



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y
GENOTÓXICO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO,
CARNOSINA Y S-ALIL CISTEÍNA EN RATONES CD1.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

BRENDA CASARRUBIAS TABAREZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARCELA ROJAS LEMUS**

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito.
Título

Número de páginas
Año

1. Datos del alumno
Casarrubias
Tabarez
Brenda
57 01 67 90
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308028720

2. Datos del tutor
Doctora
Marcela
Rojas
Lemus

3. Datos del sinodal 1
Doctor
Mario Agustín
Altamirano
Lozano

4. Datos del sinodal 2
Doctora
Laura
Colín
Barenque

5. Datos del sinodal 3
Doctora
Teresa Imelda
Fortoul
van der Goes

6. Datos del sinodal 4
Doctora
Adriana Elizabeth
González
Villalva

7. Datos del trabajo escrito.
Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico del ácido ascórbico, carnosina y S-alil cisteína en ratones CD1.
55p
2016

AGRADECIMIENTOS

- A mi tutora:
 - Dra. Marcela Rojas Lemus

- AL jurado revisor de esta tesis:
 - Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
 - Dra. Laura Colín Barenque
 - Dra. Marcela Rojas Lemus
 - Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
 - Dra. Adriana Elizabeth González Villalva

- Al Biól. Armando Zepeda Rodríguez y al Biól. Francisco Pasos Nájera, del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. Por su apoyo en la obtención y el procesamiento de las imágenes.

- Al Dr. Enrique Pinzón Estrada y al Dr. Ismael Torres Saldaña, personal del bioterio de la Facultad de Medicina por su apoyo en la obtención, cuidado y manejo de los animales experimentales.

- A la Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes por darme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo del laboratorio y por su valiosa ayuda para la realización y culminación de este trabajo.

- A los miembros del Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM por el apoyo para la realización de esta tesis.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológicas (PAPIIT) IN220414.

Esta tesis está dedicada...

A todas las personas que creyeron en mí
y estuvieron conmigo en todo momento,
incluso desde la distancia ¡Gracias!
¡Lo logramos!

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar gracias a Dios, por permitirme llegar y culminar una etapa más en mi vida y por darme la fuerza para salir adelante, porque a pesar de todas las pruebas que he pasado se que nunca he estado sola.

A Sandra N. Tabarez G. mi mamá, por ser mi ejemplo a seguir, por ser esa mujer fuerte que a pesar de todo siempre ha salido adelante, por cuidarme y estar ahí para mí siempre, por sus consejos, por sus regaños, por creer en mí y nunca dejarme sola, por sus palabras de aliento, por secar mis lagrimas en mis tristezas y compartir conmigo momentos inolvidables de alegrías y risas, por su todo su amor y comprensión, porque gracias a ella soy la mujer que soy, ¡por ser la mejor mamá del mundo!, ¡GRACIAS, TE AMO MAMÁ!

A la Dra. Nelia Casarrubias mi hermana, por estar siempre ahí cuando la he necesitado, por apoyarme y por creer en mí, por impulsarme siempre a cumplir mis metas, por demostrarme que si se puede!, por ser más que mi hermana ser mi mejor amiga y mi ejemplo a seguir, nos esperan muchos éxitos y momentos de felicidad juntas ¡TE ADORO!
¡LO LOGRAMOS!

A mi abuelita la maestra Casimira García R., que aunque ya no esté físicamente conmigo, me enseñó que a pesar de las adversidades que se presenten en la vida puedes salir adelante con esfuerzo, perseverancia y dedicación, por demostrarme que si trabajas en lo que más te gusta y amas tu profesión das siempre lo mejor de ti, por su apoyo, por siempre

enseñarme el buen camino, por ser una gran mujer y darme todo su cariño. Te llevaré siempre en mis pensamientos y corazón. ¡GRACIAS TOTALES! ¡LA ADORO ABUE!

A mi tutora Marce, Gracias por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por brindarme sus conocimientos y tenerme paciencia, por darme una de las mejores experiencias de mi vida el trabajar en el laboratorio y poder hacer lo que más me gusta, por creer en mí, por apoyarme siempre y por haberme enseñado que puedo llegar muy lejos. ¡Lo logramos Marce!

A mis ratoncitos que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

A mis amigos, gracias a cada uno de ustedes por formar parte de mi vida y estar siempre presentes en los buenos y malos momentos, saben que son mi segunda familia. ¡LOS AMO!

A mis compañeros del laboratorio por formar parte de una de las mejores experiencias de mi vida, por compartir tantas horas de trabajo y hacerlas amenas.

A la máxima casa de estudios, mi segundo hogar, la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de formar parte de esta gran comunidad de estudiantes y darme las mejores experiencias de mi vida.

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Tabla de abreviaturas.....	3
3. Introducción.....	4
3.1 Estrés oxidante.....	4
3.1.1 Fuentes endógenas de Radicales Libres.....	4
3.1.2 Fuentes exógenas de Radicales Libres.....	6
3.1.3 Efectos biológicos de los Radicales Libres.....	6
3.1.3.1 Efectos positivos.....	6
3.1.3.2 Efectos negativos.....	7
3.2 Sistema de defensa celular.....	8
3.2.1 Antioxidantes.....	8
3.2.1.1. Ácido ascórbico.....	8
3.2.1.2 Carnosina.....	13
3.2.1.3 S-alil cisteína.....	17
3.3 Autoadministración y libre venta de antioxidantes.....	18
4. Pruebas para detección de genotoxicidad.....	19
4.1 Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina.....	20
4.2 Ensayo cometa pH 13.....	23
5. Prueba para detección de citotoxicidad: Viabilidad celular por fluorocromos.....	24
6. Justificación.....	24
7. Hipótesis.....	25
8. Objetivos.....	25
8.1 Objetivo general.....	25
8.2 Objetivos particulares.....	25

9. Método.....	25
9.1 Selección de grupos expuestos y toma de muestras.....	25
9.2 Administración oral de antioxidantes.....	26
9.3 Estrategias experimentales.....	27
9.3.1 Viabilidad celular por fluorocromos.....	27
9.3.2 Ensayo cometa pH 13.....	28
9.3.3 Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina.....	29
9.4 Análisis estadístico.....	30
10. Resultados.....	31
10.1 Efecto citotóxico: Viabilidad celular.....	31
10.2 Efecto genotóxico.....	32
10.2.1 Ensayo cometa alcalino.....	32
10.2.2 Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina.....	33
10.3 Resumen de resultados.....	34
11. Discusión.....	35
11.1 Importancia de los resultados obtenidos mediante el ensayo de micronúcleos.....	35
11.2 Ácido ascórbico.....	35
11.3 Carnosina.....	37
11.4 S-alil cisteína.....	38
12. Conclusión.....	39
13. Perspectivas.....	40
14. Bibliografía.....	41

1. Resumen

Los antioxidantes son fundamentales para la vida, nos ayudan a protegernos contra el estrés oxidante que es un factor importante de daño al DNA, lo que puede desencadenar múltiples patologías. Con el fin de mitigar los efectos adversos, se ha incrementado el consumo de antioxidantes, aunado a la mayor difusión y a la sobrevaloración de los beneficios que generan. Los antioxidantes se pueden consumir sin prescripción ni supervisión médica y son fáciles de conseguir, ya que son de libre venta. Sin embargo, la información sobre los efectos sistémicos y sobre las biomoléculas más importantes (como el DNA) de los antioxidantes es escasa o inexistente en la literatura. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto genotóxico y citotóxico del ácido ascórbico (AA), la carnosina (CAR) y la S-alil cisteína (SAC) en un modelo *in vivo*.

En ratones machos de la cepa CD-1, se administró una dosis de 17mg/Kg/día de los distintos antioxidantes (dosis equivalente a la que consume un humano de 60 Kg). Se tomaron muestras de sangre entera a las 0, 24 y 48 horas y a los 7, 14, 21 y 28 días, se realizaron las siguientes técnicas: viabilidad celular por fluorocromos para evaluar citotoxicidad, el ensayo cometa alcalino para evaluar los rompimientos de cadena sencilla y evidenciar el daño al DNA reparable y el ensayo de micronúcleos con naranja de acridina para evaluar el daño irreparable.

Los resultados mostraron que ninguno de los antioxidantes tuvo actividad citotóxica e incluso la CAR y la SAC aumentaron significativamente la viabilidad celular. No se incrementaron los rompimientos de cadena sencilla en ninguno de los grupos. Se observó que el AA y la SAC aumentaron la frecuencia de micronúcleos durante todo el experimento.

Los resultados muestran que el mejor antioxidante fue la CAR al no mostrar efectos genotóxicos y aumentar la viabilidad celular, esto podría deberse a su efectiva protección antioxidante y al mejorar la actividad de los antioxidantes endógenos, de igual manera se explica por la posible interacción electrostática directa de la carnosina con el DNA, lo que contribuye al mantenimiento de su estructura.

El AA no generó rompimientos de cadena sencilla, contrario a lo observado en experimentos *in vitro*, donde se sugiere que los rompimientos son dependientes de la dosis, ya que conforme aumentaba la dosis el daño aumentaba, por lo que es importante tomar en cuenta que en altas dosis el AA *in vitro* tiene un efecto prooxidante, por otra parte el AA generó daño irreparable al DNA, esto podría deberse al efecto prooxidante reportado del AA *in vitro* en presencia de metales de transición como el Fe⁺³ y el Cu⁺³, posiblemente esta ruta prooxidante también ocurra *in vivo* ocasionando un daño al DNA,

el daño irreparable producido al DNA es preocupante ya que el AA es uno de los antioxidantes más consumidos por la población.

Nuestros resultados muestran que la SAC *per se* ocasiona aumento en la frecuencia de MN, no hay referencias en la literatura de este comportamiento con el DNA, por lo que podemos pensar que su metabolismo es importante para este evento, dado que, la tasa de absorción es rápida y la tasa de eliminación es lenta debido a que posiblemente exista una reabsorción, posiblemente el daño ocasionado *per se*, se puede prolongar debido a la reabsorción que existe durante su metabolismo. Podemos concluir que la SAC mostró un mayor daño al material genético ya que aumentó la frecuencia de micronúcleos durante todo el experimento y aumentó la viabilidad celular, es decir, las células tienen una mayor supervivencia pese a que estén dañadas.

Con base en los resultados obtenidos, se recomienda la no administración de los antioxidantes sin supervisión médica, por otra parte, debido a la escasez de información, se sugiere más investigación respecto a los efectos que causan los antioxidantes en el material genético, con el fin de dilucidar los mecanismos de daño al DNA en condiciones normales.

2. Tabla de abreviaturas

A^{•-}	Radical ascorbilo
AA	Ácido ascórbico
CAR	Carnosina
DHA	Ácido dehidroascórbico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Food and Drug Administration
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Img	Índice de migración
MN	Micronúcleos
NA	Naranja de acridina
·OH	Radical hidroxilo
RL	Radicales libres
SAC	S-alil cisteína
TES	Testigo

3. Introducción

3.1 Estrés oxidante

El estrés oxidante es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante de un organismo (Chihuilaf *et al.* 2002). Puede ser el resultado de una mayor exposición a los oxidantes o de la disminución de la defensa antioxidante, o que ambos problemas ocurran de manera simultánea (Davies 2000).

Los radicales libres (RL), son cualquier especie química que contiene uno o más electrones no apareados en su última órbita. Debido a estos electrones no apareados, los radicales libres son inestables y reaccionan con los componentes de la célula tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Kohen y Nyska 2002, Pryor *et al.* 2006). Debido a su inestabilidad, su tiempo de vida es muy corto y cuando reaccionan con otro radical o con otra molécula, forman nuevos radicales iniciando una reacción en cadena (Sen 2001).

Por otra parte, en la mayoría de los sistemas biológicos, también se producen especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales se forman como productos del metabolismo de los radicales libres y son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en RL, lo que les confiere la característica de ser compuestos potencialmente dañinos para las células (Martínez *et al.* 2003).

Las ERO y los RL, en concentraciones bajas o moderadas, participan en los procesos fisiológicos celulares, pero en altas concentraciones producen efectos adversos a los componentes de la célula. Estas moléculas provienen de dos diferentes fuentes: endógenas y exógenas (Halliwell y Gutteridge 2007, Marnett 1999, Valko *et al.* 2006).

3.1.1 Fuentes endógenas de RLs

Los RL se producen de manera normal y continua durante el metabolismo celular, como sucede en: microsomas, peroxisomas, la cadena mitocondrial de transporte de electrones, en la activación de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, etc. (Klimp *et al.* 2002, Martínez *et al.* 2003).

Tabla 1. Formación de los principales radicales libres y especies reactivas de oxígeno

Radicales Libres	Formación	Referencia
Anión superóxido O_2^-	Se forma por la adición de 1 electrón al oxígeno molecular, principalmente en la mitocondria. $O_2 + e^- \rightarrow \cdot O_2^-$	Miller <i>et al.</i> 1990
Radical hidroxilo $\cdot OH$	Se puede generar por la descomposición del H_2O_2 en presencia de metales como el Fe^{+2} y el Cu^{+2} . $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^- + \cdot OH$	Fenton 1984
Radicales alcoxilo $RO\cdot$ y peroxilo $ROO\cdot$	Están relacionados con la peroxidación lipídica. Ambos radicales orgánicos se pueden formar durante la descomposición de lipoperóxidos (ROOH) por calentamiento, la radiación UV o por la presencia de metales de transición. $ROOH + Fe^{+3} \rightarrow ROO\cdot + Fe^{+2} + H^+$ $ROOH + Fe^{+2} \rightarrow RO\cdot + Fe^{+3} + OH^-$	Đurčaková 2010
Especies Reactivas de Oxígeno	Formación	Referencia
Peróxido de hidrógeno H_2O_2	Es producido por la xantina oxidasa $Xantina + H_2O + O_2 \rightarrow \text{ácido úrico} + H_2O_2$, aminoácido oxidasa y NADPH oxidasa y en los peroxisomas por la participación de oxígeno molecular en las reacciones metabólicas.	Dupuy <i>et al.</i> 1991 Granger 1988
Ácido hipocloroso $HOCl$	La enzima mieloperoxidasa (MPO) que está presente en neutrófilos y monocitos, en presencia de peróxido de hidrógeno produce ácido hipocloroso. $H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{MPO} HOCl + OH^-$	Đurčaková 2010

3.1.2 Fuentes exógenas de RL

Los radicales libres también se pueden generar por la exposición a diferentes fuentes exógenas por ejemplo:

- El humo del cigarro ya que contiene muchos oxidantes, entre ellos, compuestos orgánicos y radicales libres tales como superóxido y óxido nítrico (Church y Pryor 1985).
- Ozono: La exposición al ozono puede causar la peroxidación lipídica e inducir el aumento de los neutrófilos en el epitelio de las vías respiratorias; La exposición a corto plazo también provoca la liberación de mediadores inflamatorios (Hiltermann *et al.* 1999).
- Radiación ionizante: La radiación ionizante, en presencia de O₂ transforma la molécula a diferentes prooxidantes como: radical hidroxilo, anión superóxido, radicales orgánicos, peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos. Estas especies de hidroperóxido reaccionan con los iones metálicos activos redox, tales como Fe⁺² y Cu⁺², a través de la reacción de Fenton e inducen estrés oxidante (Chiu *et al.* 1993).
- Exposición a metales pesados: Iones de metales pesados, tales como hierro, cobre, cadmio, mercurio, níquel, plomo y arsénico, pueden inducir la generación de radicales libres y causar daño celular a través de la peroxidación lipídica, la reacción con las proteínas y el DNA (Stohs y Bagchi 1995).

3.1.3 Efectos biológicos de los RL

3.1.3.1 Efectos positivos

El papel fisiológico de los RL, se asocia con casi todos los procesos del cuerpo y dado que en condiciones fisiológicas se requiere un cierto nivel de radicales libres y metabolitos reactivos, la supresión completa de la formación RL no sería benéfica (Halliwell y Gutteridge 2007, Ďurčaková *et al.* 2010).

Los radicales libres juegan un papel irremplazable en la fagocitosis como uno de los sistemas microbicidas más importantes (Klimp *et al.* 2002), también participan en varias reacciones bioquímicas, por ejemplo en la hidroxilación, la carboxilación o en las reacciones de peroxidación. Actualmente se sabe que los radicales libres y sus metabolitos, tienen actividades biomoduladoras importantes y de regulación en el proceso de transducción de señales (Ďurčaková 2010), un ejemplo de ello es el papel del peróxido de hidrógeno como un segundo mensajero, ya que se difunde fácilmente a través de las membranas biológicas (Forman *et al.* 2010, Bienert *et al.* 2007).

3.1.3.2 Efectos negativos

Cuando la concentración de ERO y RL sobrepasa los límites fisiológicos normales, ocurre lo que se denomina estrés oxidante (EO) (Chihuilaf *et al.* 2002), ocasionando daño y/o muerte celular (Martínez *et al.* 2003).

El estrés oxidante se ha asociado con diversas patologías entre ellas: enfermedades cardiovasculares (Ballinger 2005), arteriosclerosis (Harrison *et al.* 2003), obesidad y síndrome metabólico (Furukawa *et al.* 2004), algunas enfermedades degenerativas como: Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, cataratas, diabetes e incluso el envejecimiento (Golden *et al.* 2002, Rahal *et al.* 2014, Martínez *et al.* 2013).

Como resultado del incremento de ERO y RL, pueden ocurrir modificaciones en las proteínas, los lípidos y el DNA. (Bhor *et al.* 1998)

- Lípidos: El daño producido en los lípidos se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que altera la permeabilidad de la membrana produciendo edema y muerte celular, es causado por el oxígeno, el anión superóxido, el peróxido de hidrogeno y el radical hidroxilo. (Jerlick *et al.* 2000). Una vez que se produce el daño, este desencadena una reacción en “cascada” ya que a partir de los ácidos grasos insaturados se producen RL que llevan a producción de peróxidos orgánicos y otros productos como radicales lipídicos, radicales lipoperoxilo etc. que son responsables de efectos citotóxicos y múltiples enfermedades como: Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, entre otras (Rangon y Bulkeley 1993, Martínez *et al.* 2013).
- Proteínas: el contacto con ERO produce oxidación de un grupo de aminoácidos como la fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas y hay formación de grupos carbonilo (Roche E. 1994).
- DNA: el daño producido sobre el DNA afecta principalmente a la desoxirribosa, provocando la liberación de las bases nitrogenadas que se encuentran unidas a esta azúcar, ocasionando el rompimiento de una o ambas cadenas de DNA causando deleciones que dan como resultado mutaciones y la activación o inactivación de genes. Además, el estrés oxidante produce errores durante la transcripción y traducción del RNA (Dukan *et al.* 2000, Kryston *et al.* 2011).

3.2 Sistema de defensa celular

El sistema de defensa celular, ha sido ampliamente estudiado y se sabe que las células no están indefensas contra los radicales libres a los que están continuamente expuestas. Todos los organismos aerobios utilizan una serie de defensas para protegerse contra el estrés oxidante, entre los mecanismos de defensa que emplean los sistemas biológicos, están las moléculas antioxidantes (Davies 2000).

3.2.1 Antioxidantes

Un antioxidante se define como "cualquier sustancia que a bajas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, retrasa significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato" (Halliwell 2002).

Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de DNA (Halliwell 2002).

Las células utilizan compuestos antioxidantes que reaccionan directamente con los agentes oxidantes, funcionando como "barredores" o escudos químicos (Davies 2000), estos antioxidantes pueden ser compuestos endógenos producidos por el organismo como la Superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), el glutatión (GSH) y la glutatión peroxidasa (GPx) o compuestos exógenos adquiridos de la dieta (Khalid 2007) como el ácido ascórbico (en el hombre, el mono, el cobayo, el cerdo de guinea y algunos otros pocos mamíferos ya que no lo pueden sintetizar), la carnosina que es sintetizada de forma endógena, también se adquiere de forma exógena y la S- alil cisteína.

3.2.1.1. Ácido ascórbico

La vitamina C, también conocida como ácido ascórbico (AA) es una vitamina hidrosoluble y termolábil indispensable para la vida de muchos mamíferos. La mayoría de los animales tienen la capacidad de sintetizar el AA, sin embargo, el hombre, el mono, el cobayo, el cerdo de guinea y algunos otros pocos mamíferos, no lo pueden hacer debido a la ausencia de la enzima L-gulonolactona-oxidasa y necesitan incorporarlo a través de la dieta (Xammar y Donnamaría 2006, Linster y Van Schaftingen 2007).

La incorporación del AA a nuestro organismo puede ser de forma natural, a través de la ingesta de vegetales y frutas o sintética por administración de suplementos alimenticios, los cuales son sumamente populares y se encuentran disponibles en tabletas masticables y efervescentes, cápsulas, polvo y en forma líquida (Xammar y Donnamaría 2006).

Actividad biológica

- Es esencial para el buen funcionamiento del sistema inmunológico, por su participación en la actividad de los linfocitos, neutrofilos, fagocitos y anticuerpos. (Anderson *et al.* 1980).
- Participa como cofactor en la biosíntesis de neurotransmisores en el sistema nervioso y de carnitina en los músculos (Naidu 2003, Rebouche 1991).
- Es un cofactor requerido en la esteroidogénesis adrenal (Patak *et al.* 2004)
- Juega un papel fundamental actuando como coenzima en la síntesis de colágena, que es la proteína más abundante del tejido conectivo y de la matriz orgánica del tejido óseo, se encuentra presente en la piel, huesos, dientes, ligamentos, cartílagos, tendones y vasos sanguíneos. La carencia de AA implica que la colágena sintetizada es defectuosa y de mala calidad, por lo tanto todos los sistemas del organismo se encuentran comprometidos (Tinker y Ricker 1985, Reiser *et al.* 1992).
- El AA es el principal antioxidante hidrosoluble y actúa como la primera defensa contra los radicales libres en la sangre, es un excelente "barredor" de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como anión superóxido, radicales hidroperoxilo, peroxilo, ozono, peroxinitrito, dióxido de nitrógeno, radicales nitróxido y ácido hipocloroso (Halliwell B., 1996)

Dos propiedades principales del AA hacen que sea un antioxidante ideal (Carr y Frei 1999). En primer lugar tiene un alto poder reductor lo que le permite reducir casi a todos los radicales y oxidantes fisiológicamente relevantes (Buettner 1993). La segunda propiedad importante, es la estabilidad y la baja reactividad del radical ascorbilo formado cuando el AA elimina una especie reactiva de oxígeno o nitrógeno (Eq 1). El radical ascorbilo ($A^{\bullet-}$) dismuta (es al mismo tiempo oxidado y reducido) fácilmente para formar ascorbato y ácido dehidroascórbico (DHA) (Eq 2), o se reduce de nuevo a ascorbato por una reductasa dependiente de NADH. El producto de oxidación de 2 electrones de ascorbato, da como resultado una molécula de ácido dehidroascórbico y éste puede a su vez ser reducido de nuevo a ascorbato por el glutatión, por medio de intervención enzimática (dehidroascorbato-reductasa, tiol-transferasa o proteína-ditiol-isomerasa); Alternativamente, el ácido dehidroascórbico es rápida e irreversiblemente hidrolizado a 2,3 diceto L-ácido gluónico (DKG) (Eq 3) (Halliwell 1996).



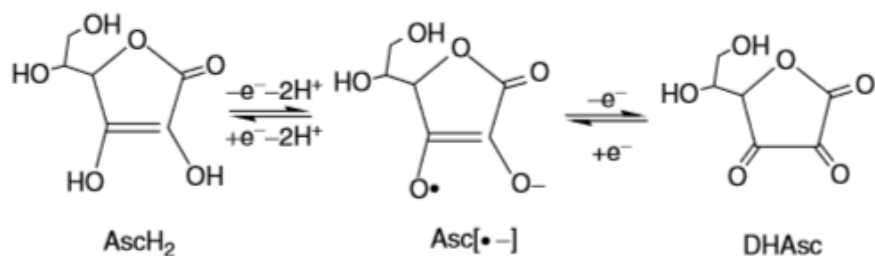


Figura 1 Ácido ascórbico y sus productos de oxidación (Tomado de Johnston *et al.* 2007 “Ascorbic acid” en Handbook of vitamins).

Criterios de administración

Los organismos de salud internacionales como The Food and Nutrition Board (FNB) y The Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos recomiendan, para adultos sanos una ingesta diaria de AA de 60 mg, sin embargo, cada organización ha propuesto una dosis diferente (Tabla 2), de 30 a 45 mg para niños menores de 14 años (no lactantes) y en los enfermos la dosis adecuada de AA puede ser diferente para cada paciente ésta depende de la patología que se desea tratar (Food and Nutrition Board (FNB), Institute of Medicine, National Academy of Sciences 2000.)

Sin embargo no se ha llegado a un consenso entre los investigadores que proponen dosis desde los 250 mg a los 4000mg en adultos sanos (Pauling 1974, Anderson *et al.* 1980, Jeng *et al* 1996).

Tabla 2. Descripción general de los valores de referencia de AA para adultos. Modificado de: EFSA Journal 2013.

	D-A-CH (2003)	NNR (2012)	WHO/FAO (2004)	Afssa (2001)		IOM (2000)	SCF (1993)	NL (1992)	DH (1991)
EDAD (años)	≥19	≥18	≥19	20 a 74	≥75	≥19	≥18	≥19	≥19
HOMBRES (mg/día)	100	75	45	110	120	90	45	70	40
MUJERES (mg/día)	100	75	45	110	120	75	45	70	40

D-A-CH: Alemania, Austria Confederación Suiza; NNR: Recomendaciones Nutricionales Nórdicas; WHO: Organización mundial de la salud; FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; AFssa: Agencia francesa para la Seguridad Alimentaria; IOM: Instituto de EE.UU. de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias; SCF: Comité Científico de la Alimentación; NL: Países bajos; DH: Departamento de salud.

Metabolismo

-Absorción, transporte y distribución: En el ser humano, el AA es fácilmente absorbido en el yeyuno (Rose 1996) y pasa a la sangre por medio de un proceso de transporte activo de los iones de sodio, este proceso es saturable y dependiente de la dosis, ya que al ingerir grandes cantidades (>100 g), el porcentaje que se absorbe es mucho menor, por ejemplo: consumiendo 100 g solo se absorbe un 80% (Kallner *et al.* 1982), por otra parte el ácido dehidroascórbico es llevado dentro de las células por transportadores de glucosa (GLUT1, GLUT3 y GLUT4). El AA está presente en el plasma y en todas las células, sin embargo, se encuentra en concentraciones elevadas en la corteza suprarrenal y en la hipófisis (Arilla 1999).

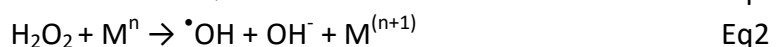
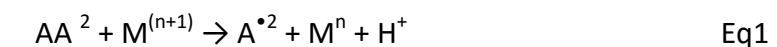
-Degradación y excreción: Cuando la ingestión de AA excede los requerimientos del organismo, una pequeña porción se almacena en los tejidos, principalmente en la corteza suprarrenal y en la hipófisis, pero la mayor parte del exceso es eliminada a través de la orina cuando se rebasa el umbral plasmático renal de 1.5mg/100mL. El DHA puede ser hidrolizado y convertirse en 2,3-dicetogulónico y cuando este sufre una descarboxilación genera dos metabolitos, la xilosa y el ácido xilónico, por otra parte, cuando es oxidado da lugar al oxalato. Además el AA puede ser convertido a ácido ascórbico-2-sulfato (Carr y Frei 1999).

En el caso del AA al superarse los 3 g diarios, se elimina también con las heces. La vida media de eliminación del ácido ascórbico absorbido por el organismo depende de la vía de administración, de la cantidad ingerida y de la velocidad de absorción. En términos generales se puede hablar de aproximadamente 14 a 20 días (Xammar y Donnamaría 2006).

Efectos adversos generales

El AA tiene varios efectos adversos los cuales están relacionados directamente con la dosis (Levine *et al.* 1985), en dosis mayores a 2-6 g/día se han reportado: diarrea, dolor abdominal, litiasis renal, cefaléa, náusea, vómitos y calambres abdominales (VADEMECUM *on line*).

A pesar de que el AA es reconocido como un buen antioxidante, se ha reportado que también puede comportarse como un prooxidante en presencia de metales de transición, esto ha sido reportado en trabajos *in vitro*, por ejemplo en presencia de metales como el hierro o el cobre y formar el radical ascorbil y el metal reducido (Eq1) y éste en presencia de peróxido de hidrógeno puede resultar en la formación de radicales hidroxilo también conocida como reacción de Fenton (Eq2) (Halliwell 1996).



Efectos adversos sobre el DNA

En la literatura son muy escasos y los encontrados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Efectos adversos del AA sobre el DNA

Autor y año	Tipo de estudio	Resultados
	<i>In vitro</i>	
Gow-Chin <i>et al.</i> 2002	Linfocitos humanos Dosis: 0.82 mM	A bajas concentraciones el AA produce 14.8% de rompimientos de cadena sencilla.
Nefic Hilada 2008	Linfocitos humanos Dosis: a)1000µg/ml b) 10 y 20µg/ml	a) Produce rompimientos de cromosomas. b) Produce fallas en el huso mitótico (husos multipolares, segregación multipolar, errores en la segregación cromosómica, formación de puentes entre cromosomas y cromosomas rezagados).
	<i>In vivo</i>	
Podmore <i>et al.</i> 1998	Linfocitos humanos Dosis: oral 500 mg/día/6 semanas	Produce un aumento en el marcador de daño en el DNA 8-oxoadenina, debido a los RL.
Rojas Lemus 2014	Reticulocitos de ratón Dosis: oral 100,150 y 225mg/Kg/día	Aumentó la frecuencia de micronúcleos a dosis bajas durante las 4 semanas de duración del experimento.

En general, el AA es un excelente antioxidante, sin embargo, los estudios relacionados con el efecto adverso que ocasiona en el material genético han generado una alerta ya que es el antioxidante más consumido por la población.

3.2.1.2. Carnosina

Es un dipéptido hidrosoluble compuesto por β -alanina y L-histidina, se encuentra de forma natural en el cuerpo de muchas especies de mamíferos principalmente en el músculo esquelético y en bulbo olfatorio, tomando en cuenta que el músculo esquelético representa un gran porcentaje de la masa corporal total, se calcula que el 99% de la carnosina presente en un organismo se encuentra en el tejido muscular, sin embargo, también se ha detectado en el cerebro, corazón, otros tejidos y fluidos corporales en concentraciones de 10 a 1000 veces menores que en el músculo esquelético (Boldyrev 2013).

El contenido de carnosina en el cuerpo es dependiente de diferentes variables como:

- a) El sexo, ya que se ha observado que los hombres muestran altos niveles de carnosina ~5-6 mM (22- 82%) en comparación con las mujeres ~3-4 mM (Everaert *et al.* 2010) por lo que se ha sugerido que los andrógenos tienen un efecto positivo en la síntesis y contenido de carnosina en los músculos, un estudio muestra que ratones machos castrados reducen los niveles de carnosina en un 40% y las hembras a las que se les administra testosterona incrementan el contenido de carnosina en un 268% (Penafiel *et al.* 2004).
- b) La edad, se ha observado que el contenido de carnosina disminuye en la edad adulta sin embargo aún no se conocen con exactitud las causas (Baguet *et al.* 2012).
- c) La dieta, ya que se ha observado que las personas omnívoras tienen más carnosina que las personas vegetarianas (Everaert *et al.* 2010).

Actividad biológica

-Se ha reportado que la carnosina puede formar complejos con metales de transición como el Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} y Zn^{+2} . Por ejemplo: el complejo carnosina- Zn^{+2} (polaprezinc o Z-103) protege la mucosa gástrica de ulceraciones experimentales *in vivo* (Ko y Leung 2010) y es eficaz contra la gastritis asociada con *Helicobacter pylori* (Ishihara *et al.* 2002).

-Tiene actividad antioxidante, la cual implica mecanismos como la quelación de metales, “barredor” de especies reactivas de oxígeno y radicales peroxilo (Boldyrev 2013).

-Mejora los sistemas antioxidantes endógenos (Aydin *et al.* 2010).

- Actúa contra la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs por su siglas en inglés), los cuales son grupos amino de las proteínas, particularmente de la cadena lateral de lisina, arginina e histidina que reaccionan con carbohidratos reductores, que incluyen a la glucosa, fructosa y triosas, pueden formarse por reacciones oxidantes y no

oxidantes, cuando se forman por reacciones oxidantes estas pueden ser aceleradas por la presencia de metales como el Cu y el Fe. Estos AGEs están involucrados en el proceso de envejecimiento y de enfermedades como la diabetes y el Alzheimer, por lo que la carnosina actúa mediante la quelación de metales para evitar la aceleración de la glicación (Boldyrev 2013).

-Tiene un papel muy importante en las células del músculo esquelético:

- Capacidad amortiguadora de protones: Durante las contracciones musculares de alta intensidad, la glucólisis anaerobia conduce a la producción de ácido láctico que se disocia inmediatamente en protones (H^+) e iones de lactato a valores de pH fisiológicos. La acidosis resultante puede llegar a valores de pH de 6.5 o menos y a menudo se ha asociado con la fatiga muscular contráctil, es por este motivo, que se puede vincular la abundancia de carnosina en el músculo, con la propiedad de secuestrar protones debido a los átomos de nitrógeno de su anillo de imidazol, esto debido a que los valores de pKa de la carnosina están muy cerca de 7.0 por lo que su capacidad para secuestrar protones es alta (Sale *et al.* 2010).

- Protección contra las ERO: A través de su actividad antioxidante (Boldyrev 2013).

- Quelación de metales de transición: A través de su actividad antioxidante (Boldyrev 2013).

- Proveedor extracelular de histidina/alanina: La carnosina se puede liberar al espacio extracelular o hacia las células adyacentes, en los que puede ser utilizada o degradada, por ejemplo, para el uso de L-histidina o alanina (Boldyrev 2012).

Criterios de administración

Algunos estudios han demostrado que la disponibilidad de β -alanina puede limitar la síntesis de carnosina, en contraste con la histidina, que al ser un aminoácido esencial está presente en concentraciones elevadas (Harris *et al.* 2006). La β -alanina es sintetizada en el hígado como el metabolito final de la degradación del uracilo y la timina (Matthews y Traut 1987), pero el mejor recurso para obtener la β -alanina es de la hidrólisis de los dipéptidos de la dieta. Por lo tanto, la suplementación de β -alanina es relevante ya que se ha demostrado que aumenta la síntesis de carnosina en los tejidos (Harris *et al.* 2006).

La ingesta diaria promedio de β -alanina a partir de una dieta de un omnívoro occidental se ha calculado que equivaldría aproximadamente a 330 mg/día (Everaert *et al.* 2010) de los cuales la mayoría proviene de origen animal (carnes rojas, carnes blancas, pescado, etc.).

Los suplementos de carnosina se consumen en dosis de 500 a 1500 mg/día (Producto de la empresa Vitamin World©) y debido a los beneficios en el ejercicio la dosis reportada en suplementos deportivos es de 1067 a 3200mg/día (Productos de General Nutrition Centers, GNC).

Metabolismo

-Absorción, transporte y distribución: La carnosina es sintetizada por una enzima citosólica llamada carnosina sintasa (ATP GD1) la cual es dependiente de ATP y Mg^{+2} está presente principalmente en el músculo esquelético, en ciertas regiones del cerebro y el corazón (Drozak *et al.* 2010).

La carnosina es absorbida en el intestino delgado (Gardner *et al.* 1991) y transportada a través de la membrana celular mediante transportadores de la familia de oligopéptidos acoplados a protones: PEPT1 y PEPT2 (transportador oligopéptido 1 y 2) y PHT1 y PHT2 (péptido/histidina transportador 1 y 2), los miembros de esta familia se destacan por tener una amplia especificidad (Yamashita *et al.* 1997).

-Degradación y excreción: La carnosina no es degradada por las (di)peptidasas, su metabolismo es caracterizado por tener sus propias enzimas hidrolíticas llamadas carnosinasas, de las cuales se han identificado 2 tipos: carnosinasa 1 o carnosinasa de suero y carnosinasa 2 o carnosinasa de tejidos o dipeptidasa citosólica no específica, cada una consta de dos dominios, el A que tiene actividad catalítica y de unión a metales y el dominio B para la dimerización (Teufel *et al.* 2003), algunas de sus características se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3 Enzimas hidrolíticas específicas de la carnosina. Modificado de Boldyrev, 2013.

	Carnosinasa 1	Carnosinasa 2
Otros nombres	Carnosina suero y β -Ala-His dipeptidasa	Dipeptidasa citosólica no específica
Expresión en tejidos humanos	Cerebro, hígado, suero, glomérulos del riñón	Ubicua (menos en el suero o fluido cerebroespinal)
Localización subcelular	Secretada	Citosólica
Cofactor	Zn^{2+} , Cd^{2+}	Mn^{2+}
pH óptimo para la hidrolisis de carnosina	8.5	9.5
Substrato específico	Carnosina>anserina> ofidina > homocarnosina	Anserina/ofidina>carnosina

Cuando la carnosina entra a los enterocitos, una parte es hidrolizada presumiblemente por la carnosinasa 2, y los aminoácidos constituyentes pasan a circulación por medio de los transportadores de aminoácidos y otra parte, pasa sin hidrolizar a través de la membrana basolateral, por medio de los transportadores oligopeptidos (Boldyrev 2013).

Efectos adversos sobre el DNA

No hay efectos adversos reportados.

Efectos protectores sobre el DNA

En la literatura existe evidencia del efecto protector de la carnosina sobre el DNA como se resume en la Tabla 4.

Tabla 4 Muestra el efecto protector de la Carnosina sobre el DNA.

Autor y año	Estudios <i>In vitro</i>	Resultados
Shao <i>et al.</i> 2004	Fibroblastos pulmonares Dosis:20mM	Las células mostraron una tasa lenta de acortamiento en los telómeros y una mayor esperanza de vida en poblaciones que están duplicándose.
Mozdzan <i>et al.</i> 2004	DNA genómico de una ternera Dosis: a)0.5-10mM b) 20mM	a) Reducción del daño en el DNA en el sistema oxidante H ₂ O ₂ CuSO ₄ -ácido ascórbico. b) Inhibió la oxidación de la ribosa en un 60% en medios oxidantes como: CuSO ₄ -H ₂ O ₂ -EDTA, FeSO ₄ -H ₂ O ₂ -EDTA y FeCl ₃ -H ₂ O ₂ -EDTA
Alpsoy <i>et al.</i> 2011	Linfocitos humanos Dosis: a)20mN b)5, 10,15 y 20mM	En presencia de cloroformo la CAR: a) Redujo significativamente el intercambio de cromátidas hermanas. b) Mantuvo los niveles de SOD, GSH y GPx.

3.2.1.3 S-Alil cisteína

La S-alil cisteína (SAC) es un compuesto organosulfurado derivado del ajo, ha sido utilizado como un suplemento dietético común y en la medicina tradicional. La SAC es un derivado del aminoácido cisteína, en el que un grupo alquilo ha sido añadido al átomo de azufre (Imai *et al.* 2014).

Actividad biológica

-Tiene actividad antioxidante, ya que posee un grupo tiol que puede donar fácilmente su protón a una especie electrófila, neutralizándola o haciéndola menos reactiva (Colín-González *et al.* 2012), puede “barrer” eficientemente el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidróxilo y el anión peroxinitrito (Medina-Campos *et al.* 2007).

- Tiene un efecto quelante sobre metales como el hierro y el cobre (Pelizzoni *et al.* 2008).

-Aumenta los niveles de antioxidantes endógenos como la catalasa y la glutatión peroxidasa (Hsu *et al.* 2004).

Criterios de administración

La ingesta de este compuesto no está limitada y en promedio se consumen en suplementos alimenticios 1000mg al día (Producto de empresa naturista Kyolic®).

Metabolismo

En ratas, la farmacocinética de la SAC tras la administración oral consta de tres fases: dos fases muy rápidas (absorción y distribución), seguido de una fase de eliminación lenta, debido a su reabsorción (Colín-González *et al.* 2012 y Nagae *et al.* 1994).

-Absorción, transporte y distribución: La SAC es soluble en agua y es fácilmente absorbida en el tracto gastrointestinal y puede ser detectada 8 horas después de la administración. Se distribuye en varios órganos como el corazón, bazo, pulmón, cerebro y se encuentra en mayor concentración en el riñón y en el hígado y su vida media es de 2.7h (Yan y Zeng 2005, Nagae *et al.* 1994).

-Degradación y excreción: La SAC es eliminada por medio de la orina y se han identificado los siguientes metabolitos: N-acetil S-alil cisteína sulfóxido (Nac-SACs), S-alil cisteína sulfóxido (SACS) y L-γ-glutamil S-alil cisteína y principalmente N-acetil S-alil cisteína (Nac-SAC) (Colín-González *et al.* 2012). Este último metabolito sugiere que la SAC es metabolizada en el riñón y en el hígado por la N-acetil transferasa para formar Nac-SAC. Sin embargo, se ha demostrado que cuando la SAC se elimina casi por completo del hígado, se retiene una relativamente alta concentración en el riñón. Por lo tanto, se puede especular

que la SAC puede ser transformada en N-acetil-SAC por N-acetil transferasa en el hígado y a continuación, una parte de N-acetil-SAC puede ser desacetilada a SAC por la amilasa en el riñón, seguido de su reabsorción (Nagae *et al.* 1994).

Efectos adversos generales

Se han observado efectos adversos en dosis orales mayores a 500mg/Kg en ratas macho: aumento del pH urinario, disminución de los niveles de urobilinógeno en la orina y en ratas hembra: aumento de los niveles de glucosa, lo que sugiere que la SAC induce atrofia del páncreas y disminuye la secreción de insulina, ocurren modificaciones renales (disminución del nitrógeno de urea en sangre y de la creatinina en suero) y modificaciones hepáticas (aumento del colesterol en suero, proteínas, lípidos y concentraciones de fosfatasa alcalina) y en ambos sexos disminución del hematocrito y hemoglobina (Kodera *et al.* 2002).

Al contener azufre y al ser hidrosoluble, su consumo excesivo puede causar efectos adversos como: dolor abdominal, vómito o diarrea (Consulta en línea “Toxicología”)

Efectos adversos sobre el DNA

No hay estudios donde se reporte la interacción del SAC con el DNA.

3.3 Autoadministración y libre venta de antioxidantes

Debido al papel fundamental de los antioxidantes en la vida, en la salud humana y a su general popularidad (debido a una mayor difusión de sus beneficios), la demanda de estos compuestos por el público en general, ha aumentado recientemente (Bouayed y Bohn 2010).

Los suplementos alimenticios (vitaminas, minerales, hierbas o productos a base de plantas, algas, levaduras, hongos y muchas otras sustancias o extractos que incluyen aminoácidos o enzimas) no requieren contar con registro sanitario, es decir, no pasan pruebas exhaustivas para demostrar su eficacia, calidad y seguridad antes de ser comercializados, su vigilancia se realiza cuando ya están en el mercado por lo que pueden ser adquiridos sin receta médica ya que son de libre venta (Cofepris 2010) y se espera que para el 2020 en México el precio de estos suplementos llegue a recaudar \$22 000 millones de pesos, ya que año con año aumenta su demanda entre la población (Euromonitor 2015).

A pesar de los beneficios que generan, la FDA (Food and Drug Administration) dió a conocer que el número de informes de efectos adversos de suplementos ha aumentado cada año:

- 2010: 1,009 informes de efectos adversos
- 2011: 2,047 informes de efectos adversos
- 2012: 2,844 informes de efectos adversos
- 2013: los informes sobre efectos adversos representaron más de 100,000 llamadas a los centros de toxicología de Estados Unidos.

No obstante, la mayoría de las personas que sufren efectos secundarios y/o enfermedades no llaman a los centros de control de envenenamiento o al fabricante de suplementos, por lo que las cifras reportadas son estimaciones muy bajas de lo que realmente acontece) (American Cancer Society, 2015).

De igual manera hay reportes que contradicen la eficacia de los antioxidantes, argumentando dos posibles razones: (American Cancer Society, 2015)

- a) Las megadosis, a pesar de que su auge fue en la década de los 90's hoy en día aún se cree que "más es mejor". Sin embargo, hay estudios en donde compuestos administrados en dosis altas pueden resultar perjudiciales (American Cancer Society, 2015)
- b) Falta de conocimiento del mecanismo de acción en patologías, principalmente en el cáncer (American Cancer Society, 2015).

A pesar de los efectos adversos reportados, la información sobre los efectos sistémicos y sobre las biomoléculas más importantes (como el DNA) de los antioxidantes, es escasa o inexistente en la literatura, por tal motivo, es de primordial importancia evaluar estos efectos en el material genético mediante diferentes pruebas.

4. Pruebas para detección de genotoxicidad

En los últimos años, las pruebas para detectar el daño al DNA son de gran importancia, ya que el conocimiento adquirido acerca de los eventos genéticos evaluados por estas pruebas, permiten comprender la alteración del material genético en los organismos causado por un agente (xenobiótico, molécula, toxina, compuesto), ya que éstos pueden causar mutaciones en células germinales y somáticas, inducir enfermedades, iniciar procesos carcinogénicos o de transformación tumoral de las células (Guzmán-Rincón *et al.* 1995, Gómez-Meda *et al.* 2007).

Con el objeto de evaluar la interacción y/o el efecto mutagénico potencial sobre el DNA que distintos compuestos pueden ejercer, se utilizan diferentes ensayos para la detección

de genotoxicidad (Nigro *et al.* 2009) tanto en sistemas procariontes como eucariontes (Fernández *et al.* 2003). Entre ellas están: la prueba de Ames, aberraciones cromosómicas, (Fatima *et al.* 2001) aductos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), intercambio de cromátidas hermanas (ICH) (Norppa 2004), el ensayo cometa (Rojas *et al.* 2000) y el ensayo de micronúcleos (Krishna y Hayashi 2000).

4.1 Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina

La toxicología genética estudia los efectos adversos en el proceso de la herencia mediante una serie de técnicas *in vitro* e *in vivo*, diseñadas para evaluar los efectos de los agentes sobre los mecanismos genéticos y el consiguiente riesgo para los organismos, incluyendo a los seres humanos. Existen tres niveles de mutación: genes, cromosomas y aparato mitótico, por lo que, es preciso proporcionar una amplia cobertura del potencial mutagénico y carcinogénico de un agente. En este sentido, el ensayo de micronúcleos se ha utilizado ampliamente para evaluar la genotoxicidad, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Krishna y Hayashi 2000).

La evaluación de la frecuencia de micronúcleos *in vivo* es la principal prueba en una serie de pruebas de genotoxicidad y está recomendada por los organismos reguladores de todo el mundo para ser llevado a cabo como parte de la evaluación de la bioseguridad (Krishna y Hayashi 2000). Así mismo, la alta fiabilidad y el bajo costo de la técnica, han contribuido a la adopción de este biomarcador y a su éxito en todo el mundo (Bonassi *et al.* 2006).

El propósito del ensayo de micronúcleos es identificar sustancias que causan la formación de micronúcleos (en hematología conocidos como cuerpos de Howell-Jolly), que se forman durante la transición de metafase-anafase, como resultado de la fragmentación de cromosomas (clastogenicidad) o de pérdida de cromosomas completos debido a la disfunción del aparato mitótico (aneugenicidad). Cuando esto ocurre el material genético que se desprende y que, por tanto, queda excluido no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, originando uno o varios núcleos de menor tamaño que el principal y se denomina “micronúcleo” (Schmid 1975, Krishna y Hayashi 2000), esta prueba se puede realizar en células de: córnea, vejiga urinaria, esófago, cavidad nasal, mucosa oral y en células eritropoyéticas de médula ósea (Krishna y Hayashi 2000, Morita *et al.* 2011).

El ensayo de micronúcleos con naranja de acridina, utiliza las células de la médula ósea debido a que es un órgano hematopoyético, en el que las células madre forman la base de la eritropoyesis con etapas de proliferación y maduración (Krishna y Hayashi 2000).

Durante la proliferación, las células se dividen normalmente, pero en el momento en que es administrado un agente éste puede actuar y causar daño a los cromosomas, de igual manera puede actuar en macromoléculas relacionadas con la función de disyunción de

cromátidas. Estas anomalías ocasionadas (pérdida de un fragmento o un cromosoma completo) generalmente quedan fuera durante la división celular y no pueden integrarse en los núcleos de las células hijas formando micronúcleos, que se pueden ver en el citoplasma (Krishna y Hayashi 2000).

Durante la maduración, se libera a la circulación un eritroblasto que se transforma en eritrocito policromático o reticulocito (eritrocito joven que todavía contiene RNA y se formó 24 horas antes de su liberación), en el que el núcleo principal es expulsado, contrario a cualquier micronúcleo que se ha formado ya que éste permanece en el citoplasma (Krishna y Hayashi 2000).

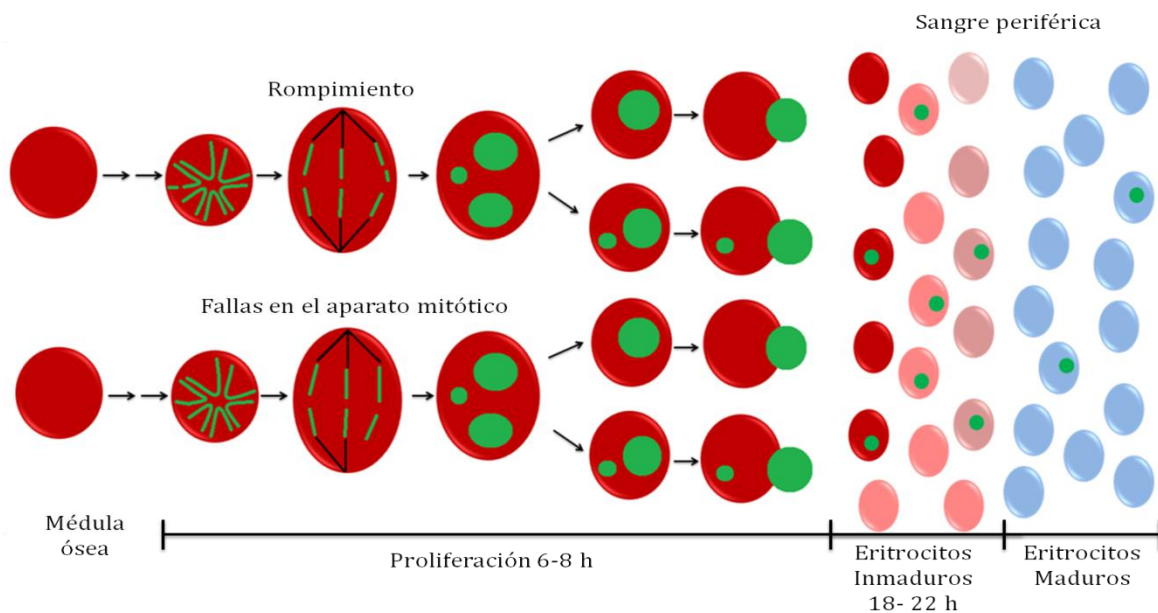


Figura 2 Modelo de formación de micronúcleos en eritrocitos de la médula ósea por efectos clastogénicos (rompimientos) y por aneuploidogénicos (fallas en el aparato mitótico). Modificado de Hayashi 2005.

Por lo tanto, un aumento en la frecuencia de reticulocitos micronucleados es una indicación de daño cromosómico inducido por agentes clastógenos o aneuploidogénicos (Schmid 1975, Krishna y Hayashi 2000). Sin embargo, la técnica por sí misma no puede identificar el origen del MN pero pueden llevarse a cabo estudios adicionales para identificar el origen de los micronúcleos por ejemplo: hibridación fluorescente *in situ* (FISH), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de cariotipo (Krishna & Hayashi., 2000, Calasanz 2001).

Basándonos en lo anterior, el ensayo de naranja de acridina es idóneo debido a que otorga una tinción diferencial ya que fluorocromiza de color amarillo-verde limón el DNA y naranja el RNA (Krishna y Hayashi 2000) Figuras 3 y 4.

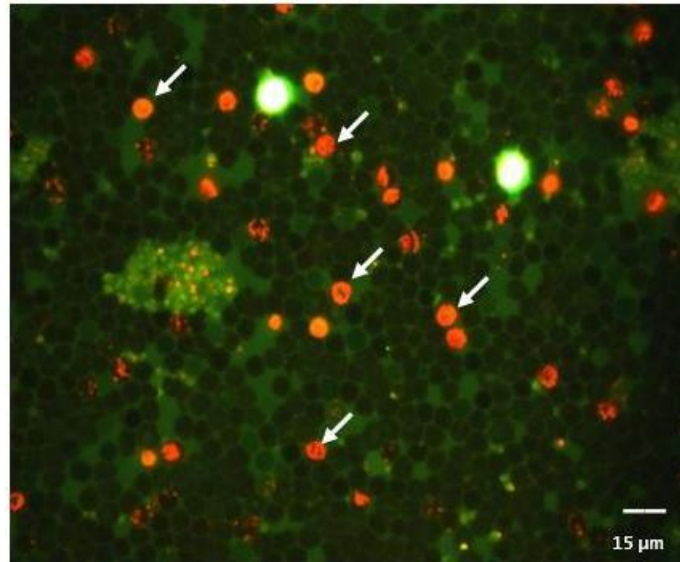


Figura 3 Observación de reticulocitos con naranja de acridina (Flechas).

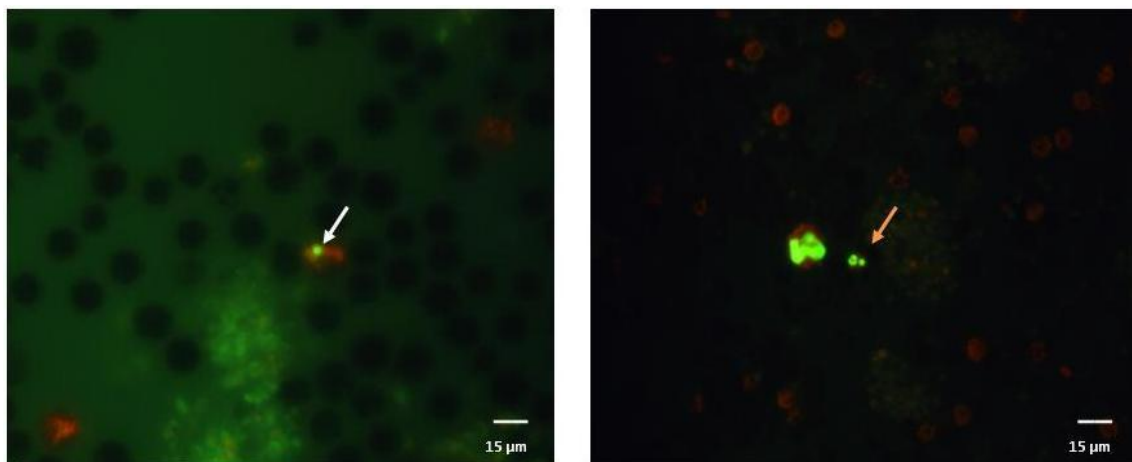


Figura 4 Observación de un reticulocito con un micronúcleo (Flecha blanca) y de un reticulocito con 2 micronúcleos (flecha naranja), obsérvese la fluorescencia diferencial.

4.2. Ensayo cometa pH13

El ensayo cometa evalúa el daño al DNA ocasionado por una exposición reciente y en una etapa temprana, por lo que la célula puede potencialmente reparar al DNA dañado (Maluf y Erdtmann 2001). Su nombre deriva de la apariencia del DNA de las células tras la realización del ensayo: una cabeza intensamente brillante la cual es DNA sin daño y una cola cuya longitud e intensidad están relacionadas con la cantidad de rompimientos de cadena del DNA (Figura 5). Esto se debe a la migración de los rompimientos de cadena del DNA hacia el ánodo durante una electroforesis horizontal (Pérez-Cadahía 2004).

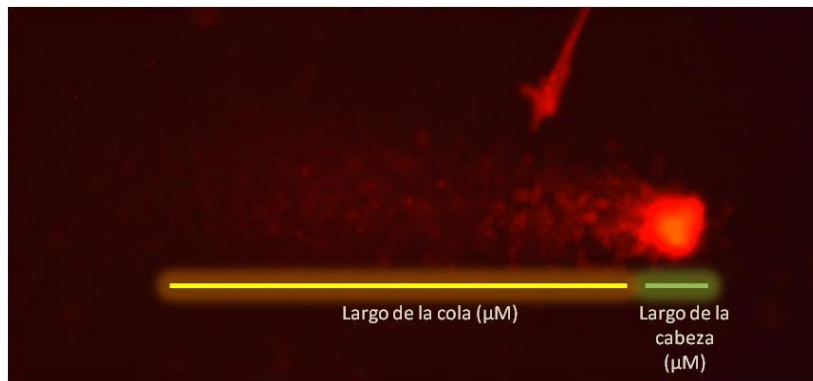


Figura 5 Célula al término del ensayo cometa

Los primeros en cuantificar el daño al DNA en las células utilizando una técnica de electroforesis de microgel conocida como "electroforesis en gel de una célula " o "ensayo cometa" fueron Ostling y Johanson (1984). Sin embargo, las condiciones neutras que utilizaron sólo permitían la detección de rompimientos de doble cadena. Más tarde, el protocolo fue modificado por Singh *et al.* (1988) para su uso en condiciones alcalinas, ésta versión permitió evaluar rompimientos en el DNA de cadena sencilla y detectar sitios álcali-lábiles.

Durante la última década, el ensayo cometa, o electroforesis en gel de una sola célula (SCGE) se ha convertido en uno de los métodos estándar para la evaluación de daños en el DNA, se aplica por lo general a las células animales ya sea en cultivo o aislado del organismo, (por ejemplo, linfocitos aislados de la sangre ó células disgregadas de diferentes tejidos) (Tice *et al.* 2000, Collins 2004) y tiene aplicaciones en diferentes áreas de investigación como: pruebas de genotoxicidad, control biológico, epidemiología molecular, genotoxicología ecológica así como en la investigación en el daño y reparación del DNA (Collins 2004, Cortés-Gutiérrez *et al.* 2011).

En comparación con otros ensayos de genotoxicidad, el ensayo cometa otorga múltiples ventajas: es muy sensible, detecta bajos niveles de daño, utiliza un pequeño número de

células por muestra, es flexible, es de bajo costo, fácil aplicación y puede utilizarse en estudios *in vivo* e *in vitro* (Tice *et al.* 2000). Para la evaluación de resultados es necesario realizar simultáneamente un ensayo de citotoxicidad, ya que está relacionada con el nivel del daño al DNA y aunque no se han llevado a cabo estudios de los niveles de citotoxicidad aceptable para el ensayo cometa (*in vivo*), la viabilidad celular que está por debajo del 70 al 80% es considerada excesiva para la validación de la prueba (Tice *et al.* 2000, Collins 2004).

5. Prueba para detección de citotoxicidad: Viabilidad celular por fluorocromos

La viabilidad celular por fluorocromos con FDA (diacetato de fluoresceína) y Bromuro de etidio, se basa en el principio general en el cuál las células viables tienen la propiedad de hidrolizar por medio de esterasas el FDA (no fluorescente), el cual es un éster no polar que pasa a través de las membranas plasmáticas convirtiéndolo en fluoresceína y debido a que la membrana celular está intacta éste tiende a acumularse intracelularmente y puede ser observado de un color verde fluorescente en condiciones de excitación apropiada. Por otra parte, el bromuro de etidio tiende a penetrar a las células lentamente, sin embargo, en las células que están muertas éste tiende a penetrar más rápidamente otorgando a la célula un color rojo brillante debido a su combinación con el DNA (Kvach *et al.* 1983, Bank 1987).

El resultado de esta técnica genera un fuerte contraste entre las células vivas (con fluorescencia verde) y las células muertas (fluorescencia roja), permitiendo sacar un porcentaje (Takasugi 1971).

6. Justificación

Debido a la sobrevaloración de los beneficios que generan los antioxidantes y su general popularidad debido a una mayor difusión ha ocasionado un incremento en la autosuplementación ya que se pueden consumir sin prescripción, sin supervisión médica y son fáciles de conseguir ya que son de libre venta y toda la población tiene acceso a ellos por lo que los consumen aunque se encuentren sanos, sin considerar los posibles efectos adversos.

Así mismo, se ha observado un aumento en los reportes por intoxicación con antioxidantes, sin embargo la información sobre los efectos sistémicos y sobre las biomoléculas más importantes (como el DNA) es escasa o inexistente en la literatura.

7. Hipótesis

Si el ácido ascórbico, la carnosina y la S-alil cisteína tienen actividad citotóxica y genotóxica *in vivo*, entonces se observará muerte celular y daño al DNA que se observará en forma de rompimientos de cadena sencilla y micronúcleos.

8. Objetivos

8.1 Objetivo general

Evaluar la genotoxicidad y la citotoxicidad en ratones machos de la cepa CD1, suplementados con distintos antioxidantes.

8.2 Objetivos particulares

Evaluar en sangre periférica de ratones adultos de la cepa CD1, con administración oral diaria de: Ácido ascórbico, Carnosina o S-alil cisteína:

- El efecto citotóxico mediante viabilidad celular por fluorocromos en leucocitos.
- Los rompimientos de cadena sencilla del DNA mediante ensayo cometa alcalino en leucocitos.
- La presencia de remanencias de DNA mediante la técnica de micronúcleos con naranja de acridina, en reticulocitos.

9. Método

9.1. Selección de grupos expuestos y toma de muestras

Se emplearon 40 ratones machos adultos (60 días) de la cepa CD1 con alimento Rodent Laboratory Chow y agua *ad libitum* y se subdividieron en 4 grupos como lo muestra la siguiente tabla.

Tabla 5 Muestra la relación de los grupos de trabajo y su variable (antioxidante).

GRUPO	COMPUESTO
1	Ácido ascórbico
2	Carnosina
3	S-alil cisteína
4	Testigo

Se tomó sangre entera de la vena caudal del ratón la cual se procesó para realizar las técnicas de viabilidad celular por fluorocromos, ensayo cometa y ensayo de micronúcleos con naranja de acridina durante los siguientes tiempos: 0 horas (antes de la primer administración del antioxidante), 24 horas (transcurrida la primer administración), 48 horas (transcurrida la segunda administración) y posteriormente cada 7 días hasta completar 28 días.



Figura 6. *Izquierda:* corte de la vena caudal. *Centro:* Toma de muestra de la vena caudal. *Derecha:* Detalle de la toma de muestra (Fotografías cortesía de Luz Tabarez).

9.2 Administración oral de antioxidantes

La administración oral se realizó diariamente durante los 28 días de duración del experimento y para realizarla primero se pesó cada ratón y posteriormente con la ayuda de una micropipeta se tomó la dosis correspondiente de cada uno de los antioxidantes tomando en cuenta la siguiente tabla.

Tabla 6 Tabla de dosificación de los antioxidantes, muestra la dosis que se administró a un ratón la cual es equivalente a la dosis media consensual del consumo de cada uno de los antioxidantes en un humano de 60 Kg.

ESPECIE	ÁCIDO ASCÓRBICO	CARNOSINA	S-ALIL CISTEÍNA
HUMANO (60Kg)	Dosis reportadas: 10-2500mg/día \bar{X} =1000mg/día	Dosis reportadas: 500-1500mg/día Dosis en productos deportivos: 1067-3200mg/día \bar{X} =1000mg/día	Dosis reportada: 1000mg/día \bar{X} =1000mg/día
RATÓN	\bar{X} =17mg/Kg/día	\bar{X} =17mg/Kg/día	\bar{X} =17mg/Kg/día



Figura 7. Muestra como se pesó cada uno de los ratones (Fotografía cortesía de Luz Tabarez).

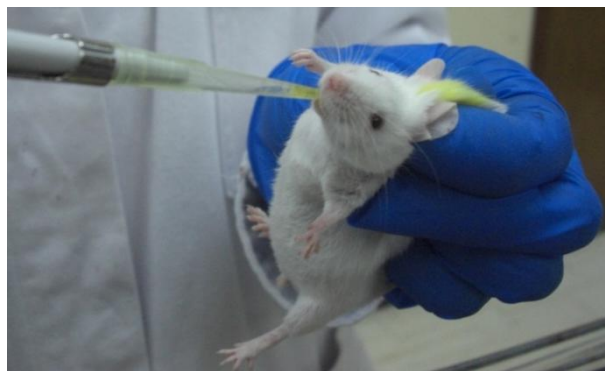


Figura 8. Muestra el procedimiento de la administración oral de los antioxidantes (Fotografía cortesía de Luz Tabarez).

9.3. Estrategias experimentales

9.3.1 Viabilidad celular por fluorocromos

La técnica de viabilidad celular por fluorocromos se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Strauss (1991) con algunas modificaciones. Se disolvieron 0.01g de diacetato de fluoresceína (FDA) en 2mL de acetona y 0.01g de bromuro de etidio (BrEt) en 5mL de buffer de fosfatos (PBS). Posteriormente se tomaron 15 μ L de FDA, 2.4 mL de PBS y 100 μ L de BrEt y se depositaron en un frasco cubierto para impedir la entrada de luz a la solución.

Se tomó una muestra de sangre entera y se mezcló en proporción 1:1 con la solución FDA-PBS-BrEt y se observó en el microscopio de fluorescencia (con aumento de 20X). Se contaron en campos al azar 100 células de las cuales se sacó la proporción de células vivas (las cuales se encontraban metabólicamente activas y emitían color verde fluorescente) y las células muertas (las cuales emitían un color rojo fluorescente) Figura 9.

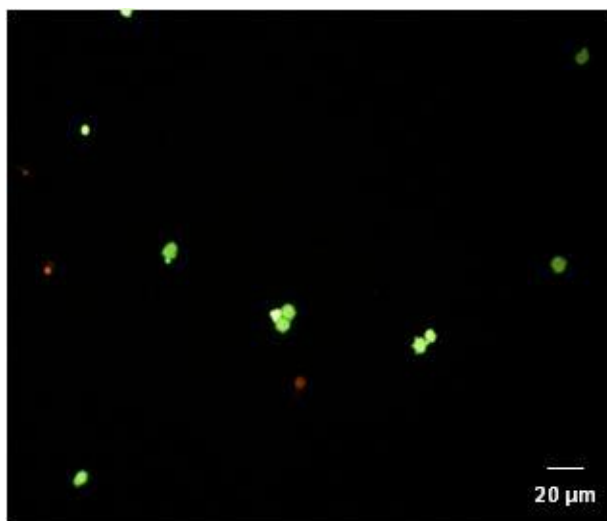


Figura 9. Campo donde se observan las células vivas (verde fluorescente) y muertas (rojo fluorescente).

9.3.2 Ensayo cometa pH13

El ensayo cometa alcalino se llevó acabo de acuerdo a Singh *et al.* (1988) con algunas modificaciones.

Preparación de laminillas: Los porta objetos se cubrieron con una capa de agarosa de punto de fusión normal (APFN) disuelta al 0.5% en buffer de fosfatos (PBS) y se secaron en la estufa a 60°C.

Toma de muestras: Se tomaron 5µL de sangre entera de la vena caudal de un ratón y se mezclaron con 150µL de agarosa de bajo punto fusión (APFB) la cual se disolvió al 0.5% en PBS, de este preparado se realizaron muestras por duplicado colocando 75µL en cada laminilla a la que previamente se le adicionó una capa de APFN, se colocaron los cubre objetos y se pusieron las laminillas en hielo hasta que solidificó el gel, posteriormente se les colocó una tercer capa de APFB se cubrieron nuevamente y se mantuvieron en hielo hasta que solidificó el gel.

Desenrollamiento y electroforesis: Después de la solidificación se procedió a remover el cubreobjetos y las laminillas se colocaron en una solución de lisis (NaCl 2.5M, Na₂ EDTA

100mM, Tris 0.01M, Tritón x-100 1% y DMSO10%) donde permanecieron al menos 24 horas a 4°C.

En una cámara de electroforesis horizontal se colocaron las muestras embebidas en un buffer de corrida (NaOH 300mM, Na₂ EDTA 1mM, pH13) durante 20 minutos (tiempo de desenrollamiento del DNA) y posteriormente 20 minutos más para el corrimiento a 300 mA y 25 V.

Posteriormente, se realizaron lavados en una solución Tris pH 7.5 durante 15 min. Finalmente, se fijaron con etanol absoluto.

Fluorocromización y evaluación de resultados: Para la observación de las muestras se fluorocromizaron con bromuro de etidio (0.02mg/ml) y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Para categorizar el daño se midió al azar la longitud de la cola de 200 nucleoides por muestra y de acuerdo con la longitud de la cola del cometa se clasificaron en 5 categorías: 1 (sin daño), 2 (daño bajo), 3 (daño medio), 4 (daño alto) y 5 (daño total), al final se calculó un índice de migración (Img) de acuerdo con Rodríguez Mercado *et al.* (2011) el cuál sirvió para la interpretación de los resultados.

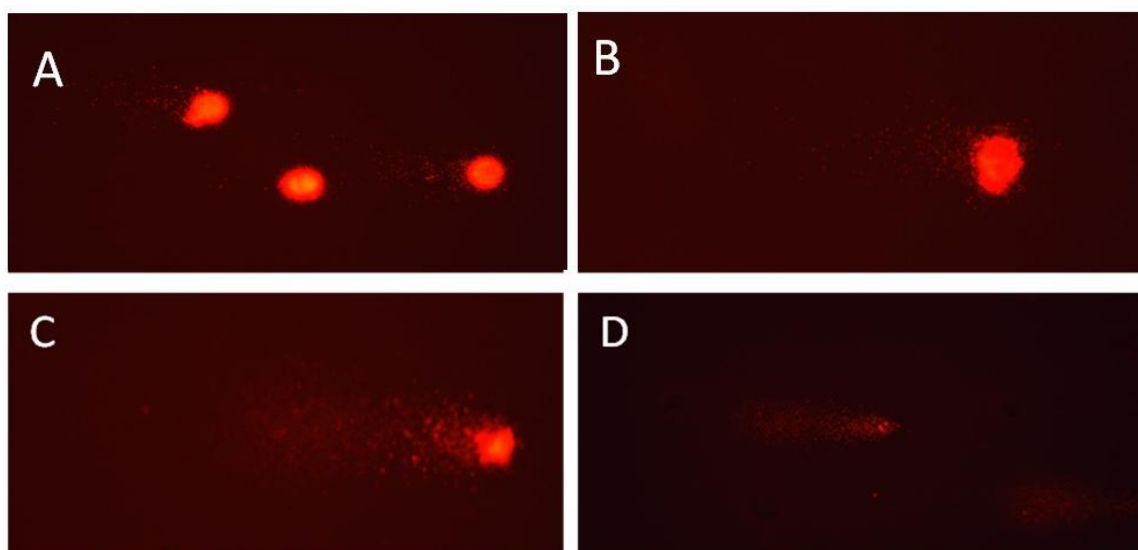


Figura 10. Campo donde se observan las diferentes categorías de daño al DNA. **A** muestra categoría 1 (sin daño) y 2 (bajo), **B** muestra la categoría 3 (medio), **C** muestra la categoría 4 (alto) y **D** muestra la categoría 5 (daño total).

9.3.3 Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina

Preparación de laminillas: Se prepararon laminillas cubiertas de naranja de acridina (NA) con base en la técnica de Krishna y Hayashi (2000). La NA se preparó en una solución con agua destilada (1mg/ml), de la cual se tomó una pequeña cantidad y se colocó en un portaobjetos precalentado (alrededor de 70°C). Con ayuda de otro portaobjetos, se extendió el colorante y se dejó secar a temperatura ambiente. Las laminillas se guardaron en la oscuridad hasta su uso.

Toma de muestras: Se tomaron 5µL de sangre entera de la vena caudal de un ratón y se colocaron en las laminillas previamente preparadas con NA, inmediatamente se colocó un cubreobjetos y las muestras se mantuvieron a 4°C durante 24 h y hasta 2 días. La toma de muestras se realizó por duplicado.

Evaluación de resultados: Se realizó bajo un microscopio de fluorescencia y se identificó en la muestra la tinción diferencial que se obtuvo con la NA, ya que esta tiñe de color rojo el RNA que se observó en los reticulocitos y de amarillo verde limón el DNA que se observó en los leucocitos y en los micronúcleos. Por cada laminilla se cuantificó el número de reticulocitos en 1000 eritrocitos, posteriormente por cada 2000 reticulocitos el número de MN encontrados y se calculó la frecuencia de micronúcleos en reticulocitos.

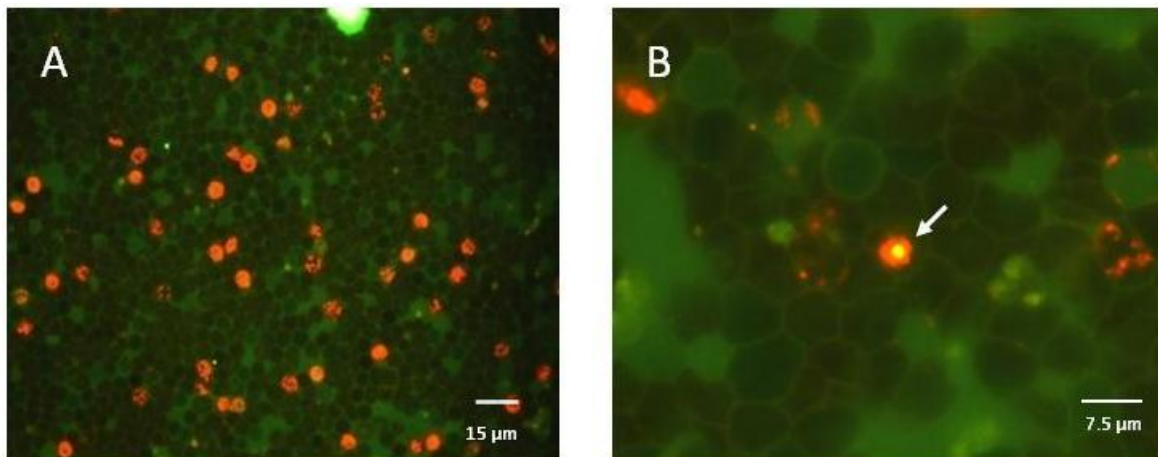


Figura 11. **A** Observación del campo de conteo de reticulocitos, **B** Observación de un reticulocito con un micronúcleo (Flecha), obsérvese la fluorescencia diferencial.

9.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism (versión 5.0). Para identificar diferencias entre el grupo se utilizó la prueba de ANOVA $p \leq 0.05$ y *post hoc* Tukey. Para la comparación del antioxidante versus grupo testigo se utilizó la prueba de t-Student $p \leq 0.05$ (dos colas, no pareada).

Los datos están reportados como media \pm error estándar y los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

10. Resultados

10.1 Efecto citotóxico

Viabilidad celular: En los tres antioxidantes, no se observó disminución de la viabilidad celular durante todo el experimento, ésta se mantuvo por arriba del 90% (Figuras 12 y 13) y se observó un aumento significativo respecto al grupo testigo en los grupos CAR (A) y SAC (B) (Figura 13).

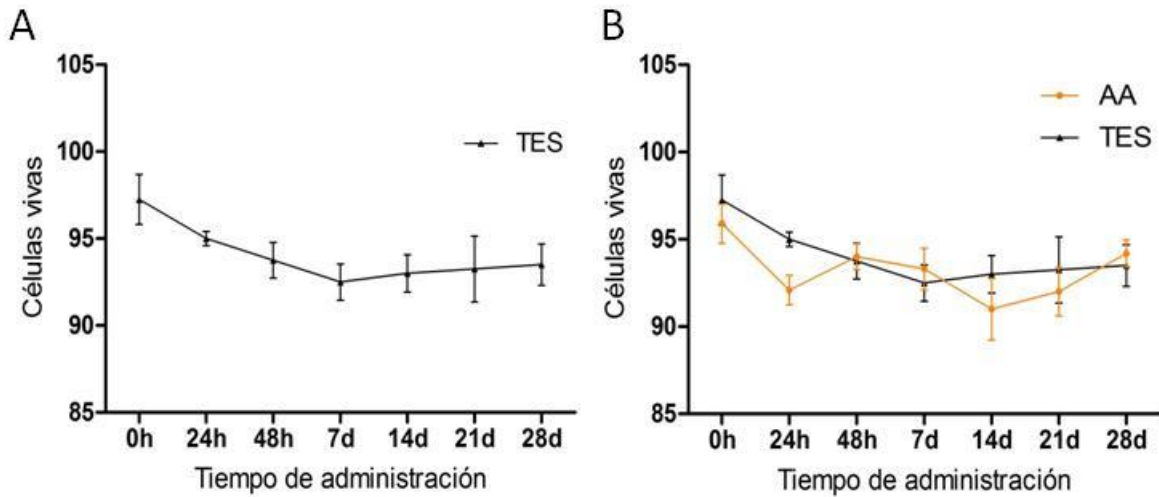


Figura 12 Viabilidad celular, A: no se observó citotoxicidad espontánea en el grupo testigo, B: no se observaron diferencias significativas entre el grupo testigo y el grupo ácido ascórbico.

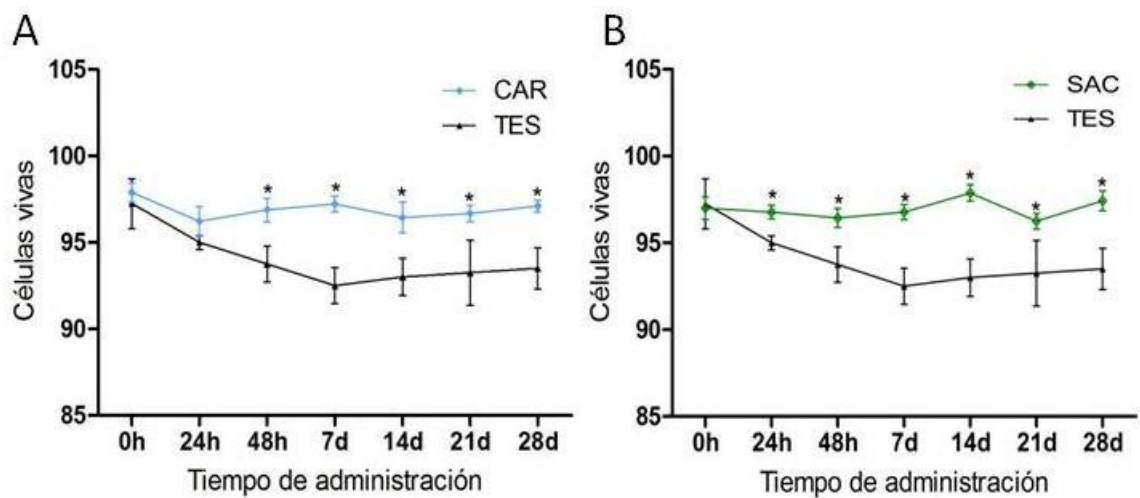


Figura 13 Viabilidad celular, A: se observó un aumento significativo en la viabilidad celular entre el grupo carnosina y el grupo testigo desde las 48h y hasta los 28d, B: se observó un aumento significativo en la viabilidad celular entre el grupo S-alil cisteína y el grupo testigo desde las 24h y hasta los 28d t Student $p \leq 0.05$

10.2 Efecto genotóxico

10.2.1 Ensayo cometa alcalino

Ensayo cometa alcalino: Durante todo el experimento en los tres antioxidantes: AA, CAR y SAC no se observaron rompimientos de cadena sencilla respecto al grupo testigo (Figuras 14 y 15).

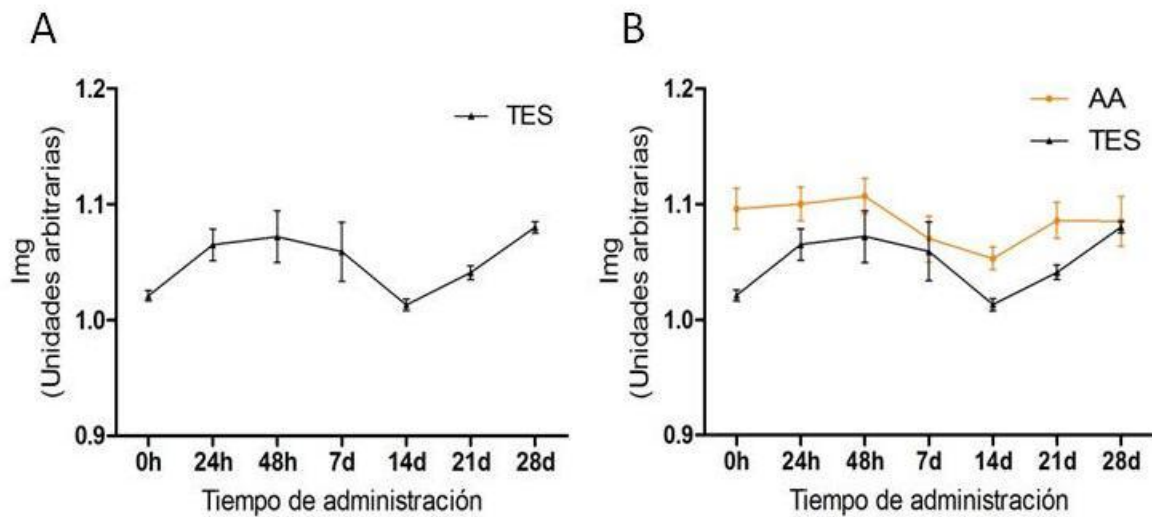


Figura 14. Ensayo cometa, A: No hubo rompimientos de cadena sencilla espontáneos en el grupo testigo, B: no hubo diferencias significativas durante todo el experimento entre el grupo testigo y el ácido ascórbico.

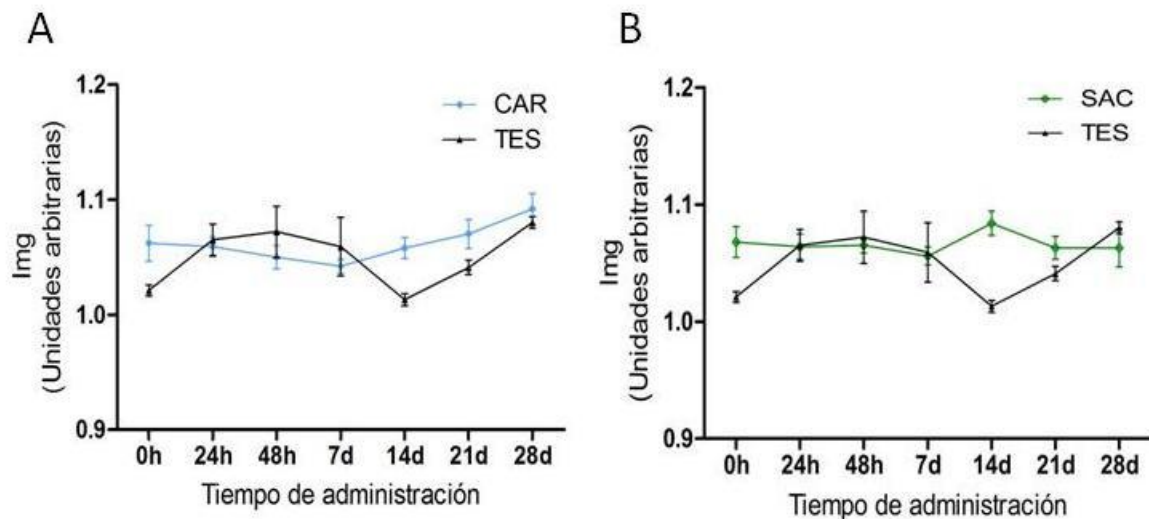


Figura 15. Ensayo cometa, No hubo diferencias significativas durante todo el experimento entre el grupo testigo y carnosina (A), de igual manera entre el grupo testigo y S-alil cisteína (B).

10.2.2 Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina

Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina: El grupo TES no presentó aumento significativo en la frecuencia de MN durante todo el experimento (Figura 16 A) al igual que en el grupo CAR (Figura 17 A), sin embargo, en los grupos AA y SAC se observó el aumento significativo en la frecuencia de MN respecto al grupo TES a partir de las 24h y hasta el término del experimento (Figura 16 B y Figura 17 B respectivamente).

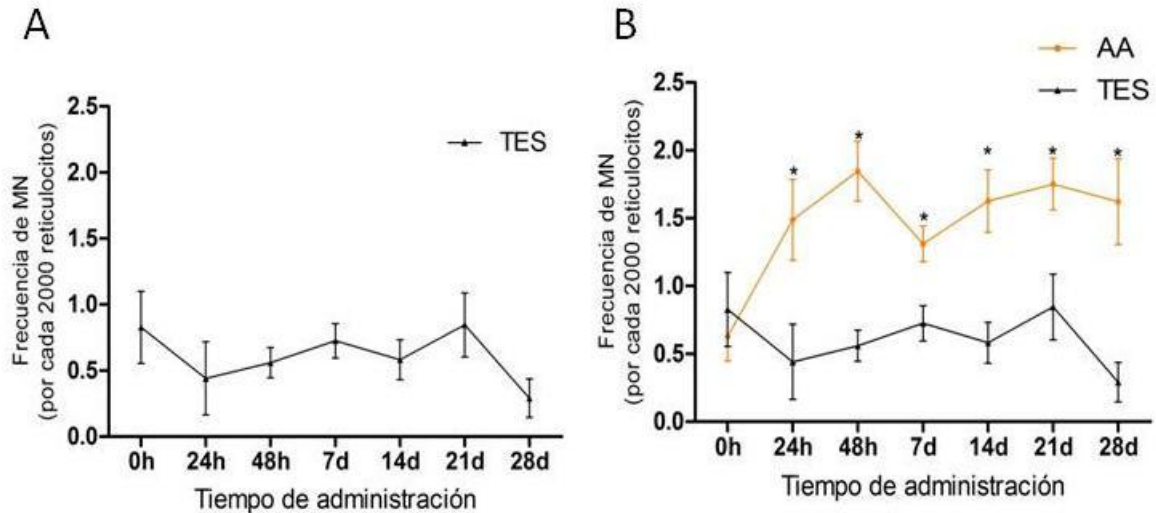


Figura 16. Ensayo de MN, A: en el grupo testigo no se observó aumento en la frecuencia de MN en ningún tiempo durante todo el experimento, B: desde las 24h y hasta los 28d el ácido ascórbico aumento significativamente la frecuencia de MN, t Student $p \leq 0.05$.

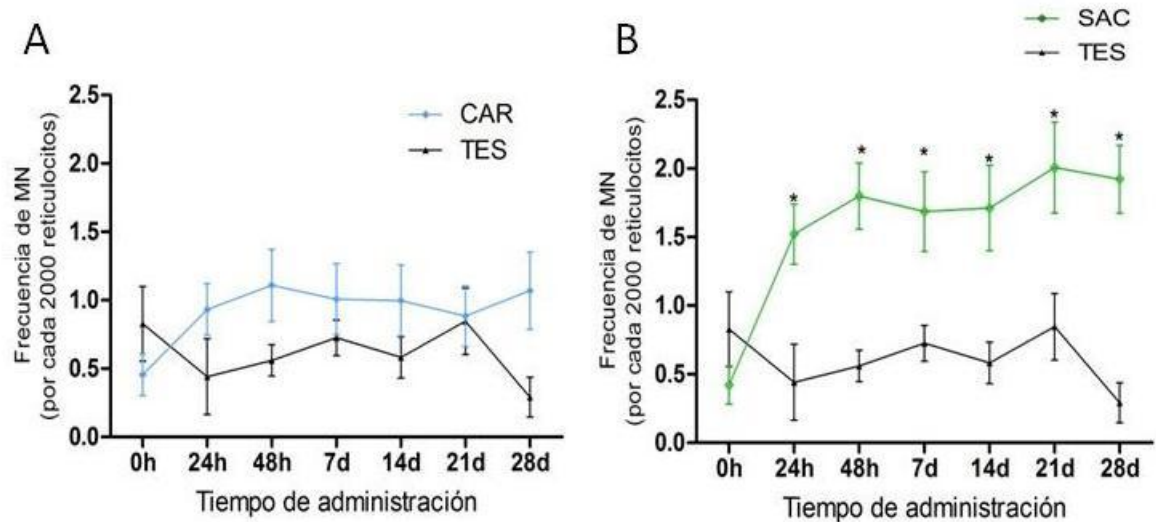


Figura 17. Ensayo de MN, A: en el grupo carnosina no se observó aumento en la frecuencia de MN en ningún tiempo durante todo el experimento, B: en el grupo S-alil cisteína, se observó un aumento significativo en la frecuencia de MN desde las 24h hasta los 28d, t Student $p \leq 0.05$.

10.3 Resumen de resultados

El grupo AA

- Mantuvo la viabilidad celular por arriba del 90%.
- No generó rompimientos de cadena sencilla durante todo el experimento.
- Aumentó la frecuencia de MN a partir de las 24h y hasta los 28d.

El grupo CAR

- Aumentó significativamente la viabilidad celular respecto al grupo testigo a partir de las 48h y hasta los 28d.
- No generó rompimientos de cadena sencilla durante todo el experimento.
- No aumentó la frecuencia de MN durante todo el experimento.

El grupo SAC

- Aumentó significativamente la viabilidad celular respecto al grupo testigo a partir de las 24h y hasta los 28d.
- No generó rompimientos de cadena sencilla durante todo el experimento.
- Aumentó significativamente la frecuencia de MN a partir de las 24 h y hasta los 28d.

11. Discusión

11.1 Importancia de los resultados obtenidos mediante el ensayo de MN

Dado los resultados obtenidos en la prueba de micronúcleos con naranja de acridina, es de vital importancia comprenderlos desde el punto de vista general, es decir, lo que sucede en un individuo.

El ensayo de micronúcleos con naranja de acridina, utiliza las células de la médula ósea debido a que es un órgano hematopoyético, donde las células madre forman la base de la eritropoyesis y están en constante división (Krishna y Hayashi 2000), por lo que es importante saber el número de células generadas por día y cuantas de esas células, según nuestros resultados, podrían tener pérdida de material genético evidenciado en micronúcleos

El bazo es el encargado de retirar a los eritrocitos micronucleados de la circulación, por lo tanto, los MN generados no tienen un impacto perjudicial en estas células, no así en el resto de los tipos celulares (Zuñiga *et al.* 2006).

El ensayo de MN nos da un panorama de lo que ocurre en células que están en proliferación. Si se calcula la cantidad de micronúcleos en eritrocitos en los que se observa una frecuencia de 2MN por cada 2000 células, entonces en 1 día 200 millones de células sufrieron daño genotóxico al menos en la eritropoyesis, debido a que la médula ósea produce en 1 día 200,000 millones de eritrocitos, lo que nos conduce a dimensionar la idea del número total de células que sufrieron daño genotóxico por cada estirpe celular que se divide (Tabla 7).

Tabla 7 Muestra el número de eritrocitos normales y con 2 MN generados por 1 día.

Tiempo	Eritrocitos generados
1 día	200,000 millones
1 día	2MN por cada 2000→200 millones

11.2 Ácido ascórbico

El antioxidante ácido ascórbico, no tuvo actividad citotóxica y mantuvo una viabilidad celular mayor al 90%, comprobando lo observado *in vivo* por Rojas Lemus (2014) e *in vitro* por Gow-Chin *et al.* (2002). Por otra parte, Sakagami (1996) mostró que el AA genera citotoxicidad contra las células cancerosas (HL-60 de leucemia promielocítica humana) inducida por el aumento del radical ascorbil, causando incremento del calcio intracelular, que se traduce en una señal de apoptosis. Sin embargo, en la presente investigación el AA

no mostró citotoxicidad en leucocitos, lo que sugiere, que AA genera citotoxicidad contra las células cancerosas pero no citotoxicidad frente a los leucocitos normales.

El rompimiento de cadena sencilla del DNA es un tema controversial, ya que contrario a lo observado en estudios *in vitro* (Anderson *et al.* 1993, Gow-Chin *et al.* 2002 e Hilada Nefić 2008) en el presente trabajo *in vivo* no se observaron rompimientos.

Lo sugerido en los estudios *in vitro*, es que los rompimientos son producidos dependientes de la dosis, así lo observó Anderson *et al.* (1993) que realizó pruebas con dosis entre los 0µM-50mM de AA y observó que conforme aumentaba la dosis el daño era mayor, encontrando una dosis adecuada de 40 µM en donde el daño no es significativo, de igual manera Gow-Chin *et al.* (2002) e Hilada Nefić (2008) observaron este patrón.

Con estos experimentos, podemos sugerir que posiblemente *in vivo* suceda lo mismo y los rompimientos sean dependientes de la dosis ya que Rojas Lemus (2014) observó que en una dosis de 50mg/kg/día de AA, hay un aumento significativo en los rompimientos de cadena sencilla desde la primer administración y en el presente trabajo se observó que en una dosis de 17mg/kg/día el AA no produce rompimientos.

Por otra parte, sabemos que los principales metabolitos producto del metabolismo del AA son: el 2,3-dicetogulónico y el oxalato (Naidu 2003), éste último, aumenta dependiente de la dosis y recientemente Unlu y Saglar (2015) demostraron que el aumento de oxalato está relacionado con el daño al DNA provocando rompimientos de cadena sencilla, por lo que, si el AA *per se* aumenta los rompimientos en altas dosis, de igual manera, aumenta el oxalato ocasionando más rompimientos, por lo que, la dosis de AA es de primordial importancia para evaluar el daño al DNA, apoyando a lo sugerido anteriormente.

El aumento de la frecuencia de MN de igual manera fue observado por Rojas-Lemus (2014) al probar diferentes dosis de AA: 100, 150, 225 mg/Kg/día, durante las 4 semanas que duró el experimento, (estas dosis son consideradas bajas ya que hay reportes de dosis desde los 250 mg a los 4000mg) (Pauling 1974, Anderson *et al.* 1980, Jeng *et al.* 1996).

Este aumento en la frecuencia de MN, podría deberse al efecto prooxidante reportado del AA *in vitro* en presencia de metales de transición como el Fe⁺³ y el Cu⁺³, ya que al reducir el metal se forma el radical ascorbil y este radical en un medio con peróxido de hidrógeno tiende a aumentarlo (Deutsch 1998). Por otra parte, el metal reducido en presencia de peróxido de hidrógeno, puede resultar en la formación de radicales hidroxilo esto mediante la reacción de Fenton (Zhao y Jung 1995, Halliwell 1996), lo que sugiere, que a pesar de ser un buen quelante de metales, los radicales generados tienden a dañar al DNA, por lo que en un sistema biológico como lo es un ratón, existe la interacción del AA

administrado con estos metales de transición y, posiblemente esta ruta prooxidante, sea un factor que explique el daño ocasionado al DNA.

Por otra parte, sabemos que el ensayo de MN con naranja de acridina no identifica el origen de los micronúcleos (Krishna Hayashi 2000), pero podemos hacer una inferencia ya que Vijayalaxmi *et al.* (1999), en un experimento *in vivo* observaron que el AA en dosis de 10, 30 y 60 mg/Kg disminuía los MN en presencia de agentes clastógenos como ciclofosfamida (CP) y clorhidrato de bleomicina (BLM), aunado a los resultados obtenidos en el ensayo cometa demostrando que no hay rompimientos de cadena sencilla, podemos decir que posiblemente el origen de los micronúcleos generados sea aneugénico. Sin embargo, se requiere más investigación al respecto.

11.3 Carnosina

La carnosina no mostró efecto citotóxico, por el contrario, aumentó la viabilidad de las células respecto al grupo testigo, esto se podría explicar por la efectividad de la protección antioxidante ya que de igual manera Boldyrev *et al.* (2011) observaron la disminución de la apoptosis en neuronas en un medio con homo ácido cisteico (el cual aumenta las ERO), argumentando que la protección es debida al efecto antioxidante de la carnosina.

En el ensayo cometa, la carnosina no generó rompimientos en ningún tiempo durante el transcurso del experimento, en la literatura sólo existe un trabajo (Hsieh *et al.* 2002) donde utilizan el ensayo cometa *in vitro* en linfocitos humanos, en donde observan la capacidad de la carnosina para evitar el daño ocasionado por Fe^{+2} , Cu^{+2} y H_2O_2 y cuando prueban a la carnosina sola observan que hay daño sobre el DNA, el cual sucede cuando se va aumentando la dosis, sin embargo, este daño ocasionado no es significativo.

El no causar daño al DNA como rompimientos o MN, también se explica por la posible interacción directa de la carnosina con la molécula de DNA, ya que la carga principal negativa del DNA que se encuentra en los residuos de fosfato del esqueleto de la molécula y su interacción con el anillo de imidazol, con carga positiva de la carnosina pueden “ocultar” a la molécula de DNA de la acción de los radicales libres otorgando una carga negativa parcial (Lavery *et al.* 1981).

Por lo tanto, teniendo en cuenta las características contra RL de carnosina y su posible interacción electrostática con el DNA, posiblemente este dipéptido contribuye al mantenimiento de la estructura integral del DNA en la célula (Leinsoo *et al.* 2006).

Aunado a lo anterior, los pocos trabajos que existen en la literatura entre la carnosina y el DNA, hacen referencia a su eficiente actividad antioxidante mediante la quelación de metales como el Fe^{+2} y Cu^{+2} *in vitro* (Hsieh *et al.* 2002, Mozdzan *et al.* 2004), posiblemente esta actividad quelante ocurra *in vivo* y dado que no hay reportes de que la carnosina posea una actividad prooxidante durante la quelación de estos metales la hace un mejor antioxidante. De igual manera, el mejorar los antioxidantes endógenos (Aydin *et al.* 2010) hacen que la defensa antioxidante sea mayor protegiendo al organismo, sin olvidar que este dipéptido se encuentra de forma natural en el cuerpo y puede ser utilizado como tal o hidrolizarse para su uso dependiendo el caso (Boldyrev 2013).

11.4 S- alil cisteína

La S-alil cisteína, aumentó significativamente la viabilidad celular respecto al grupo testigo durante todo el experimento. En un experimento *in vivo*, protegió a las células expuestas a plomo ya que aumentó la viabilidad celular a dosis de 200mg/Kg/día (por 20 días) y en dosis de 150 a 250 mg/Kg/día (durante 7 días), en ese estudio los autores observaron que a mayor dosis más protección y lo atribuyeron a la capacidad de aumentar los niveles de antioxidantes endógenos como la CAT y la GPx y a su capacidad como quelante de metales (Mandal *et al.* 2012), por lo que posiblemente *in vivo*, en condiciones normales, suceda lo mismo.

Por otra parte, en el ensayo cometa no se observó el aumento en los rompimientos de cadena sencilla durante todo el experimento. Existe un experimento *in vitro* en el cual la línea celular HepG2 de hepatoma humano fue expuesta a diferentes compuestos como el MMS (metimetanosulfonato) que es un agente clastógeno (Wahnschaffe *et al.* 2005). En este experimento se reportó que la SAC protegió a las células disminuyendo significativamente los rompimientos desde la dosis más baja (5 μM) hasta la dosis mayor (100 μM), la cual disminuyó el daño entre un 40 y 44%, en otra parte del estudio, la SAC protegió a las células de los rompimientos causados por H_2O_2 de manera dosis dependiente, es decir, en dosis de 25 μM disminuyó el daño 24% y en dosis de 100 μM disminuyó el daño 54% (Belloir *et al.* 2006). Por lo que, si bien en este estudio se utilizó una línea proveniente de una patología, podemos pensar que posiblemente en células sanas de acuerdo con nuestros resultados, no cause rompimientos *per se* o proteja a las células de este daño.

La SAC causó un aumento en la frecuencia de MN durante todo el experimento, no hay referencias en la literatura acerca de este comportamiento con el DNA, por lo que podemos pensar que su metabolismo es importante para este evento, dado que, la tasa de absorción es rápida y la tasa de eliminación es lenta debido a que posiblemente exista una reabsorción, ya que el principal metabolito N-acetil S-alil cisteína (Nac-SAC) producido

por su metabolismo sugiere que la SAC es metabolizada en el riñón y en el hígado por N-acetil transferasa para formar Nac-SAC. Sin embargo, se ha demostrado que, cuando la SAC se elimina casi completamente del hígado, se retiene fácilmente una alta concentración en el riñón (Nagae *et al.* 1994, Amano *et al.* 2015, Colín-González *et al.* 2012). Por lo tanto, se puede especular que la SAC puede ser transformada en N-acetil-SAC por N-acetil transferasa en el hígado y a continuación, una parte de N-acetil-SAC puede ser desacetilada a SAC por la amilasa en el riñón, seguido de su reabsorción (Nagae *et al.* 1994, Amano *et al.* 2015, Colín-González *et al.* 2012).

Por lo que los resultados muestran que la SAC *per se*, causa un aumento en la frecuencia de MN, posiblemente este daño se puede prolongar debido a la reabsorción que existe durante su metabolismo y debido a los resultados obtenidos con el ensayo cometa podemos especular que los MN producidos son de origen aneugénico.

12. Conclusión

El ácido ascórbico, es uno de los antioxidantes más consumidos por la población y en una dosis 17mg/Kg/día (que es equivalente a la dosis suplementada en un humano) produjo daño irreparable durante todo el experimento, por lo que tiene actividad genotóxica *in vivo* y debido a los resultados de esta investigación, se sugiere tomar en cuenta las dosis que recomiendan las organizaciones como la FAO, ya que, la dosis media que utilizamos es mayor a la recomendada, sin embargo, es la dosis que se suplementa con más frecuencia entre la población, lo que genera mayor preocupación.

El mejor antioxidante es la carnosina, ya que no generó ningún tipo de daño al DNA y protegió a las células de la muerte celular, aumentando la viabilidad celular.

El antioxidante que mostró un mayor daño al material genético fue la S-alil cisteína ya que aumentó la frecuencia de micronúcleos durante todo el experimento y aumentó la viabilidad celular, es decir, las células tienen una mayor supervivencia pese a que estén dañadas.

Debido a los resultados obtenidos y a la escasez de información, se sugiere más investigación respecto a los efectos que causan los antioxidantes en el material genético, con el fin de dilucidar su mecanismo de acción frente al DNA en condiciones normales, ya que debido a una mayor difusión y sobrevaloración de los antioxidantes, aunado a la libre venta, conllevan a incrementar su consumo entre la población aunque se encuentren sanos, por lo que se sugiere que no se autosuplementen, cualquier antioxidante sin supervisión médica.

13. Perspectivas

- ▶ Se sugieren más estudios con diferentes antioxidantes aumentando los días de administración.
- ▶ En cuanto a la formación de MN analizar su origen mediante la técnica de FISH.
- ▶ Realizar un estudio dosis respuesta para conocer la dosis óptima, es decir, que no tenga un efecto perjudicial sobre el DNA.

14. Bibliografía

- ∴ Alpsy, L., Akcayoglu, G. D., & Sahin, H. "Anti-oxidative and anti-genotoxic effects of carnosine on human lymphocyte culture." *Hum Exp Toxicol* (2011); 0960327111404908.
- ∴ American Cancer Society, "Dietary Supplements: What Is Safe" (2015).
- ∴ Anderson, R., Oosthuizen, R., Maritz, R., Theron, A., & Van Rensburg, A. J. "The effects of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular and humoral immune functions in normal volunteers". *Am J Clin Nutr* (1980); 33:71–76.
- ∴ Arilla Ferreiro E. "Vitaminas hidrosolubles". En "Tratado de nutrición" (Manuel Hernández Rodríguez, Ana Sastre Gallego Ed. Díaz de Santos Madrid) (1999); pp. 153-155.
- ∴ Aydın, A. F., Küçükgergin, C., Özdemirler-Erata, G., Koçak-Toker, N., & Uysal, M. "The effect of carnosine treatment on prooxidant–antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats". *Biogerontology*, (2010); 11(1), 103-109.
- ∴ Baguet A., Everaert I., Achten E., Thomis M., Derave W. "The influence of sex, age and heritability on human skeletal muscle carnosine content". *Amino Acids* (2012) 43:13–20.
- ∴ Ballinger, Scott W. "Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease." *Free Radical Biol.* (2005); 38.10: 1278-1295.
- ∴ Bank, Harvey L. "Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes." *Diabetologia*(1987); 30.10 812-816.
- ∴ Belloir C., Singh V., Daurat C., Siess M. H., & Le Bon A. M. "Protective effects of garlic sulfur compounds against DNA damage induced by direct-and indirect-acting genotoxic agents in HepG2 cells". *Food Chem Toxicol* (2006); 44(6), 827-834.
- ∴ Bienert, G. P., Møller, A. L., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. "Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes". *J Biol Chem*, (2007); 282(2), 1183-1192.
- ∴ Bohr V., Anson R.M., Mazur S., Dianov G. "Oxidative DNA damage processing and changes with aging". *Toxicol Lett* (1998);102-103:47-52.
- ∴ Boldyrev A.A. "Carnosine: new concept for the function of an old molecule" *Biochemistry*, (2012); 77: 313–326.
- ∴ Boldyrev A.A., Giancarlo A., and Wim D. "Physiology and pathophysiology of carnosine." *Physiol Rev* (2013); 93.4: 1803-1845.
- ∴ Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W.P., Holland N., *et al.* "An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans." *Carcinogenesis* (2006); 28.3: 625-631.
- ∴ Bouayed Jaouad, and Torsten Bohn. "Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses." *Oxid Med Cell Longev* (2010); 3.4:228-237.
- ∴ Buettner G.R. "The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, a-tocopherol, and ascorbate". *Arch Biochem Biophys* (1993); 300:535–43.
- ∴ Calasanz, M. "Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer". *ANALES Sis San Navarra*. (2001); 24 (1): 17-29.
- ∴ Carr, A. C., & Frei, B. "Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans". *Am J Clin Nutr* (1999); 69:1086–107
- ∴ Chihuailaf R. H., Contreras P. A. & Wittwer F. G. "Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal" *Vet. Méx*, (2002); 33(3), 265.

- ∴ Chiu S.M., Xue L.Y., Friedman L.R., Oleinick N.L. "Copper ion-mediated sensitization of nuclear matrix attachment sites to ionizing radiation" *Biochemistry* (1993); 32:6214–6219.
- ∴ Church D.F. & Pryor W.A. "Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications" *Environ Health Perspect* (1985); 64:111–126.
- ∴ Colín-González A. L., Santana R.A., Silva- Islas C.A., Chánez-Cárdenas M.E., Santamaría A., Maldonado P.D. "The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract and S-allyl cysteine induced protection" *Oxid Med Cell Longev* (2012); 1-16
- ∴ Collins Andrew R. "The comet assay for DNA damage and repair." *Mol Biotechnol* (2004); 26.3: 249-261.
- ∴ Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (2010) [homopage en internet] Suplementos alimenticios. Consulta en línea en: www.cofepris.gob.mx/Paginas/Suplementos%20Alimenticios/
- ∴ Cortés-Gutiérrez E. I., Dávila-Rodríguez M. I., Fernández J. L., López-Fernández C., Gosálbez A., & Gosálbez J. "New Application of the Comet Assay Chromosome–Comet Assay" *J Histochem Cytochem* (2011); 59(7), 655-660.
- ∴ Davies Kelvin JA. "Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems" *IUBMB Life* (2000); 50:279-289.
- ∴ Deutsch, John C. "Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide." *Analytical biochem* (1998); 255.1:1-7.
- ∴ Dietary Supplements: What Is Safe? American Cancer Society (2015) [homopage en internet], Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002385-pdf.pdf>
- ∴ Drozak J., Veiga-da-Cunha M., Vertommen D., Stroobant V., Van S.E. "Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1)" *J Biol Chem* (2010); 285: 9346–9356.
- ∴ Dukan S., Farewell A., Ballesteros M., Taddei F., Radman M. and Nyström T. "Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors" *PNA* (2000); 5746–5749,
- ∴ Dupuy C., Virion A., Ohayon R., Kaniewski J., Dème D., Pommier J. "Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane" *J Biol Chem.* (1991); 266:3739–3743.
- ∴ Ďurčáková Z. "Some current insights into oxidative stress," *Physiol Res* (2010); 59.4:459–469.
- ∴ EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2013. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin C. *EFSA Journal* 2013;11(11):3418
- ∴ Euromonitor (2015). [homopage en internet] Statistics retrieved from Euromonitor Passport Database, Disponible en: <http://www.euromonitor.com/vitamins-and-dietary-supplements-in-mexico/report>
- ∴ Everaert I., Mooyaart A., Baguet A., Zutinic A., Baelde H., Achten E., *et al.* "Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNBP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans" *Amino Acids* (2010); 40: 1221–1229.
- ∴ Fatima S.K., Prabhavathi A., Reddy P.P. "Analysis of chromosomal aberrations in men occupationally exposed to cement dust" *Mutat Res* (2001); 490: 179-186.
- ∴ Fenton H.J.H. "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron" *J Chem Soc* (1984); 65:899–910
- ∴ Fernández, M. E. M., Ortiz, J. B. L., Londoño, G. C., López, A. P., & Solano, N. A. G. "Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos" *Latreia* (2003); 16(4), 275-282.

- .: Food and Nutrition Board (FNB), Institute of Medicine, National Academy of Sciences. "Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, Selenium and Carotenoids", Ed: National Academy Press. Washington DC. (2000)
- .: Forman H., M. Maiorino and F.Ursini "Signaling functions of reactive oxygen species," *Biochemistry* (2010); 49. 5: 835– 842.
- .: Furukawa Shigetada, Fujita Takuya, Shimabukuro Michio, Iwaki Masanori, Yamada Yukio, Nakajima Yoshimitsu, *et al.* "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." *J Clin Invest* (2004); 114.12: 1752-1761.
- .: Gardner M.L., Illingworth K.M., Kelleher J., Wood D. "Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose" *J Physiol* (1991); 439: 411–422.
- .: Golden T.R., Hinerfeld D.A., Melov S. "Oxidative stress and aging: beyond correlation Aging" *Cell* (2002); 1: 117-23
- .: Gómez-Meda B.C., Zúñiga-González G.M. "Genotoxicidad y potencial teratógeno" *La ciencia y el hombre* (2007); 20(3): 57-62
- .: Gow-Chin Yen, Pin-Der Duh, and Hui-Ling Tsai. "Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid." *Food chemistry* (2002); 79.3:307-313.
- .: Granger D.N. "Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemiareperfusion injury" *Am J Physiol* (1988); 255:H1269–H1275
- .: Guzmán-Rincón M., Graf U. "Drosophila melanogaster somatic mutation and recombination test as a biomonitor. Biomonitoring and biomarkers and indicators of environmental change". *New York: Plenum Press* (1995);34.
- .: Halliwell B. "Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo" *Free Radic Res* (1996); 25:439–54
- .: Halliwell B. "Chapter 1. Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and In Vivo", in: *Handbook of Antioxidants*. 2a Ed. (2002). Taylor & Francis Group, LLC.
- .: Halliwell B., Gutteridge J.M.C. "Free Radicals in Biology and Medicine". 3rd ed. (2007).New York: Oxford University Press.
- .: Harris R. C., Tallon M.J., Dunnett M., Boobis L., Coakley J., Kim H. J., *et al.* "The absorption of orally supplied beta-alanine and its effects on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis" *Amino Acids* (2006); 30,279-289.
- .: Harrison, D., Griendling, K. K., Landmesser, U., Hornig, B., & Drexler, H. "Role of oxidative stress in atherosclerosis." *Am. J. Cardiol.* (2003); 91.3: 7-11.
- .: Hayashi Makoto "The rodent micronucleus test –The basic research and application to regulatory use– Environ" *Mutagen Res* (2005); 27: 13-20.
- .: Hiltermann J.T., Lapperre T.S, van Bree L., Steerenberg P.A., Brahim J.J., Sont J.k. *et al.* "Ozone-induced inflammation assessed in sputum and bronchial lavage fluid from asthmatics: a new noninvasive tool in epidemiologic studies on air pollution and asthma" *Free Radic Biol Med* (1999); 27:1448–1454.
- .: Hsieh, C. L., Ho, Y. C., Lai, H. H., & Yen, G. C. "Inhibitory effect of carnosine and anserine on DNA oxidative damage induced by Fe²⁺, Cu²⁺ and H₂O₂ in lymphocytes" *J Food Drug Anal* (2002); 10.1: 47-54
- .: Hsu C. C., C. N. Huang, Y. C. Hung, and M. C. Yin, "Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice," *J Nutr* (2004); 134. 1: 149–152.
- .: Imai, T., Kosuge, Y., Endo-Umeda, K., Miyagishi, H., Ishige, K., Makishima, M., & Ito, Y. "Protective effect of S-allyl-L-cysteine against endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death is mediated by inhibition of calpain." *Amino acids* (2014);: 46.2 385-393.

- ∴ Ishihara R., Iishi H., Sakai N., Yano H., Uedo N., Narahara H. *et al.* "Polaprezinc attenuates Helicobacter pylori-associated gastritis in Mongolian gerbils" *Helicobacter* (2002) 7: 384–389.
- ∴ Jeng, K. C., Yang, C. S., Siu, W. Y., Tsai, Y. S., Liao, W. J., & Kuo, J. S. "Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults" *Am J Clin Nutr* (1996); 64:960–965.
- ∴ Jerlick A., Pitt A.R., Schaur R.J., Spickett C.M. "Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS" *Free Radic Biol Med* (2000); 28 (5): 673-82
- ∴ Johnston S.V., Francene M. S, and Robert B. R., "Chapter 15. Ascorbic acid", in: Handbook of Antioxidants. 4a Ed (2007). Taylor & Francis Group, LLC.
- ∴ Kallner, A., D. Horing & D. Hartman "Kinetics of ascorbic acid in humans". In "Ascorbic acid: Chemistry, metabolism and uses" (P.A. Seib & B.M. Tolbert, eds.). Advances in Chemistry Series No.200, American Chemical Society, Washington, DC (1982);pp. 385-400
- ∴ Khalid Rahman "Studies on free radicals, antioxidants and co-factors" *Clin Interv Aging* (2007);2(2) 219–236)
- ∴ Klimp A. H., E. G. E. De Vries, G. L. Scherphof, and T. Daemen, "A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer," *Crit Rev Oncol Hemat* (2002); 44.2: 143–161.
- ∴ Ko J.K, Leung C.C. "Ginger extract and polaprezinc exert gastroprotective actions by anti-oxidant and growth factor modulating effects in rats" *J Gastroenterol Hepatol* (2010)25: 1861–1868.
- ∴ Kodera Y., Suzuki A., Imada O., Kasuga S., Sumioka I., Kanezawa A., Taru N., Fijikawa M., Nagae S., Mosamoto K., Maeshige K., & Ono K "Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic" *J Agr Food Chem* (2002); 50. 3: 622–632.
- ∴ Kohen R, Nyska A. "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification" *Toxicol Pathol* (2002); 30(6):620-50.
- ∴ Krishna Gopala, and Makoto Hayashi. "In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation." *Mutat Res Fund Mol Mech Mut* (2000); 455.1 155-166.
- ∴ Kryston T. B., A. B. Georgiev, P. Pissis, and A. G. Georgakilas, "Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis," *Mutat Res* (2011); 711.1-2:193–201.
- ∴ Kvach James T., Guadalupe Munguia, and Susan H. Strand. "Staining tissue-derived Mycobacterium leprae with fluorescein diacetate and ethidium bromide" *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis* (1984): 52.2 176-182.
- ∴ Lavery, Richard, and Bernard Pullman. "The molecular electrostatic potential and steric accessibility of A-DNA." *NAR* (1981); 9.18 4677.
- ∴ Leinsoo, T. A., H. Abe, and A. A. Boldyrev. "Carnosine and related compounds protect the double-chain DNA from oxidative damages." *J Evol Biochem Phys* (2006); 42.5 570-574.
- ∴ Levine, M., Dhariwal, K. R., Welch, R. W., Wang, Y., & Park, J. B "Determination of optimal vitamin C requirements in humans" *Am J Clin Nutr.* (1995); 62 (suppl): 1347S-1356S
- ∴ Levine M, Morita K. "Ascorbic acid in endocrine systems" *Vitam Horm.* (1985);42:1-64.
- ∴ Linster CL, Van Schaftingen E. "Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals" *FEBS J* (2007); 274:1–22.
- ∴ Maluf S. W. and B. Erdtmann, "Genomic instability in Down's Syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis" *Cancer Genet. Cytogenet.*, (2001; 124(1), 71–5.
- ∴ Mandal, Samir, et al. "S-allyl cysteine in combination with clotrimazole downregulates Fas induced apoptotic events in erythrocytes of mice exposed to lead." *BBA-General Subjects* (2012); 1820.1 9-23.

- ∴ Martínez, Claudia Dorado, Concepción Rugerío Vargas, and Selva Rivas Arancibia. "Estrés oxidativo y neurodegeneración." *Rev Fac Med* (2003); 46.6: 229-35.
- ∴ Marnett L.J. "Lipid peroxidation and DNA damage by malondialdehyde" *Mutat Res.* (1999); 424:83-95.
- ∴ Matthews, Margaret M., and Thomas W. Traut. "Regulation of N-carbamoyl-beta-alanine amidohydrolase, the terminal enzyme in pyrimidine catabolism, by ligand-induced change in polymerization." *J. Biol. Chem.* (1987); 262.15: 7232-7237.
- ∴ Medina-Campos, O. N., Barrera, D., Segoviano-Murillo, S., Rocha, D., Maldonado, P. D., Mendoza-Patiño, N., & Pedraza-Chaverri, J. "S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK1 cells of potassium dichromate-induced toxicity," *Food Chem. Toxicol*, vol. 45, no. 10, pp. 2030-2039, 2007.
- ∴ Miller D.M., Buettner G.R., Aust S.D. "Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions" *Free Radic Biol Med.* (1990); 8:95-108.
- ∴ Morita T., MacGregor J.T., Hayashi M. "Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow" *Mutagenesis* (2011); 26(1), 223-230.
- ∴ Mozdzan, M., Szemraj, J., Rysz, J., & Nowak, D. "Antioxidant Properties of Carnosine Re-Evaluated with Oxidizing Systems Involving Iron and Copper Ions" *Basic Clin Pharmacol Toxicol* (2005); 96(5), 352-360.
- ∴ Nagae S., Ushijima M., Hatono S., Imai J., Kasuga S., Matsuura H., Itakura Y. & Higashi Y. "Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine," *Planta Medica* (1994);60. 3:214-217.
- ∴ Naidu, K. Akhilender. "Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview." *Nutrition Journal* (2003); 2: 1-10.
- ∴ Nefić, Hilada. "The genotoxicity of vitamin C in vitro" *BJBMS* (2008); 141-146.
- ∴ Nigro M. M. L., Portmann E., Angeleri G., Gurni A., & Carballo M. A. "Biomarcadores para evaluación de genotoxicidad potencial" *BLACPMA* (2009); 154-159.
- ∴ Norppa H. "Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms" *Toxicol. Lett.* (2004); 149, 309-334.
- ∴ Ostling, O., and K. J. Johanson. "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells." *Biochem Biophys Res Co* (1984); 123.1: 291-298.
- ∴ Toxicología [homo page en internet] No. 18 Azufre Disponible en: <http://www3.syngenta.com/country/cl/cl/manejoyososeguro/Documents/toxicologia.pdf>
- ∴ Pauling L. "Are recommended daily allowances for vitamin C adequate?" *Proc Natl Acad Sci U S A* (1974);71:4442-4446.
- ∴ Patak, P., Willenberg, H.S., and Bornstein, S.R. "Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla". *Endocrine.* (2004); 30, 871-875.
- ∴ Pelizzoni I., R. Macco, D. Zacchetti, F. Grohovaz, and F. Codazzi, "Iron and calcium in the central nervous system: a closer relationship in health and sickness," *Biochem Soc T* (2008); 36.6: 1309-1312.
- ∴ Penafiel R, Ruzafa C, Monserrat F, Cremades A. "Gender-related differences in carnosine, anserine and lysine content of murine skeletal muscle" *Amino Acids* (2004); 26:53-58.
- ∴ Pérez-Cadahía, B., Laffon, B., Pásaro, E., & Méndez, J. "Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil." *Comp Biochem Phys C* (2004);138.4: 453-460.
- ∴ Podmore I. D., Griffiths H. R., Herbert K. E., Mistry N., Mistry P., & Lunec J. "Vitamin C exhibits pro-oxidant properties". *Nature*, (1998); 392(6676), 559-559.
- ∴ Pryor, W. A., Houk, K. N., Foote, C. S., Fukuto, J. M., Ignarro, L. J., Squadrito, G. L., & Davies, K. J. "Free radical biology and medicine: it's a gas, man!" *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2006); 291(3):R491-511.

- ∴ Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. Review Article "Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay". *Bio Med Res Int*, (2014); 1-20.
- ∴ Rangon V, Bulkley GB. "Prospects for treatment of free radicals-mediated tissue injury" *Br Med Bull* (1993); 49: 700-18
- ∴ Rebouche, Charles J. "Ascorbic acid and carnitine biosynthesis." *Am J Clin Nutr* (1991) 54.6:1147S-1152S.
- ∴ Reiser, K., McCormick, R.J., and Rucker, R.B. "Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin" *FASEB J.* (1992); 6:2439–2449.
- ∴ Roche E. "Estrés oxidativo y degradación de proteínas." *Med Clin* (1994); 103: 189-96.
- ∴ Rodríguez-Mercado, Juan J., Rodrigo A. Mateos-Nava, and Mario A. Altamirano-Lozano. "DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides in vitro." *Toxicol in Vitro* (2011); 25.8: 1996-2002.
- ∴ Rojas E., Valverde M., López M.C., Naufal I., Sanchez I., Bizarro P., Lopezl. *et al.* "Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay" *Mutat Res* (2000); 468: 11-17.
- ∴ Rojas Lemus, Marcela (2014) Comparación por sexo del efecto genotóxico de la administración de ácido ascórbico y anastrozol en ratones CD1 expuestos a la inhalación de vanadio. (Tesis doctoral) UNAM.
- ∴ Rose RC. "Intestinal absorption of water-soluble vitamins" *Proc Soc Exp Biol Med* (1996); 212: 191-198.
- ∴ Sakagami, H., and K. Satoh. "The interaction between two antioxidants, sodium ascorbate and gallic acid: radical intensity and apoptosis induction." *Anticancer Res.* (1995); 16.3A 1231-1234
- ∴ Sale C, Saunders B, Harris RC. "Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance." *Amino Acids* (2010); 39: 321–333.
- ∴ Schmid W., "The micronucleus test" *Mutat. Res.* (1975) 31 9–15
- ∴ Sen C.K. "Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction" *Med Sci Sports Exerc* (2001); 33 (3):368-70
- ∴ Shao Lan, Qing-huan Li, and Zheng Tan. "L-carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts." *Biochem Bioph Res Co* (2004); 324.2: 931-936.
- ∴ Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." *Exp Cell Res* (1988); 175.1:184-191.
- ∴ Slater TF. "Free-radical mechanisms in tissue injury" *Biochem J.* (1984); 222(1):1-15.
- ∴ Stohs SJ, Bagchi D. "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions" *Free Radic Biol Med.* (1995); 18:321–336.
- ∴ Strauss GHS. "Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocytes tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects" *Mutat. Res.* (1991); 252:1–15.
- ∴ Takasugi, M. "An improved fluorochromatic cytotoxic test" *Transplantation* (1971); 12: 148-150.
- ∴ Teufel M., Saudek V., Ledig J.P., Bernhardt A., Boularand S., Carreau A., *et al.* "Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase" *J Biol Chem* (2003); 278: 6521–6531.
- ∴ Tice, R. R., Argurell A., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., *et al.* "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." *Environ Mol Mutagen* (2000); 35.3: 206-221.
- ∴ Tinker, D. and Rucker, R.B. "Role of selected nutrients in synthesis, accumulation, and chemical modification of connective tissue proteins" *Physiol. Rev.* (1985); 65: 607–657.

- ∴ Unlu, Sibel, and Emel Saglar. "Evaluation of Cytogenetic and Genotoxic Effects of Oxalic Acid by the Alkaline Comet Assay and QRT PCR in Human Buccal Epithelial Cells." *Anal Quant Cytol* (2015) 37.6: 347-352.
- ∴ VADEMECUM [homo page en internet], "Ácido ascórbico" [consultada el 22 de Abril del año 2016] Disponible en: <http://www.vademecum.es/principios-activos-ascorbico+acido+%28vitamina+c%29-a11ga01>
- ∴ Valko M, Morris H, Cronin MT. "Metals, toxicity and oxidative stress" *Curr Med Chem.* (2005);12(10): 1161-208.
- ∴ Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cáncer" *Chem Biol Interact.* (2006); 160:1–40.
- ∴ Vijayalaxmi, K. K., and R. Venu. "In vivo anticlastogenic effects of L-ascorbic acid in mice." *Mutat Res-Gen Tox En* (1999); 438.1: 47-51.
- ∴ Wahnschaffe, U., Bitsch, A., Kielhorn, J., & Mangelsdorf, I. "Mutagenicity testing with transgenic mice. Part I: Comparison with the mouse bone marrow micronucleus test" *J Carcinogenesis*, (2005); 4(1), 3.
- ∴ Xammar Oro Juan R. & M. Cristina donamaría "Acción Farmacológica, Biofísicoquímica y Estructura Dinámica de la Vitamina C" *Acta Farm. Bonaerense* (2006); 25 (1): 145-54.
- ∴ Yamashita T., Shimada S., Guo W., Sato K., Kohmura E., Hayakawa T., Takagi T., Tohyama M. "Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter" *J Biol Chem* (1997); 272: 10205–10211.
- ∴ Yan and C. K. F. D. Zeng, "Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine," *J Asian Drug Metab Ph* (2005); 5.1: 61–69,
- ∴ Zhao, M. J., and L. Jung. "Kinetics of the competitive degradation of deoxyribose and other molecules by hydroxyl radicals produced by the Fenton reaction in the presence of ascorbic acid." *Free radical res* 23.3 (1995): 229-243.
- ∴ Zúñiga, G.M., Gómez, B. 2006. La prueba de micronúcleos. La ciencia y el hombre. Vol. XIX. [En Línea] 2016:
Marzo
<http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol19num1/articulos/micronucleos/index.html>.