C (2006) Dose-dependent levels of epigallocatechin-3-gallate in human colon cancer cells and mouse plasma and tissues. *Drug Metab Dispos*; 34(1): 8-11.
- Lee M, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc F, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang C (2002) Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 11(10): 1025-1032.
- Lee W (2009) The Prospects of Vitamin C in Cancer Therapy. *Immune Netw*; 9(5): 147-152.
- Legeay S, Rodier M, Fillon L, Faure S, Clere N (2015) Epigallocatechin gallate: a review of its beneficial properties to prevent metabolic syndrome. *Nutrients*; 7(7): 5443-5468.
- Levine M, Rumsey S, Daruwala R, Park J, Wang Y (1999) Criteria and recommendations for vitamin C

- intake. *Jama*; 281(15): 1415-1423.
- Levine M, Wang Y, Padayatty S, Morrow J (2001) A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. *Proc Natl Acad Sci*; 98(17): 9842-9846.
- Li N, Taylor L, Mauer L (2011) Degradation kinetics of catechins in green tea powder: Effects of temperature and relative humidity. *J Agric Food Chem*; 59(11): 6082-6060.
- Lindsay D, Astley S (2002) European research on the functional effects of dietary antioxidants. *Mol Aspects Med*; 23(1-3): 1-38.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*; 4(8): 118-126.
- Maeng S, Chung H, Yu I, Kim H, Lim C, Kim K, Kim S, Ootsuyama Y, Kasai H (2003) Changes of 8-OH-dG levels in DNA and its base excision repair activity in rat lungs after inhalation exposure to hexavalent chromium. *Mutat Res*; 539(1-2): 109-116.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*; 79(5): 727-747.
- Marim R, De Gusmão A, Castanho R, Deminice R, Therezo A, Jordão A, Assis M, Taiepeiro E, Martins L (2015) Effects of vitamin C supplementation on the chronic phase of chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 57(3): 245-250.
- Marnett L (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*; 21(3): 361-370.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras J (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*; 17(6): 271-278.
- Martínez-Sámano J, Torres-Durán P, Juárez-Oropeza M (2011) El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Rev Educ Bioquím*; 30(2): 56-67.
- Martínez-Sarrasague M, Barrado D, Zubillaga M, Hager A, De Paoli T, Boccio J (2006) Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 40(1): 45-54.
- May J, Qu Z, Morrow J (2001) Mechanisms of ascorbic acid recycling in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*; 1528(2-3): 159-66.
- McCord J, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*; 244(22): 6049-6055.
- McGahon A, Martin S, Bissonnette R, Mahboubi A, Shi Y, Mogil R, Nishioka W, Green D (1995) The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *in vitro*. *Methods in Cell Biology*; 46: 153-185.
- McNaught A, Wilkinson A (1997) Compendium of Chemical Terminology, Flavonoids (isoflavonoids and neoflavonoids). *IUPAC, Blackwell Scientific*, Oxford, segunda edición.
- Mohan K, Hara Y, Abraham S, Nagini S (2005) Comparative evaluation of the chemopreventive efficacy of green and black tea polyphenols in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Clin Biochem*;

38: 879-886.

- Morel I, Lescoat G, Cillard J (1994) Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Methods Enzymol*; 234: 437-443.
- Mozdarani H, Nazari E (2009) Cytogenetic damage in preimplantation mouse embryos generated after paternal and parental g-irradiation and the influence of vitamin C. *Reproduction*; 137(1): 35-43.
- Müller W, Nüsse M, Miller B, Slavotinek A, Viaggi S, Streffer C (1996) Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutat Res*; 366(2): 163-169.
- Myers C (2012) The effects of chromium (VI) on the thioredoxin system: Implications for redox regulation. *Free Radic Biol Med*; 52(10): 2091-2107.
- Nakabeppu Y (2014) Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. *Int J Mol Sci*; 15(7): 12543-12557.
- NLM (1999) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (Base de datos en línea RTECS) National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD. 2000.
- Navarro-Aviñó J, Aguilar I, López-Moya J (2007) Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*; 16(2): 10-25.
- Nriagu J (1998) Chromium in the Natural and Human Environments. Wiley Inter-Science; 1-57.
- O'Brien T, Ceryak S, Patierno S (2003) Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res*; 533:3-36.
- OECD (1997) Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. *Guideline for Testing of Chemicals*; 474:
- OSHA (2006) Occupational exposure to hexavalent chromium: final rule. Occupational Safety and Health Administration. *Fed Regist*; 71:10099-10385.
- Ock C, Kim E, Choi D, Lee H, Hahm, K, Chung M (2012) 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World journal of gastroenterology*; 18(4): 302.
- Oro J y Donnamaría M (2006) Acción Farmacológica, Biofísicoquímica y Estructura Dinámica de la Vitamina C. *Acta Farm Bonaerense*; 25(1): 145-54.
- Padayatty S, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta S, Levine M (2003) Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J Am Coll Nutr* 22(1): 18-35.
- Patlolla A, Barnes C, Yedjou C, Velma V, Tchounwou P (2009) Oxidative Stress, DNA Damage, and Antioxidant Enzyme Activity Induced by Hexavalent Chromium in Sprague-Dawley Rats. *Environ Toxicol*; 24(1): 66-73.
- Pavlovic V, Cekic S, Kamenov B, Ciric M, Krtinic D (2015) The Effect of Ascorbic Acid on Mancozeb-Induced Toxicity in Rat Thymocytes. *Folia Biol*; 61(3):116-23.
- Pérez M (2006) Cromatos de México: "Tumba tóxica". Día V. Cultura a favor de la Tierra; 1(11): 34-36.
- Potenza M, Marasciulo F, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim J, Quon M, Montagnani

- M (2007) EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 292(5): 1378-1387.
- Rahman K (2007) Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*; 2(2): 219-236.
- Ralhan R, Kaur J (2007) Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opin Ther Pat*; 17(19):1061-1075.
- Ramos M, Batista C, Gómez B, Zamora A (2006) Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Inv Salud*; 8(1): 7-15.
- Ran Z, Chen C, Xiao S (2008) Epigallocatechin-3-gallate ameliorates rats colitis induced by acetic acid. *Biomed Pharmacother*; 62(3): 189-196.
- Rizzo A, Berselli P, Zava S, Montorfano G, Negroni M, Corsetto P, Berra B (2010) Bio Farms for Nutraceuticals. Capítulo: Endogenous antioxidants and radical scavengers, US: 52-67.
- Roy M, Chakrabarty S, Sinha D, Bhattacharya R, Siddiqi M (2003) Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutat Res*; 523-524:33-41.
- Sakhila K, Stanley J, Lee J, Stephen S, Arosh J, Hoyer P, Burghardt R (2011) Hexavalent chromium-induced apoptosis of granulosa cells involves selective sub-cellular translocation of Bcl-2 members, ERK1/2 and p53. *Toxicol Appl Pharmacol*; 251(3): 253-266.
- Sancar A, Lindsey-Boltz L, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*; 73: 39-85.
- Sang S, Lee M, Hou Z, Ho C, Yang C (2005) Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J Agric Food Chem*; 53(24): 9478-9484.
- Santos I, Tomé A, Saldanha G, Ferreira P, Militão G, Freitas R (2009) Oxidative stress in the hippocampus during experimental seizures can be ameliorated with the antioxidant ascorbic acid. *Oxid Med Cell Longev*; 2(4): 214-21.
- SEMARNAT (2012). Libro blanco. Seguimiento a las acciones de contención del riesgo, preparación del sitio y remediación del predio (ex fábrica de cromatos de México). México, D.F.
- Sheng R, Gu Z, Xie M, Zhou W, Guo C (2007) EGCG inhibits cardiomyocyte apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy and protects cardiomyocytes from oxidative stress in rats. *Acta Pharmacol Sin*; 28(2): 191-201.
- Shi X, Dalal N (1992) The role of superoxide radical in chromium (VI)- generated hydroxyl radical: The Cr (VI) Haber-Weiss cycle. *Arch Biochem Biophys*; 292(1): 323-327.
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman A (1992) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*; 349, 431-434.
- Silva-Nunes M, Da-Silva-Nunes R, Silva V, Moysés J, Da-Silva J (2013) Use of buccal micronucleus assay to determine mutagenicity induced by amfepramone in humans and the protective effects of vitamin C.

- Toxicol Environ Health A*; 76(19): 1121-1128.
- Singh B, Chatterjee A, Ronghe A, Bhat N, Bhat H (2013) Antioxidant-mediated up-regulation of OGG1 via NRF2 induction is associated with inhibition of oxidative DNA damage in estrogen-induced breast cancer. *BMC Cancer*; 13(1): 253.
- Singh T, Katiyar S (2013) Green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, induces toxicity in human skin cancer cells by targeting β -catenin signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*; 273(2): 418-424.
- Skrzydłowska E, Ostrowska J, Stankiewicz A, Farbiszewski R (2002) Green tea as a potent antioxidant in alcohol intoxication. *Addict Biol*; 7: 307-314.
- Słoczyńska K, Powroźnik B, Pękala E, Waszkielewicz A (2014) Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genet*; 55(2): 273-285.
- Standeven A, Wetterhahn K (1991) Possible role of glutathione in chromium (VI) metabolism and toxicity in rats. *Pharmacol Toxicol*; 68(6): 469-76.
- Surh Y (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*; 3: 768-780.
- Surh Y, Ferguson L (2003) Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential-highlights of a symposium. *Mutat Res*; 523-524: 1-8.
- Tasao R (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*; 2(12): 1231-1246.
- Taylor R, Cullen S, Martin S (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9(3): 231-241.
- Teaf C, Middendorf P (2000) Mutagenesis and Genetic Toxicology. Principle of Toxicology. 2nd edition. New York, USA: 239-264.
- Tian Y, Hsieh C, Hsieh Y, Chen Y, Peng Y, Hsieh P (2012) α -lipoico ácido impide portal leve inflamación hepática inducida por endotoxemia y disfunción de las células β . *Eur J Clin Invest*; 42: 637-648.
- Uhlir S, Wendel A (1992) The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sci*; 51:1083-1094.
- USDA (2007) Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Release 2.1. U.S. departamento f Agriculture.
- Valdiglesias V, Pasaro E, Méndez J, Laffon B (2010) Evaluación *in vitro* de selenio genotóxico, citotóxica, y los efectos de protección: una revisión. *Arch Toxicology*; 84:337-351.
- Valko M, Morris H, Cronin M (2005) Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr Med Chem*; 12(10) 1161-1208.
- Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M y Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induce cancer. *Chem Biol Interact*; 160(1): 1-40.
- Von Ledebur, Schmid W (1973) The micronucleus test methodological aspects. *Mutat Res*; 19(1): 109-117.
- Ward J (1985) Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res*; 104: 103-111.
- Wattenberg L, Lam L (1981) Inhibition of chemical carcinogenesis by phenols, coumarins, aromatic isothiocyanates, flavones, and indoles. In *Inhibition of Tumor Induction and Development*. Springer US: 1-22.

- Weydert C, Cullen J (2010) Measurement of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Cultured Cells and Tissue. *Nat Protoc*; 5(1): 51-66.
- White E (1996) Life, death and pursuit of apoptosis. *Genes Dev*; 10(1): 1-5.
- Wong V, Armknecht S, Zhitkovich A (2012) Metabolism of Cr (VI) by ascorbate but not glutathione is a low oxidant-generating process. *J Trace Elem Med Biol*; 26(2-3): 192-196.
- Wu C, Wei G (2002) Tea as a functional food for oral health. *Nutrition*; 18(5):443-444.
- Wu F, Sun H, Kluz T, Clancy H, Kiok K, Costa M (2012) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol*; 258(2): 166-175.
- Wu L, Chiou C, Chang P, Wu J (2004) Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*; 339(1-2): 1-9.
- Xiao F, Chen D, Luo L, Zhong X, Xie Y, Zou L, Zeng M, Guan L, Zhong C (2013) Time-order effects of vitamin C on hexavalent chromium-induced mitochondrial damage and DNA-protein crosslinks in cultured rat peripheral blood lymphocytes. *Mol Med Rep*; 8(1): 53-60.
- Zangeneh M, Mozdarani H, Mahmoudzadeh A (2015) Potent radioprotective effects of combined regimens of famotidine and vitamin C against radiation-induced micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes. *Radiat Environ Biophys*; 54(2): 175-181.
- Zhu W, Xu J, Ge Y, Cao H, Ge X, Luo J, Cao J (2014) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects skin cells from ionizing radiation via heme oxygenase-1 (HO-1) overexpression. *J Radiat Res*; 55(6): 1056-1065.
- Zou P, Song J, Jiang B, Pei F, Chen B, Yang X, Hu Z (2014) Epigallocatechin-3-gallate protects against cisplatin nephrotoxicity by inhibiting the apoptosis in mouse. *Int J Clin Exp Pathol*; 7(8): 4607- 4616.

XI. ANEXOS

Los resultados obtenidos en este estudio se publicaron de manera parcial o total en:

- i. *“Free Radical Biology and Medicine”* (88) Parte B, Suplemento del SFRBM, 2015, Boston, MA, USA, 2015.

Título: “Effect of Ascorbic Acid and (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on Oxidative Damage Induced by Chromium (VI) in Hsd-ICR Mice”.

Autores: García-Rodríguez, M.C.; Serrano-Reyes, G.; Retana-Ugalde, R. y Altamirano-Lozano, M.

- ii. Capítulo del Libro: *Tendencias de Investigación en Ciencias de la Salud*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Septiembre, 2015.

Título: Efecto de los compuestos fitoquímicos (ácido ascórbico y (-) epigallocatequina-3-galato) sobre el daño genotóxico, la actividad apoptóticas y los niveles de antioxidantes totales en ratones CD-1 expuestos a cromo hexavalente.

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

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

- i. **Evento:** “*The Society for Redox Biology and Medicine’s Annual Meeting (SFRBM 2015)*”, Society for Redox Biology and Medicine. Boston, USA; celebrado del 18 al 21 de Noviembre de 2015.

Título: Effect of Ascorbic Acid and (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on Oxidative Damage Induced by Chromium (VI) in Hsd-ICR Mice

Autores: García-Rodríguez, M.C.; Serrano-Reyes, G.; Retana-Ugalde, R. y Altamirano-Lozano, M.

- ii. **Evento:** *Congreso Internacional de Ciencias Básicas y Aplicadas (COICIBA 2015)*, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Ciudad Valles, San Luis Potosí; celebrado del 25 al 27 de febrero del 2015.

Título: Efecto de los compuestos fitoquímicos (ácido ascórbico y (-) epigallocatequina-3-galato) sobre el daño genotóxico, la actividad apoptóticas y los niveles de antioxidantes totales en ratones CD-1 expuestos a cromo hexavalente.

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

- iii. **Evento:** *Quinto Congreso de Alumnos de Posgrado*, Coordinación de Estudios de Posgrado, UNA, México D.F.; celebrado de 23 al 25 de marzo de 2015.

Título: Efecto del ácido ascórbico y de la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre la inducción de micronúcleos y de la actividad apoptótica en ratones CD-1 tratadas con trióxido de cromo.

Autores: Serrano-Reyes, G

- iv. **Evento:** *XIX Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud*, Universidad Autónoma de México, Unidad Iztapalapa, Noviembre 26, 27 y 28 del 2014

Título: Efecto del Ácido Ascórbico sobre la inducción de micronúcleos y de micronúcleos y de apoptosis en ratones CD-1 tratados con metales pesados (pentóxido de vanadio y trióxido de cromo).

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



Volume 87, Supplement 1, October 2015
Supplement to Free Radical Biology and Medicine

ISSN 0891-5849



FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE

An Official Journal of the
Society for Redox Biology
and Medicine



An Official Journal of the
Society for Free Radical
Research-Europe



An Affiliate Journal of
the International Society
for Free Radical Research



Founding Editors:
Kelvin J. A. Davies, William A. Pryor

SFRBM's 22nd Annual Meeting
Program and Abstracts
November 18 – 21, 2015
Westin Boston Waterfront
Boston, MA, USA

207

Autophagy as an Essential Antioxidant Pathway in Neuronal Oxidative and Bioenergetic Stress

Mathew Redmann¹, Wilaya Wan¹, Balu Chacko², Victor Darley-Usmar¹, and Jianhua Zhang¹
¹University of Alabama at Birmingham, USA

Protein damage leading to depletion of antioxidants and perturbation of mitochondrial dynamics is a key aspect of chronic disease and direct therapeutic intervention with radical scavengers has had limited success in clinical trials. We propose this is due to their inability to reverse established oxidative damage to proteins and organelles and their propensity to perturb physiological redox signaling. This concept suggests that autophagy may provide cytoprotection by removing damaged or dysfunctional proteins and organelles where conventional antioxidants fall short. We tested this hypothesis in neurons exposed to α -synuclein (aSyn) fibrils. aSyn aggregation and mitochondrial dysfunction are the principle hallmarks of Parkinson's disease, a common neurodegenerative disorder characterized by severe neuron loss. Importantly, aSyn can be taken up by neurons, seed further intracellular aggregation, and amplify neuronal damage elsewhere. We found that aSyn fibrils caused significant dose dependent accumulation of phosphorylated and insoluble aSyn, and subsequent cell death. And while aSyn did not alter upstream steps of autophagy, we found an increase in MitoTracker and LysoTracker colocalization, suggesting a blockade of mitochondrial turnover. To determine the impact of enhanced autophagy on aSyn fibril-induced intracellular aggregation and cell death, we tested the effects of trehalose, an mTOR independent autophagy inducer and TFEB activator that leads to autophagosome and lysosome biogenesis. Trehalose alone significantly induced autophagy, indicated by flux analyses, as well as an increase in lysosomal number over a 14 day period. In the presence of trehalose, aSyn fibril induced neuron death was attenuated, and was associated with increased mitophagy, even though aSyn aggregates still remained. These studies indicate that trehalose may provide a mechanism in attenuating aSyn fibril-induced toxicity through modulating lysosomal biogenesis and mitochondrial turnover rather than through the removal of aSyn aggregates.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.251

208

Effect of Ascorbic Acid and (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on Oxidative Damage Induced by Chromium (VI) in Hsd-ICR Mice

Maria del Carmen García-Rodríguez¹, Gabriela Serrano-Reyes¹, Rafael Retana-Ugaldé², and Mario Almaraz-Locena¹
¹FES-Zaragoza, UNAM, Mexico

Antioxidants such as Ascorbic acid (AA) and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) have been associated with beneficial effects against the development of diseases related to oxidative stress. These effects include the capture of free radicals and reactive oxygen species (ROS), the regulation of cell growth and the induction of detoxifying enzymes. On the other hand, hexavalent chromium [Cr (VI)] generates ROS during its reduction to Cr (III), leading to DNA damage. In this study the micronucleus (MN) frequency, the apoptotic activity, the 8-OHdG and antioxidant (GSH and total antioxidant) levels were evaluated in peripheral blood of mice treated with AA, EGCG and Cr (VI). Groups of five

Hsd-ICR mice were divided and treated as follows: i) only vehicle, ii) AA (100 mg/kg intraperitoneal) or EGCG (10 mg/kg by gavage), iii) 20 mg/kg of CrO₃, iv) AA or EGCG in addition to CrO₃. Evaluations were performed at 0, 24, 48 and 72 h after treatments. The treatment with CrO₃ showed an increase in MN, non-viable cells and GSH levels and a decrease in the total levels of antioxidant. The treatments with AA and EGCG prior to administration of CrO₃ decreased MN frequencies and non-viable cells induced by CrO₃. Apoptotic cells increased in all treatments suggesting that this may play a role in the elimination of micronucleated cells. Moreover, it was observed a decrease in the levels of 8-OHdG in CrO₃ group and an increase in the groups treated with AA and EGCG. The 8-OHdG in blood is a marker repairer of DNA damage, suggesting that in the CrO₃ group it has been altered. Our findings show a protective effect of EGCG and AA on genotoxic and cytotoxic damage induced by Cr (VI) and that it could be related with its ROS-suppression properties of oxidative stress generated during the reduction of Cr (VI) to Cr (III).

Financial support was obtained from DGAPA-UNAM IN217712.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.252

209

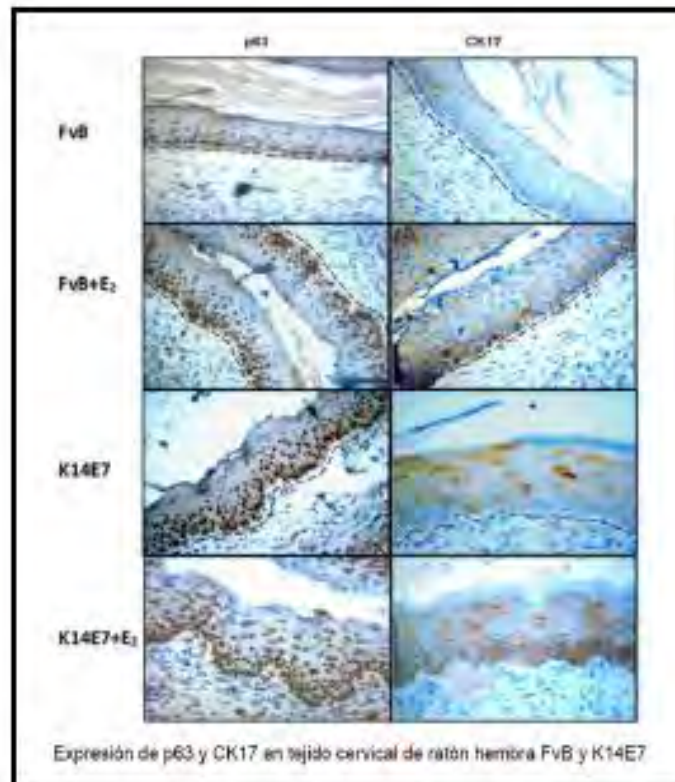
Resveratrol Prevents Oxidative Damage in Human Skin 3D Models: Nrf2 and Glutathione Implication?

Jérémie Sauer¹, Jean Eilstein¹, Christophe Jouis², Guillaume Lévesque¹, and Laurent Marrot¹
¹L'Oréal R&D, France, ²L'Oréal R&D, France, Metropolitan

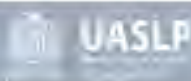
Skin is directly exposed to environmental insults such as UV or pollutants inducing oxidative stress. In adverse situations, natural compounds such as polyphenols can be used in order to temporarily increase endogenous defenses such as Nrf2 pathway connected to glutathione (GSH) tripeptide antioxidant biosynthesis. Here, full thickness reconstructed human skin models (3D models) were treated with resveratrol (RSV, 20 μ M and 100 μ M for 16 hours in culture medium). The results showed that some known Nrf2 downstream genes involved in GSH metabolism such as glutamyl-cysteinyl-ligase GCL (catalytic: GCLM, and modified: GCLM subunits) and SLC7A11 (XC⁻: cystine/glutamate antiporter) were up-regulated. GSH epidermal content detected by UHPLC/MS increased in a range of 20% to 50% in line with the RSV concentrations used. Moreover, experiments where Nrf2 expression was silenced in normal human keratinocytes (NHK) demonstrated that Nrf2 is involved in the regulation of GSH synthesis. Finally, epidermal cells of 3D models were protected from toxic effects of cumene hydroperoxide (CHP) through RSV-induced GSH neosynthesis. Indeed, 3D models pretreated by RSV+ Buthionine Sulfoximide (BSO, GCLC inhibitor) were not protected from the CHP toxic effects compared to RSV-pretreated 3D models. These data demonstrate that exogenous stimulation of skin defenses represents a pertinent approach for skin care.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.253

Tendencias de Investigación en Ciencias de la Salud



Dr. Alejandro Hernández Morales
Dr. Jesús Ramón Castillo Hernández



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
GENÉTICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

Efecto de los compuestos fitoquímicos (ácido ascórbico y (-)-epigallocatequina-3-galato) sobre el daño genotóxico, la actividad apoptótica y los niveles de antioxidantes totales en ratones CD-1 expuestos a cromo hexavalente

Gabriela Serrano-Reyes*, Mario Altamirano-Lozano*, Raquel Retana-Ugalde*, María del Carmen García-Rodríguez*

*Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), FES-Zaragoza, UNAM.

†Unidad de Investigación en Gerontología, FES-Zaragoza, UNAM.

Resumen

Se estudió el efecto del ácido ascórbico (aa) y de la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) sobre la cinética de micronúcleos (MN), la actividad apoptótica, la viabilidad celular y los niveles de antioxidantes totales en sangre periférica de ratones expuestos a compuestos de cromo hexavalente [Cr (VI)]. Grupos de cinco ratones CD-1 fueron divididos y tratados de la siguiente forma: a) Testigo, solo el vehículo; b) Fitoquímicos, aa o EGCG (100 o 10 mg/kg respectivamente); c) Cr (VI), 20 mg/kg de CrO₃ y d) Combinados, ambos tratamientos fitoquímicos y Cr (VI). Las evaluaciones se realizaron a las 0, 24, 48 y 72 h después de los tratamientos. Los resultados mostraron un incremento significativo de MN y células no-viables, así como una disminución de los niveles de antioxidantes totales con el tratamiento de CrO₃. La administración previa del aa y de la EGCG disminuyó el daño genotóxico y citotóxico inducido por CrO₃. Sin embargo, las células apoptóticas se incrementaron en todos los tratamientos, lo que sugiere que la apoptosis pudiera jugar un papel importante en la eliminación de las células micronucleadas. Nuestros hallazgos muestran un efecto protector del aa y de la EGCG contra el daño genotóxico y citotóxico inducido por compuestos metálicos del Cr (VI), y que la actividad antioxidante de estos fitoquímicos podría presentar un efecto sobre el estrés oxidante generado durante la reducción de Cr [VI] a Cr [III].

Abstract

We studied the effects of ascorbic acid (aa) and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the kinetics of micronucleus (MN), the apoptotic activity, the cell viability and the total antioxidant levels in the peripheral blood of mice exposed to compounds of hexavalent chromium [Cr (VI)]. Groups of five CD-1 mice were divided and treated as follows: a) Control, only vehicle; b) Phytochemicals, aa or EGCG (100 and 10 mg/kg respectively); c) Cr (VI), 20 mg/kg of CrO₃ and d) Combination, both treatments, phytochemical-Cr (VI). The evaluations were performed at 0, 24, 48 and 72 h after treatments. The results showed a significant increase in MN and non-viable cells, as well as a decrease in the levels of the total antioxidants treated with CrO₃. The previous administration of aa and EGCG reduced the genotoxic and cytotoxic damage induced by CrO₃. Apoptotic cells increased with all treatments suggesting that this may play a role in the elimination of micronucleated cells. Our findings demonstrates a protective effect of EGCG and aa against the genotoxic and cytotoxic damage induced by compounds of Cr (VI), and also suggests that these antioxidant activities of the phytochemicals might have an impact on the oxidative stress generated during the reduction of Cr [VI] to Cr [III].

Palabras clave: Fitoquímicos, ácido ascórbico, cromo hexavalente, micronúcleos, apoptosis.

logo congreso

Keywords: Phytochemicals, antioxidants, hexavalent chromium, micronucleus, apoptosis.

Correspondencia

Dra. María del Carmen García-Rodríguez
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología
Ambiental, Lab. 2 Planta Alta UMIEZ, Campus II,
FES-Zaragoza, UNAM, PO Box 9-020, C.P. 15000,
D.F., México. carmen.garcia@unam.mx

FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Introducción

La exposición a agentes mutágenos así como el estilo de vida y deficiencias nutricionales, incrementan la probabilidad de desarrollar enfermedades relacionadas con el daño al ADN como lo son algunos tipos de cáncer [1]. En contra parte, se ha mostrado en diferentes estudios que algunos componentes de las plantas pueden tener un efecto protector de los daños inducidos por agentes mutágenos y de los procesos carcinogénicos [2]. Compuestos fitoquímicos como el ácido ascórbico (aa) y la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) son capaces de inhibir el estrés oxidante, proponiéndose no solo como mecanismo la captura y prevención de la formación de radicales libres (RL), sino también la reparación de las lesiones que ocasionan y la activación de enzimas antioxidantes endógenas [3]. También a estos compuestos fitoquímicos se le ha relacionado con la disminución de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer, además de que presentan propiedades anti-inflamatorias, anti-alérgicas, inmuno-moduladoras, antibacterianas y neuroprotectoras [4,5].

El ácido ascórbico se encuentra principalmente en los cítricos [6]; mientras que los polifenoles en el vino tinto, la cerveza e infusiones del té verde (*Camellia sinensis*). En particular el té verde, además del aa contiene por lo menos 12 derivados de polifenoles que son los que le confieren su principal potencial antioxidante [7].

Por otra parte, a los compuestos metálicos con actividad cancerígena tales como los del cromo hexavalente Cr (VI) también se les ha relacionado con el daño genotóxico, ya que durante la reducción intracelular de Cr (VI) a Cr (III) se generan especies reactivas de oxígeno (ERO's) y RL que inducen daño al ADN [8]. De ahí que en el presente trabajo se estudió el efecto de compuestos fitoquímicos (aa y EGCG) sobre el daño genotóxico evaluado mediante las frecuencias de micronúcleos (MN) y la actividad apoptótica, además de cuantificar los niveles de antioxidantes totales en sangre periférica de ratones expuestos a compuestos de Cr (VI).

Metodología

Animales

Se emplearon ratones macho de la cepa CD-1, de 2 a 3 meses de edad (35-40 g) los cuales fueron obtenidos del bioterio Harlan de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales fueron aclimatados durante dos semanas en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" (FES-Z) de la UNAM. Se les permitió libre acceso tanto al agua como al alimento (NUTRI-CUBOS, Purina®). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y circulación de aire, así como de periodos de luz-oscuridad de 12-12 horas.

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo se establecieron de acuerdo con los lineamientos de la OCDE (474), de la "Food and



UASLP

TÉRMINOS DE INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS DE LA SALUD

Drug Administration" (FDA), de la "Environmental Protection Agency" (EPA), del "Collaborative Study Group for the Micronucleus Test" (CSGMT) y del "Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Society of Japan" (JEMS.MMS) para ensayos de micronúcleos a corto plazo en sangre periférica de ratón [9-11]. El Comité de Bioética de la FES-Z de la UNAM aprobó los protocolos experimentales utilizados en este estudio.

Reactivos

Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Naranja de Acrídina [CAS No. 10127-02-3]; Bromuro de Etidio [CAS No. 1239-45-8]; aa [50-81-7]; EGCG [989-51-5]; CrO_3 [CAS No. 1333-82-0]; Kit comercial para antioxidantes (No. Catálogo CS0790).

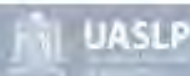
Diseño experimental

Los compuestos fitoquímicos (aa y EGCG), así como el compuesto metálico (CrO_3) se prepararon por separado mediante su disolución en agua destilada estéril, y se administraron inmediatamente en un volumen no mayor a 0.25 ml. Se conformaron grupos al azar de cinco ratones que fueron tratados de la siguiente forma: a) *Grupo testigo*, se les administró únicamente el vehículo, b) *Grupos de compuestos fitoquímicos*, se les administró aa (100 mg/kg por vía i.p.) o EGCG (10 mg/kg vía oral (sonda intragástrica)), c) *Grupo Cr (VI)*, se les aplicó 20 mg/kg de CrO_3 , y d) *Grupos*

combinados fitoquímicos-Cr (VI), a los que se les administró primeramente el aa o EGCG y cuatro horas después se les aplicó el CrO_3 .

Para las evaluaciones de MN se tomaron muestras de sangre periférica (10 μl) de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 h después de los tratamientos. Las muestras se colocaron directamente sobre laminillas pre-tratadas con naranja de acridina (NA) preparadas de acuerdo con la técnica establecida por Hayashi, et al. [12]. Las preparaciones se mantuvieron en la oscuridad a una temperatura aproximada de 4° C hasta su análisis. Las evaluaciones se realizaron mediante la identificación de PCE, NCE, y MN bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot-2) con una excitación azul (480 nm) y un filtro de barrera (515-530 nm). El daño genotóxico fue cuantificado mediante el análisis de los MN en 2000 EPC por ratón. Mientras que el daño citotóxico se basó en el análisis de 1000 eritrocitos totales por ratón, en los que se estableció la relación EPC/ENC.

Las evaluaciones de la viabilidad, apoptosis y necrosis se realizaron con base en la técnica descrita por García-Rodríguez, et al. (2013) [13] en la que se emplea una tinción diferencial con naranja de acridina/bromuro de etidio. Las muestras de sangre periférica (100 μl) se obtuvieron de la vena caudal a las 48 h después de la administración de los tratamientos. Las evaluaciones se realizaron mediante la observación de las muestras bajo un microscopio de fluorescencia con una emisión de luz azul y un filtro de luz amarilla (Olympus

TENDENCIA INVESTIGACIÓN
DECENTAR LA SALUD

Fluorod). Se evaluaron 200 células nucleadas por ratón; para la evaluación de la viabilidad se contabilizaron las células viables y no viables, mientras que para el análisis de apoptosis se cuantificaron 200 células en las cuales se identificaron las células apoptóticas viables y no viables de acuerdo a la tinción y estructura de las mismas [13].

La determinación de antioxidantes totales se realizó mediante el kit comercial para antioxidantes (Sigma Chemicals®) basado en el método ABTS propuesto por Miller et al. (1993) [14]. Las muestras se tomaron a las 48 horas de la vena caudal (20 µl). Posteriormente se centrifugaron para obtener el suero, el cual se mezcló con el 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) (ABTS) previamente incubado con peróxido de hidrógeno. Transcurridos cinco minutos se leyó la absorbancia a 405 nm en un Lector de microplacas Benchmark (Bio-Rad®). El valor de antioxidantes totales de las muestras analizadas se expresa como un equivalente de la concentración milimolar (mM) de solución Trolox.

Análisis estadístico

A los datos obtenidos de MN y de antioxidantes totales se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba Tukey, mediante el paquete estadístico SPSS/PC V18TM. Los datos obtenidos de las frecuencias de viabilidad celular, apoptosis y necrosis fueron

analizados mediante la prueba de chi-cuadrada utilizando el paquete Statistica/PC V 6.0TM [15, 16]. Para todos los análisis se consideró una $p < 0.05$ como significativo.

Resultados

En la tabla 1 se muestran los promedios de los MN evaluados de las 0 a las 72 horas cuando se administraron los tratamientos de los compuestos fitoquímicos, del Cr (VI) y de la combinación de ambos. En los resultados se observa que la administración por separado de los compuestos fitoquímicos (aa y EGCG) no incrementan los promedios de MN, sino por el contrario hay una disminución en comparación con los MN evaluados a la hora 0 (cuando aún no se administraban los tratamientos). Por el contrario, en el grupo tratado con el CrO₃, se observó un incremento en los promedios de MN a las 24 y 48 horas que resultaron estadísticamente significativos al compararse con el grupo testigo y con su propia hora 0. Cuando se combinaron los tratamientos de los fitoquímicos y el Cr (VI) se observó una disminución de los promedios de MN a las horas 24 y 48 con respecto al grupo tratado solo con CrO₃. La mayor disminución se observó con el tratamiento del aa.

La evaluación del daño citotóxico se realizó mediante la técnica descrita por García-Rodríguez, et al. [13] para viabilidad, esto debido a que al cuantificar los EPC con respecto a los ENC se presentó una alta variabilidad y no hubo



TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS BÁSICAS

diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados.

Tabla 1 Frecuencia de MN en ratones CD-1 tratados con CrO_3 , ácido ascórbico o EGCG ($\bar{X} \pm \text{d.e.}$)

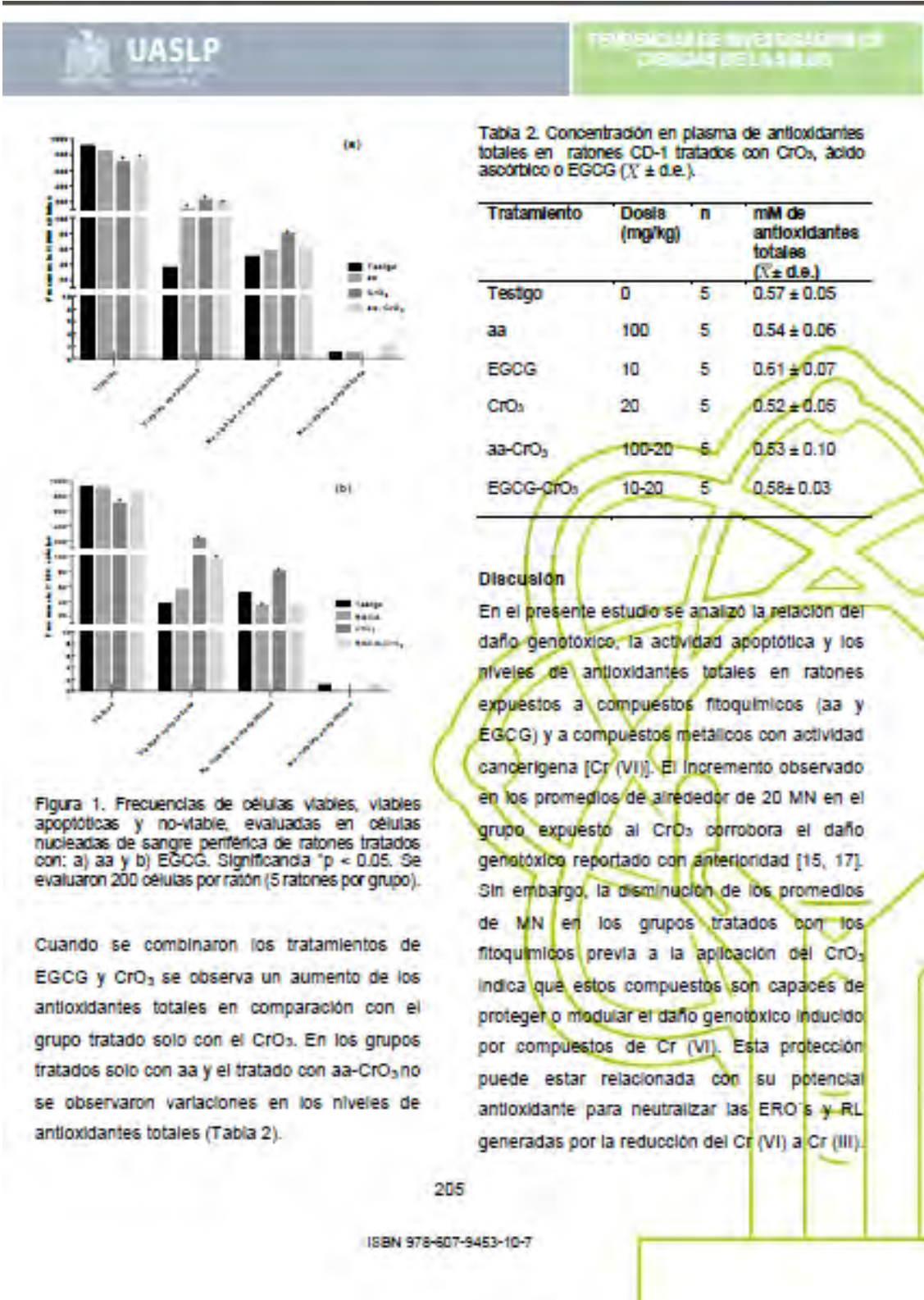
Grupo	Dosis (mg/kg)	n	Hora	MN/1000 cél. ($\bar{X} \pm \text{d.e.}$)
Testigo	0	5	0	1.60 ± 1.14
			24	1.60 ± 1.48
			48	1.60 ± 1.14
			72	1.60 ± 1.48
aa	100	5	0	3.00 ± 1.87
			24	1.20 ± 1.30
			48	2.20 ± 1.09
			72	1.60 ± 1.14
EGCG	10	5	0	2.40 ± 1.14
			24	1.60 ± 1.14
			48	1.80 ± 0.83
			72	1.60 ± 0.89
CrO_3	20	5	0	2.80 ± 1.30
			24	$7.40 \pm 2.60^{\text{A}}$
			48	$23.0 \pm 5.95^{\text{A,B}}$
			72	2.40 ± 0.54
aa- CrO_3	100-20	5	0	1.60 ± 0.89
			24	5.20 ± 3.03
			48	$11.2 \pm 5.06^{\text{A,B,C}}$
			72	2.60 ± 1.14
EGCG- CrO_3	10-20	5	0	1.60 ± 1.51
			24	$8.40 \pm 1.94^{\text{A,B}}$
			48	$15.6 \pm 4.09^{\text{A,B,C}}$
			72	3.60 ± 1.67

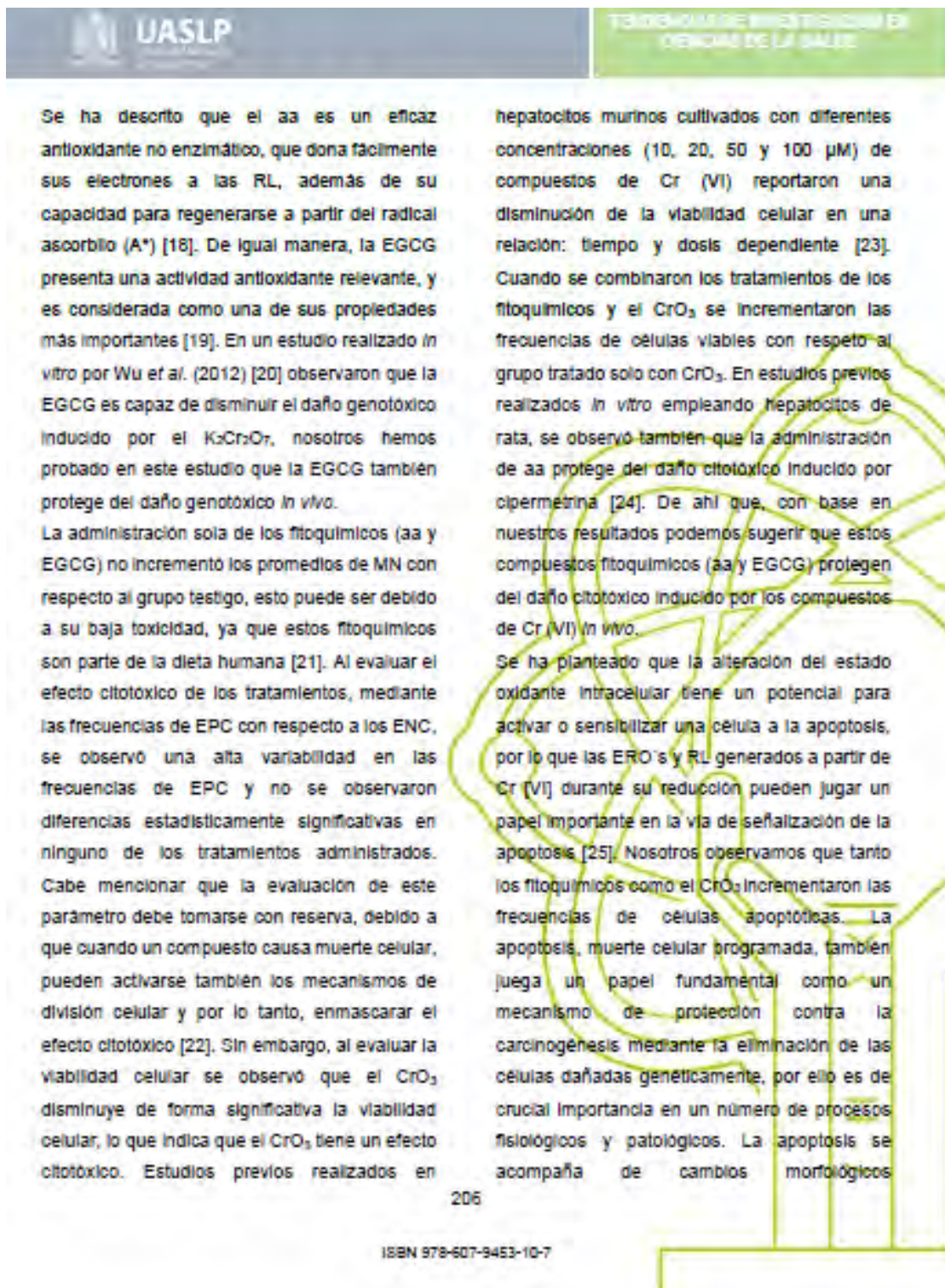
En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos del análisis de la viabilidad celular. Se observa que la administración sola de los tratamientos con los fitoquímicos no presenta efectos sobre las frecuencias de células viables.

Sin embargo, la aplicación del CrO_3 disminuye significativamente las células viables al compararse con el grupo testigo. Cuando se administraron los fitoquímicos previo al tratamiento del CrO_3 se observa un incremento de las células viables con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 , el cual es mayor en el grupo tratado con EGCG.

La apoptosis se evaluó directamente en células nucleadas de sangre periférica obtenida a las 48 h después de los tratamientos. En la figura 1 se observa que las células apoptóticas se incrementaron de forma significativa tanto en los grupos tratados con los fitoquímicos, como en el tratado con el Cr (VI) (Figura 1).

En la tabla 2 se muestran las concentraciones de antioxidantes totales evaluadas a las 48 horas después de los tratamientos. Se observa que los niveles de antioxidantes totales se disminuyen ligeramente en el grupo tratado con CrO_3 , en comparación con el grupo testigo, sin embargo esta disminución no resulta estadísticamente significativa. Por el contrario, en el grupo tratado con la EGCG los niveles de antioxidantes totales se incrementan en comparación con el grupo testigo.



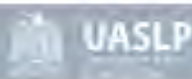


Se ha descrito que el aa es un eficaz antioxidante no enzimático, que dona fácilmente sus electrones a las RL, además de su capacidad para regenerarse a partir del radical ascorbilo ($A^{\bullet}$) [18]. De igual manera, la EGCG presenta una actividad antioxidante relevante, y es considerada como una de sus propiedades más importantes [19]. En un estudio realizado *in vitro* por Wu et al. (2012) [20] observaron que la EGCG es capaz de disminuir el daño genotóxico inducido por el $K_2Cr_2O_7$, nosotros hemos probado en este estudio que la EGCG también protege del daño genotóxico *in vivo*.

La administración sola de los fitoquímicos (aa y EGCG) no incrementó los promedios de MN con respecto al grupo testigo, esto puede ser debido a su baja toxicidad, ya que estos fitoquímicos son parte de la dieta humana [21]. Al evaluar el efecto citotóxico de los tratamientos, mediante las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, se observó una alta variabilidad en las frecuencias de EPC y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos administrados. Cabe mencionar que la evaluación de este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto, enmascarar el efecto citotóxico [22]. Sin embargo, al evaluar la viabilidad celular se observó que el CrO_3 disminuye de forma significativa la viabilidad celular, lo que indica que el CrO_3 tiene un efecto citotóxico. Estudios previos realizados en

hepatocitos murinos cultivados con diferentes concentraciones (10, 20, 50 y 100 μM) de compuestos de Cr (VI) reportaron una disminución de la viabilidad celular en una relación: tiempo y dosis dependiente [23]. Cuando se combinaron los tratamientos de los fitoquímicos y el CrO_3 se incrementaron las frecuencias de células viables con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 . En estudios previos realizados *in vitro* empleando hepatocitos de rata, se observó también que la administración de aa protege del daño citotóxico inducido por cipermetrina [24]. De ahí que, con base en nuestros resultados podemos sugerir que estos compuestos fitoquímicos (aa y EGCG) protegen del daño citotóxico inducido por los compuestos de Cr (VI) *in vivo*.

Se ha planteado que la alteración del estado oxidante intracelular tiene un potencial para activar o sensibilizar una célula a la apoptosis, por lo que las ERO's y RL generados a partir de Cr (VI) durante su reducción pueden jugar un papel importante en la vía de señalización de la apoptosis [25]. Nosotros observamos que tanto los fitoquímicos como el CrO_3 incrementaron las frecuencias de células apoptóticas. La apoptosis, muerte celular programada, también juega un papel fundamental como un mecanismo de protección contra la carcinogénesis mediante la eliminación de las células dañadas genéticamente, por ello es de crucial importancia en un número de procesos fisiológicos y patológicos. La apoptosis se acompaña de cambios morfológicos

TENDENCIAS DE INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS DE LA SALUD

característicos, que incluyen contracción citoplasmática, formación de ampollas en la membrana plasmática, condensación o fragmentación de los núcleos y extensa degradación del ADN cromosómico [26, 27 en prensa], de ahí se sugiere que la apoptosis inducida por los compuestos fitoquímicos pudiera eliminar las células micronucleadas durante el proceso de eritropoyesis y por ello se observó una menor inducción de MN en los organismos tratados con estos compuestos.

Por otra parte, se ha descrito que algunos antioxidantes exógenos tienen la capacidad de activar el sistema antioxidante endógeno (enzimas antioxidantes) [3], de ahí que en el presente estudio también se midieron los niveles de los antioxidantes totales (ver Tabla 2). Al cuantificar los antioxidantes totales se observó una ligera disminución de estos en el grupo tratado con CrO_3 , en comparación con el grupo testigo, aunque esta disminución no resulta significativa, es posible que contribuya con el de estado de estrés oxidante generado por el Cr (VI). En estudios previos realizados en ratas a las que se les administró 50 mg/kg de Cr (VI), se observó una disminución en la actividad de las enzimas glutatión (GSH), peroxidasa y catalasa con respecto a sus niveles basales [28]. Por el contrario, en el grupo tratado con la EGCG los niveles de antioxidantes totales se incrementaron en comparación con el grupo testigo, al igual que cuando se combinaron los tratamientos (EGCG- CrO_3). En estudios previos se ha descrito que el consumo de 300 ml de té

verde en ratones, indujo un aumento de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GSH, atribuyéndosele dicho efecto a los polifenoles del té verde [29]. Estos resultados sugieren que la EGCG puede potenciar las defensas antioxidantes endógenas celulares.

El hecho de que no se hayan modificado los niveles de antioxidantes totales con los tratamientos de aa y el combinado (aa- CrO_3) pudo deberse a que el aa al donar sus electrones a los RL para neutralizarlos, se forma el radical $\text{A}^{\bullet}$ el cual puede regenerarse hasta formar nuevamente aa mediante la acción de las enzimas NADH y GSH, por lo que la regeneración de grandes cantidades de aa puede disminuir las concentraciones de estas enzimas [18].

Conclusiones

Nuestros hallazgos muestran que el aa y la EGCG son capaces de disminuir el daño genotóxico y citotóxico inducido por la exposición de ratones *in vivo* a compuestos metálicos con potencial cancerígeno, tales como los del Cr (VI). Se sugiere que la actividad antioxidante de estos fitoquímicos podría presentar un efecto sobre el estrés oxidante generado durante la reducción de Cr [VI] a Cr [III].

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la UNAM, mediante la DGAPA, PAPIIT-IN217712.

SFRBM2015

NOVEMBER 18-21

WESTIN BOSTON WATERFRONT — BOSTON, MA



Effect of Ascorbic Acid and (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on Oxidative Damage Induced by Chromium (VI) in Hsd-ICR Mice

Maria del Carmen García-Rodríguez¹, Gabriela Serrano-Reyes², Raquel Retana-Ugalde¹, and Mario Altamirano-Lozano¹

¹FES-Zaragoza, UNAM, Mexico

Antioxidants such as Ascorbic acid (AA) and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) have been associated with beneficial effects against the development of diseases related to oxidative stress. These effects include the capture of free radicals and reactive oxygen species (ROS), the regulation of cell growth and the induction of detoxifying enzymes. On the other hand, hexavalent chromium [Cr (VI)] generates ROS during its reduction to Cr (III), leading to DNA damage. In this study the micronucleus (MN) frequency, the apoptotic activity, the 8-OHdG and antioxidant (GSH and total antioxidant) levels were evaluated in peripheral blood of mice treated with AA, EGCG and Cr (VI). Groups of five Hsd-ICR mice were divided and treated as follows: i) only vehicle, ii) AA (100 mg/kg intraperitoneal) or EGCG (10 mg/kg by gavage), iii) 20 mg/kg of CrO₃, iv) AA or EGCG in addition to CrO₃. Evaluations were performed at 0, 24, 48 and 72 h after treatments. The treatment with CrO₃ showed an increase in MN, non-viable cells and GSH levels and a decrease in the total levels of antioxidation. The treatments with AA and EGCG prior to administration of CrO₃ decreased MN frequencies and non-viable cells induced by CrO₃. Apoptotic cells increased in all treatments suggesting that this may play a role in the elimination of micronucleated cells. Moreover, it was observed a decrease in the levels of 8-OHdG in CrO₃ group and an increase in the groups treated with AA and EGCG. The 8-OHdG in blood is a marker repairer of DNA damage, suggesting that in the CrO₃ group it has been altered. Our findings show a protective effect of EGCG and AA on genotoxic and cytotoxic damage induced by Cr (VI) and that it could be related with its ROS-suppression properties of oxidative stress generated during the reduction of Cr (VI) to Cr [III]. Financial support was obtained from DGAPA-UNAM IN217712.



UASLP
Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

(COICIBA 2015)



Biotecnología,
Ciencias Agropecuarias,
Innovación Tecnológica,
Ciencias de la Salud,
Ciencias Naturales y Exactas,
Competitividad Socioeconómica
y Medio Ambiente

**25 al 27
FEB 2015**
Cd. Valles, SLP

Informes:
www.uzh.uaslp.mx/coiciba2015



PLAN INSTITUCIONAL DE DESARROLLO
PIDE 2013-2023

 UASLP Universidad Autónoma del Estado de Potosí		CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS BÁSICAS APACOSILLA, POTOSÍ, 39100
PONENCIAS ORALES		
Viernes 27 de febrero de 2015		
11:30 – 12:30 Hrs		
Horario	Sala 1	BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
11:30-11:50 hrs	Maldonado Cervantes Enrique	Análisis fosfoproteínico del grano de amaranto
11:50-12:10 hrs	Alonso Santos Esmeralda	Crecimiento de <i>Fischerella</i> sp. (Stigonematales: Cyanobacteria) en ausencia de nitrógeno y carbonatos
12:10-12:30 hrs	Trujillo Tapia María Nieves	Influencia de la cinetina y el ácido naftalenacético sobre el crecimiento y producción de fenoles de <i>Padina durvillaei</i>
	Sala 2	CIENCIAS DE LA SALUD: TOXICOLOGÍA Y GENOTOXICIDAD
11:30-11:50 hrs	Castillo Cadena Julieta	Alteraciones en la Calidad Espermática de Floricultores Expuestos a Plaguicidas en Villa Guerrero, Estado de México
11:50-12:10 hrs	Pruneda Álvarez Lucía Guadalupe	Evaluación de la Exposición a mezclas de contaminantes (HAPs, Benceno, Tolueno) y su relación con la alteración de un estado inflamatorio y un marcador temprano de disfunción endotelial (ADMA) en mujeres
12:10-12:30 hrs	Serrano Reyes Gabriela	Efecto de los compuestos fitoquímicos (ácido ascórbico y (-)-epigallocatequina-3-galato) sobre el daño genotóxico, la actividad apoptótica y los niveles de antioxidantes totales en ratones CD-1 expuestos a cromo hexavalente.
	Sala 3	COMPETITIVIDAD SOCIOECONÓMICA: MERCADOTECNIA
11:30-11:45 hrs	Ruiz Esparza Irene Guadalupe	La savia del altiplano. Investigación desde la perspectiva de mercadotecnia social y turística en el uso de plantas medicinales del altiplano Potosino.
11:45-12:00 hrs	Nava Alvarado Sahamyra Leilani	Pink or not pink? Segmentación del mercado homosexual, un estudio exploratorio
12:00-12:15 hrs	Susano García José Luis	Mimetismo en las marcas
12:15-12:30 hrs	Gallegos Fonseca Gustavo	Impacto de las características del consumidor y la mercadotecnia en el consumo sustentable
	Sala 4	CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS: CIENCIAS EXACTAS EN LA EDUCACION
11:30-11:50 hrs	Alcántara Rosales Rodolfo Guadalupe	La modelación matemática como estrategia didáctica para el aprendizaje de aplicaciones de la derivada con el cálculo y determinación de máximos y mínimos
11:50-12:10 hrs	Recio Reyes Ramón Gerardo	Modelo de solución: Cuatrinomio elevado a la n
12:10-12:30 hrs	Sánchez Moreno Alberto	Física Moderna y los Institutos Tecnológicos del Bajío: un primer vistazo



Efecto de los compuestos fitoquímicos (ácido ascórbico y (-)-epigallocatequina-3-galato) sobre el daño genotóxico, la actividad apoptótica y los niveles de antioxidantes totales en ratones CD-1 expuestos a cromo hexavalente

Gabriela Serrano-Reyes^a, Mario Altamirano-Lozano^a, Raquel Retana-Ugaide^b, María del Carmen García-Rodríguez^a

^aUnidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), FES-Zaragoza, UNAM.

^bUnidad de Investigación en Gerontología, FES-Zaragoza, UNAM.

Resumen

Se estudió el efecto del ácido ascórbico (aa) y de la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) sobre la cinética de micronúcleos (MN), la actividad apoptótica, la viabilidad celular y los niveles de antioxidantes totales en sangre periférica de ratones expuestos a compuestos de cromo hexavalente [Cr (VI)]. Grupos de cinco ratones CD-1 fueron divididos y tratados de la siguiente forma: a) Testigo, solo el vehículo; b) Fitoquímicos, aa o EGCG (100 ó 10 mg/kg respectivamente); c) Cr (VI), 20 mg/kg de CrO₃ y d) Combinados, ambos tratamientos fitoquímicos y Cr (VI). Las evaluaciones se realizaron a las 0, 24, 48 y 72 h después de los tratamientos. Los resultados mostraron un incremento significativo de MN y células no-viables, así como una disminución de los niveles de antioxidantes totales con el tratamiento de CrO₃. La administración previa del aa y de la EGCG disminuyó el daño genotóxico y citotóxico inducido por CrO₃. Sin embargo, las células apoptóticas se incrementaron en todos los tratamientos, lo que sugiere que la apoptosis pudiera jugar un papel importante en la eliminación de las células micronucleadas. Nuestros hallazgos muestran un efecto protector del aa y de la EGCG contra el daño genotóxico y citotóxico inducido por compuestos metálicos del Cr (VI), y que la actividad antioxidante de estos fitoquímicos podría presentar un efecto sobre el estrés oxidante generado durante la reducción de Cr (VI) a Cr (III).

Abstract

We studied the effects of ascorbic acid (aa) and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the kinetics of micronucleus (MN), the apoptotic activity, the cell viability and the total antioxidant levels in the peripheral blood of mice exposed to compounds of hexavalent chromium [Cr (VI)]. Groups of five CD-1 mice were divided and treated as follows: a) Control, only vehicle; b) Phytochemicals, aa or EGCG (100 and 10 mg/kg respectively); c) Cr (VI), 20 mg/kg of CrO₃ and d) Combination, both treatments phytochemical-Cr (VI). The evaluations were performed at 0, 24, 48 and 72 h after treatments. The results showed a significant increase in MN and non-viable cells, as well as a decrease in the levels of the total antioxidants treated with CrO₃. The previous administration of aa and EGCG reduced the genotoxic and cytotoxic damage induced by CrO₃. Apoptotic cells increased with all treatments suggesting that this may play a role in the elimination of micronucleated cells. Our findings demonstrates a protective effect of EGCG and aa against the genotoxic and cytotoxic damage induced by compounds of Cr (VI), and also suggests that these antioxidant activities of the phytochemicals might have an impact on the oxidative stress generated during the reduction of Cr (VI) to Cr (III).

Palabras clave: Fitoquímicos, antioxidantes, cromo hexavalente, micronúcleos, apoptosis.

Keywords: Phytochemicals, antioxidants, hexavalent chromium, micronucleus, apoptosis.

Correspondencia

Dra. María del Carmen García-Rodríguez
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Lab. 2 Planta Alta UMIEZ, Campus II, FES-Zaragoza, UNAM, PO Box 9-020, C.P. 15000, D.F., México. carmen.garcia@unam.mx

Fecha de recepción 23 de septiembre de 2014
Fecha de recepción de correcciones 5 de enero de 2015
Fecha de aceptación 25 de enero de 2015





Efecto del ácido ascórbico y (-)-epigallocatequina-3-galato sobre la inducción de micronúcleos y la actividad apoptótica en ratones CD-1 tratados con trióxido de cromo

Serrano-Reyes Gabriela
Tutor principal: Ma. del Carmen García Rodríguez
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. D.F. gmc@puma2.zaragoza.unam.mx

INTRODUCCIÓN



Los compuestos de Cr(VI) inducen daño genotóxico

Incremento de agentes tóxicos en el ambiente

Acido ascórbico y EGCG

Possible vía de protección mediante la neutralización del EDx relacionada con uno o más mecanismos

Potenciamiento de los sistemas antioxidantes

Apoptosis

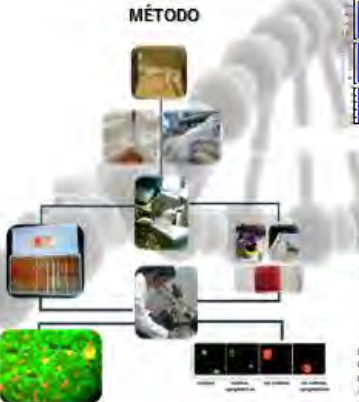
Son capaces de generar EDx durante su reducción a Cr(III)

RESULTADOS



Figure 1. Frecuencia relativa de inducción de MN (MN%) calculada para 10,000 EPC cuando en ratones CD-1 tratados con Cr(VI) se les administró ácido ascórbico o EGCG. Significancia *p < 0.05.

MÉTODO



Exposición al tóxico

Análisis de micronúcleos

Análisis de apoptosis

Tratamiento con AA y EGCG

Exposición al tóxico

Análisis de micronúcleos

Análisis de apoptosis

Tratamiento con AA y EGCG

CONCLUSIONES

Nuestros hallazgos muestran que el AA y la EGCG son capaces de disminuir el daño genotóxico y citotóxico inducido por la exposición de ratones *in vivo* a compuestos metálicos con potencial cancerígeno, tales como los del Cr(VI). Se sugiere que la actividad antioxidante de estos fitoquímicos podría presentar un efecto sobre el estrés oxidante generado durante la reducción de Cr(VI) a Cr(III).

REFERENCIAS

1. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66:119-135, 1981.
2. Suh Y, Ferguson L. Dietary and medicinal antioxidants and anticarcinogens. *Mutat Res* 523:1-43, 2003.
3. O'Brien T, Ceylan S y Pelam S. Compounds of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res* 523:3-15, 2003.

Este proyecto fue financiado por CONACYT y CONAHCYT y No. 387236/387119



MEMORIAS

XIX

simposio del
departamento de
ciencias de la
salud

Noviembre 26, 27 y 28 del 2014





EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LA INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS Y DE APOPTOSIS EN RATONES CD-1 TRATADOS CON METALES PESADOS (PENTÓXIDO DE VANADIO Y TRIÓXIDO DE CROMO)

**Hernández-Cortés
Lourdes Montserrat,
Serrano-Reyes
Gabriela, Altamirano-
Lozano Mario y
García-Rodríguez Ma.
del Carmen***

Unidad de Investigación en
Genética y Toxicología
Ambiental (UNIGEN).
Facultad de Estudios
Superiores Zaragoza, UNAM.
México D.F.

*carmen.garcia@unam.mx

La contaminación ambiental por metales pesados constituye en la actualidad una preocupación a nivel mundial por los riesgos que conlleva para la salud humana. Aunque algunos metales son micronutrientes y se encuentran en casi todos los seres vivos (ej. el vanadio y el cromo) en concentraciones elevadas presentan efectos tóxicos. El pentóxido de vanadio (V_2O_5) ha sido considerado por la "International Agency of Research on Cancer" (IARC) como un posible carcinógeno para el humano, y que aunque ha mostrado efectos citotóxicos y tóxicos generalizados, existen pocas evidencias *in vivo* de sus efectos sobre el ADN y de los mecanismos de inducción del daño. Por otra parte, a los compuestos del cromo [VI] la IACR los reconoce como potentes cancerígenos, aunado a sus efectos genotóxicos y citotóxicos. Los compuestos metálicos del cromo [VI] son capaces de atravesar la membrana celular y reducirse a cromo [III], durante esta reducción se generan especies reactivas de oxígeno y radicales libres; mismos que pueden interaccionar y dañar biomoléculas como el ADN. En contraparte, en estudios epidemiológicos se ha observado que los componentes antioxidantes de las frutas y los vegetales, son un factor importante en la modulación de algunas enfermedades relacionadas con el daño al ADN, así como de algunos tipos de cáncer. En particular el ácido L-ascórbico (aa), es una vitamina esencial y un importante agente antioxidante que se sintetiza químicamente a partir de la glucosa. De ahí que, en el presente estudio se evaluó el efecto del aa sobre el daño genotóxico inducido por metales pesados con potencial cancerígeno, como lo son el V_2O_5 y el trióxido de cromo (CrO_3). Grupos de cinco ratones fueron tratados por vía intraperitoneal con 100 mg/kg de aa, 40 mg/kg de V_2O_5 , 20 mg/kg de CrO_3 , 100-40 mg/kg de aa- V_2O_5 y 100-20 mg/kg de aa- CrO_3 . Las muestras de sangre periférica fueron tomadas de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. Los MN se evaluaron de acuerdo a la técnica de propuesta por Hayashi *et al.* (1990)¹, mientras que la apoptosis y viabilidad celular se realizó de acuerdo a la técnica modificada por García-Rodríguez *et al.*, (2013)². Los resultados mostraron un incremento significativo en la frecuencia de MN en ambos grupos tratados solo con los metales pesados. Mientras que, la administración sola del aa disminuyó las frecuencias basales de MN e incrementó la viabilidad celular. De igual manera, tanto el V_2O_5 como el CrO_3 cuando se administraron solos incrementaron las células apoptóticas. Cuando a los ratones tratados con los metales pesados, previamente se les administro el aa, se observó que este fue capaz de modular el efecto tanto genotóxico como citotóxico, ya que se disminuyeron las frecuencias de MN y de células apoptóticas. Cabe señalar que se observó un efecto más consistente en la modulación del daño genotóxico inducido por el V_2O_5 . Con base en estos resultados, se sugiere que aunque la exposición de las poblaciones humanas a compuestos metálicos como los de cromo [VI] y vanadio [V] puede representar un riesgo genético y citotóxico, sustancias con potencial antioxidante como el aa pueden prevenir o modular estos efectos. **Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN217712.**

¹Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res*; 245: 245-249.

²García-Rodríguez MC, Cervante-Juarez MM, Altamirano-Lozano MA. (2013). Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. *Oxid Med Cell Longev*; 1-9.

**XIX Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud.
26-28 de Noviembre, 2014**