



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**“Efecto del ácido ascórbico y del alfa-tocoferol sobre la reparación  
del daño al ADN y de los niveles de antioxidantes totales en ratones  
Hsd:ICR expuestos a trióxido de cromo”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**THELMA JACQUELINE PARRA AGUILAR**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ**



**CIUDAD DE MÉXICO. JUNIO, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna **PARRA AGUILAR THELMA JACQUELINE**, con número de cuenta **311111446**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **19 de junio de 2018** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

**VOCAL** Dra. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ

**SECRETARIO** Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

**SUPLENTE** M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

**SUPLENTE** Dr. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA

*[Handwritten signatures of the jury members]*

El título de la tesis que presenta es: **Efecto del ácido ascórbico y del alfa-tocoferol sobre la reparación del daño al ADN y de los niveles de antioxidantes totales en ratones Hsd:ICR expuestos a trióxido de cromo.**

Opción de titulación: Actividad de Investigación.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad de México, a 17 de mayo de 2018

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA  
DIRECCION

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA



**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM**

**La investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN219216. Proyecto “Los componentes antioxidantes de la dieta en la modulación y protección *in vivo* del daño genotóxico y citotóxico inducido por metales con potencial cancerígeno: Ensayo Cometa, Micronúcleos, Apoptosis, Enzimas Antioxidantes y 8-hidroxideoxiguanosina”. Se contó con beca de titulación (elaboración de tesis).**

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, mi *alma mater*, en donde me he desarrollado en el ámbito intelectual, profesional y personal. Le agradezco la oportunidad de haber pertenecido a su comunidad y los apoyos económicos que me ha otorgado, pero sobre todo que en ésta he conocido a las mejores amistades que cualquiera pudiera tener.

A la DGAPA-UNAM por el financiamiento del proyecto con el cual se realizó el presente estudio (PAPIIT-219216).

A la Dra. María del Carmen García Rodríguez por aceptarme en su grupo de investigación, por compartirme sus conocimientos, por exigirme realizar trabajos de calidad, por instruirme disciplina y dedicarme valioso tiempo en las observaciones del trabajo. Además, le agradezco de corazón la amistad brindada dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava por la enseñanza y el apoyo constante durante el desarrollo de los experimentos, le expreso mi más cordial agradecimiento.

A los miembros del jurado Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, Dr. Juan José Rodríguez Mercado, Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava y M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez por sus valiosas aportaciones, comentarios y sugerencias para el mejoramiento del trabajo.

# *Dedicatoria*

Siempre he considerado que somos el resultado de las personas que nos rodean, o al menos en mi caso influyen en gran medida. Por ello, dedico este logro a aquellos que siempre me han apoyado y me han hecho una mejor persona.

No hay palabras suficientes para agradecerle a mi madre, **Irene Aguilar**, por todo lo que se ha esforzado y sacrificado por el bienestar de mi familia. Cada logro que yo he obtenido es gracias a su ejemplo, amor, confianza y apoyo incondicional. Me ha enseñado a conseguir las cosas por mi propia cuenta, a ser constante hasta lograr mis objetivos, pero ante todo disfrutar y valorar la vida. De igual forma agradezco a mi padre, **Javier Parra**, quien a pesar de la distancia siempre me ha apoyado, consentido y acompañado en cada momento.

A mis hermanos **Alfonso, Emmanuel y Julio** de quien estoy orgullosa, les doy gracias por todas las enseñanzas académicas y de vida, por las veces que elevaron mi ánimo en las peores situaciones y porque desde pequeña nunca me han dejado sola. Sé que siempre contaré con su apoyo, así como yo siempre estaré para ellos.

A mis abuelos, tíos y primos quienes siempre me hacen sentir segura y capaz de mí misma, por liberarme del estrés constante y darme todo el amor posible. En especial agradezco a mi tío **Alberto Aguilar**, a quien considero como a otro hermano con el que comparto el mismo gusto por la ciencia y constantemente me transmite sus conocimientos sobre cualquier tema.

A mis amigos **Ari, Gris, Demi, Alan, Uriel, Zanabria, Medina, Mauricio y Brian** les agradezco por todos los momentos que compartimos en la carrera, los viajes en donde nos conocimos mejor y por el apoyo que me ofrecieron en las clases o en los asuntos personales, sin mencionar que se volvieron parte importante de mi vida. En especial quiero agradecerle a **Alan Fuentes** por acompañarme en innumerables ocasiones, por hacerme ver mis virtudes y defectos, por presionarme para cumplir con las tareas, por entusiasmarme a mejorar profesionalmente, por provocarme miles de risas espontáneas y por apoyarme en cualquier situación.

A mis amigos del laboratorio **Tona, Fany, Lulú, Gaby y Julio** por todos sus consejos y enseñanzas, así como su amistad y compañía a lo largo de mi proyecto. Le agradezco con mucho cariño a **Gris** por haber hecho las horas de trabajo más amenas y porque a pesar de no conocernos logramos congeniar excelente, a tal medida que ahora la considero una de mis mejores amigas.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	i
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	ii
<i>I. INTRODUCCIÓN.....</i>	<i>1</i>
1.1. Antioxidantes.....	1
1.1.1. Ácido ascórbico .....	3
1.1.2. $\alpha$ -tocoferol.....	6
1.2. Estrés oxidante.....	8
1.3. Metales pesados como inductores de estrés oxidante.....	9
1.3.1. Cromo hexavalente.....	11
1.4. Estrés oxidante y genotoxicidad .....	12
1.5. Evaluación de daño genotóxico.....	13
1.5.1. Ensayo de micronúcleos.....	14
1.5.2. Evaluación de rompimientos de cadenas de ADN.....	15
1.5.3. Apoptosis y viabilidad celular.....	17
1.6. Reparación del daño oxidativo al ADN .....	19
<i>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</i>	<i>22</i>
<i>III. HIPÓTESIS .....</i>	<i>22</i>
<i>IV. OBJETIVOS .....</i>	<i>23</i>
4.1. Objetivo general .....	23
4.2. Objetivos particulares.....	23
<i>V. MATERIAL Y MÉTODO.....</i>	<i>24</i>
5.1. Animales .....	24
5.2. Reactivos .....	24
5.3. Tratamientos .....	25
5.4. Ensayo de micronúcleos y relación EPC/ENC.....	27

5.5. Evaluación de apoptosis y viabilidad celular.....	28
5.6. Rupturas de cadena de ADN.....	29
5.7. Determinación de la capacidad de antioxidantes totales .....	31
5.8. Análisis estadístico .....	31
VI. RESULTADOS .....	32
6.1. Genotoxicidad .....	32
6.2. Apoptosis .....	34
6.3. Reparación del daño al ADN (rompimientos de cadenas).....	34
6.4. Citotoxicidad.....	40
6.4.1. Relación EPC/ENC.....	40
6.4.2. Viabilidad celular.....	41
6.5. Antioxidantes totales .....	42
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
VIII. CONCLUSIÓN .....	49
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
X. ANEXOS .....	57



## RESUMEN

Se ha mostrado el potencial de protección que presentan algunos antioxidantes como el ácido ascórbico (AA) y el  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH) contra el daño genotóxico inducido por compuestos de cromo hexavalente (Cr[VI]). Sin embargo, las vías por las cuales estas sustancias protegen o disminuyen el daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) aún no están bien estudiadas. En este trabajo se evaluaron las frecuencias de micronúcleos (MN), de células apoptóticas, de rompimientos de cadena sencilla y los niveles de antioxidantes endógenos en ratones tratados con AA- $\alpha$ TOH y Cr(VI), con la finalidad de indagar los posibles efectos del AA- $\alpha$ TOH sobre la reparación del daño al ADN y de los niveles de antioxidantes totales como posibles vías de protección del daño genotóxico inducido por Cr(VI). Grupos de cinco ratones fueron tratados con dosis únicas de la siguiente manera: i) Grupos testigo, se les administró el vehículo (agua o aceite de maíz); ii) Grupo antioxidante, se le suministró por vía intragástrica (*ig*) AA- $\alpha$ TOH (100 y 20 mg/Kg respectivamente); iii) Grupo Cr(VI), se trató con trióxido de cromo (CrO<sub>3</sub>) por vía intraperitoneal (*ip*) (20 mg/Kg); iv) Grupo experimental, se le aplicaron los antioxidantes cuatro horas antes del compuesto metálico por las mismas vías de administración. Para todas las técnicas se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal; las evaluaciones de MN y la relación de eritrocitos policromáticos respecto a los normocromáticos (EPC/ENC) se realizaron a las 0 y 48 horas después de los tratamientos. El ensayo cometa (reparación del ADN) se evaluó a las 0, 4, 24 y 48 horas, mientras que la viabilidad celular, la apoptosis y los niveles de antioxidantes totales se midieron únicamente a las 48 horas después de los tratamientos. La administración del AA- $\alpha$ TOH no resultó genotóxico ni citotóxico, no presentó efectos sobre la apoptosis e incrementó los niveles de antioxidantes totales. Se corroboró el efecto genotóxico y citotóxico del CrO<sub>3</sub>; además de la inducción de MN, se presentaron rupturas de cadena sencilla del ADN (desde la hora 4), se incrementaron las células apoptóticas y se disminuyeron los niveles de antioxidantes totales. En el grupo tratado con AA- $\alpha$ TOH previo al CrO<sub>3</sub> se observó disminución en el daño genotóxico, ya que se redujeron alrededor del 37% las frecuencias de MN, así como las frecuencias de células apoptóticas en comparación con el grupo tratado con CrO<sub>3</sub>. No obstante, se vio afectada la viabilidad celular, lo cual se atribuye al incremento de la necrosis dada por el CrO<sub>3</sub> y el AA. La defensa antigenotóxica pudo deberse a dos vías: 1) la activación de la reparación al ADN, ya que se disminuyeron significativamente las rupturas de cadenas a la hora 48; y 2) la activación y el restablecimiento de los antioxidantes endógenos, ya que se incrementaron significativamente las concentraciones de éstos.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxideoxiguanosina
8-oxoG	8-hidroxiguanina
$\alpha$ -TOH	$\alpha$ -tocoferol
$\alpha$ -TTP	Proteína de transferencia de $\alpha$ -tocoferol
AA	Ácido ascórbico
AA- $\alpha$ TOH	Combinación de ácido ascórbico y $\alpha$ -tocoferol
ABTS	3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANDEVA	Análisis de varianzas
ARN	Ácido ribonucleico
BrEt	Bromuro de etidio
CAT	Catalasa
Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(IV)	Cromo tetravalente
Cr(V)	Cromo pentavalente
Cr(VI)	Cromo hexavalente
CrO <sub>3</sub>	Trióxido de cromo
ENC	Eritrocitos normocromáticos
EOx	Estrés oxidante
EPA	<i>"Environmental Protection Agency"</i>
EPC	Eritrocitos policromáticos
EPC-MN	Eritrocitos policromáticos micronucleados
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FDA	<i>"Food and Drug Administration"</i>
Fe	Hierro
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
H <sub>2</sub> O	Agua

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HOCl	Ácido hipocloroso
IARC	<i>“International Agency for Research on Cancer”</i>
<i>ig</i>	Intragástrica
<i>ip</i>	Intraperitoneal
MN	Micronúcleo (s)
NA	Naranja de acridina
NIF	Frecuencia de inducción neta
-OH	Grupo hidroxilo
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
O <sub>3</sub>	Ozono
OECD	<i>“Organisation for Economic Co-operation Agency”</i>
<sup>•</sup> OH	Radical hidroxilo
RDA	Ingesta media recomendada
RL	Radicales libres
R-O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Radical peroxilo
RO <sup>•</sup>	Radical alcoxilo
SOD	Superóxido dismutasa
UA	Unidades arbitrarias

## I. INTRODUCCIÓN

Se ha planteado que diversas enfermedades crónico-degenerativas, incluidos algunos tipos de cáncer pueden ser iniciados y promovidos por el daño genotóxico (Gatto *et al.*, 2010; McCarroll *et al.*, 2010). La genotoxicidad inducida por compuestos de Cr(VI), se ha relacionado con el estrés oxidante (EOx) generado durante su reducción intracelular a cromo trivalente (Cr[III]) (O'Brien, Ceryak y Patierno, 2003). En contraparte, las sustancias con propiedades antioxidantes han surgido como una opción en la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el EOx. Particularmente, en el grupo de investigación del Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la FES Zaragoza, UNAM, se ha mostrado el potencial de protección que presentan el AA y el  $\alpha$ -TOH contra el daño genotóxico inducido por metales de transición (García-Rodríguez *et al.*, 2012; García-Rodríguez, Hernández-Cortés y Altamirano-Lozano, 2016). Sin embargo, las vías por las cuales estos antioxidantes protegen o disminuyen el daño al ADN aún no están bien estudiadas.

### 1.1 Antioxidantes

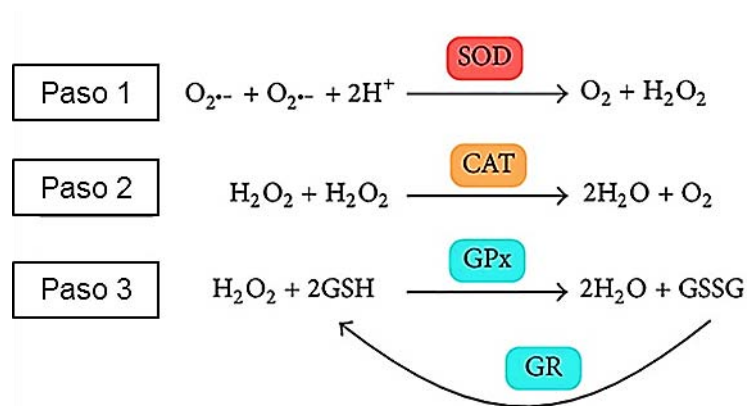
Los antioxidantes pueden ser definidos como cualquier sustancia que retrase, prevenga o elimine la oxidación de otras moléculas, ya que éstos son capaces de donar electrones para estabilizar a los radicales libres (RL) y neutralizar sus efectos dañinos. La principal característica estructural de éstos, es la presencia de grupos hidroxilo (-OH) o sulfhidrilo (-SH) en la molécula original o en su forma reducida (Veskoukis, Tsatsakis y Kouretas, 2012; Halliwell y Gutteridge, 2015; Pisoschi y Pop, 2015).

Las funciones antioxidantes implican disminuir el EOx, generalmente pueden proteger contra la toxicidad de los metales por la estabilización de RL y así terminar con la reacción en cadena; además de que pueden quelar al ion metálico y de esta manera evitar la reacción de especies reactivas de oxígeno (ERO), o bien, pueden quelar al metal y mantenerlo en un estado redox que lo hace incompetente para la reducción del oxígeno (Pisoschi y Pop, 2015).

Los antioxidantes se clasifican como hidrosolubles (ácido úrico, glutatión reducido [GSH] y polifenoles), o liposolubles (ácido lipoico, vitamina A y E). También se les ha dividido en

enzimáticos (superóxido dismutasa [SOD], catalasa [CAT], glutatión reductasa [GR] y glutatión peroxidasa [GPx]) y no enzimáticos (GSH, ácido úrico, vitaminas y polifenoles). Los antioxidantes primarios son principalmente rompedores de reacciones en cadena capaces de atrapar especies reactivas mediante la donación de hidrógeno y los secundarios son inhibidores de oxígeno singlete, descomponedores de peróxido, quelantes de metales, inhibidores de enzimas oxidativas o absorbentes de radiación UV (Flora, 2009; Veskoukis, Tsatsakis y Kouretas, 2012; Pisoschi y Pop, 2015).

Los antioxidantes pueden ser sintetizados por la célula (endógenos) o ingresar a través de la dieta (exógenos) (Ramos *et al.*, 2006; Veskoukis, Tsatsakis y Kouretas, 2012). Entre los antioxidantes endógenos se incluyen tioles, ácido úrico, bilirrubina, melatonina, ácido lipoico y tres sistemas principales de enzimas: SOD, CAT y GPx. La SOD cataliza la dismutación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular ( $O_2$ ). La actividad de la CAT se localiza básicamente en los peroxisomas, en donde cataliza la conversión del  $H_2O_2$ , en agua ( $H_2O$ ) y  $O_2$  en varios tejidos. La GPx cataliza la reacción a través de la cual el GSH reacciona con el  $H_2O_2$  para transformarlo en  $H_2O$  (Figura 1) (González-Torres, Betancourt-Rule y Ortiz-Muñiz, 2000; Pisoschi y Pop, 2015).



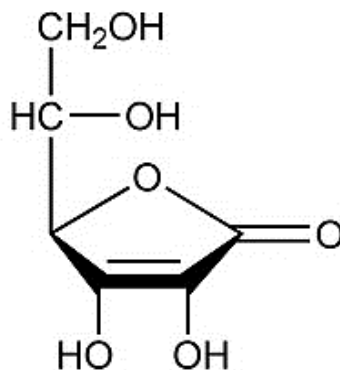
**Figura 1. Principal sistema de defensa antioxidante enzimático in vivo y sus reacciones en la eliminación de RL y ERO. Modificada de Peng *et al.* (2014).**

Los antioxidantes exógenos provienen de los alimentos ingeridos, transforman a los RL en radicales menos reactivos, o bien, los transfieren de sitios donde pueden provocar graves daños (membranas) a compartimentos celulares donde sus efectos sean menos drásticos (citoplasma). Dentro de este tipo de antioxidantes se encuentran nutrientes esenciales que

incluyen al AA,  $\alpha$ -TOH y  $\beta$ -caroteno, además de los no esenciales como los flavonoides. Se ha sugerido que una dieta rica en antioxidantes puede traer beneficios para la salud, por lo que ha surgido un gran interés hacia la evaluación de los productos naturales y su capacidad antioxidante (González-Torres, Betancourt-Rule y Ortiz-Muñiz, 2000; Avello y Suwalsky, 2006; Pisoschi y Pop, 2015).

### 1.1.1 Ácido ascórbico

El AA también conocido como ascorbato o vitamina C, es considerado el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre y uno de los más potentes agentes antioxidantes del organismo. La forma natural de la vitamina es el enantiómero L (Figura 2) que posee propiedades nutricionales, mientras que el D no está disponible en la naturaleza y no tiene relevancia fisiológica. El AA posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras, debido a que se comporta como un ácido carboxílico vinílico, en donde el doble enlace (grupo vinilo) transmite pares de electrones entre el hidroxilo y el carbonilo. El AA dona electrones a las ERO oxidándose primero a monodehidroascorbato y después a dehidroascorbato (Figura 3). Las ERO son reducidas a  $H_2O$ , mientras que las formas oxidadas del AA son relativamente estables, no reactivas y no causan daño celular (Avello y Suwalsky, 2006; Serra y Cafaro, 2007; Flora, 2009).



**Figura 2. Estructura de la molécula del L-ácido ascórbico. Tomada de Royal Society of Chemistry (2018).**



El AA es un nutrimento esencial producido por la mayoría de las plantas y de los animales a partir de la D-glucosa y la D-galactosa, fundamentalmente en hígado, glándulas suprarrenales e intestino. Sin embargo, los humanos, cobayos, murciélagos frugívoros, algunas aves y primates son incapaces de sintetizar esta vitamina debido a la pérdida de la enzima L-gulonolactona oxidasa (GLO), por lo que el AA debe tomarse de la dieta (Serra y Cafaro, 2007; Unlu *et al.*, 2016). Las fuentes más ricas de AA incluyen a las grosellas, kiwis, cítricos (guayabas, limas y naranjas), pimientos, fresas y melones, así como verduras de hoja verde (brócoli) y algunos cereales (Devaki y Raveendran, 2017). En humanos se absorbe en el intestino delgado por un proceso activo mediado por el transportador de vitamina C dependiente de sodio 1 (SVTC-1 por sus siglas en inglés), que se expresa predominantemente en tejido epitelial (intestino, hígado y riñón); mientras que el SVTC-2 se localiza en tejidos especializados del ojo y del cerebro (Tsukaguchi *et al.*, 1999).

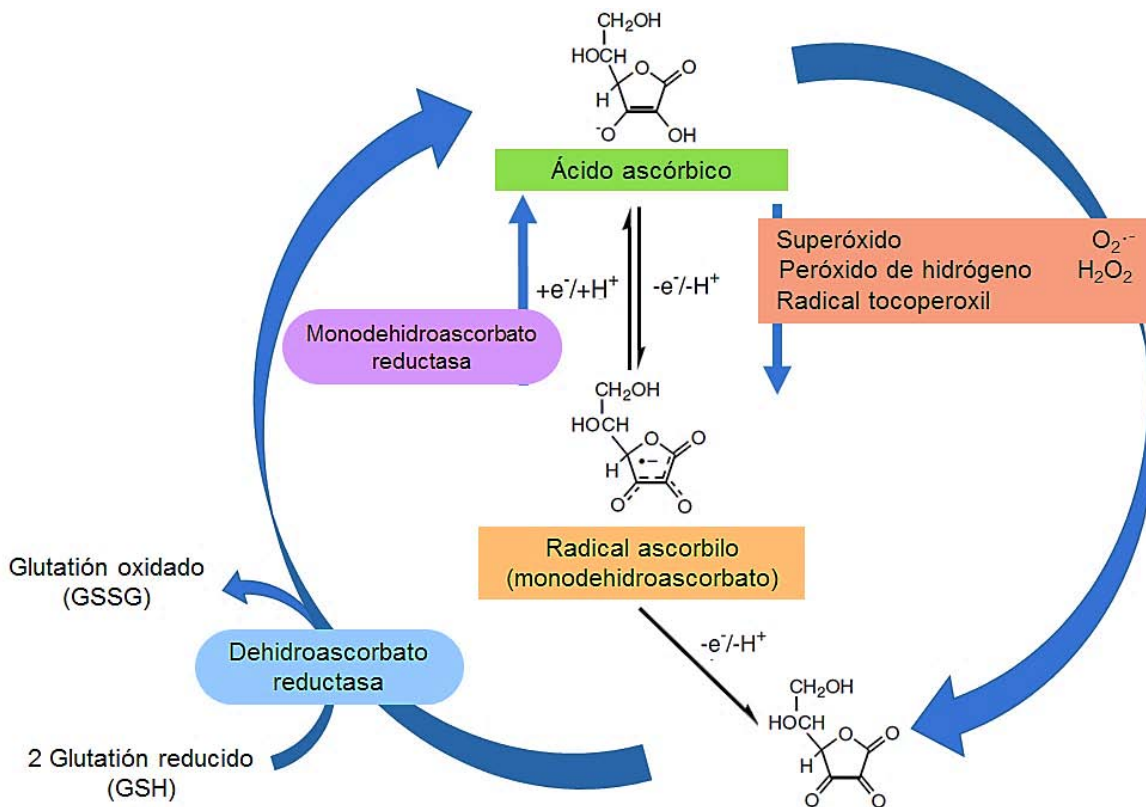


Figura 3. Degradación oxidativa del ácido ascórbico. Modificada de Pehlivan (2017).

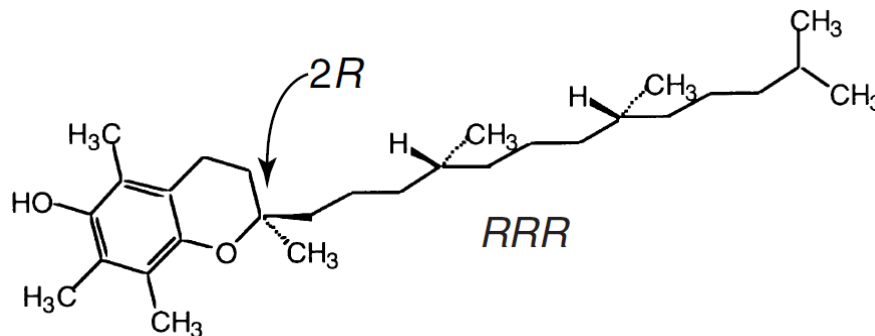
La importancia biológica del AA radica en que desempeña un papel de cofactor y de agente reductor en varias reacciones enzimáticas. Es esencial en la biosíntesis del colágeno, de la L-carnitina (importante para la conversión de la dopamina a noradrenalina) y de varios neurotransmisores. Se requiere en el metabolismo de la tirosina, ácido fólico y triptófano, además es necesario en la hidroxilación de glicina, prolina, lisina y catecolaminas. El AA facilita y aumenta la absorción del hierro en el tracto digestivo mediante la reducción del estado férrico al ferroso. Se ha asociado con el sistema inmune debido a que está disponible en altas concentraciones en los leucocitos, además reduce la duración y severidad del resfriado común, aunque aún se desconozcan las razones (Serra y Cafaro, 2007; Mauro-Martín y Garicano-Vilar, 2015; Pisoschi y Pop, 2015; Unlu *et al.*, 2016).

El motivo por el cual el AA se ha considerado como la defensa antioxidante más importante en el plasma, es que posee dos grupos -OH ionizables que eliminan ERO y RL, como el anión radical hidroxilo ( $\cdot$ OH), alcoxilo ( $\text{RO}\cdot$ ) y superóxido  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Los retira de los compartimentos hidrofílicos de la célula, de la matriz extracelular y del sistema circulatorio, por lo tanto, previene la oxidación de las biomoléculas esenciales, se inhibe la peroxidación lipídica y el EOx (Flora, 2009; Pisoschi y Pop, 2015). Evidencias experimentales muestran que el AA interacciona de forma sinérgica con otros antioxidantes, dentro de los cuales se incluye el  $\alpha$ -TOH. En la interfase lípido-acuosa, el ascorbato reduce al radical tocoperóxido oxidado que se encuentra unido a las membranas, permitiéndole cumplir de nuevo con sus funciones antioxidantes (González-Torres, Betancourt-Rule y Ortiz-Muñiz, 2000; Pisoschi y Pop, 2015).

La ingesta media recomendada (RDA, por sus siglas en inglés) de AA que proporciona protección antioxidante es de 90 mg/día para hombres y 75 mg/día para mujeres. Esta dosis está basada para mantener la concentración máxima de AA en neutrófilos, con una mínima excreción urinaria de éste. Debido a que fumar aumenta el EOx, se ha sugerido que los fumadores aumenten 35 mg/día (Institute of Medicine U.S., 2000). La ausencia de esta vitamina en el organismo conlleva a la enfermedad de escorbuto ( $\text{AA} < 2.5 \text{ mg/l}$ ). Las manifestaciones clínicas son fatiga, mialgias, artralgias, púrpura vascular, síndrome hemorrágico y pérdida de dientes. Los signos biológicos más evidentes son: anemia, hipocolesterolemia, hipoalbuminemia, edema, deficiencia en la cicatrización, entre otras (Pauling, 1970; Serra y Cafaro, 2007).

### 1.1.2 $\alpha$ -tocoferol

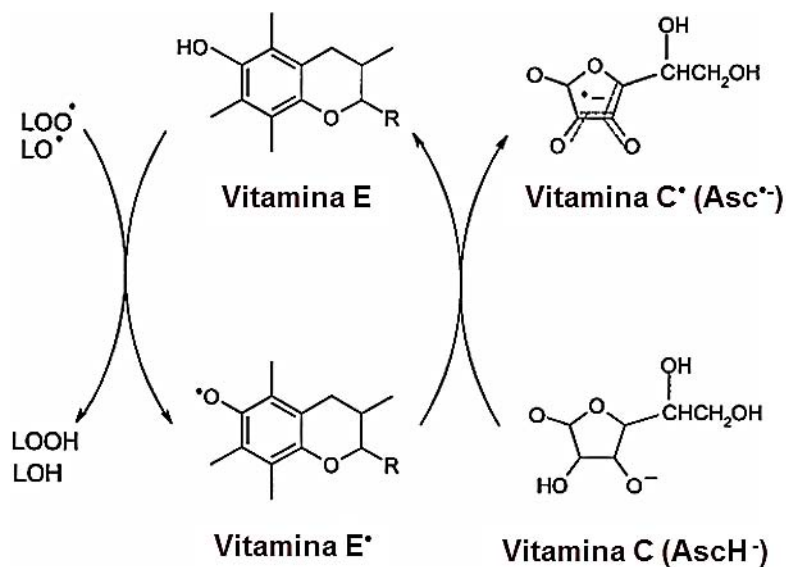
La vitamina E agrupa diferentes compuestos, dentro de los cuales se incluyen los tocoferoles y los tocotrienoles. El más importante en la especie humana es el  $\alpha$ -TOH que está presente en las membranas celulares y en las lipoproteínas plasmáticas. Su estructura molecular consta de dos partes principales: un anillo complejo cromanol y una larga cadena lateral (Figura 4); estas características le confieren su papel como antioxidante biológico, ya que es capaz de fijar RL como  $O_2^{\cdot-}$ , peroxilo ( $R-O_2^{\cdot}$ ) e  $\cdot OH$  (Febles *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 2002; Azzi, 2017).



**Figura 4. Estructura de la molécula RRR- $\alpha$ -tocoferol presente en los alimentos. Tomada de "Institute of Medicine U.S." (2000).**

El  $\alpha$ -TOH se encuentra de forma natural en los alimentos de origen vegetal; es sintetizado y almacenado en hojas y semillas de plantas. Sus principales fuentes son los aceites vegetales de maíz, soya y germen de trigo (Márquez *et al.*, 2002). En humanos la eficiencia de absorción del  $\alpha$ -TOH consumido se estima entre el 51-86%. Al ser liposoluble, su absorción depende de la formación de micelas y de la absorción de lípidos en el lumen intestinal, además se requiere de secreciones pancreáticas y biliares. En las células del epitelio intestinal, el  $\alpha$ -TOH es incorporado a los quilomicrones, los cuales son secretados por vía linfática a la circulación sistémica. En el hígado, el  $\alpha$ -TOH es reconocido específicamente por la proteína de transferencia de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TTP) y de esta forma es incorporado a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) secretadas por el hígado. Después la vitamina es intercambiada entre las diferentes lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL respectivamente) que se distribuyen dentro del plasma a los tejidos periféricos (Márquez *et al.*, 2002; Olmedilla *et al.*, 2017).

El  $\alpha$ -TOH puede alterar positivamente los biomarcadores del EOX, mejorar la eritropoyesis o disminuir la dosis necesaria de eritropoyetina. Los radicales  $R-O_2^{\bullet}$  que causan la lipoperoxidación tienen una mayor afinidad por el  $\alpha$ -TOH que por las cadenas de los ácidos grasos adyacentes. De esta manera, la vitamina detiene las reacciones en cadena de oxidación de lípidos de las membranas celulares y se transforma en una molécula con baja reactividad incapaz de atacar sustratos lipídicos. En este punto el AA juega un papel importante en la regeneración de la forma antioxidante del  $\alpha$ -TOH (Figura 5) (González-Torres, Betancourt-Rule y Ortiz-Muñiz, 2000).



**Figura 5. Reacción de la vitamina E con radicales peroxilo y la regeneración del radical tocoperoxilo a través de la oxidación de un solo electrón de la vitamina C.  $LOO^{\bullet}$ , radical lipoperoxilo;  $LO^{\bullet}$ , radical lipoalcoxilo;  $LOOH$ , lipoperóxido;  $AscH^-$ , ascorbato;  $AscH^{\bullet}$ , radical ascorbilo. Modificada de Valko et al. (2004).**

La concentración de  $14 \mu\text{M}$  de  $\alpha$ -TOH en el plasma es suficiente para prevenir la avitaminosis y la lisis de eritrocitos (hemólisis) inducida por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La RDA para hombres y mujeres es de  $15 \text{ mg/día}$  de  $\alpha$ -TOH (Institute of Medicine U.S., 2000). La deficiencia de vitamina E es poco común, generalmente sólo ocurre en alteraciones genéticas que afectan al metabolismo de la vitamina. La ataxia con deficiencia de vitamina E (AVED, por sus siglas en inglés), se produce por mutaciones en el gen que codifica para la proteína de  $\alpha$ -TTP. Estos individuos tienen la capacidad de absorber la vitamina en el intestino, pero no la pueden retener. Los síntomas incluyen ataxia progresiva, torpeza de las manos, pérdida de propiocepción y arreflexia (Azzi, 2017).

## 1.2 Estrés oxidante

Cuando la acción de los sistemas antioxidantes no puede neutralizar la producción excesiva de radicales de oxígeno, se altera la homeostasis óxido-reducción de la célula que conlleva a un daño potencial, conocido como estrés oxidante (EOx). Éste se ha asociado a varios trastornos celulares y en grandes niveles induce la muerte celular a través de necrosis y/o apoptosis (Harman, 1956; Ríos, 2003; Flora, 2009; Li *et al.*, 2015; Pisoschi y Pop, 2015).

Un RL es una especie química (molécula o átomo) que presenta al menos un electrón desapareado en la órbita externa. La mayoría de los RL son en extremo reactivos y tienden a asociarse a otras moléculas “apareando” el electrón libre, lo que a su vez las convierte en moléculas reactivas, capaces de provocar una reacción en cadena que causa daño oxidante, desde células hasta tejidos (Bunker, 1992; González-Torres, Betancourt-Rule y Ortiz-Muñiz, 2000; Ramos *et al.*, 2006).

El EOx surge de un incremento en la generación de ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN). Las ERO están representadas tanto por RL, que incluyen al  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$  y  $R-O_2^{\bullet}$ ; y no-radicales, como  $H_2O_2$ , ácido hipocloroso (HOCl), ozono ( $O_3$ ), entre otros (Figura 6). Las ERO en los organismos aerobios, son producidas principalmente por el empleo del  $O_2$  en su metabolismo. Sin embargo, no todas las especies oxidantes tienen un origen endógeno, pueden generarse durante la irradiación con luz UV, rayos X y rayos gamma; a su vez son productos de reacciones catalizadas por metales y están presentes como contaminantes en la atmósfera (Flora, 2009; Delgado, Betanzos y Sumaya, 2010; Li *et al.*, 2015; Pisoschi y Pop, 2015).

Las ERO en bajas cantidades actúan como moléculas de señalización, que están implicadas en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis y la expresión génica al desencadenar factores de transcripción. De igual forma, su producción por los fagocitos es esencial en el mecanismo de defensa contra diversas cepas de bacterias u hongos. Sin embargo, en altas concentraciones pueden iniciar la peroxidación lipídica y oxidar indiscriminadamente prácticamente todas las moléculas en las membranas y tejidos biológicos, lo que resulta en lesiones (Finkel, 1998; Apel y Hirt, 2004; Li *et al.*, 2015; Pisoschi y Pop, 2015).

Radicales libres		No radicales	
<b>Especies reactivas de oxígeno (ERO)</b>			
Superóxido	$O_2^{\bullet -}$	Peróxido de hidrógeno	$H_2O_2$
Hidroxilo	$\bullet OH$	Ácido hipobromoso	$HOBr$
Hidroperoxilo	$HO_2^{\bullet}$	Ozono	$O_3$
Lipoperoxilo	$LO_2^{\bullet}$	Oxígeno singlete	$O_2^1\Delta g$
Lipoalcoxilo	$LO^{\bullet}$	Lipoperóxido	$LOOH$
		Productos de reacción de Maillard	
<b>Especies reactivas de cloro (ERC)</b>			
Cloro atómico	$Cl^{\bullet}$	Ácido hipocloroso	$HOCl$
		Cloruro de nitrilo	$NO_2Cl$
		Cloraminas	
<b>Especies reactivas de nitrógeno (ERN)</b>			
Ácido nítrico	$NO^{\bullet}$	Ácido nitroso	$HNO_2$
Dióxido de nitrógeno	$NO_2^{\bullet}$	Catión nitrosilo	$NO^+$
		Anión nitroxilo	$NO^-$
		Tetróxido de dinitrógeno	$N_2O_4$
		Trióxido de dinitrógeno	$N_2O_3$
		Peroxinitrito	$ONOO^-$
		Ácido peroxinitroso	$ONOOH$
		Catión de nitronio	$NO_2^+$

Figura 6. Especies reactivas radicales y no radicales. Editado de Packer y Canenas (2013).

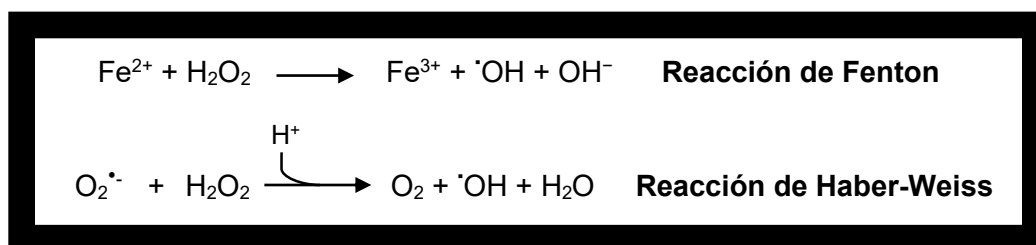
### 1.3 Metales pesados como inductores de estrés oxidante

Los metales pesados son elementos naturales que tienen un alto peso atómico y una densidad al menos 5 veces mayor que la del agua, además son potentes agentes oxidantes debido a la presencia del orbital “d” vacío. El arsénico (As), el cadmio (Cd), el cromo (Cr), el vanadio (V), el plomo (Pb) y el mercurio (Hg) poseen alto grado de toxicidad, por lo que figuran entre los metales prioritarios que son de importancia para la salud pública. Éstos se clasifican en carcinógenos humanos (conocidos o probables) de acuerdo con la “*Environmental Protection Agency*” (EPA) y la “*International Agency for Research on Cancer*” (IARC). Aunque el cobre (Cu), el cobalto (Co), el hierro (Fe), el níquel (Ni), el selenio (Se) y el zinc (Zn), son esenciales para los organismos vivos en cantidades mínimas, la exposición crónica y extensa causa efectos perjudiciales para los tejidos y



órganos que resulta eventualmente en carcinogénesis. Las posibles fuentes de exposición a los metales incluyen la contaminación del agua subterránea, el trabajo con metales, el curtido de pieles y la minería (IARC, 1990; Navarro-Aviñó, Aguilar y López-Moya, 2007; Lee *et al.*, 2012; Tchounwou *et al.*, 2012).

La toxicidad y carcinogenicidad de algunos metales se debe a que éstos poseen la capacidad de interactuar con el ADN y las proteínas nucleares, asimismo generan ERO que causan el deterioro oxidativo de diversas biomoléculas. Los compuestos de Fe(II), Cu(II), Cr(III), (IV), (V) y (VI), Co(II), Ni(II) y V(IV), mediante la reacción de Fenton producen ERO intracelulares de manera directa e indirecta. Durante esta reacción, un ion del metal de transición reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para generar un  $\cdot$ OH altamente tóxico y un ion metálico oxidado. Otro mecanismo clave por el cual los metales como Cr(III), (IV), (V) y (VI), V(IV), Co(I) y Co(II) generan ERO es la reacción de Haber-Weiss. En esta reacción, el O<sub>2</sub> $\cdot^-$  media la generación del  $\cdot$ OH a partir del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y también participa en la reducción de Fe(III) que conduce a la reacción de Fenton (Figura 7). Es probable que el mecanismo de generación de  $\cdot$ OH de tipo Haber-Weiss sea más predominante *in vivo* que la reacción de tipo Fenton (Flora, 2009; Lee *et al.*, 2012).



**Figura 7. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss.**

### 1.3.1 Cromo hexavalente

El cromo es un elemento natural que existe en combinación con otros elementos para formar diversos compuestos. Los tres principales estados de oxidación del cromo son Cr(0), Cr(III), y Cr(VI). Los efectos a la salud y la carcinogenicidad del cromo se relacionan principalmente con su estado de oxidación en el momento de exposición. Mientras que el Cr(III) en bajas dosis es un mineral esencial dietético, los compuestos de Cr(VI) son tóxicos y carcinogénicos en altas dosis (Nordberg *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2012).

El Cr(VI) es el de mayor aplicación industrial por sus propiedades ácidas y oxidantes; se ha utilizado históricamente en el cromado de metales, en tintes y pigmentos, en el proceso de curtido de cuero y en la conservación de la madera. Los compuestos de Cr(VI) más importantes en la industria son: el dicromato sódico ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), el dicromato potásico ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) y el  $\text{CrO}_3$  (Nordberg *et al.*, 2001; EPA, 2010; ATSDR, 2012).

La IARC clasifica los compuestos de Cr(VI) como carcinógenos humanos del grupo 1, ya que se encuentran en ciertos entornos ocupacionales. La exposición prolongada de Cr(VI) genera cáncer principalmente en los pulmones y en la cavidad nasal, al igual que puede causar úlceras y alergias en la piel. Además, existen estudios que muestran que el Cr(VI) induce la muerte celular por EOx, ya que genera  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton (IARC, 1990; O'Brien, Ceryak y Patierno, 2003; Lee *et al.*, 2012).

El Cr(VI) atraviesa la membrana celular a través de transportadores aniónicos de fosfato/sulfato. Dentro de la célula, este compuesto experimenta una rápida reducción metabólica a sus estados de oxidación más bajos, Cr(V), Cr(IV) y Cr(III), mediante el AA, el GSH y la cisteína (Cys). Estos estados intermedios son en extremo reactivos, participan en la producción de ERO y generan diversos tipos de daño oxidativo en el ADN, los cuales incluyen las modificaciones de bases, rompimientos de cadena sencilla, entrecruzamientos de ADN-ADN, entrecruzamientos de ADN-proteína, aductos de cromo-ADN, oxidación de nucleótidos y aberraciones cromosómicas (Figura 8) (O'Brien, Ceryak y Patierno, 2003; Lee *et al.*, 2012; Lay y Levina, 2013).

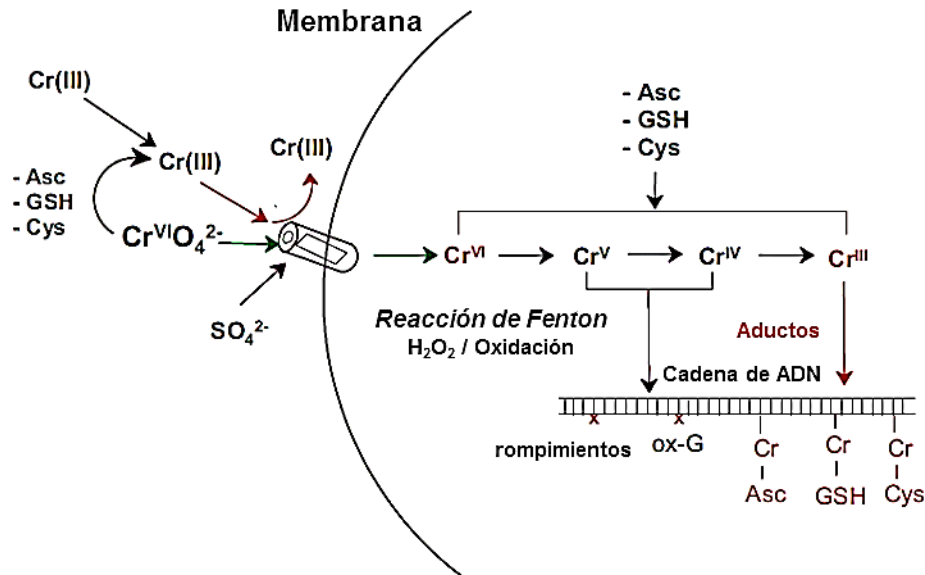


Figura 8. Absorción y daño al ADN por Cr(VI). Modificado de Jomova y Valko (2011).

#### 1.4 Estrés oxidante y genotoxicidad

La genotoxicidad es un término referido a la capacidad de las sustancias para dañar al ADN y/o componentes celulares responsables de regular la fidelidad del genoma, como el huso mitótico, las topoisomerasas, los sistemas de reparación del ADN y las ADN polimerasas, por mencionar algunos (Eastmond *et al.*, 2009). Los agentes que producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados, son conocidos como agentes genotóxicos. Dentro de estos, se incluyen los agentes que interaccionan directa e indirectamente con el ADN (Hengstler, 2007; Zuluaga, Valencia y Ortiz, 2009). Los efectos genotóxicos en células somáticas se asocian con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, que pueden propiciar el desarrollo de un cáncer en el órgano comprometido o si los daños ocurren en la línea germinal, se vinculan con trastornos durante el desarrollo fetal (Weisburger, 1999; Márquez *et al.*, 2003).

La oxidación del ADN puede generar mutaciones somáticas, que causan la síntesis de proteínas defectuosas y transformaciones malignas. La desoxirribosa es susceptible a ser dañada por el  $\cdot\text{OH}$ , lo que puede producir rompimientos de cadena sencilla; cuando se forman numerosos rompimientos de este tipo pueden conducir a la generación de

rompimientos de cadena doble y así provocar daño permanente al material genético. Los sitios más vulnerables de esta azúcar son los carbonos (C) 4 y 5, ya que son los más expuestos en la molécula del ADN (Ward, 1985; González-Torres, Betancourt-Rule y Ortiz-Muñiz, 2000).

Los RL tienen la capacidad de reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN; si este daño oxidativo no es reparado se pueden generar alteraciones como sustituciones, deleciones e inserciones. Los daños al ADN inducidos por ERO incluyen modificaciones en la estructura de las bases de purinas y pirimidinas, errores de replicación, inestabilidad del genoma y la eventual muerte. Antes de que ocurra la replicación, todas las alteraciones deben ser reparadas (González-Torres, Betancourt-Rule y Ortiz-Muñiz, 2000; Lee *et al.*, 2012).

### 1.5 Evaluación de daño genotóxico

La evaluación de la genotoxicidad está dirigida teóricamente a eliminar a los carcinógenos genotóxicos. Las técnicas para medir este daño son muy diversas; se han utilizado pruebas citogenéticas, bioquímicas, moleculares y espectrofotométricas (Ames, 1989; Arellano *et al.*, 2012; Nesslany, 2016). La evaluación de la genotoxicidad consiste en un sistema jerarquizado dividido en tres fases. En el primer nivel se emplean células cultivadas de bacterias y mamíferos para la identificación de mutaciones genéticas y alteraciones cromosómicas. Se realizan al menos dos ensayos *in vitro*: un ensayo de mutagenicidad en bacterias, que usualmente se emplea el test de Ames con *Salmonella* y un ensayo citogenético, que comúnmente analizan metafases en linfocitos humanos o en líneas celulares de roedores. Estos ensayos iniciales establecen la potencia de un compuesto para provocar un efecto mutagénico y es importante confirmarlos *in vivo* (Repetto y Repetto, 2009; Słoczyńska *et al.*, 2014).

El segundo nivel implica la evaluación de la actividad mutagénica *in vivo* en células somáticas. Éste consiste en analizar el daño citogenético en médula ósea, mediante el ensayo de micronúcleos o por la detección de alteraciones cromosómicas. Otros ensayos *in vivo* incluyen los realizados en animales transgénicos y los que se basan en el rompimientos de cadenas de ADN, como el ensayo cometa, que puede detectar rompimientos de cadenas simples y dobles, rupturas inducidas por reparación y lesiones

de sitios lábiles al álcali (Combes *et al.*, 2007; Repetto y Repetto, 2009; Słoczyńska *et al.*, 2014).

En el tercer nivel, los compuestos que dan resultados positivos de efectos mutagénicos en células somáticas *in vivo*, se analiza su potencial para afectar a las células germinales. Los ensayos de esta fase se dividen en dos clases: la clase 1 incluye ensayos en células germinales *per se* y la clase 2 son pruebas que detectan alteraciones en la descendencia de animales expuestos (Eastmond *et al.*, 2009).

### 1.5.1 Ensayo de micronúcleos

El ensayo de MN *in vivo* es especialmente relevante para evaluar la genotoxicidad, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo, farmacocinética y procesos de reparación del ADN (OECD, 2016). Dentro de sus ventajas se incluye que puede detectar clastogenicidad (rotura cromosómica) y aneugenicidad (retraso del cromosoma debido a la disfunción del aparato mitótico). La facilidad de la técnica posibilitó su adopción generalizada como un ensayo estándar de genotoxicidad (Krishna y Hayashi, 2000).

Los MN son generalmente restos lisos y redondos de cromatina nuclear observados en células en división; son fácilmente reconocibles en eritrocitos, ya que éstos extruyen su núcleo. Se pueden originar espontáneamente en consecuencia del envejecimiento celular o a manera de respuesta a determinados agentes genotóxicos. Cuando los cromosomas se dañan en la división celular, pueden perderse partes de cromosomas o cromosomas completos; estas pérdidas darán lugar a fragmentos cromosómicos o cromosomas acéntricos, que al no disponer de centrómero no se incluirán en los núcleos hijos durante la división celular (Krishna y Hayashi, 2000; Arellano *et al.*, 2012; Alborghetti *et al.*, 2015).

En el proceso de eritropoyesis, los eritroblastos se desarrollan a eritrocitos policromáticos (EPC, eritrocitos jóvenes que aún contiene ácido ribonucleico [ARN]), el núcleo principal se extruye y cualquier MN que se haya formado puede permanecer en el citoplasma enucleado. La visualización de MN se facilita en estas células porque carecen de un núcleo principal; un aumento en la frecuencia de EPC micronucleados (EPC-MN) en animales tratados con un agente de prueba es un indicador de daño cromosómico inducido. Los EPC con el tiempo pierden ARN e incrementa su contenido de hemoglobina, convirtiéndose en eritrocitos normocromáticos (ENC, eritrocitos maduros acidófilos) (Figura 9). Estos dos tipos

de eritrocitos, que se tiñen diferencialmente, se pueden ver en los compartimientos de la médula ósea, bazo y sangre periférica. En el ensayo de MN, la relación de EPC/ENC de los animales tratados con un agente de prueba proporciona un índice de citotoxicidad (Krishna y Hayashi, 2000).

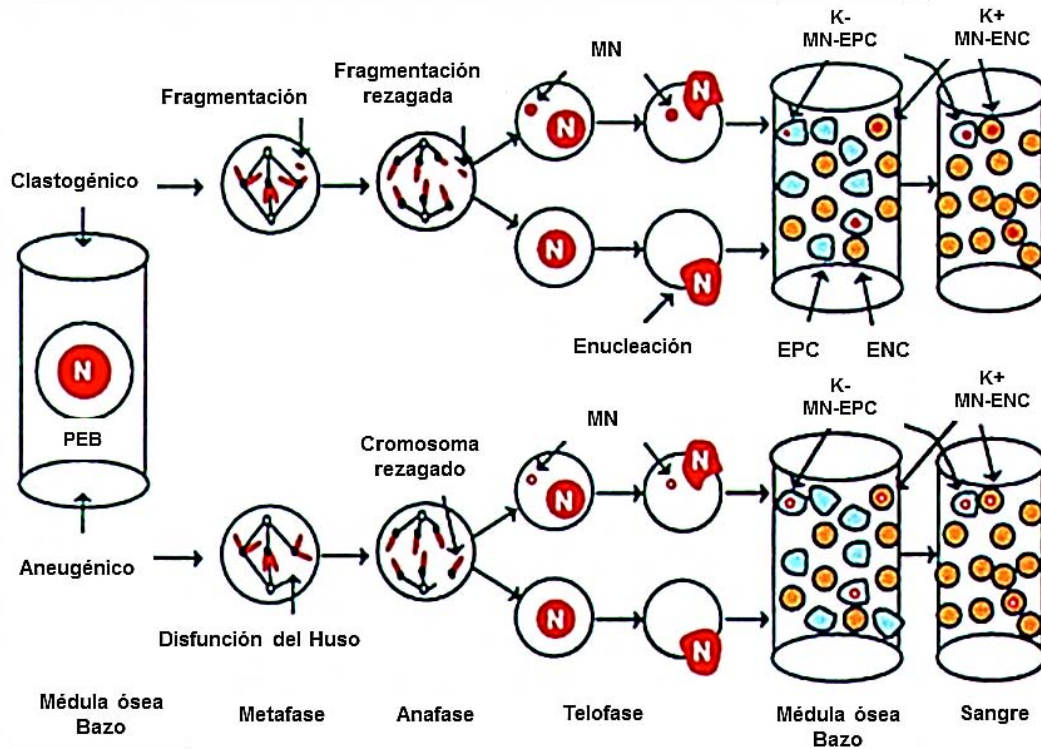


Figura 9. Mecanismos de formación de MN en los eritrocitos (EPC y ENC). K+, cinetocoro positivo; K-, cinetocoro negativo; N, núcleo; PEB, proeritroblasto; MN, micronúcleo. Modificado de Krishna y Hayashi (2000).

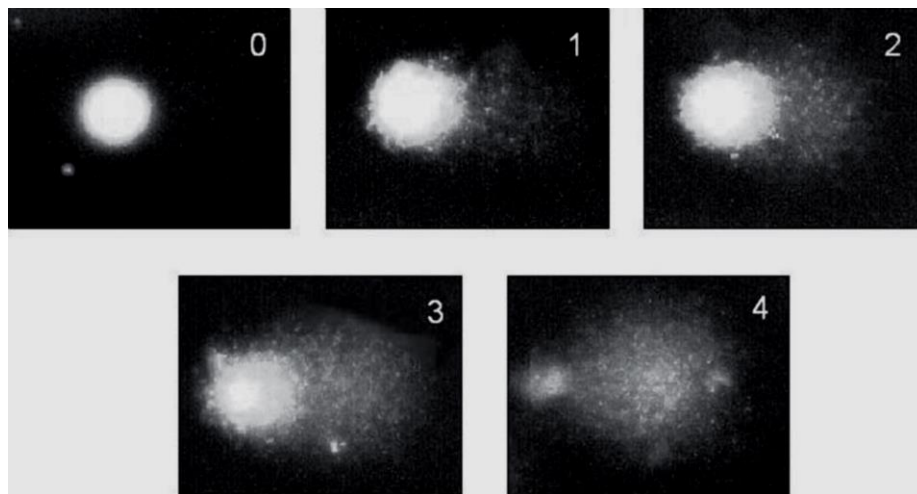
### 1.5.2 Evaluación de rompimientos de cadenas de ADN

El ensayo de electroforesis unicelular en gel (SCGE por sus siglas en inglés) o ensayo cometa, detecta rupturas de cadenas simples y dobles, rupturas inducidas por reparación y lesiones de sitios lábiles al álcali; es utilizado ampliamente en toxicología genética para medir el daño al ADN y ha sido reconocido por la "International Conference on Harmonization [ICH- S2 (R1)], 2012" como un segundo ensayo de genotoxicidad *in vivo* junto con el ensayo de MN (Kang *et al.*, 2013). La prueba fue descrita originalmente por Ostling y Johanson (1984), a partir de ésta se desarrolló el ensayo cometa neutro que mide rupturas de cadena doble y el ensayo cometa alcalino que mide sitios lábiles al álcali y



rupturas de cadena sencilla de ADN (Singh *et al.*, 1988; Malyapa *et al.*, 1998; Collins, 2004).

La intensidad relativa de la fluorescencia en la cola del cometa es una medida cuantitativa de la frecuencia de rompimientos del ADN. Los parámetros más comúnmente utilizados en la medición de cometas mediante un analizador de imágenes son la longitud de la cauda, la intensidad de fluorescencia relativa de la cabeza y la cauda (normalmente expresada en % del ADN en la cauda) y el momento de la cauda (producto de la longitud de la cola y la intensidad de ésta). Además, es posible calcular el daño en el ADN de los cometas sin sofisticados programas de análisis de imágenes; el ojo humano puede discriminar grados de daño según la apariencia del cometa (Figura 10) (Collins, 2004).



**Figura 10. Imágenes de cometas de linfocitos. Se representan los niveles de daño al ADN (0-4). Tomada de Collins (2004).**

Actualmente, el ensayo cometa ha logrado ubicarse en una posición privilegiada dentro de los ensayos utilizados para evaluar la respuesta de las células frente a agentes genotóxicos, estrés biótico y abiótico que conducen al daño al ADN (Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2015). Las ventajas de la técnica incluyen: (1) la recopilación de datos a nivel de la célula individual, permitiendo análisis estadísticos más robustos; (2) la necesidad de un número pequeño de células por muestra (<10,000); (3) su sensibilidad para detectar daño al ADN; y (4) que prácticamente cualquier población de células es susceptible al análisis (Malyapa *et al.*, 1998; Rojas, Lopez y Valverde, 1999; Dhawan *et al.*, 2007).

### 1.5.3 Apoptosis y viabilidad celular

La muerte celular programada en animales se produce normalmente, aunque no siempre por apoptosis. La apoptosis es una muerte fisiológica, que se puede presentar, ya sea porque el organismo requiera para su desarrollo de la muerte en particular de una célula, o bien porque la célula sufrió un daño irreparable y muere en beneficio del organismo (Evan y Littlewood, 1998; Alfaro, García y Dueñas, 2000). Diversos tipos de estrés (endógenos y ambientales) amenazan constantemente la integridad del genoma, lo que lleva a la evolución de vías preventivas, como son los puntos de control del ciclo celular y los mecanismos de reparación del ADN. Sin embargo, si la integridad del genoma está irremediablemente comprometida, la célula se ve obligada a morir; cuando el daño en el ADN es demasiado severo, las células pueden sufrir una detención permanente del ciclo celular o muerte (De Zio, Cianfanelli y Cecconi, 2013).

Las rupturas de doble cadena de ADN conducen a la activación de ATM y Chk2 que, a su vez activan a p53 para inducir la expresión de varios genes implicados en la reparación del ADN y en la apoptosis, además de los inhibidores de p53 (Wip1 y MDM2). Si el daño en el ADN es sostenible, p53 se inhibe rápidamente a través de la retroalimentación negativa de MDM2 y Wip1, lo que resulta en la reparación del ADN y la supervivencia celular. Si la lesión del ADN persiste, la continua activación de ATM/p53 permite la acumulación de proteínas apoptóticas, desencadenando la muerte celular (Figura 11) (De Zio, Cianfanelli y Cecconi, 2013).

Las células que mueren por apoptosis experimentan cambios morfológicos característicos: se encogen y se condensan, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura nuclear se desensambla y la cromatina nuclear se condensa y se fragmenta. La superficie celular a menudo emite protrusiones y si la célula es grande, con frecuencia se rompe en fragmentos rodeados de membrana denominados cuerpos apoptóticos (Figura 12). Además, la superficie de la célula o de los cuerpos apoptóticos se altera químicamente con la externalización de fosfatidilserina, de modo que una célula adyacente o un macrófago los fagocita antes de que puedan liberar su contenido, evitando así una respuesta inflamatoria perjudicial. Los métodos con los que se evalúa la apoptosis son numerosos y variados; éstos se basan en uno o más criterios mencionados anteriormente (McGahon *et al.*, 1995; Alberts *et al.*, 2010).

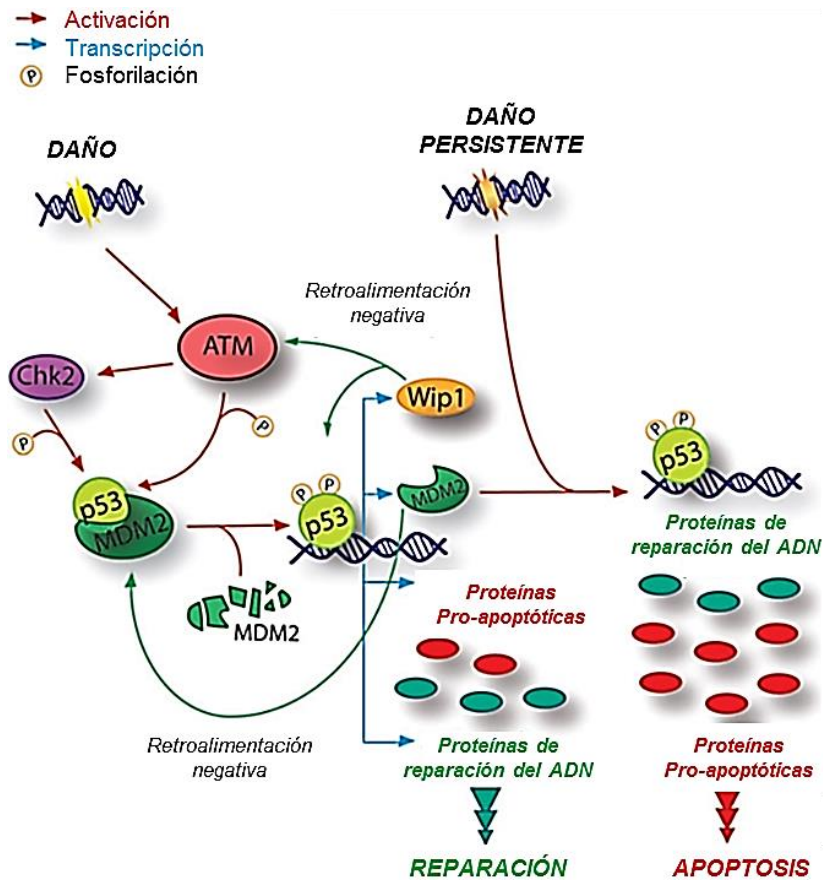
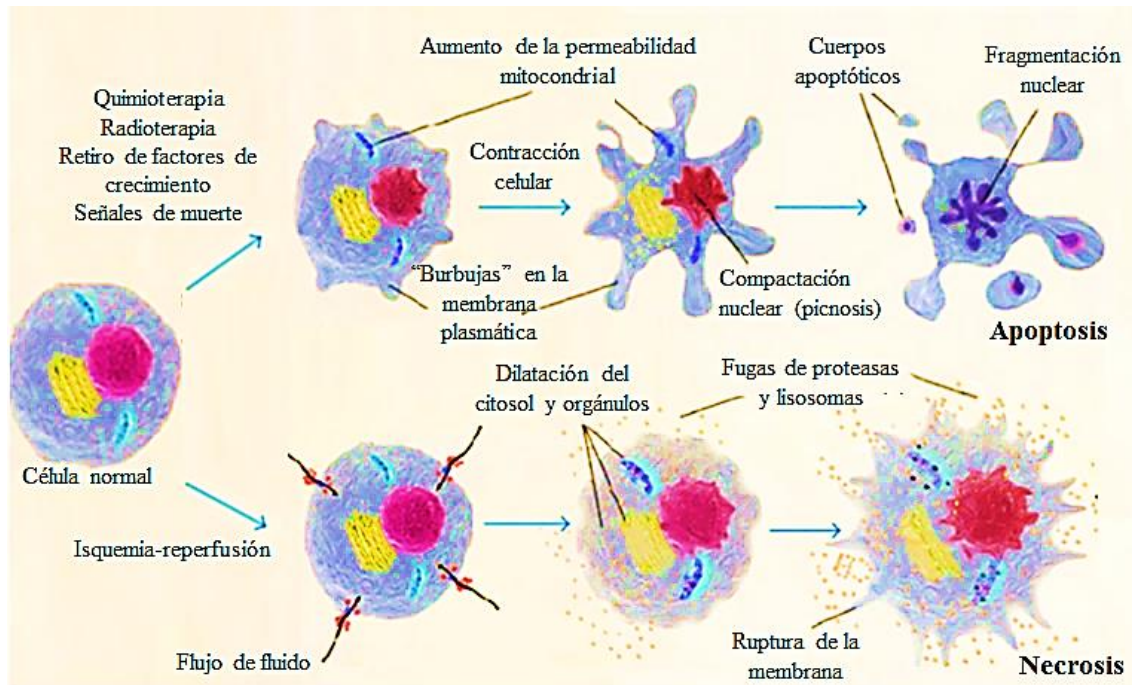


Figura 11. Activación de p53 y su implicación en la reparación del ADN y apoptosis. Modificada de De Zio, Cianfanelli y Cecconi (2013).

A diferencia de la apoptosis y de otras formas de muerte celular programada, las células animales que sufren una lesión aguda por traumatismo o falta de riego sanguíneo, normalmente mueren por un proceso denominado necrosis celular (Figura 12). Las células necróticas se hinchan y se lisan, de modo que liberan todo su contenido sobre las células adyacentes, lo que provoca una respuesta inflamatoria (Alberts *et al.*, 2010).

La pérdida de viabilidad celular se mide con mayor frecuencia por la pérdida de la integridad de la membrana; este evento puede deberse a necrosis o apoptosis. Este parámetro se mide por la absorción de ciertos colorantes, como el azul tripán o el yoduro de propidio. Otros ensayos de viabilidad celular que usan colorantes como rezasurina o MTT se basan en parámetros bioquímicos y miden la reducción en la actividad metabólica de la célula. El método de tinción diferencial con naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BrEt)

determina la viabilidad celular y la apoptosis en función de la integridad de la membrana (McGahon *et al.*, 1995).



**Figura 12. Diferencias de las vías de muerte celular (apoptosis y necrosis). Editada de Nunes, Bernardazzi y de Souza (2014).**

## 1.6 Reparación del daño oxidativo al ADN

Dada a la variedad de lesiones en el ADN, existen diferentes mecanismos de reparación. El primer paso para una respuesta eficiente contra el daño al ADN es el reconocimiento de la lesión, ésta es mediada por proteínas "sensor", que reconocen específicamente el daño y coordinan a otras moléculas ("mediadores y efectores"), las cuales son responsables de la transducción de la señal del núcleo al citoplasma. En consecuencia, el ciclo celular se detiene a fin de evitar la herencia de la lesión; mientras tanto, se establecen los mecanismos de reparación del ADN (De Zio *et al.*, 2013). De acuerdo con Beas y colaboradores (2009) los sistemas de reparación son: (1) la reparación por escisión de bases; (2) la reparación por escisión de nucleótidos; (3) la reparación de pares erróneos; y (4) la reparación de rompimientos de doble cadena.

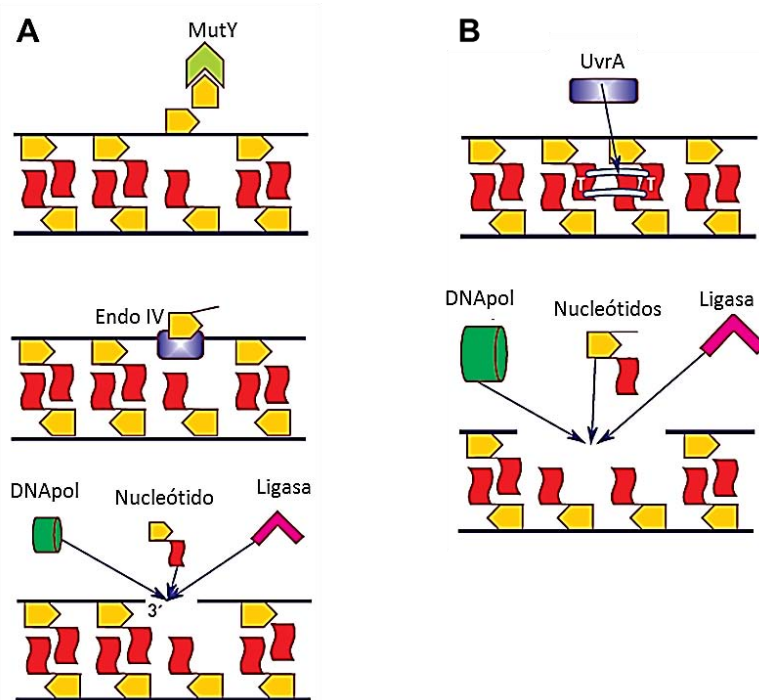
El daño oxidativo al ADN produce modificaciones en las bases nitrogenadas y en la desoxirribosa, entrecruzamientos covalentes, rupturas de cadena sencilla y doble. Entre las bases nitrogenadas del ADN, la guanina tiene el potencial de oxidación más bajo y es la más propensa al daño oxidativo. La nucleobase 8-hidroxi-guanina (8-oxoG) es menos común, pero actúa como trampa para radicales catiónicos, ya que tienen un potencial de oxidación mucho más bajo que la guanina. Tras la oxidación del 8-oxoG, se agrega un grupo -OH al carbono 8 de la molécula de guanina y el producto modificado es conocido como 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG). La presencia de este nucleótido es un biomarcador de daño oxidativo y al no ser reparado puede generar mutaciones relacionadas con algunos tipos de cáncer. Las lesiones en el ADN de este tipo son reconocidas y escindidas por el mecanismo de reparación por escisión de bases (Prabhulkar y Li, 2010).

La reparación por escisión de bases entra en acción en los sitios donde se encuentran citosinas, adeninas o guaninas desaminadas; adeninas, guaninas o citosinas alquiladas por agentes exógenos, o guaninas oxidadas por ERO, que producen 8-OHdG. El sistema utiliza dos tipos de proteínas para retirar y sustituir la base modificada: glucosilasas (MutY en bacterias y MUTYH en humanos) y endonucleasas (Endo IV en *Escherichia coli* y APE1 en humanos). La glucosilasa identifica la base alterada mediante modificaciones en la estructura, rompe el enlace glucosídico entre la base y la desoxirribosa y retira la base, creando una desoxirribosa que carece de base. La endonucleasa AP (apurínica/apirimidínica) reconoce este sitio sin base; genera un extremo 3'-OH libre, que permite que una polimerasa de ADN inserte el nucleótido faltante; posteriormente, una ligasa sella los extremos (Figura 13) (Beas, Ortuño y Armendáriz, 2009).

El 8-OHdG que es soluble en agua se secreta fuera de la célula hacia el espacio extracelular después de ser eliminado de la hélice de ADN. Por lo tanto, la monitorización de 8-OHdG extracelular proporcionará información sobre el daño oxidativo del ADN (formación de 8-OHdG) y los mecanismos de reparación (escisión de 8-OHdG) (Zhang *et al.*, 2006).

La estructura general del ADN puede verse alterada mediante lesiones que crean deformaciones notables en la hélice, como las que se generan cuando las bases nitrogenadas reaccionan con hidrocarburos como el benzopireno, o cuando se generan dímeros entre pirimidinas adyacentes en la misma hebra, debido a exposición a luz ultravioleta o algunos químicos, como cisplatino, psoraleno o mitomicina C. El sistema

agrupa varias proteínas que reconocen la lesión y sirven de contacto para nucleasas especializadas que retiran de 12 a 30 nucleótidos, incluyendo el sitio de lesión. Una vez que se retiran varios nucleótidos del sitio de lesión sobre la hebra afectada, el hueco que se genera se repara mediante la acción coordinada de una polimerasa de ADN y una ligasa (Figura 13). Los blancos comunes de este sistema son los dímeros de timina formados por la luz UV (Beas, Ortuño y Armendáriz, 2009).



**Figura 13. Mecanismos de reparación de daño al ADN. A) por escisión de bases; B) por escisión de nucleótidos. Tomada de Beas, Ortuño y Armendáriz (2009).**



## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las exposiciones ocupacionales y ambientales a los metales están estrechamente relacionadas con un mayor riesgo de varios tipos de cáncer. La toxicidad y la carcinogenicidad de éstos se debe a que generan ERO y poseen la capacidad de interaccionar con proteínas nucleares y ADN, lo que causa el deterioro de estas macromoléculas biológicas. En particular se ha mostrado que los compuestos de Cr(VI) inducen genotoxicidad ya que al reducirse a Cr(III) generan ERO y RL, produciendo así varios tipos de lesiones de ADN y mutaciones genéticas. En contraparte, se ha probado que ciertas plantas o sus componentes confieren efectos protectores contra procesos mutagénicos y carcinogénicos. Una dieta basada en alimentos como frutas, vegetales y granos aportan la cantidad necesaria de antioxidantes al organismo, que podrían prevenir y disminuir los efectos negativos del ERO. En estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación se ha observado que el daño genotóxico inducido por metales pesados puede ser contrarrestado mediante la administración de antioxidantes exógenos como el AA y el  $\alpha$ -TOH. Además de que el AA juega un papel importante en la regeneración de la forma antioxidante del  $\alpha$ -TOH, los antioxidantes pueden tener efectos sobre el sistema antioxidante endógeno. Por ello resulta de interés evaluar las frecuencias de MN, apoptosis, rompimientos de cadena sencilla y los niveles de antioxidantes endógenos en ratones tratados con AA- $\alpha$ TOH y Cr(VI).

## **III. HIPÓTESIS**

Si el AA (hidrosoluble) y el  $\alpha$ -TOH (liposoluble) son considerados como la defensa antioxidante más importante a nivel del citoplasma y de la membrana lipídica respectivamente, e incluso se ha probado que protegen contra el daño genotóxico inducido por metales asociados con el ERO, entonces se espera que la combinación de estos compuestos (AA- $\alpha$ TOH) proteja contra el daño al ADN inducido por Cr(VI) mediante la disminución de las frecuencias de MN, el incremento de la apoptosis, la activación de la reparación del ADN y el restablecimiento de los niveles de antioxidantes totales en sangre periférica de ratones expuestos a CrO<sub>3</sub>.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto del ácido ascórbico y del alfa-tocoferol sobre la reparación del daño al ADN y de los niveles de antioxidantes totales en ratones Hsd:ICR expuestos a trióxido de cromo.

### **4.2 Objetivos particulares**

- ❖ Corroborar el daño genotóxico y citotóxico del CrO<sub>3</sub> mediante la evaluación de las frecuencias de MN en EPC, la relación de EPC/ENC y la viabilidad celular en muestras en sangre periférica.
- ❖ Valorar la dosis no genotóxica ni citotóxica del AA- $\alpha$ TOH mediante la evaluación de las frecuencias de MN en EPC, la relación de EPC/ENC y la viabilidad celular en muestras en sangre periférica.
- ❖ Evaluar el efecto del AA- $\alpha$ TOH sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por CrO<sub>3</sub> mediante la evaluación de las frecuencias de MN en EPC, la relación de EPC/ENC y la viabilidad celular en muestras en sangre periférica.
- ❖ Evaluar el efecto del CrO<sub>3</sub>, del AA- $\alpha$ TOH y de la combinación de ambos tratamientos (CrO<sub>3</sub> y AA- $\alpha$ TOH) sobre la apoptosis en células nucleadas de sangre periférica.
- ❖ Evaluar mediante el ensayo cometa el efecto del AA- $\alpha$ TOH sobre la reparación de rupturas de cadenas sencillas de ADN inducidas por CrO<sub>3</sub>.
- ❖ Evaluar el efecto del CrO<sub>3</sub>, del AA- $\alpha$ TOH y de la combinación de ambos tratamientos (CrO<sub>3</sub> y AA- $\alpha$ TOH) sobre los niveles de antioxidantes totales en plasma de sangre periférica.

## V. MATERIAL Y MÉTODO

### 5.1 Animales

Se emplearon ratones hembra de la cepa Hsd:ICR de ocho semanas de edad con un peso variable entre 40 a 50 g. Los animales se obtuvieron del “Centro UNAM-Harlan para la Producción de Animales de Laboratorio” con sede en la Facultad de Química y de éstos se desarrolló un pie de cría en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. A los ratones se les permitió el libre acceso al agua y alimento (nutricubos, Purina®), se mantuvieron bajo condiciones estériles a una temperatura de 22 °C ( $\pm$  3 °C) y periodos de 12 horas luz, 12 horas oscuridad. El Comité de Bioética de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, aprobó los protocolos experimentales utilizados en este estudio (número de registro FESZ/DEPI/363/14).

Los criterios de evaluación y las condiciones de trabajo se establecieron con base a los lineamientos de la “*Food and Drug Administration*” (FDA por sus siglas en inglés), de la “*Environmental Protection Agency*” (EPA por sus siglas en inglés) y de la “*Organisation for Economic Co-operation and Development*” (OECD por sus siglas en inglés) (Heddle *et al.*, 1983; Mavournin *et al.*, 1990; EPA, 1998; FDA, 2000; OECD, 2016).

### 5.2 Reactivos

Los reactivos empleados en el estudio se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Se utilizaron los colorantes NA [CAS No. 10127-02-3] y BrEt [CAS No. 1239-45-8]. Para los tratamientos se requirió agua destilada estéril, aceite de maíz (vehículo para compuestos liposolubles) [CAS No. 8001-30-7], CrO<sub>3</sub> [CAS No. 1333-82-0], AA [CAS No. 50-81-7] y  $\alpha$ -TOH [CAS No. 10191-41-0]. Los reactivos necesarios para el ensayo cometa fueron los siguientes: agarosa con punto de fusión normal [CAS No. 9012-36-6], agarosa con bajo punto de fusión [CAS No. 39346-81-1], NaCl [CAS No. 7647-14-5], NaOH [CAS No. 1310-73-2], HCl [CAS No. 7647-01-0], EDTA [CAS No. 6381-92-6], DMSO [CAS No. 67-68-5], Triton™ X-100 [CAS No. 9002-93-1], Trizma® Base [CAS No. 77-86-1], PBS y alcohol etílico [CAS No. 64-17-5]. Los niveles de antioxidantes totales se midieron con un Kit de la empresa Cayman [No. 709001].

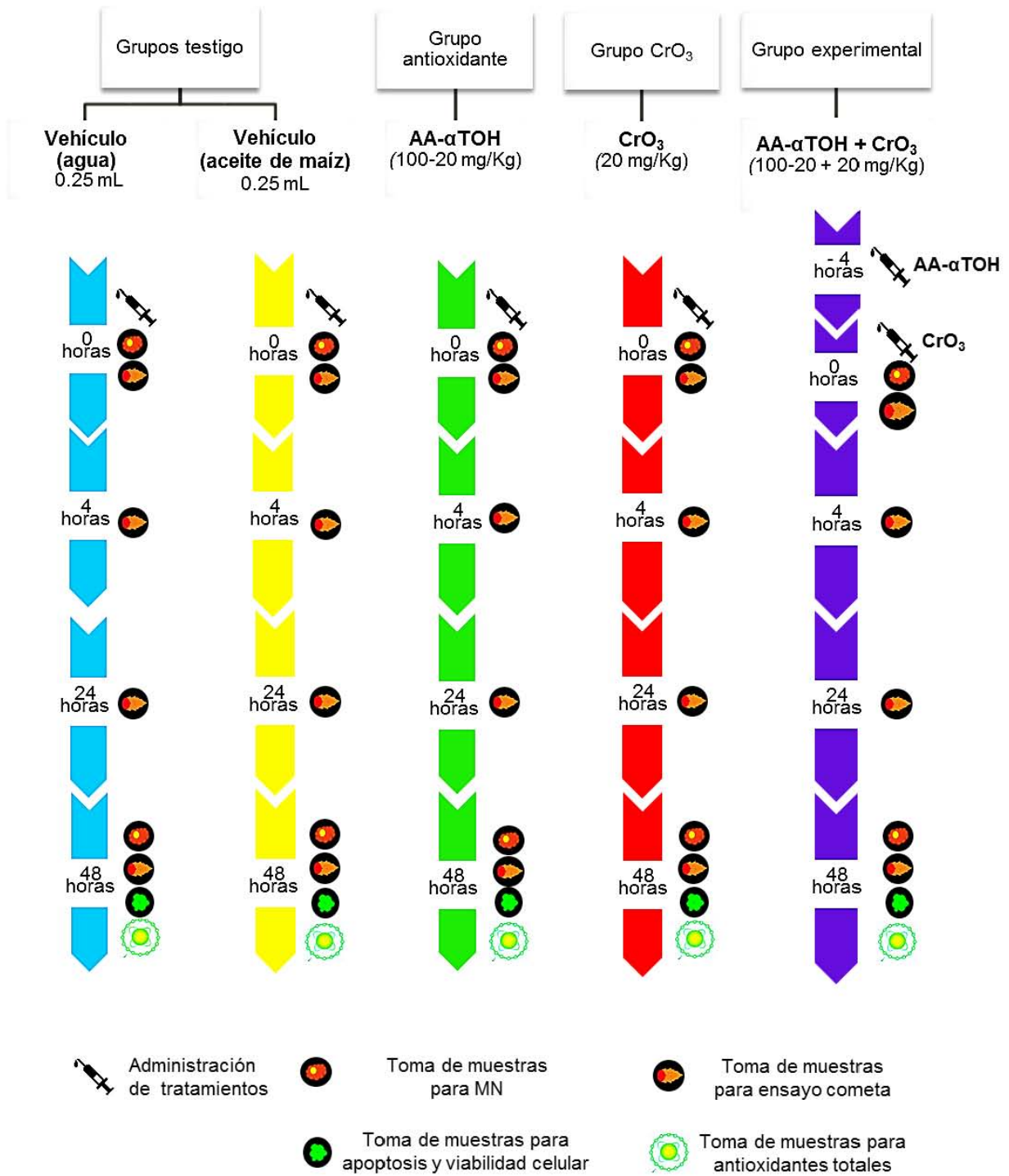
### 5.3 Tratamientos

Las soluciones de  $\text{CrO}_3$  y de AA se prepararon con agua destilada estéril, mientras que el  $\alpha$ -TOH se disolvió en aceite de maíz (vehículo para compuestos liposolubles). La administración de los antioxidantes (AA- $\alpha$ TOH) se realizó por vía *ig*, mientras que el  $\text{CrO}_3$  por vía *ip*, todos en un volumen aproximado de 0.25 ml.

La dosis del  $\text{CrO}_3$  fue establecida de acuerdo a investigaciones previas, en donde el compuesto induce daño genotóxico sin causar la muerte de los organismos (García-Rodríguez, López-Santiago y Altamirano-Lozano, 2001; O'Brien, Ceryak y Patierno, 2003; García-Rodríguez *et al.*, 2014). La dosis del AA y del  $\alpha$ -TOH se establecieron con base a estudios anteriores en donde estos antioxidantes no generaron daño genotóxico ni citotóxico (García-Rodríguez, Serrano-Reyes y Altamirano-Lozano, 2012; García-Rodríguez, Hernández-Cortés y Altamirano-Lozano, 2016).

Los grupos experimentales se conformaron al azar por cinco ratones cada uno y se dividieron de la siguiente manera (Figura 14):

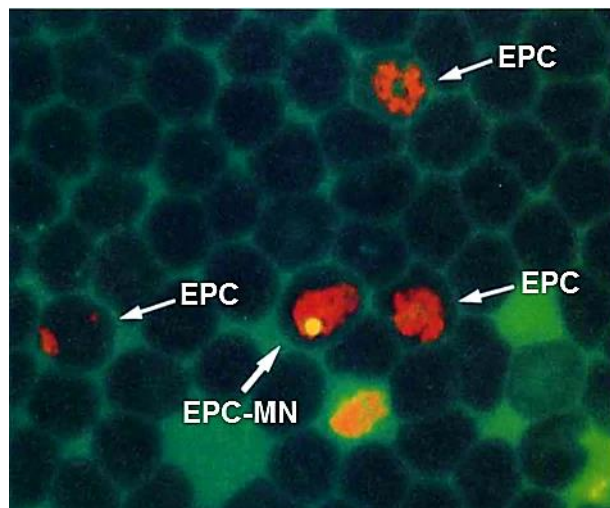
- a) Grupos testigo, se les administró sólo el vehículo (0.25 ml de agua destilada estéril o de aceite de maíz).
- b) Grupo de antioxidantes, se les administró una dosis única de 100 mg/Kg de AA y 20 mg/Kg de  $\alpha$ -TOH vía *ig*.
- c) Grupo  $\text{CrO}_3$ , se administró una dosis única de 20 mg/Kg de  $\text{CrO}_3$  vía *ip*.
- d) Grupo experimental (combinados), a los que se les administró el tratamiento antioxidante (AA- $\alpha$ TOH) cuatro horas antes del  $\text{CrO}_3$  por las mismas vías.



**Figura 14. Protocolo para la administración de tratamientos y toma de muestras. Grupos testigo: se trataron únicamente con el vehículo (agua o aceite de maíz); grupo antioxidante: se le administró AA- $\alpha$ TOH vía ig. (100-20 mg/Kg); grupo CrO<sub>3</sub>: se le aplicó 20 mg/Kg de CrO<sub>3</sub> vía ip.; grupo experimental: se le administró AA- $\alpha$ TOH vía ig. (100-20 mg/Kg) cuatro horas antes del CrO<sub>3</sub> vía ip. (20 mg/Kg).**

#### 5.4 Ensayo de micronúcleos y relación EPC/ENC

La prueba de MN y la relación de EPC/ENC se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Hayashi *et al.* (1990). Las muestras de sangre periférica fueron tomadas de la vena caudal de los animales a las 0 y 48 horas después de la administración de los tratamientos. La sangre se colocó sobre laminillas previamente tratadas con NA. Para la evaluación se empleó un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS CX31RBSFA) con una luz de excitación azul (480 nm) y un filtro de barrera amarillo (515 nm). La tinción de los eritrocitos con NA, permite diferenciar a los ENC de los EPC, ya que estos últimos al seguir presentando ARN-ribosomal, el fluorocromo los tiñe de color rojo. Con este método también es posible identificar la presencia de MN, ya que el ADN es teñido de color amarillo (Figura 15). Para el análisis del daño genotóxico se cuantificaron los EPC-MN que había en 4000 EPC por ratón; para la evaluación de daño citotóxico se contaron los EPC presentes en 2000 eritrocitos totales (EPC+ENC).



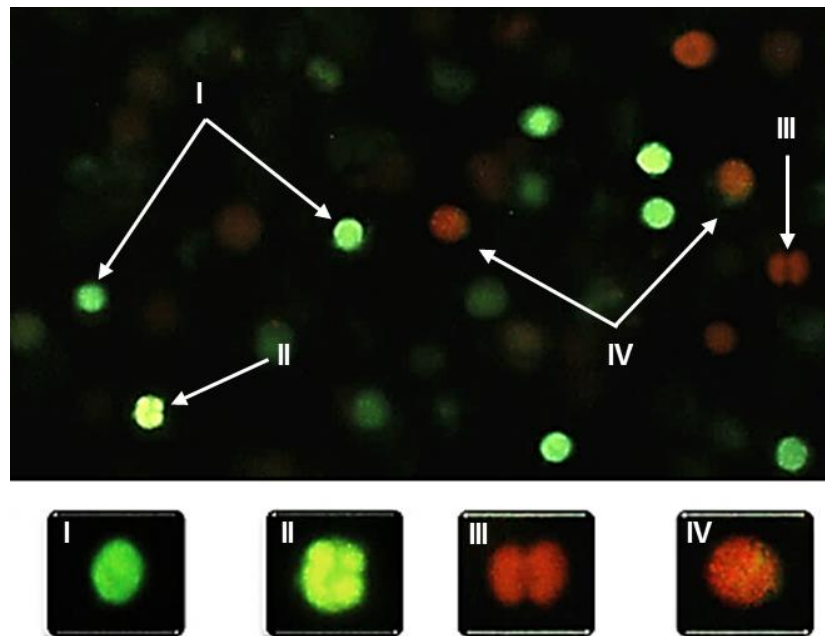
**Figura 15. Microfotografía de fluorescencia de células de sangre periférica de ratón teñidas con NA. EPC, eritrocito policromático; EPC-MN, eritrocito policromático micronucleado. Tomada de Hayashi *et al.* (1990).**

## 5.5 Evaluación de apoptosis y viabilidad celular

Las evaluaciones de apoptosis y viabilidad celular se realizaron después de 48 horas de la administración de los tratamientos mediante una técnica de tinción diferencial con NA/BrE establecida por McGahon *et al.* (1995), con modificaciones de García-Rodríguez, Carvente-Juárez y Altamirano-Lozano (2013). Por cada ratón se obtuvo aproximadamente 25  $\mu$ l de sangre de la vena caudal, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm para posteriormente teñir el botón celular con una solución de NA/BrE (1:1). La evaluación de células se realizó inmediatamente bajo un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS CX31RBSFA) con una luz de excitación azul y un filtro de barrera amarillo. Se procuró no exponer las laminillas a la luz y realizar la técnica lo más rápido posible para evitar la muerte celular y la degradación de los fluorocromos.

El NA se intercala en el ADN dándole una coloración verde, mientras que el BrEt sólo ingresa en las células no viables en donde se ha comprometido la membrana, éste se intercala en el ADN tiñéndolo de color rojo (el BrEt sobrepasa al NA). De esta manera las células vivas con membranas intactas tendrán un color verde uniforme en sus núcleos. Las células apoptóticas tempranas cuyas membranas aún están intactas, pero han comenzado a fragmentar su ADN, la condensación de la cromatina será visible como parches de color verde. A medida que la célula progresa a través de la vía apoptótica el BrEt puede ingresar en la célula y teñirla. Las células apoptóticas tardías tendrán cromatina condensada de color rojo que las distinguirá de las células necróticas, que tienen una estructura uniforme (McGahon *et al.*, 1995). Se evaluaron 300 células por ratón, entre las que se cuantificó el número de células sanas, apoptóticas y necróticas. Para el análisis de viabilidad celular, se consideraron células viables a las teñidas de color verde y células no-viables a las teñidas de color rojo (Figura 16).





**Figura 16.** Morfología de células viables (sanas y apoptóticas tempranas) y células no viables (apoptóticas tardías y necróticas) teñidas con NA/BrEt (vistas a 400x). I) células sanas; II) apoptóticas tempranas; III) apoptóticas tardías; IV) necróticas. Tomada de García-Rodríguez, Hernández-Cortés y Altamirano-Lozano (2016).

## 5.6 Rupturas de cadena de ADN

La evaluación de la reparación del daño al ADN se realizó basándonos en la técnica de electroforesis alcalina unicelular en gel propuesta por Singh *et al.* (1988) y Dhawan *et al.* (2007). Por cada ratón se tomaron dos muestras de sangre (10  $\mu$ l) de la vena caudal a las 0, 4, 24 y 48 horas después de la administración de los tratamientos; éstas se suspendieron en 75  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) y se colocaron sobre portaobjetos previamente tratados con agarosa de punto de fusión normal (0.7%). Posteriormente, se les agregó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) y se colocaron en una solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Trizma base 10 mM, 1% Triton X-100 y 10% DMSO; pH 10) durante 24 horas a 4° C. Esto remueve las membranas y componentes solubles de la célula, incluyendo la mayoría de las histonas.

Después de la lisis, las muestras se incubaron en la cámara de electroforesis con una solución amortiguadora alcalina (NaOH 300 mM/EDTA 1 mM; pH>13) durante 20 minutos. Posteriormente, la electroforesis se realizó a 300 mA y 25 V durante 20 minutos. El ánodo atrae al ADN y la migración dependerá de las rupturas presentes en éste. Al finalizar la

electroforesis, a las laminillas se les realizó un lavado con una solución amortiguadora de neutralización (Tris 0.4 M; pH 7.5) durante 15 min y se les fijó con alcohol etílico al 70% (5 min).

Los geles se tiñeron con 75  $\mu$ L de una solución de BrEt (20  $\mu$ g/ml) para la observación de los "cometas". Las evaluaciones se realizaron con un ocular graduado (reglilla), bajo un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2 (filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm). Se evaluaron 300 células por ratón, se obtuvo la frecuencia de cometas y se midió la longitud de cada uno para sacar el porcentaje de ADN en la cauda, el cual se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de ADN en la cauda} = \frac{LongC}{LongT} (100)$$

Dónde:

$LongC$  = longitud de la cauda

$LongT$  = longitud total del cometa

Cada núcleo fue clasificado de acuerdo al grado de daño al material genético con base a los criterios de Collins (2004) y Muñoz (2009) en las siguientes categorías:

Nivel de daño 0 (ninguno):	<5% de ADN en la cauda.
Nivel de daño 1 (bajo):	5-10% de ADN en la cauda.
Nivel de daño 2 (medio):	11-40% de ADN en la cauda.
Nivel de daño 3 (alto):	41-95% de ADN en la cauda.
Nivel de daño 4 (total):	>95% de ADN en la cauda.

La magnitud del daño en el ADN fue expresado en unidades arbitrarias (UA) de acuerdo al sistema propuesto por Collins (2004), de tal forma que el número de cometas observados fue multiplicado por la clasificación de los mismos, representado con la siguiente ecuación (Marrero *et al.*, 2007):

$$UA = \sum i \cdot TCG(i)$$

Dónde:

$TCG(i)$  = total de células clasificadas con grado de daño al ADN

## 5.7 Determinación de la capacidad de antioxidantes totales

La determinación de antioxidantes totales se realizó en plasma de sangre periférica 48 horas después de la administración de los tratamientos mediante un kit comercial (Cayman). Por cada ratón se tomaron 300  $\mu$ l de sangre con heparina como anticoagulante y se centrifugaron a 3,500 rpm a 4 °C durante 10 minutos. El plasma se colectó y se diluyó en una relación 1:10 con una solución amortiguadora; posteriormente se utilizaron 10  $\mu$ l de estas diluciones para la cuantificación de antioxidantes. El kit se basa en el método ABTS propuesto por Miller *et al.* (1993), en el cual se determina la capacidad de los antioxidantes en la muestra para inhibir la oxidación del ABTS (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) a ABTS $^{\bullet+}$ , por la acción de la metmioglobina. Con esta técnica se evalúan las actividades antioxidantes combinadas de todos los componentes de la muestra, que incluyen vitaminas, proteínas, lípidos, GSH, ácido úrico, etc. La cantidad de ABTS $^{\bullet+}$  producido se midió en un lector de placas a 405 nm. La supresión de la absorbancia de este radical es causada por los antioxidantes en la muestra, la cual es proporcional a su concentración. La curva estándar de calibración se construyó con Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un análogo soluble en agua de la vitamina E. El valor de los antioxidantes totales de las muestras analizadas se expresó como un equivalente de la concentración milimolar (mM) de la solución Trolox.

## 5.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de MN, EPC/ENC, ensayo cometa (UA y porcentaje de ADN en la cauda) y antioxidantes totales se presentan como media  $\pm$  desviación estándar y se les aplicó un análisis de varianzas (ANDEVA) seguido de una prueba Tukey o Dunnett de acuerdo con la homogeneidad de varianzas. A los MN se les calculó la frecuencia neta de inducción de MN (NIF por sus siglas en inglés), estos datos, así como las frecuencias de apoptosis, viabilidad celular y cometas se les analizó mediante una prueba de chi-cuadrada ( $\chi^2$ ). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete IBM SPSS Statistic 21 y el paquete GraphPad Prism 5. Para todos los casos se consideraron estadísticamente significativos aquellos que presentaran una  $p < 0.05$  (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez, López-Santiago y Altamirano-Lozano, 2001).

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Genotoxicidad

En el Cuadro 1 se muestran los promedios de los MN evaluados en los grupos tratados con AA- $\alpha$ TOH (100-20 mg/Kg), CrO<sub>3</sub> (20 mg/Kg) y sus respectivos testigos. Se puede observar que en el tratamiento de antioxidantes no se incrementó el promedio de MN con respecto a sus testigos (agua y aceite), ni contra su hora 0 (MN basales). En el tratamiento con CrO<sub>3</sub> se presentó un incremento de alrededor de 3 MN, que resultó significativo contra su testigo y su hora 0, además de causar la muerte de un organismo. Por otra parte, en el grupo combinado (AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub>) se disminuyó significativamente el promedio de MN en comparación con el grupo CrO<sub>3</sub>, aunque el incremento de MN aún resultó significativo al compararlo contra su testigo. Esto sugiere que existe una protección parcial del AA- $\alpha$ TOH.

**Cuadro 1. Promedios de MN en sangre periférica de los grupos tratados con CrO<sub>3</sub> y AA- $\alpha$ TOH.**

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Hora	N	MN / 1,000 EPC ( $\bar{x} \pm d.e.$ )	ANDEVA
Testigo/agua	-	0	5	0.4 $\pm$ 0.1	
		48	5	0.3 $\pm$ 0.2	
Testigo/aceite	-	0	5	0.3 $\pm$ 0.3	
		48	5	0.4 $\pm$ 0.1	
AA- $\alpha$ TOH	100-20	0	5	0.5 $\pm$ 0.3	
		48	5	0.4 $\pm$ 0.3	
CrO <sub>3</sub>	20	0	5	0.5 $\pm$ 0.2	
		48	4 †	3.6 $\pm$ 1.0	a, c, e
AA- $\alpha$ TOH + CrO <sub>3</sub>	100-20 + 20	0	5	0.3 $\pm$ 0.3	
		48	5	2.2 $\pm$ 1.1	a, b, d

Significancia estadística  $p < 0.05$ ; <sup>a</sup>p: vs. testigo/agua; <sup>b</sup>p: vs. testigo/aceite; <sup>c</sup>p: vs. CrO<sub>3</sub> hora 0; <sup>d</sup>p: vs. AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub> hora 0; <sup>e</sup>p: vs. AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub> hora 48. †: Muerte de un ratón.

Debido a la variabilidad que se observó en los promedios de MN basales (antes de administrar el tratamiento), se realizó el cálculo del NIF. Este cálculo parte de la premisa de que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que se le resta la frecuencia de MN basales a las siguientes horas del tratamiento, como se representa en la siguiente fórmula (García-Rodríguez, López-Santiago y Altamirano-Lozano, 2001):

$$NIF = MN_a x_i - MN_a x_0$$

Dónde:  
 $a$  = grupo  
 $x_0$  = tiempo 0  
 $x_i$  = tiempo de evaluación

En la Figura 17 se muestra el análisis del NIF de MN calculado por grupo en 20,000 EPC a la hora 48. Al hacer este análisis se corrobora lo anteriormente descrito y se observa que el grupo tratado con AA- $\alpha$ TOH disminuye significativamente la frecuencia de MN con respecto al testigo/aceite y que la disminución de las frecuencias de MN en el grupo AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub> respecto al grupo CrO<sub>3</sub> es del 37.5%.

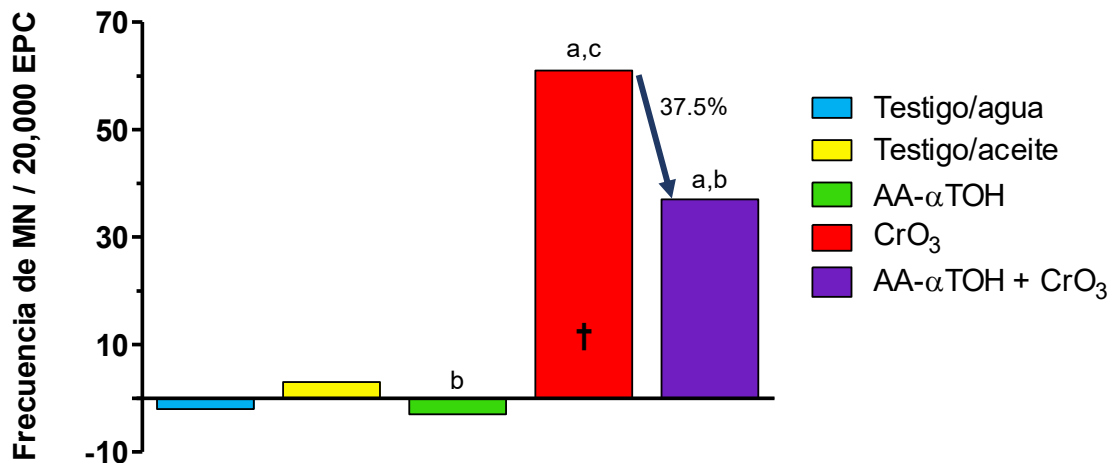
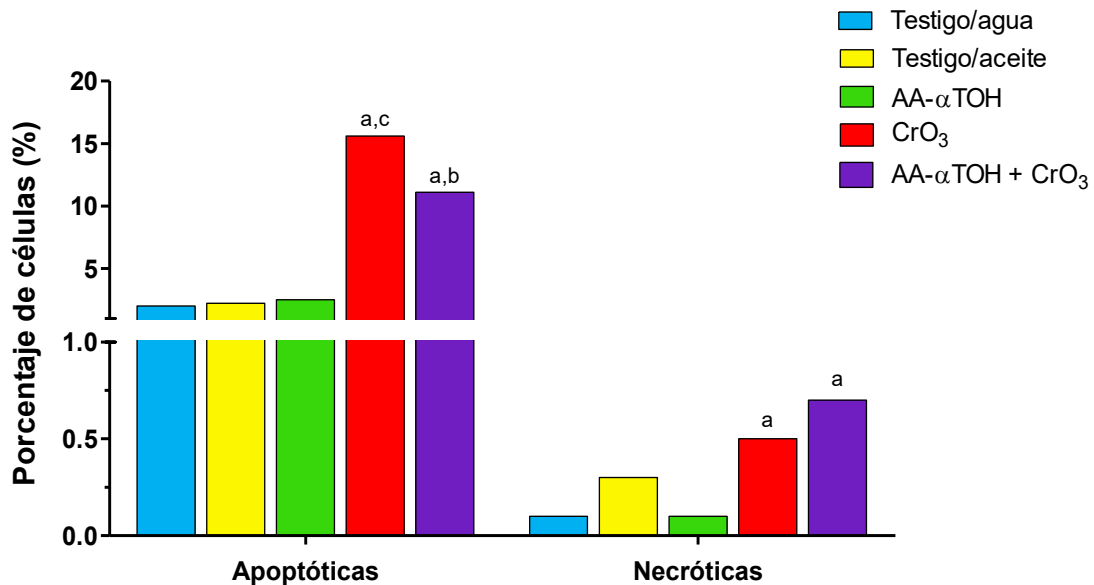


Figura 17. Análisis del NIF de MN calculado por grupo en 20,000 EPC. Significancia estadística  $p < 0.05$ , <sup>a</sup>p: vs. testigo/agua; <sup>b</sup>p: vs. testigo/aceite; <sup>c</sup>p: vs. AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub>. †: Muerte de un ratón.

## 6.2 Apoptosis

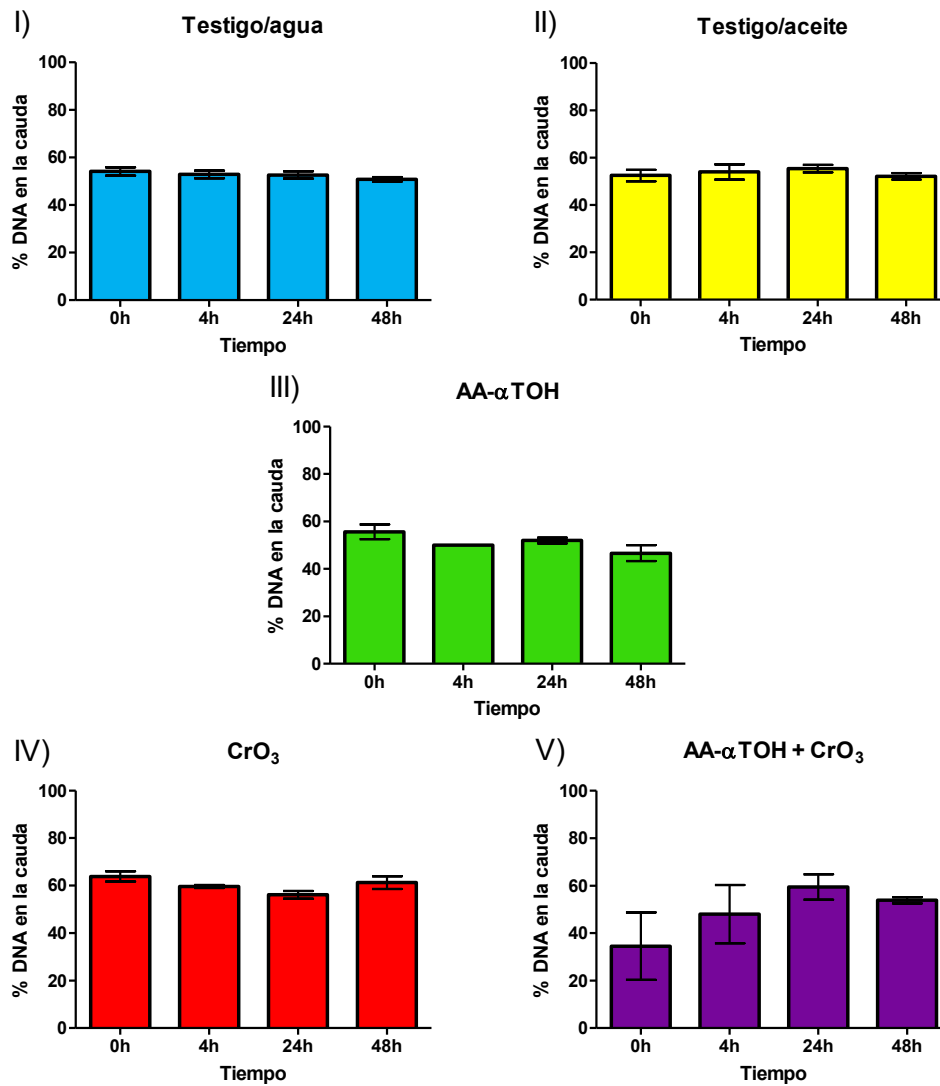
En la Figura 18 se presentan los porcentajes de las células, apoptóticas y necróticas calculadas por cada grupo. Se observa que en el grupo tratado con AA- $\alpha$ TOH no se modifican las frecuencias de células apoptóticas ni necróticas respecto a sus testigos. En el grupo al que se le administró CrO<sub>3</sub> se aumentó significativamente la frecuencia de células apoptóticas y necróticas al compararlas con su testigo. Cuando se combinaron los tratamientos de AA- $\alpha$ TOH y CrO<sub>3</sub> se disminuyeron las células apoptóticas en comparación al grupo tratado con CrO<sub>3</sub>; sin embargo, las células necróticas se incrementaron significativamente respecto al testigo/agua.



**Figura 18.** Porcentaje de células, apoptóticas y necróticas calculadas por grupo. Significancia estadística de  $p < 0.05$ , <sup>a</sup>p: vs. testigo/agua; <sup>b</sup>p: vs. testigo/aceite; <sup>c</sup>p: vs. AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub>. Muerte de un ratón en el grupo CrO<sub>3</sub>.

## 6.3 Reparación del daño al ADN (rompimientos de cadenas)

Con la finalidad de evaluar si existían diferencias entre los cometas presentes por grupo y por hora, se calcularon las medias del % de ADN en la cauda de éstos. En la Figura 19 se observan los promedios del % de ADN en la cauda de los cometas evaluados a las diferentes horas por cada grupo, sin embargo, en ninguno de los tratamientos se presentó una diferencia significativa en el daño al ADN.



**Figura 19. Análisis del promedio del porcentaje de ADN en la cauda calculado en los cometas presentes en los distintos tiempos evaluados por grupo: I) Testigo/agua, II) Testigo/aceite de maíz, III) AA- $\alpha$ TOH, IV) CrO<sub>3</sub>, V) AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub>. †: Muerte de un ratón.**

Debido a que los promedios del % de ADN en la cauda no mostraron diferencia entre los cometas presentes en los tratamientos, se hizo un análisis de frecuencias. En la Figura 20 se muestran las frecuencias de cometas presentes en 1,500 núcleos evaluados en distintos tiempos (hora 0, 4, 24 y 48 después de los tratamientos) por cada grupo. Se puede observar que en el tratamiento con AA- $\alpha$ TOH (Figura 20. III) no se incrementó la frecuencia de cometas respecto a sus testigos e incluso la disminuyó ligeramente a partir de la hora 24. En el grupo tratado con CrO<sub>3</sub> (Figura 20. IV) se aumentó significativamente la frecuencia de cometas a partir de la hora 4, siendo la hora 48 la de mayor incremento. Cuando se



combinaron los tratamientos (grupo AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub>; Figura 20.V) se observa un incremento significativo del número de cometas a partir de la hora 4 hasta la hora 24, sin embargo, a la hora 48 éstos disminuyeron.

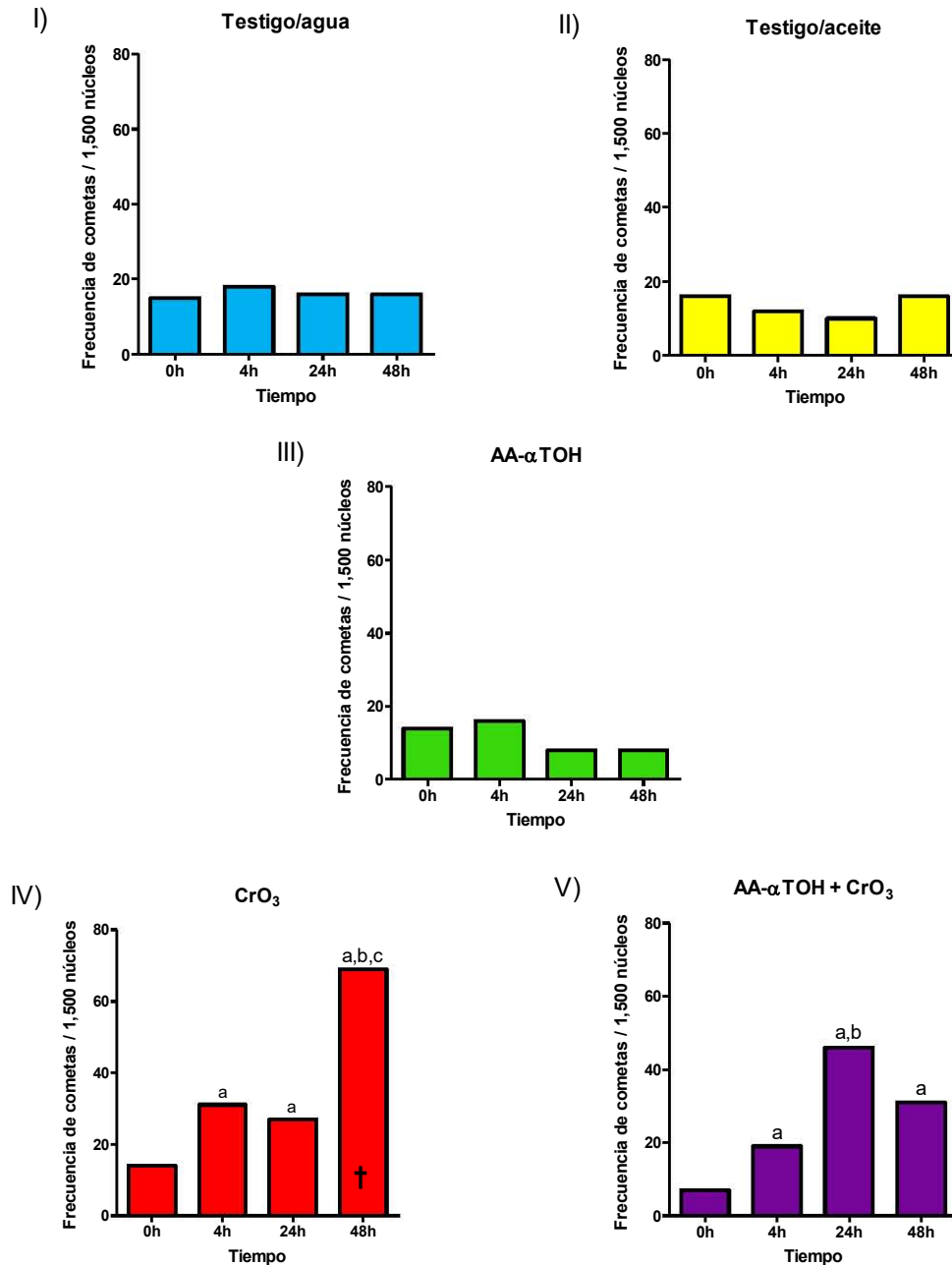
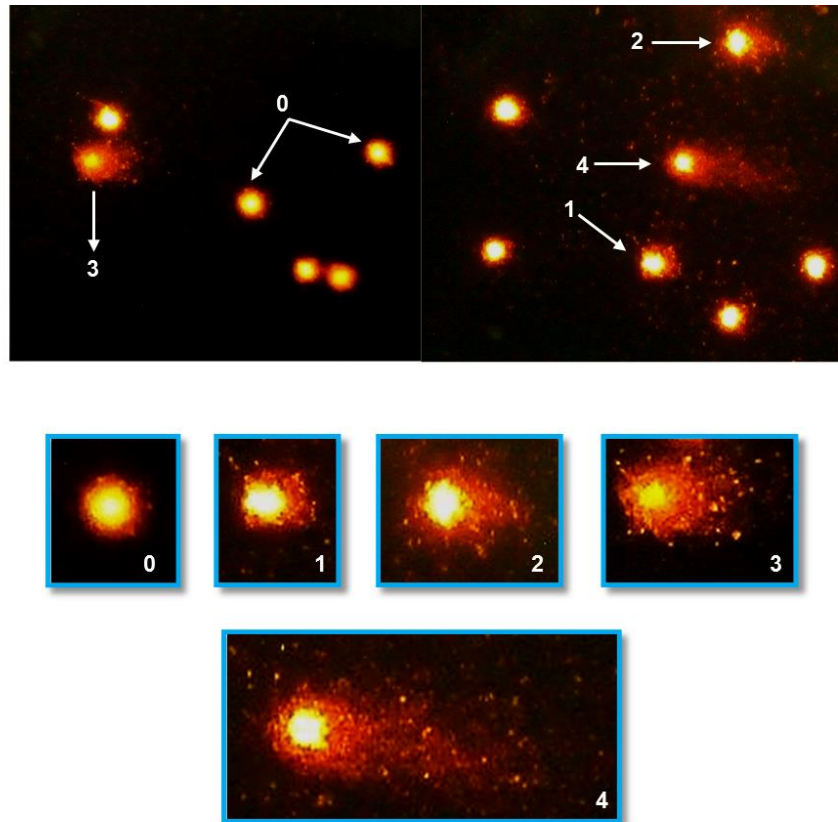


Figura 20. Análisis de la frecuencia de cometas presentes en 1,500 núcleos evaluados a los distintos tiempos por grupo: I) Testigo/agua, II) Testigo/aceite de maíz, III) AA- $\alpha$ TOH, IV) CrO<sub>3</sub>, V) AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub>. Significancia estadística  $p < 0.05$ ; <sup>a</sup>p: vs. 0h; <sup>b</sup>p: vs. 4h; <sup>c</sup>p: vs. 24h. †: Muerte de un ratón.

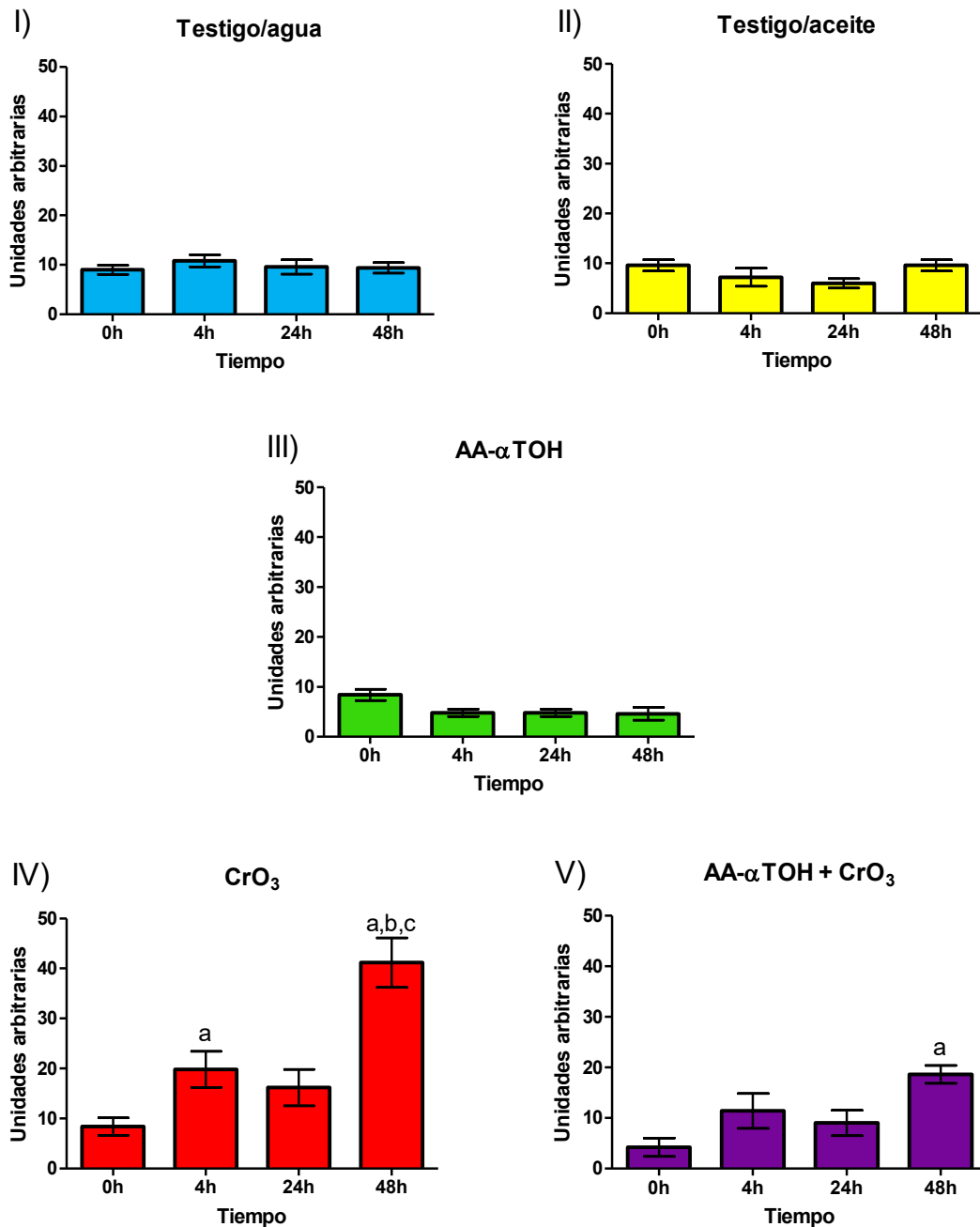
Para completar la información sobre la inducción de cometas de los dos parámetros anteriores, se analizó la magnitud del daño en el ADN presente en los organismos. Esto se realizó mediante el cálculo de las UA de acuerdo al sistema propuesto por Collins (2004), en donde el número de cometas observados se multiplica por la clasificación de los mismos (0 a 4). En la Figura 21 se muestran los cometas teñidos con BrEt que se observaron y se clasificaron de acuerdo con su nivel de daño.



**Figura 21. Clasificación del nivel de daño de los cometas (Observadas a 400x). 0, ningún daño; 1, daño bajo; 2, daño medio; 3, daño alto; 4, daño total.**

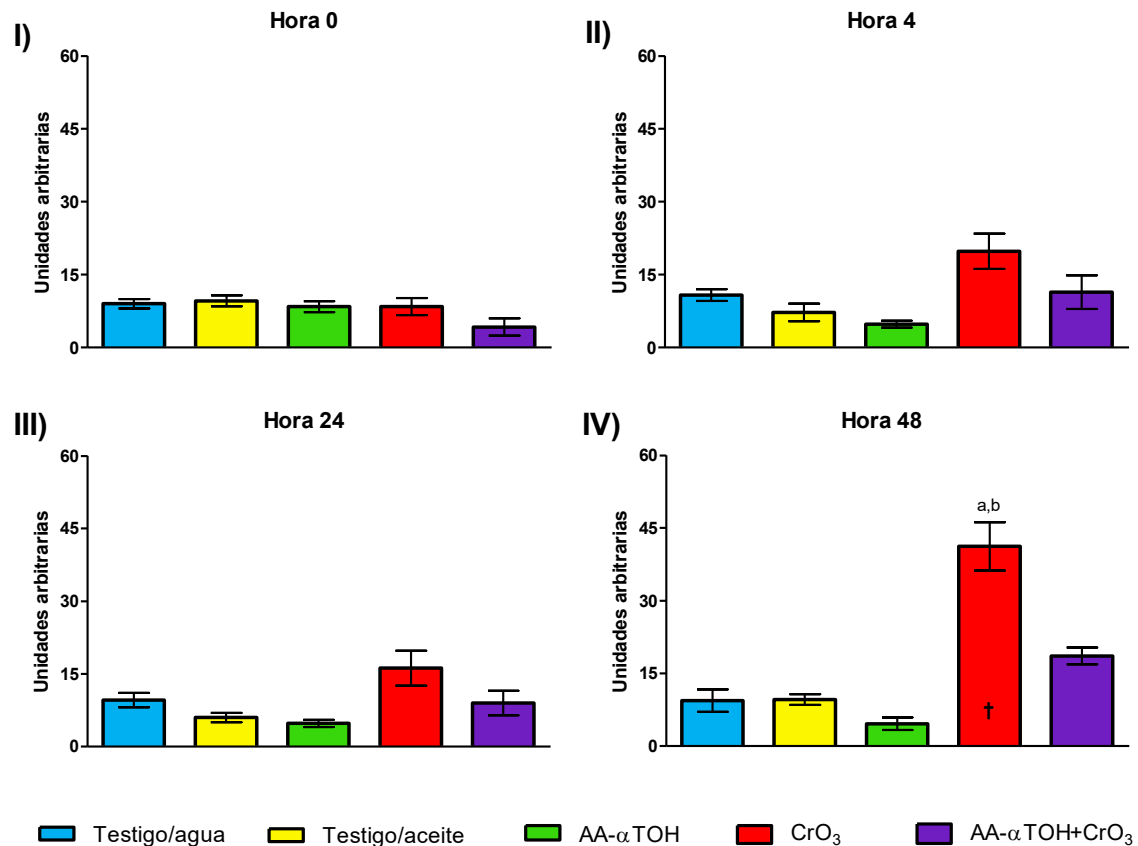
Con el cálculo de las UA es posible obtener resultados claros sobre la cinética de los cometas y determinar si se activa la reparación del ADN. En la Figura 22, se tiene el análisis del promedio de las UA calculadas en 300 núcleos presentes en los distintos tiempos de evaluación por grupo. Se puede observar que en el grupo AA- $\alpha$ TOH no se modificaron los promedios de las UA en ninguno de los tiempos. En el grupo CrO<sub>3</sub>, a las 4 y 48 horas se incrementaron significativamente las UA, siendo la hora 48 la de mayor magnitud del daño

al ADN. Mientras que, en el grupo combinado (AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub>), en la hora 48 se presentó el único incremento significativo de las UA respecto a su hora 0.



**Figura 22.** Análisis del promedio de las unidades arbitrarias calculadas en 300 núcleos presentes en los distintos tiempos de evaluación por grupo: I) Testigo/agua, II) Testigo/aceite de maíz, III) AA- $\alpha$ TOH, IV) CrO<sub>3</sub>, V) AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub>. Significancia estadística  $p < 0.05$ ; <sup>a</sup>p: vs. 0h; <sup>b</sup>p: vs. 4h; <sup>c</sup>p: vs. 24h. †: Muerte de un ratón.

En la Figura 23 se comparan los promedios de las UA presentes en cada grupo en los tiempos de evaluación (0, 4, 24 y 48 horas). Se observa que entre los grupos no hubo cambios significativos hasta la hora 48, en donde en el grupo tratado con  $\text{CrO}_3$  se incrementó la media de UA respecto a su testigo, mientras que en el tratamiento con AA- $\alpha$ TOH previo al  $\text{CrO}_3$  se disminuyó significativamente el daño inducido por este compuesto.



**Figura 23. Análisis del promedio de las unidades arbitrarias calculadas en 300 núcleos presentes por grupo en los distintos tiempos de evaluación: I) Hora 0, II) Hora 4, III) Hora 24, IV) Hora 48. Significancia estadística  $p < 0.05$ ; <sup>a</sup>p: vs. testigo/agua; <sup>b</sup>p: vs. AA- $\alpha$ TOH +  $\text{CrO}_3$ . †: Muerte de un ratón.**

## 6.4 Citotoxicidad

### 6.4.1 Relación EPC/ENC

Los lineamientos para las pruebas de sustancias químicas de las agencias reguladoras (EPA y OECD) recomiendan que en la evaluación de genotoxicidad (MN) se incluya la proporción de los eritrocitos inmaduros entre los eritrocitos totales (EPC/ENC). En el Cuadro 2 se muestran los promedios de los EPC presentes en 1,000 ENC de cada grupo a las 0 y 48 horas después de la administración de los tratamientos. Se puede observar que ningún valor resultó significativo. Este parámetro debe tomarse con reserva y para corroborar algún posible efecto citotóxico se realizó una prueba de viabilidad celular basada en la integridad de la membrana.

**Cuadro 2. Promedios de los EPC en sangre periférica de los grupos tratados con CrO<sub>3</sub> y AA- $\alpha$ TOH.**

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Hora	N	EPC / 1,000 ENC ( $\bar{x}$ + d.e.)
Testigo/agua	-	0	5	52.6 $\pm$ 3.2
		48	5	50.0 $\pm$ 2.8
Testigo/aceite	-	0	5	47.9 $\pm$ 6.9
		48	5	46.5 $\pm$ 5.9
AA- $\alpha$ TOH	100-20	0	5	54.8 $\pm$ 7.6
		48	5	52.1 $\pm$ 15.8
CrO <sub>3</sub>	20	0	5	53.9 $\pm$ 2.7
		48	4 †	48.0 $\pm$ 6.8
AA- $\alpha$ TOH + CrO <sub>3</sub>	100-20 + 20	0	5	55.1 $\pm$ 2.4
		48	5	46.7 $\pm$ 6.7

†: Muerte de un ratón.

### 6.4.2 Viabilidad celular

Debido a que los resultados de la relación de EPC/ENC presentan una alta variabilidad en los promedios y desviaciones estándar, se determinó la viabilidad celular mediante una tinción diferencial de NA/BrEt en células nucleadas de sangre periférica. En la Figura 24 se observa que en el tratamiento con antioxidantes no se modifica la viabilidad celular respecto a sus testigos (agua y aceite), por lo tanto, no resultan citotóxicos. En el grupo tratado con  $\text{CrO}_3$  se incrementaron significativamente las células no viables, además de causar la muerte de un organismo. Por otro lado, en el tratamiento con AA- $\alpha$ TOH previo al  $\text{CrO}_3$ , se afectó significativamente la viabilidad celular al compararla con sus testigos.

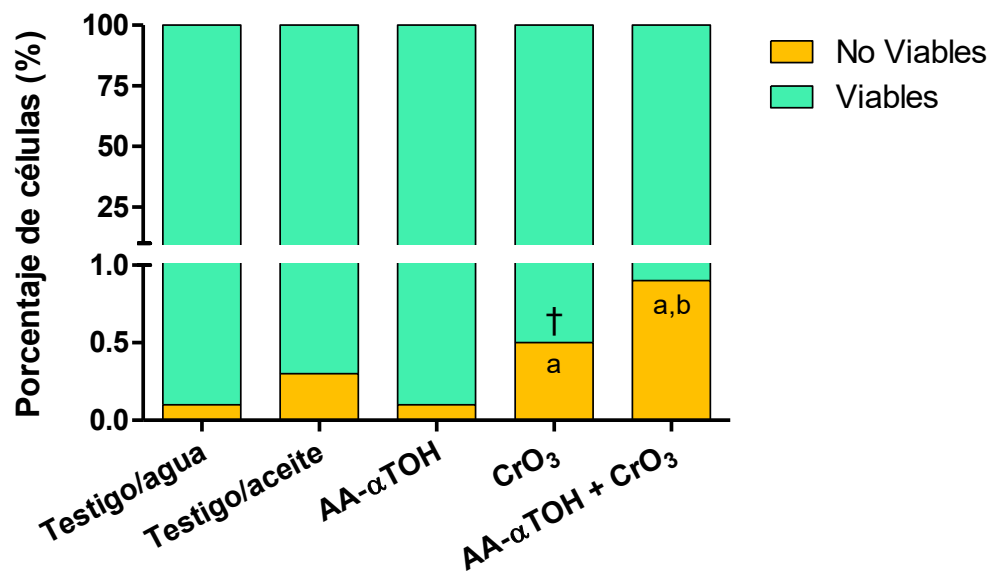


Figura 24. Porcentaje de células viables y no viables calculado por grupo en 1,500 células. Significancia estadística  $p < 0.05$ , <sup>a</sup>p: vs. testigo/agua; <sup>b</sup>p: vs. testigo/aceite. †: Muerte de un ratón.

## 6.5 Antioxidantes totales

En la Figura 25 se presenta el análisis de los promedios de las concentraciones de antioxidantes totales en plasma de sangre periférica. Se puede observar que tanto en el grupo testigo/aceite, así como en el grupo AA- $\alpha$ TOH se incrementaron significativamente los niveles de antioxidantes totales respecto al testigo/agua. Por otra parte, en el grupo tratado con CrO<sub>3</sub> se disminuyeron las concentraciones de antioxidantes totales respecto a su testigo, aunque no resultó significativo; sin embargo, al administrar el AA- $\alpha$ TOH previo al CrO<sub>3</sub> se recuperaron significativamente estos niveles, incluso este incremento resultó significativo al compararlo con el testigo/agua.

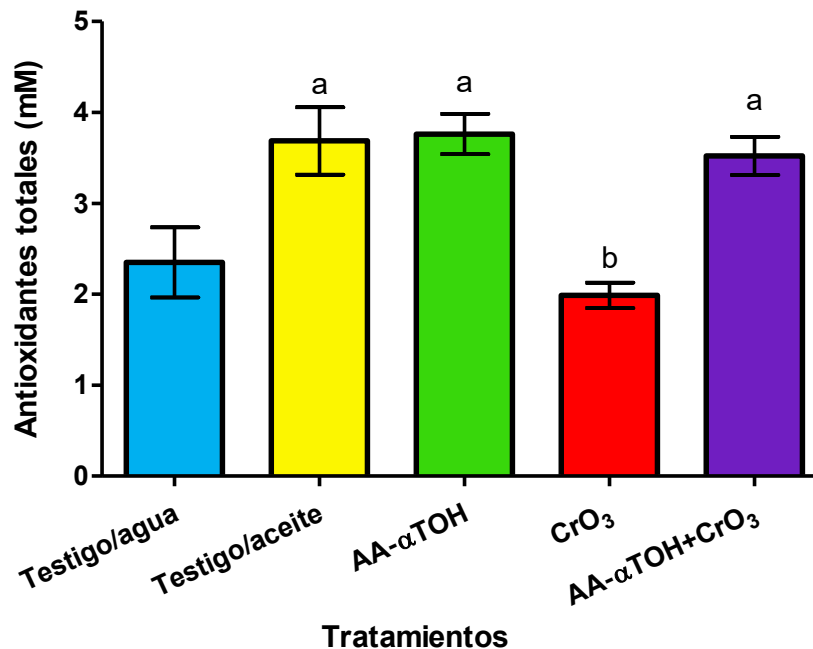


Figura 25. Análisis de los promedios de las concentraciones de antioxidantes totales en plasma de ratones tratados con CrO<sub>3</sub> y AA- $\alpha$ TOH a las 48 horas. Significancia estadística  $p < 0.05$ .

<sup>a</sup> $p$ : vs. testigo/agua; <sup>b</sup> $p$ : vs. AA- $\alpha$ TOH + CrO<sub>3</sub>.



## VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Si bien existen diversos trabajos que describen el potencial antioxidante por separado, tanto del AA como del  $\alpha$ -TOH, no hay estudios de los efectos sobre el daño genotóxico inducido por compuestos metálicos inductores de EOX, empleando la combinación de ambos antioxidantes, a pesar de que se ha probado que el AA juega un papel importante en la regeneración de la forma antioxidante del  $\alpha$ -TOH (Packer, Slater y Willson, 1979). De ahí que, se evaluó el efecto de la administración de AA y  $\alpha$ -TOH, sobre las frecuencias de MN, apoptosis, rompimientos de cadena sencilla, niveles de antioxidantes totales y viabilidad celular en ratones expuestos a CrO<sub>3</sub>.

La administración de los tratamientos de AA- $\alpha$ TOH no resultó genotóxica, ya que no incrementó la frecuencia de MN, ni de células apoptóticas, además de que no modificó los rompimientos de cadenas sencilla en comparación con ninguno de los testigos. Estas mismas dosis probadas por separado tampoco habían inducido daño genotóxico ni citotóxico (García-Rodríguez, Serrano-Reyes y Altamirano-Lozano, 2012; García-Rodríguez, Hernández-Cortés y Altamirano-Lozano, 2016). De hecho, en un estudio realizado por Khan y Sinha (1993) probaron que la administración de altas dosis de AA (40mg/Kg/día por 7 días) a ratones, no inducen efectos genotóxicos y se mantiene su eficacia antimutagénica. De igual forma, se ha reportado, que la administración de altas dosis de  $\alpha$ -TOH (100 mg/Kg/día por 30 días) a ratones, no incrementa la frecuencia de MN (Sarmishtha *et al.*, 2000).

Se corroboró la genotoxicidad reportada para los compuestos de Cr(VI) (O'Brien, Ceryak y Patierno, 2003; García-Rodríguez *et al.*, 2014), ya que en el grupo tratado con CrO<sub>3</sub> se presentó un incremento significativo en la frecuencia de MN. Se ha propuesto como mecanismo el daño oxidante al ADN inducido por las ERO y los RL generados durante la reducción del Cr(VI) a Cr(III). Sin embargo, también se ha planteado que los compuestos de Cr(VI) pueden presentar efectos sobre los mecanismos de reparación del material genético (O'Brien, Ceryak y Patierno, 2003; Lee *et al.*, 2012; García-Rodríguez *et al.*, 2014). En este sentido, el ensayo cometa es un método ampliamente utilizado para medir y analizar el daño al ADN en forma de rompimientos de cadenas, así como su reparación. En el tratamiento con CrO<sub>3</sub> se incrementó significativamente la frecuencia de cometas a partir de la hora 4, el daño persistió y se incrementó hasta la hora 48. Este mismo comportamiento

se observó en el análisis de las UA, ya que en la hora 48 se observó un incremento significativo. Estos datos concuerdan con diversas investigaciones realizadas *in vitro* e *in vivo* usando electroforesis unicelular en gel en las que se ha mostrado que la exposición a Cr(VI) aumenta significativamente el número de sitios lábiles al álcali en el ADN y de rompimientos de cadenas (Blasiak y Kowalik, 2000; Trzeciak *et al.*, 2000; Dana *et al.*, 2001; Ueno *et al.*, 2001). Un posible mecanismo por el cual el Cr(VI) puede causar estas rupturas, implica la generación del  $\cdot\text{OH}$  y el posterior ataque a la azúcar base. Alternativamente, el Cr(V) o complejos peroxo-Cr(V) pueden oxidar al ADN mediante la sustracción del hidrógeno del carbono 1 o del carbono 4 de la desoxirribosa, que da lugar a un rompimiento de cadena (O'Brien, Ceryak y Patierno, 2003).

El daño genotóxico de los compuestos de Cr(VI) también fue corroborado al evaluar las frecuencias de células apoptóticas, las cuales se incrementaron significativamente en el grupo tratado con  $\text{CrO}_3$ . La apoptosis constituye una de las respuestas celulares frente al daño al ADN, ya que es activada para eliminar las células con daño en su material genético cuando las lesiones exceden la capacidad de reparación celular (Hayashi *et al.*, 1990; García-Rodríguez, Carvente-Juárez y Altamirano-Lozano, 2013). Se ha reportado que la exposición a compuestos de Cr(VI) puede activar la ruta de señalización de p53 (Carlisle *et al.*, 2000). Además, se ha encontrado que la exposición a estos compuestos provoca la regulación negativa de ciertos genes antiapoptóticos (*bcl-W* y *bcl-X<sub>L</sub>*) y la sobreexpresión del gen proapoptótico *bcl-X<sub>S</sub>* (Ceryak *et al.*, 2004).

Cuando se administraron los antioxidantes AA- $\alpha$ TOH previo al tratamiento con  $\text{CrO}_3$  se disminuyó la frecuencia de MN (alrededor del 37%) en comparación con el grupo tratado únicamente con el  $\text{CrO}_3$ . En estudios previos se observó que, con la administración única de AA se disminuyó el 56% y el 125% de las frecuencias de MN inducidos por  $\text{CrO}_3$  y  $\text{V}_2\text{O}_5$  respectivamente. Por otro lado, en un tratamiento con  $\alpha$ -TOH se redujo el 48% y el 68% de las frecuencias de MN inducidos por  $\text{CrO}_3$  y  $\text{V}_2\text{O}_5$  respectivamente (García-Rodríguez, Serrano-Reyes y Altamirano-Lozano, 2012; García-Rodríguez, Hernández-Cortés y Altamirano-Lozano, 2016). Con estos antecedentes se puede deducir que, si bien existe un efecto protector de la combinación de los antioxidantes AA- $\alpha$ TOH contra la genotoxicidad del  $\text{CrO}_3$ , su potencial antimutagénico es más efectivo si se administran por separado.

Otros estudios realizados *in vivo*, han mostrado el potencial antimutagénico que posee el AA y el  $\alpha$ -TOH ante la exposición de agentes genotóxicos y carcinogénicos (luz ultravioleta, hierro, pesticidas y metilcolantreno), ya que previenen y disminuyen la formación de MN (Khan y Sinha, 1993; Sarmishtha *et al.*, 2000; Premkumar y Bowlus, 2003; Zúñiga-González *et al.*, 2015). En evaluaciones en personas con leucoplasia oral a las que se les dio un tratamiento de  $\alpha$ -TOH, se observó que se reducían significativamente las frecuencias de MN tanto en las muestras de mucosas con lesiones, como en las de apariencia normal (Benner *et al.*, 1994).

Trabajos *in vivo* realizados por Konopacka y colaboradores (1998) mostraron que, con la combinación de AA,  $\alpha$ -TOH y  $\beta$ -caroteno se presentó una protección más efectiva contra la citotoxicidad y el daño cromosómico inducido por rayos gamma, en comparación si se usaban solos. Sus observaciones sugieren que la combinación de los compuestos actúa sinérgicamente, ya que el AA regenera al  $\alpha$ -TOH a través de la reducción del radical  $\alpha$ -cromanoxilo (Packer, Slater y Willson, 1979). La disminución de la genotoxicidad inducida por el Cr(VI) que se muestra en el grupo experimental, puede deberse a la acción del AA- $\alpha$ TOH como neutralizadores de ERO y RL. El AA es un antioxidante hidrosoluble que podría actuar en la primera defensa contra los radicales formados en el citoplasma por la reducción intracelular del Cr(VI) a Cr(III). Mientras que, el  $\alpha$ -TOH es el antioxidante liposoluble más activo y su mayor función se atribuye a la protección de la membrana celular y de los lípidos contra el daño oxidante (Konopacka, Widel y Rzeszowska-Wolny, 1998). De esta manera, el AA- $\alpha$ TOH pudo haber impedido la interacción de las moléculas reactivas con las biomoléculas y así proteger contra el daño al ADN.

Al evaluar la apoptosis, se observó en el grupo tratado con AA- $\alpha$ TOH y CrO<sub>3</sub> una disminución significativa en la frecuencia de células apoptóticas en comparación con el grupo tratado solo con CrO<sub>3</sub>. Carlisle y colaboradores (2000) observaron que un pretratamiento con AA en células de ovario de criceto chino (células CHO) disminuyó la apoptosis inducida por compuestos de Cr(VI), mientras que el  $\alpha$ -TOH no tuvo ningún efecto sobre esto. Se ha propuesto que la inhibición de la apoptosis por el AA y el  $\alpha$ -TOH es mediada por la vía mitocondrial (Chen *et al.*, 2018), además el  $\alpha$ -TOH podría inhibir la actividad de la caspasa 3 (Uemura *et al.*, 2002). El hecho de que no se haya incrementado la frecuencia células apoptóticas en este grupo, sino por el contrario se haya reducido, nos permite sugerir que la reducción de los MN no está mediada por la eliminación de células

con daño irreversible en el ADN y que podría estar relacionado con la activación de los mecanismos de reparación. Al evaluar la magnitud del daño al ADN (ensayo cometa) se observó una disminución en el grupo tratado con AA- $\alpha$ TOH y CrO<sub>3</sub> en comparación con el tratamiento único del CrO<sub>3</sub>, que sugiere que estos antioxidantes podrían activar la reparación del ADN y por ello se disminuye el promedio de las UA en este grupo. Se ha observado que la administración de AA a ratones, incrementa significativamente los niveles de la reparación del aducto 8-oxo-desoxiguanosina observada en los fluidos como 8-OHdG (García-Rodríguez, Gordillo-García y Altamirano-Lozano, 2017). Recientemente, se reportó que el AA es capaz de activar la reparación del ADN dañado en peces tratados con pesticidas (fipronil y buprofezin), ya que se presentó un restablecimiento del daño al ADN evaluado mediante el ensayo cometa (Ghazanfar, Shahid y Qureshi, 2018). Por su parte, Carlisle *et al.* (2000) observaron en células CHO que un pretratamiento con  $\alpha$ -TOH disminuye los rompimientos de cadena (sitios lábiles al álcali) inducidos por compuestos de Cr(VI).

Cuando se evaluó el % de ADN en la cauda, no se observaron modificaciones significativas en ninguno de los tratamientos, lo que sugiere que en los cometas se presentó el mismo nivel de daño. Éste parámetro se obtuvo a partir de la longitud de la cauda de los cometas; de acuerdo a Collins (2004) la longitud media de la cola sólo aumenta cuando las colas se establecen por primera vez, posteriormente, ésta aumenta en intensidad pero no en longitud a medida que aumenta la dosis de daño.

Por otra parte, debido a que se puede presentar una depleción del sistema antioxidante producida por los compuestos de Cr(VI) mediada por el incremento de los niveles de ERO y en particular por el radical  $\cdot$ OH generados durante su reducción de Cr(VI) a Cr(III) (García-Rodríguez, Gordillo-García y Altamirano-Lozano, 2017), en el presente estudio se evaluaron las concentraciones de antioxidantes totales en el plasma sanguíneo. El tratamiento con AA- $\alpha$ TOH, así como el testigo/aceite de maíz incrementaron significativamente los niveles de antioxidantes totales en plasma. En un estudio en el que emplearon al aceite de maíz como testigo negativo, se observó que éste contribuía a la reducción de algunos marcadores oxidativos y elevó los niveles de GSH en la sangre (Barrouin-Melo *et al.*, 2016). Se sabe que el  $\alpha$ -TOH se encuentra principalmente en los aceites vegetales de soya, maíz, algodón y girasol, lo cual podría explicar la capacidad

antioxidante detectada en el testigo/aceite de maíz (Sayago *et al.*, 2007; Combs *et al.*, 2017). En el grupo tratado solo con el  $\text{CrO}_3$  se disminuyeron los niveles de antioxidantes totales, mientras que en el grupo tratado con AA- $\alpha$ TOH y  $\text{CrO}_3$  se recuperaron. Se ha observado que la suplementación de 400 UI de  $\alpha$ -TOH más 1g de AA al día es capaz de disminuir significativamente el daño oxidativo e incrementar la capacidad antioxidante total de trabajadores expuestos a compuestos de plomo (Rendón-Ramírez *et al.*, 2014). Es posible que el AA- $\alpha$ TOH haya reducido las frecuencias de MN también por esta vía en el grupo en el cual se trató con éstos previo a la exposición del Cr(VI).

En cuanto a la citotoxicidad evaluada mediante la relación EPC con respecto a los ENC, no se presentaron cambios significativos en ninguno de los tratamientos. Si bien la OECD (2016) establece que al realizar la prueba de MN se determine la relación de EPC/ENC, este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa toxicidad durante la eritropoyesis, pueden activarse los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (Hayashi *et al.*, 2000). Por lo tanto, para determinar la citotoxicidad se evaluó la viabilidad celular basada en la integridad de la membrana con base en la técnica modificada por García-Rodríguez *et al.* (2013). Con la administración sola de los antioxidantes no se modificó la frecuencia de las células viables, lo que sugiere que estos compuestos no inducen daño citotóxico. Aunque el estudio de la citotoxicidad del AA ha sido de gran interés como agente anticancerígeno; se ha observado que mientras éste es citotóxico para una variedad de células cancerosas, las células normales son resistentes a dicho efecto (Chen *et al.*, 2008). Se ha propuesto que este efecto se debe a que el estado redox celular depende del cobre que es un elemento importante en su acción citotóxica y las células cancerosas tienen concentraciones de cobre considerablemente elevadas (Ullah *et al.*, 2011). Por su parte, se ha observado que el  $\alpha$ -TOH no presenta efectos citotóxicos sino por el contrario atenúa la citotoxicidad y la apoptosis inducida por compuestos como el  $\delta$ -tocotrienol que se utiliza contra células cancerosas (Shibata *et al.*, 2010).

En el tratamiento con  $\text{CrO}_3$  se afectó la viabilidad celular y causó la muerte de un organismo, lo cual corrobora el efecto citotóxico reportado para los compuestos de Cr(VI) (O'Brien, Ceryak y Patierno, 2003). Bajo condiciones fisiológicas el Cr(VI) no reacciona directamente con el ADN y otras macromoléculas. La actividad genotóxica y citotóxica del Cr(VI) es el resultado de su activación reductiva dentro de la célula. El metabolismo reductivo de estos

compuestos genera ERO y RL, además de las especies intermedias de Cr(V), Cr(IV) y Cr(III) que forman una serie de complejos estables con el ADN y otras moléculas intracelulares. El Cr(VI) puede provocar efectos sobre la replicación y la transcripción del ADN, desregularizar los puntos de control en el ciclo celular, afectar los mecanismos de reparación del ADN y generar disrupción en las redes génicas regulatorias relacionadas con la muerte celular (Qi *et al.*, 2000; Zhitkovich *et al.*, 2002; O'Brien, Ceryak y Patierno, 2003; Reynolds y Zhitkovich, 2007; Wong, Armknecht y Zhitkovich, 2012).

Al administrar el tratamiento de antioxidantes previo al compuesto metálico, la viabilidad celular se vio afectada significativamente. Esta disminución de la viabilidad celular en el grupo experimental resultó del incremento significativo de la frecuencia de las células necróticas. Además del daño que pudiera provocar la necrosis inducida por el CrO<sub>3</sub> (EPA, 2010), se ha planteado que el AA puede inhibir la división celular y promover la necrosis de manera dosis dependiente al modular negativamente la expresión de los genes necesarios para la progresión de la fase S (Belin *et al.*, 2009; Yurtcu, Iseri y Sahin, 2011).

## VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Se corroboró el daño genotóxico y citotóxico de la administración del CrO<sub>3</sub> ya que se incrementaron las frecuencias de MN, de rupturas de cadena sencilla (desde la hora 4), de células apoptóticas y se disminuyó la viabilidad celular
- ❖ La administración sola de una dosis de 100-20 mg/kg de AA- $\alpha$ TOH vía *ig.* no induce daño genotóxico ni citotóxico, ya que no se incrementaron las frecuencias de MN, de rupturas de cadena sencilla, de células apoptóticas y no se modificó la viabilidad celular.
- ❖ La administración previa de AA- $\alpha$ TOH protege contra el daño genotóxico inducido por el CrO<sub>3</sub>, ya que se disminuyeron las frecuencias de MN y las frecuencias de rompimientos de cadena sencilla evaluadas mediante el número de cometas y la magnitud del daño en el ADN (UA), lo que sugiere que el tratamiento combinado de AA y  $\alpha$ -TOH pueden tener efectos sobre la reparación del daño al ADN.
- ❖ La administración de AA- $\alpha$ TOH y CrO<sub>3</sub> disminuyó las células apoptóticas al compararse con el grupo tratado con CrO<sub>3</sub>, lo que sugiere que a diferencia de otros antioxidantes la reducción de MN no está mediada por la activación de la apoptosis. Sin embargo, incrementó las frecuencias de células necróticas.
- ❖ La administración de AA- $\alpha$ TOH incrementa los niveles de antioxidantes totales y el tratamiento con CrO<sub>3</sub> los disminuye. Mientras que, en el grupo tratado con AA- $\alpha$ TOH y CrO<sub>3</sub> los niveles de antioxidantes totales se recuperaron, lo que sugiere una regulación positiva del sistema antioxidante endógeno.



## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, I., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. y Hayashi, M. (1998) «Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis», *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 417(1), pp. 19-30.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2010) *Biología molecular de la célula*. 5ª Edición. Barcelona: Ediciones Omega.
- Alborghetti, G., Casanova, M., Tavares, G., Fonseca, L. F., Lemes, N. D. y Gatti, P. (2015) «Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones», *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 65(1), pp. 21-26.
- Alfaro, E., García, C. y Dueñas, A. (2000) «Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones», *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, 46(4), pp. 275-280.
- Ames, B. N. (1989) «Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors», *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 14(S16), pp. 66-77.
- Ansoar-Rodríguez, Y., Fontanetti, C. S., Christofoletti, C. A. y Díaz-Llera, S. C. (2015) «Aplicaciones del ensayo cometa en genética ecotoxicológica», *CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), pp. 51-62.
- Apel, K. y Hirt, H. (2004) «Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction», *Annual Review of Plant Biology*, 55, pp. 373-399.
- Arellano, M. E., Camarena, L., Von-Glascoe, C. A., Ruiz, B., Montañó, T. y Zúñiga, E. (2012) «Daño genotóxico en mujeres y hombres expuestos a plaguicidas en cuatro localidades de Baja California», *Género, Ambiente y Contaminación por Sustancias Químicas*, pp. 95-113.
- ATSDR (2012) *Toxicological profile for chromium*. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Avello, M. y Suwalsky, M. (2006) «Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección», *Atenea*, 494, pp. 161-172.
- Azzi, A. (2017) «Many tocopherols, one vitamin E», *Molecular Aspects of Medicine*, XXX, pp. 1-12.
- Barrouin-Melo, S. M., Anturaniemi, J., Sankari, S., Griinari, M., Atroshi, F., Ounjaijean, S. y Hielm-Björkman, A. K. (2016) «Evaluating oxidative stress, serological- and haematological status of dogs suffering from osteoarthritis, after supplementing their diet with fish or corn oil», *Lipids in Health and Disease*. *Lipids in Health and Disease*, 15(1).
- Beas, C., Ortuño, D. y Armendáriz, J. (2009) *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones*. México: McGraw-Hill.
- Belin, S., Kaya, F., Duisit, G., Giacometti, S., Ciccolini, J. y Fontés, M. (2009) «Antiproliferative effect of ascorbic acid is associated with the inhibition of genes necessary to cell cycle progression», *PLOS ONE*, 4(2), p. e4409.
- Benner, S. E., Wargovich, M. J., Lippman, S. M., Fisher, R., Velasco, M., Winn, R. J. y Hong, W. K. (1994) «Reduction in oral mucosa micronuclei frequency following alpha-tocopherol treatment of oral leukoplakia», *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 3(1), pp. 73-76.
- Blasiak, J. y Kowalik, J. (2000) «A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium», *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 469(1), pp. 135-45.
- Bunker, V. W. (1992) «Free radicals, antioxidants and ageing», *Medical Laboratory Sciences*, 49(4), pp. 299-312.

- Carlisle, D. L., Pritchard, D. E., Singh, J., Owens, B. M., Blankenship, L. J., Orenstein, J. M. y Patierno, S. R. (2000) «Apoptosis and P53 induction in human lung fibroblasts exposed to chromium (VI): effect of ascorbate and tocopherol», *Toxicological Sciences*, 55(1), pp. 60-8.
- Carlisle, D. L., Pritchard, D. E., Singh, J. y Patierno, S. R. (2000) «Chromium(VI) induces p53-dependent apoptosis in diploid human lung and mouse dermal fibroblasts», *Molecular Carcinogenesis*, 28(2), pp. 111-8.
- Ceryak, S., Zingariello, C., O'Brien, T. y Patierno, S. R. (2004) «Induction of pro-apoptotic and cell cycle-inhibiting genes in chromium (VI)-treated human lung fibroblasts: lack of effect of ERK», *Molecular and Cellular Biochemistry*, 255(1-2), pp. 139-49.
- Chen, Q., Espey, M. G., Sun, A. Y., Pooput, C., Kirk, K. L., Krishna, M. C., Khosh, D. B., Drisko, J. y Levine, M. (2008) «Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), pp. 11105-11109.
- Chen, X., Liu, R., Liu, X., Xu, C. y Wang, X. (2018) «L-ascorbic acid-2-glucoside inhibits Helicobacter pylori-induced apoptosis through mitochondrial pathway in gastric epithelial cells», *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier, 97(138), pp. 75-81.
- Collins, A. R. (2004) «The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations», *Molecular Biotechnology*, 26(3), pp. 249-261.
- Combes, R., Grindon, C., Cronin, M., Roberts, D. y Garrod, J. (2007) «Proposed integrated decision-tree testing strategies for mutagenicity and carcinogenicity in relation to the EU REACH legislation», *Alternatives to Laboratory Animals*, 35(2), pp. 267-87.
- Combs, G. F., McClung, J. P., Combs, G. F. y McClung, J. P. (2017) «Chapter 8 – Vitamin E», en *The Vitamins*, pp. 207-242.
- Dana, K., Rozati, R., Saleha, B., Jamil, K. y Grover, P. (2001) «In vivo genotoxic effect of potassium dichromate in mice leukocytes using comet assay», *Food and Chemical Toxicology*, 39(8), pp. 859-65.
- Delgado, L., Betanzos, G. y Sumaya, M. T. (2010) «Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo», *Investigación y Ciencia*, 50, pp. 10-15.
- Devaki, S. y Raveendran, R. (2017) «Vitamin C: sources, functions, sensing and analysis», en *Vitamin C*. IntechOpen, pp. 3-20.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Pandey, A. y Parmar, D. (2007) «Protocol for the single cell gel electrophoresis/comet assay for rapid genotoxicity assessment», *Industrial Toxicology Research Centre*, 17(3), pp. 1-10.
- Eastmond, D. A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W. A., Cimino, M. C., Dobrev, I., Douglas, G. R., Nohmi, T., Phillips, D. H. y Vickers, C. (2009) «Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme», *Mutagenesis*, 24(4), pp. 341-349.
- EPA (1998) «Health effects test guidelines OPPTS 870.5395. Mammalian erythrocyte micronucleus test», *Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101)*. Washington, DC, EPA 712-C-, p. 10.
- EPA (2010) «Toxicological Review of Hexavalent Chromium», *In support of summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS)*. Washington, DC, EPA/635/R-, p. 322.
- Evan, G. y Littlewood, T. (1998) «A matter of life and cell death», *Science*, 281(5381), pp. 1317-1322.
- FDA (2000) «Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use», *USA.: Redbook. Center for Food Safety and Applied Nutrition.*, pp. 1-6.
- Febles, C., Soto, C., Saldaña, A. y García, B. E. (2002) «Funciones de la vitamina E. Actualización», *Revista Cubana de Estomatología*, 39(1), pp. 28-32.

- Finkel, T. (1998) «Oxygen radicals and signaling», *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2), pp. 248-253.
- Flora, S. (2009) «Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure», *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(4), pp. 191-206.
- García-Rodríguez, M. C., Carvente-Juárez, M. M. y Altamirano-Lozano, M. A. (2013) «Antigenotoxic and apoptotic activity of green tea polyphenol extracts on hexavalent chromium-induced DNA damage in peripheral blood of CD-1 mice: analysis with differential acridine orange/ethidium bromide staining», *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, p. 9.
- García-Rodríguez, M. C., García-Cárdenas, G. P., Montañón-Rodríguez, A. R. y Altamirano-Lozano, M. A. (2014) «Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio [III]) en ratones de la cepa CD-1 : micronúcleos , apoptosis y viabilidad celular», *Acta Universitaria*, 24(55), pp. 91-96.
- García-Rodríguez, M. C., Gordillo-García, A. y Altamirano-Lozano, M. (2017) «The role of vitamin C in the protection and modulation of genotoxic damage induced by metals associated with oxidative stress», en *Vitamin C*. IntechOpen, pp. 99-112.
- García-Rodríguez, M. C., Hernández-Cortés, L. M. y Altamirano-Lozano, M. A. (2016) «In vivo effects of vanadium pentoxide and antioxidants (ascorbic acid and alpha-tocopherol) on apoptotic, cytotoxic, and genotoxic damage in peripheral blood of mice», *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, p. 11.
- García-Rodríguez, M. C., López-Santiago, V. y Altamirano-Lozano, M. (2001) «Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood», *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 496(1), pp. 145-151.
- García-Rodríguez, M. C., Serrano-Reyes, G. y Altamirano-Lozano, M. (2012) «Comparative study in vivo of the genotoxic damage induced by CrO<sub>3</sub> and the effects of the antioxidants: ascorbic acid, alfa-tocopherol and beta-carotene», *Free Radical Biology and Medicine*.
- García-Rodríguez, M. C., Vilches-Larrea, R. E., Nicolás-Méndez, T. y Altamirano-Lozano, M. A. (2012) «El té verde en la quimiopreención in vivo del daño geotóxico inducido por metales cancerígenos (cromo[VI])», *Nutrición Hospitalaria*, 27(4), pp. 1204-12.
- Gatto, N. M., Kelsh, M. A., Mai, D. H., Suh, M. y Proctor, D. M. (2010) «Occupational exposure to hexavalent chromium and cancers of the gastrointestinal tract: a meta-analysis», *Cancer Epidemiology*, 34(4), pp. 388-99.
- Ghazanfar, M., Shahid, S. y Qureshi, I. Z. (2018) «Vitamin C attenuates biochemical and genotoxic damage in common carp (Cyprinus carpio) upon joint exposure to combined toxic doses of fipronil and buprofezin insecticides», *Aquatic Toxicology*, 196, pp. 43-52.
- González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M. y Ortiz-Muñiz, R. (2000) «Daño oxidativo y antioxidantes», *Bioquímica*, 25(1), pp. 3-9.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5ª edición. New York: Oxford University Press.
- Harman, D. (1956) «Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry», *Journal of Gerontology* , 11(3), pp. 298-300.
- Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I. D., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A. y Sutou, S. (2000) «In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring», *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), pp. 234-52.

- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. y Ishidate, M. (1990) «The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides», *Mutation Research*, 245, pp. 245-249.
- Heddle, J., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J., Newell, G. y Salamone, M. (1983) «The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program.», *Mutation Research*, 123, pp. 61-118.
- Hengstler, J. (2007) *Nueva categorización de los carcinógenos genotóxicos*. Leipzig: Sociedad Iberoamericana de Información Científica.
- IARC (1990) «Chromium and chromium compounds», *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans and their Supplements*, 49, pp. 49-256.
- Institute of Medicine U.S. (2000) *Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids, Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds*. Washington (DC): National Academies Press.
- Jomova, K. y Valko, M. (2011) «Advances in metal-induced oxidative stress and human disease», *Toxicology*, 283, pp. 65-87. doi: 10.1016/j.tox.2011.03.001.
- Kang, S. H., Kwon, J. Y., Lee, J. K. y Seo, Y. R. (2013) «Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models», *Journal of Cancer Prevention*, 18(4), pp. 277-288.
- Khan, P. K. y Sinha, S. P. (1993) «Antimutagenic efficacy of higher doses of vitamin C», *Mutation Research*, 298, pp. 157-161.
- Konopacka, M., Widel, M. y Rzeszowska-Wolny, J. (1998) «Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells», *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 417, pp. 85-94.
- Krishna, G. y Hayashi, M. (2000) «In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation», *Mutation Research /Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455, pp. 155-166.
- Lay, P. A. y Levina, A. (2013) «Metal Carcinogens», en *Comprehensive Inorganic Chemistry II*. Elsevier, pp. 835-856.
- Lee, J., Son, Y., Pratheeshkumar, P. y Shi, X. (2012) «Oxidative stress and metal carcinogenesis», *Free Radical Biology and Medicine*, 53(4), pp. 742-757.
- Li, S., Tan, H., Wang, N., Zhang, Z., Lao, L., Wong, C. y Feng, Y. (2015) «The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases.», *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), pp. 26087-26124.
- Malyapa, R. S., Bi, C., Ahern, E. W. y Roti, J. L. (1998) «Detection of DNA damage by the alkaline comet assay after exposure to low-dose gamma radiation», *Radiation Research*, 149(4), pp. 396-400.
- Márquez, M. E., López, J., Correa, G., Pareja, A. y Giraldo, N. A. (2003) «Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos», *latreia*, 16(4), pp. 275-282.
- Márquez, M., Yépez, C. E., Súttil-Naranjo, R. y Rincón, M. (2002) «Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A», *Investigación Clínica*, 43(3), pp. 191-204.
- Marrero, G., Gutiérrez, A., Pardo, B., Gámez, R. y Curveco, D. (2007) «Evaluación del efecto genotóxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (ensayo cometa)», *CENIC Ciencias Biológicas*, 38(3), pp. 200-204.
- Mauro-Martín, I. y Garicano-Vilar, E. (2015) «Papel de la vitamina C y los  $\beta$ -glucanos sobre el sistema inmunitario: revisión», *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 19(4), pp. 238-245.

- Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. y Heddle, J. A. (1990) «The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program», *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 239, pp. 29-80.
- McCarroll, N., Keshava, N., Chen, J., Akerman, G., Kligerman, A. y Rinde, E. (2010) «An evaluation of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study II: chromium (VI)», *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(2), pp. 89-111.
- McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K. y Green, D. R. (1995) «The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro», en *Methods in Cell Biology*. Academic Press, pp. 153-174.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. y Milner, A. (1993) «A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates», *Clinical Science*, 84(4), pp. 407-412.
- Muñoz, A. (2009) «Evaluación del daño en el ADN en dos poblaciones colombianas de agricultores y floricultores», *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 12(1), pp. 7-16.
- Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar, I. y López-Moya, J. R. (2007) «Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas», *Ecosistemas*, 16(2), pp. 10-25.
- Nesslany, F. (2016) «The current limitations of in vitro genotoxicity testing and their relevance to the in vivo situation», *Food and Chemical Toxicology*, XXX, pp. 1-7.
- Nordberg, G., Langard, S., Sunderman, F. W., Mager Stellman, J., Osinsky, D., Markkanen, P., Dinman, B. D. y Atsdr (2001) «Metales: propiedades químicas y toxicidad», en *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, pp. 1-76.
- Nunes, T., Bernardazzi, C. y de Souza, H. S. (2014) «Cell death and inflammatory bowel diseases: apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium», *BioMed Research International*, 2014, pp. 1-12.
- O'Brien, T. J., Ceryak, S. y Patierno, S. R. (2003) «Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms», *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1), pp. 3-36.
- OECD (2016) *Mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS 474*.
- Olmedilla, B., Córdoba, C., Deulofeu, R., Granado, F., Lara, E. y Ruiz, J. (2017) «Evaluación del estatus nutricional de vitamina E», *Revista del Laboratorio Clínico*, XXX(xx), pp. 1-11.
- Ostling, O. y Johanson, K. J. (1984) «Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells», *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 123(1), pp. 291-298.
- Packer, J. E., Slater, T. F. y Willson, R. L. (1979) «Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C.», *Nature*, 278(5706), pp. 737-8.
- Packer, L. y Canenas, E. (2002) *Handbook of antioxidants*. 2ª edición. New: Marcel Dekker.
- Pauling, L. (1970) «Evolution and the need for ascorbic acid», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 67(4), pp. 1643-1648.
- Pehlivan, F. E. (2017) «Vitamin C: An Antioxidant Agent», en *Vitamin C*. InTech.
- Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y. M., Zuo, Y., Liu, Y., Lei, L., Ma, K. Y., Huang, Y. y Chen, Z. Y. (2014) «Biology of ageing and role of dietary antioxidants», *BioMed Research International*, 2014, pp. 1-13.
- Pisoschi, A. M. y Pop, A. (2015) «The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review», *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, pp. 55-74.
- Prabhulkar, S. y Li, C. Z. (2010) «Assessment of oxidative DNA damage and repair at single cellular



- level via real-time monitoring of 8-OHdG biomarker», *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4), pp. 1743-1749.
- Premkumar, K. y Bowlus, C. L. (2003) «Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice», *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 542, pp. 99-103.
- Qi, W., Reiter, R. J., Tan, D. X., Garcia, J. J., Manchester, L. C., Karbownik, M. y Calvo, J. R. (2000) «Chromium(III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E», *Environmental Health Perspectives*, 108(5), pp. 399-403.
- Ramos, M. L., Bautista, C. M., Gómez, B. C. y Zamora, A. L. (2006) «Diabetes , estrés oxidativo y antioxidantes», *Investigación en Salud*, VIII(1), pp. 7-15.
- Rendón-Ramírez, A., Maldonado-Vega, M., Quintanar-Escorza, M., Hernández, G., Arévalo-Rivas, B., Zentella-Dehesa, A. y Calderón-Salinas, J. (2014) «Effect of vitamin E and C supplementation on oxidative damage and total antioxidant capacity in lead-exposed workers», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1), pp. 45-54.
- Repetto, M. y Repetto, G. (2009) *Toxicología fundamental*. 4ª edición. Díaz de Santos.
- Reynolds, M. y Zhitkovich, A. (2007) «Cellular vitamin C increases chromate toxicity via a death program requiring mismatch repair but not p53», *Carcinogenesis*, 28(7), pp. 1613-1620.
- Ríos, M. C. (2003) «El estrés oxidativo y el destino celular», *Química Viva*, 2(1), pp. 17-28.
- Rojas, E., Lopez, M. C. y Valverde, M. (1999) «Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications», *Journal of Chromatography B*, 722, pp. 225-254.
- Royal Society of Chemistry (2018) *The Merck Index Online, Ascorbic acid*. Disponible en: <https://www.rsc.org/merck-index>.
- Sarmishtha, D., Sengupta, A., Chakraborty y Sukta, D. (2000) «Influence of alpha tocopherol during carcinogenesis in uterine cervix of mice», *Nutrition Research*, 20(2), pp. 261-272.
- Sayago, a, Marín, M. I., Aparicio, R. y Morales, M. T. (2007) «Vitamina E y aceites vegetales», *Grasas y aceites*, 58(1), pp. 74-86.
- Serra, H. M. y Cafaro, T. A. (2007) «Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo», *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(4), pp. 525-532.
- Shibata, A., Nakagawa, K., Sookwong, P., Tsuduki, T., Asai, A. y Miyazawa, T. (2010) « $\alpha$ -Tocopherol attenuates the cytotoxic effect of  $\delta$ -tocotrienol in human colorectal adenocarcinoma cells», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(2), pp. 214-219.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. y Schneider, E. L. (1988) «A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells», *Experimental Cell Research*. Academic Press, 175(1), pp. 184-191.
- Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E. y Waszkielewicz, A. M. (2014) «Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action», *Journal of Applied Genetics*, 55, pp. 273-285.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K. y Sutton, D. J. (2012) «Heavy metal toxicity and the environment», *EXS*. Editado por A. Luch. Basel: Springer Basel, 101, pp. 133-64.
- Trzeciak, A., Kowalik, J., Małecka-Panas, E., Drzewoski, J., Wojewódzka, M., Iwaneńko, T. y Błasiak, J. (2000) «Genotoxicity of chromium in human gastric mucosa cells and peripheral blood lymphocytes evaluated by the single cell gel electrophoresis (comet assay)», *Medical Science Monitor*, 6(1), pp. 24-9.
- Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X.-Z., Wang, Y., Brubaker, R. F. y Hediger, M. A. (1999) «A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters», *Nature*, 399(6731), pp. 70-75.
- Uemura, M., Manabe, H., Yoshida, N., Fujita, N., Ochiai, J., Matsumoto, N., Takagi, T., Naito, Y. y

- Yoshikawa, T. (2002) «Alpha-tocopherol prevents apoptosis of vascular endothelial cells via a mechanism exceeding that of mere antioxidation», *European Journal of Pharmacology*, 456, pp. 29-37.
- Ueno, S., Kashimoto, T., Susa, N., Furukawa, Y., Ishii, M., Yokoi, K., Yasuno, M., Sasaki, Y. F., Ueda, J., Nishimura, Y. y Sugiyama, M. (2001) «Detection of dichromate (VI)-induced DNA strand breaks and formation of paramagnetic chromium in multiple mouse organs», *Toxicology and Applied Pharmacology*, 170(1), pp. 56-62.
- Ullah, M. F., Khan, H. Y., Zubair, H., Shamim, U. y Hadi, S. M. (2011) «The antioxidant ascorbic acid mobilizes nuclear copper leading to a prooxidant breakage of cellular DNA: implications for chemotherapeutic action against cancer», *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67(1), pp. 103-110.
- Unlu, A., Kirca, O., Ozdogan, M. y Nayir, E. (2016) «High-dose vitamin C and cancer», *Journal of Oncological Science*, 1, pp. 10-12.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. y Telser, J. (2004) «Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence», *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266, pp. 37-56.
- Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M. y Kouretas, D. (2012) «Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration», *Cell Stress and Chaperones*, 17(1), pp. 11-21.
- Ward, J. F. (1985) «Biochemistry of DNA Lesions», *Radiation Research*, 104(2), pp. S103-S111.
- Weisburger, J. H. (1999) «Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now», *Mutation Research*, 437(2), pp. 105-112.
- Wong, V., Armknecht, S. y Zhitkovich, A. (2012) «Metabolism of Cr(VI) by ascorbate but not glutathione is a low oxidant-generating process», *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2-3), pp. 192-196.
- Yurtcu, E., Iseri, O. D. y Sahin, F. I. (2011) «Effects of ascorbic acid and  $\beta$ -carotene on HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line», *Molecular Biology Reports*, 38(7), pp. 4265-4272.
- Zhang, Y., Newcomb, P. A., Egan, K. M., Titus-Ernstoff, L., Chanock, S., Welch, R., Brinton, L. A., Lissowska, J., Bardin-Mikolajczak, Alicja Peplonska, B., Szeszenia-Dabrowska, N., Zatonski, W. y Garcia-Closas, M. (2006) «Genetic polymorphisms in base-excision repair pathway genes and risk of breast cancer», *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(2), pp. 353-358.
- Zhitkovich, A., Quievryn, G., Messer, J. y Motylevich, Z. (2002) «Reductive activation with cysteine represents a chromium(III)-dependent pathway in the induction of genotoxicity by carcinogenic chromium(VI)», *Environmental Health Perspectives*, 110(5), pp. 729-731.
- De Zio, D., Cianfanelli, V. y Cecconi, F. (2013) «New insights into the link between DNA damage and apoptosis», *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(6), pp. 559-571.
- Zuluaga, M., Valencia, A. M. y Ortiz, I. C. (2009) «Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos», *Medicina UPB*, 28(1), pp. 33-41.
- Zúñiga-González, G. M., Gómez-Meda, B. C., Zamora-Perez, A. L., Martínez-González, M. A., Muñoz de Haro, I. A., Pérez-Navarro, A. E., Armendáriz-Borunda, J. y Gallegos-Arreola, M. P. (2015) «Micronucleated erythrocytes in newborns of rat dams exposed to ultraviolet-A light during pregnancy; protection by ascorbic acid supplementation», *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 782, pp. 36-41.



## **X. ANEXOS**

Los resultados del presente trabajo fueron presentados de manera parcial o total en los siguientes eventos académicos.

### **❖ XX Foro de Investigación Escolar en Biología**

**Título de la ponencia:** “Evaluación genotóxica de la administración de compuestos quinolínicos, extractos de soya y vitaminas (C y E) en sangre periférica de ratones de la cepa Hsd:ICR”.

**Autores:** López-Ramírez G, Parra-Aguilar TJ, Valle-Castillo GA, Hernández-Luis F y García-Rodríguez MC.

**Organizadores:** Carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

**Lugar y fecha:** Ciudad de México, México. Celebrado del 9 al 11 de octubre de 2017.

### **❖ Congreso Nacional de Genética 2017**

**Título de la ponencia:** “Efectos del ácido ascórbico y del alfa-tocoferol sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por compuestos metálicos de cromo hexavalente y vanadio pentavalente en ratones Hsd:ICR”.

**Autores:** Parra-Aguilar TJ, Hernández-Cortés LM, Altamirano-Lozano M y García-Rodríguez MC.

**Organizadores:** Sociedad Mexicana de Genética A.C.

**Lugar y fecha:** San Francisco de Campeche, Campeche, México. Celebrado del 2 al 5 de octubre de 2017.

### **❖ XXII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud**

**Título de la ponencia:** “Evaluaciones genotóxicas en sangre periférica de ratones tratados con antioxidantes incluidos en la dieta humana y de un nuevo compuesto quinolínico”.

**Autores:** Parra-Aguilar TJ, Valle-Castillo GA, López-Ramírez G, Hernández-Luis F, López-Sánchez MA y García-Rodríguez MC.

**Organizadores:** La Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

**Lugar y fecha:** Ciudad de México, México. Celebrado el 18 y 19 de septiembre y del 13 al 15 de diciembre de 2017.



**XX FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA**

**Solicitud de registro**  
Agosto de 2017



**Evaluación genotóxica de la administración de compuestos quinolínicos, extractos de soya y vitaminas (C y E) en sangre periférica de ratones de la cepa Hsd:ICR**

López-Ramírez Griselda, Parra-Aguilar Thelma Jaqueline, Valle-Castillo Gabriela Abigail, Hernández-Luis Francisco, y García-Rodríguez María del Carmen

**Modalidad y Ciclo**

Por favor marque con una x

X	Oral		Básico
	Cartel		Intermedio
	Video	X	Terminal

**Resumen**

**Introducción**

El estilo de vida se ha asociado con el desarrollo o protección de enfermedades relacionadas con el daño al ADN. En la Facultad de Química (UNAM) se han sintetizado nuevos compuestos quinolínicos con la finalidad de potenciar sus efectos terapéuticos mediante la adición de grupos hidroxilo y metoxilo. Por otra parte, se ha observado que los extractos de soya presentan un alto contenido de antioxidantes, que de igual manera podrían modular el daño al ADN.

**Material y Método**

El presente trabajo consistió en la evaluación genotóxica de tres compuestos: a) un nuevo compuesto quinolínico (TAQ-MLB13, 10 mg/kg), b) Extractos de soya (40mg/kg) y c) Vitaminas C-E (100-20 mg/kg). A grupos de cinco ratones hembra de la cepa Hsd:ICR se les extrajeron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0 y 48 horas. Las evaluaciones genotóxicas se realizaron mediante el ensayo de micronúcleos (MN) de acuerdo con Hayashi *et al.* (1990)<sup>[1]</sup>.

**Resultados**

Se observó que la administración de los tres compuestos no modifican las frecuencias de MN en comparación con los grupos testigo. Se empleó un grupo testigo positivo al que se le administraron 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub>, el cual mostró un incremento significativo de MN en comparación con el grupo testigo. Al evaluar la relación de los eritrocitos policromáticos y normocrómicos no se observaron efectos significativos en ninguno de los grupos estudiados.

**Conclusiones**

Estos resultados generan grandes expectativas sobre el uso de estos nuevos compuestos en tratamientos terapéuticos, así como en su posible uso en la protección del daño al ADN.

**Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216 y por CB-SEP-CONACyT 220664.**

[1] Hayashi *et al.*, 1990. *Mutat Res*; 245:245-249.

**Palabras clave:**

Antioxidante, quinazolina, proteína de soya, cromo hexavalente, micronúcleos, apoptosis.

# CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA


# 2017

*"90 años del descubrimiento de la acción mutagénica de los rayos X"*

Sociedad Mexicana de Genética A.C.  
Universidad Autónoma de Campeche  
Facultad de Ciencias Químico-Biológicas




Memoria  
Congreso Nacional de Genética 2017  
*San Francisco de Campeche, Campeche, México*  
*2-5 de octubre, 2017*



Universidad Autónoma de Campeche



SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA A.C.



Facultad de Ciencias Químico-Biológicas

EFFECTOS DEL ACIDO ASCORBICO Y DEL ALFA-TOCOFEROL SOBRE EL DANO GENOTÓXICO Y CITOTÓXICO INDUCIDO POR COMPUESTOS METÁLICOS DE CROMO HEXAVALENTE Y VANADIO PENTAVALENTE EN RATONES Hsd:ICR

Parra-Aguilar T J, Hernández-Cortés L M, Altamirano-Lozano M y García-Rodríguez M C\*

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, 09230, Batalla 5 de mayo S/N esquina Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, Iztapalapa, Ciudad de México  
[maricar\\_67@yahoo.com](mailto:maricar_67@yahoo.com)

Aunque los metales pesados como el cromo y el vanadio son micronutrientes, en concentraciones elevadas son tóxicos e incluso cancerígenos<sup>1</sup>. Los compuestos de cromo hexavalente [Cr(VI)] y vanadio pentavalente [V(V)] se reducen intracelularmente generando estrés oxidante celular. En contraparte, el daño oxidante puede ser contrarrestado por moléculas antioxidantes, como es el caso del ácido ascórbico (AA) y del alfa-tocoferol ( $\alpha$ -toc). En el presente estudio se evaluaron los efectos del AA y del  $\alpha$ -toc sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO<sub>3</sub> y el V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Grupos de 5 ratones fueron tratados de la siguiente manera: 1) Grupos testigos, solo se les administró el vehículo; 2) Grupos de antioxidantes, se les administraron dosis de 100 mg/kg de AA y 20 mg/kg de  $\alpha$ -toc; 3) Grupos de compuestos metálicos, se les administraron 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub> ó 40 mg/kg de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, y 5). Grupos experimentales, se les administraron los antioxidantes y cuatro horas después los compuestos metálicos. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de la vena caudal a las 0 y 48 horas después de los tratamientos. Se observó que los antioxidantes no incrementaron MN ni afectaron la viabilidad celular. Sin embargo, los tratamientos de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y CrO<sub>3</sub> incrementaron significativamente las frecuencias de MN y de células no viables. Cuando fueron combinados los tratamientos de antioxidantes y compuestos metálicos se disminuyeron las frecuencias de MN, aunque no se observa un efecto claro en las frecuencias de células apoptóticas ni en la viabilidad celular. Con base en estos resultados se sugiere que, aunque la exposición de las poblaciones humanas a compuestos metálicos como el CrO<sub>3</sub> y el V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> puede representar un riesgo genotóxico y citotóxico, sustancias con potencial antioxidante como el AA y el  $\alpha$ -toc pueden prevenir o modular esos efectos.

Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216.

<sup>1</sup>IARC Monogr. Eval. Carcinog. 1987, 49-256 (1990), and IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Humans 86, (2006).





## EVALUACIONES GENOTÓXICAS EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATONES TRATADOS CON ANTIOXIDANTES INCLUIDOS EN LA DIETA HUMANA Y DE UN NUEVO COMPUESTO QUINOLÍNICO

Parra-Aguilar Thelma Jacqueline<sup>1</sup>, Valle-Castillo Gabriela Abigail<sup>1</sup>, López-Ramírez Griselda<sup>1</sup>, Hernández-Luis Francisco<sup>2</sup>, López-Sánchez Marcela Alejandra<sup>2</sup> y García-Rodríguez María del Carmen<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, FES-Zaragoza, UNAM, CDMX, México, <sup>2</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, CDMX, México. \*carmen.garcia@unam.mx

En la actualidad el crecimiento de las industrias ha incrementado la exposición de las poblaciones a los agentes genotóxicos, por lo que se ha planteado la necesidad de generar estrategias para la protección del daño al ADN. Una de ellas es la neutralización del estrés oxidante mediante el uso de antioxidantes. En este sentido, se ha observado que tanto las Vitaminas C y E, como los extractos de soya presentan propiedades antioxidantes. Aunado a ello se han diseñado o modificado compuestos para potenciar su capacidad antioxidante; como es el caso de la quinazolina TAQ-MLB13, sintetizada en la Facultad de Química de la UNAM, a la que se le adicionaron grupos hidroxilo y metoxilo. Como parte de la regulación establecida en el diseño, síntesis o mejora de un fármaco, se deben realizar una serie de pruebas donde se incluye la evaluación del daño al material genético. Una técnica ampliamente utilizada para este fin es el ensayo de micronúcleos (MN). El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la actividad genotóxica de la TAQ-MLB13, extractos de soya y vitaminas (C y E) en sangre periférica de ratones de la cepa Hsd:ICR. Grupos de 5 ratones hembra fueron divididos al azar y tratados de la siguiente manera: a) Quinazolina TAQ-MLB13 (10 mg/kg), b) Extractos de soya (40mg/kg) y c) Vitaminas C-E (100-20 mg/kg). También se emplearon dos grupos testigo: d) grupo testigo positivo al que se le administraron 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub> y e) testigo negativo (sólo se les administró el vehículo). Después de la administración de los tratamientos, a los organismos se les extrajeron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0 y 48 horas. Las evaluaciones genotóxicas se realizaron mediante el ensayo de MN de acuerdo con Hayashi *et al.* [1990]<sup>[1]</sup>. Al evaluar la relación de los eritrocitos policromáticos (EPC) y normocromáticos (ENC) no se observaron efectos significativos en ninguno de los grupos estudiados con excepción del grupo tratado con CrO<sub>3</sub> que mostró una disminución de los EPC. La administración de CrO<sub>3</sub> mostró un incremento significativo de MN en comparación tanto con el grupo testigo (tratado sólo con el vehículo) como con los otros grupos experimentales. Los grupos tratados con compuestos de soya y vitaminas (C y E) no incrementan los MN, por el contrario se observó una disminución en comparación con su respectivo grupo testigo. Mientras que, el tratamiento con la TAQ-MLB1 incrementa las frecuencias de MN, sin embargo, este incremento no es indicativo de una genotoxicidad clara, ya que organizaciones como la FDA<sup>[2]</sup> proponen como agentes genotóxicos claros aquellos que incrementen más de 4 MN por 1000 EPC y la TAQ-MLB1 incrementó alrededor de 1 MN en 1000 EPC. El efecto observado por los compuestos de soya y las vitaminas pudo deberse gracias a sus estructuras moleculares capaces de neutralizar el estrés oxidante celular, disminuyendo a su vez el daño directo al ADN. Mientras que el efecto que presentó la administración de la TAQ-MLB13 podría ser indicativo de daño tóxico indirecto. Estos resultados generan grandes expectativas sobre el uso de estos compuestos en tratamientos terapéuticos, así como en su posible uso en la protección del daño al ADN. Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216 y por CBSEP-CONACyT 220664.

[1] Hayashi *et al.*, 1990. *Mutat Res*; 245:245-249.

[2] FDA, CDER, and CBER. 2012; 1–31. doi:EMA/CHMP/ICH/126641/2008.

