



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Efecto de la genisteína y de los extractos proteínicos de la soya (*Glycine max*) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducidos por trióxido de cromo en sangre periférica de ratones Hsd:ICR”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

GABRIELA ABIGAIL VALLE CASTILLO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2018.





Universidad Nacional
Autónoma de México



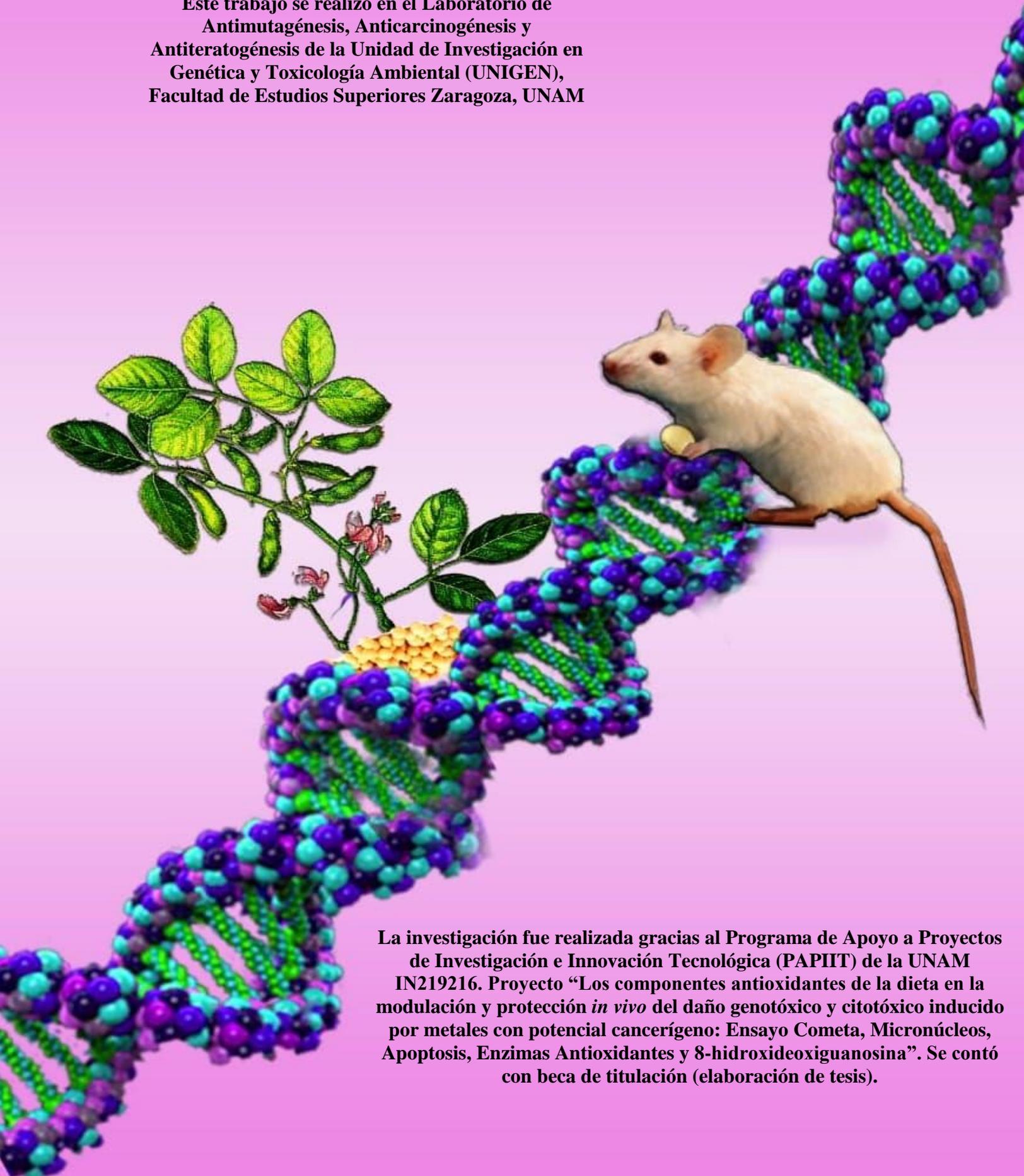
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

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).

"La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable"

Leonardo Da Vinci

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), máxima casa de estudios y mi segundo hogar, la cual me brindó la oportunidad de desarrollarme académicamente y me abrió las puertas hacia el conocimiento.

Mi más cordial agradecimiento a la Dra. María del Carmen García Rodríguez por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella, por haber tenido la paciencia necesaria para ayudarme, por transmitirme sus conocimientos y proporcionarme de su valioso tiempo.

A la DGAPA-UNAM por el financiamiento brindado para la realización del proyecto (PAPITT-219216).

Agradezco a los miembros del jurado por sus valiosos comentarios, sugerencias y tiempo dedicado para el mejoramiento del trabajo:

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dra. María del Carmen García Rodríguez

Dr. Arturo Eduardo Cano Flores

Dra. Yolanda Córdova Galaviz

Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

DEDICATORIAS

Dedicada con profundo agradecimiento y admiración a mi madre, María del Carmen Castillo Alcantar, por apoyarme a lo largo de mi trayectoria académica, por ser padre y madre a la vez, por sus esfuerzos y sacrificios en cada etapa de mi vida personal y académica, por creer en mí, por haberme dado la oportunidad de cumplir mis metas y haberme dado el legado más importante de la vida que es la educación por lo cual le estaré eternamente agradecida, sin ti nada hubiera sido posible. Gracias mamá, te amo.

A mi abuelita Elena Alcantar por su cariño y por estar a mi lado en los momentos más importantes de mi vida.

A mi padre Fermín Hernández por su apoyo, sus consejos y por acompañarme en cada momento.

A mis hermanos Victor y Noé Hernández por estar siempre a mi lado, por su apoyo incondicional y por escucharme siempre que lo necesito.

A mis compañeros y amigos de laboratorio que estuvieron apoyandome en todo momento, por sus enseñanzas y sus consejos, gracias por su valiosa compañía y amistad: Griselda Ramírez, Lourdez Hernández, Estefani Hernández, Tonancy Nicolás, Thelma Parra, Julio Olguin, Manuel Marin.

A mis amigos y acompañantes de trayectoria académica: Erick Justo, Navely Vázquez, Beatriz Patiño, David Zanabria, Fernanda Valdez, Karen Canul, Araceli Hernández, y Luis Flores, gracias por todos esos momentos únicos, especiales e inigualables.

A Raúl González por estar a mi lado en todo momento y por ser parte de esa fuerza que me impulsa a seguir adelante, gracias por todos estos años a mi lado, por creer en mí, por la motivación y por tu amor.

ÍNDICE

RESÚMEN.....	i
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	ii
FÓRMULAS.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antioxidantes.....	1
1.1.1 Soya y sus isoflavonas.....	2
1.2 Estrés oxidante.....	4
1.3 Estrés oxidante inducido por metales pesados.....	5
1.3.1 Cromo (VI)	6
1.4 Pruebas y ensayos para evaluar genotoxicidad y citotoxicidad	7
1.4.1 Ensayo de micronúcleos	8
1.4.2 Apoptosis y viabilidad celular	9
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
III. HIPÓTESIS.....	11
IV. OBJETIVOS.....	12
4.1 General	12
4.2 Particulares	12
V. MATERIAL Y MÉTODO.....	13
5.1 Animales	13
5.2 Reactivos	13
5.3 Tratamientos	13
5.4 Establecimiento de las dosis	14
5.5 Ensayo de MN y relación EPC/ENC	17
5.6 Evaluación de apoptosis y viabilidad celular	18
5.7 Análisis estadístico.....	19

VI.	RESULTADOS.....	21
6.1	Dosis de los ExPS.....	21
6.2	Efecto de los ExPS sobre el daño genotóxico	21
6.2.1	Micronúcleos.....	21
6.2.2	Apoptosis.....	29
6.3	Efecto de los ExPS sobre el daño citotóxico.....	31
6.3.1	Relación EPC/ENC.....	31
6.3.2	Viabilidad celular.....	33
6.4	Efecto de la genisteína sobre el daño genotóxico.....	34
6.4.1	Micronúcleos.....	34
6.4.2	Apoptosis.....	40
6.5	Efecto de la genisteína sobre el daño citotóxico.....	42
6.5.1	Relación EPC/ENC.....	42
6.5.2	Viabilidad celular.....	44
VII.	DISCUSIÓN.....	46
VIII.	CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES	52
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
X.	ANEXOS.....	67

RESÚMEN

En estudios epidemiológicos se ha observado que un alto consumo de soya (*Glycine max*) está relacionado con efectos benéficos a la salud humana, debido a su alto contenido de proteínas y a las propiedades antioxidantes que le confieren isoflavonas como la genisteína. En contraparte, el daño genotóxico inducido por el trióxido de cromo (CrO_3) se ha asociado al estrés oxidante (EOx) inducido durante su reducción intracelular. De ahí que, en el presente estudio se evaluó el efecto de la genisteína y de los extractos proteínicos de la soya (ExPS) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducidos por el CrO_3 en sangre periférica de ratones Hsd:ICR. Grupos de cinco ratones hembra y macho fueron tratados de la siguiente manera: a) testigo/agua, vehículo 0.25 mL de agua potable esteril por vía intragástrica (i.g.); b) testigo/aceite, vehículo 0.25 mL de aceite de maíz por vía i.g.; c) ExPS, 40 mg/Kg por vía i.g.; d) genisteína, 15 mg/Kg por vía i.g.; e) CrO_3 , 20 mg/Kg por vía intraperitoneal (i.p.); f) ExPS- CrO_3 , mismos tratamientos y vías que los grupos ExPS y CrO_3 ; y g) genisteína- CrO_3 , mismos tratamientos y vías que grupos ExPS y CrO_3 . Las evaluaciones de micronúcleos (MN), apoptosis, relación de eritrocitos policromáticos/normocromáticos (EPC/ENC) y viabilidad celular se realizaron en muestras de sangre periférica tomadas a las 0, 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos. Se corroboró el daño genotóxico y citotóxico del CrO_3 , ya que se incrementaron los promedios de MN y las células apoptóticas. La administración de los ExPS y de la genisteína no indujeron daño genotóxico en ratones hembra y macho, ya que no se incrementaron los promedios de MN, aunque la administración de los ExPS (40 mg/Kg) y de la genisteína (15 mg/Kg) incrementaron las células apoptóticas en machos. La administración de los ExPS (40 mg/Kg) y de la genisteína (15 mg/Kg) disminuyeron el daño genotóxico inducido por el CrO_3 , ya que se redujeron los promedios de MN, siendo más significativo en machos. El hecho de no observar un incremento de células apoptóticas cuando se administraron los ExPS y la genisteína previo al tratamiento con CrO_3 , sino por el contrario se redujeron, sugiere que la disminución de MN no está mediada por la activación de la apoptosis.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AC	Aberraciones cromosómicas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ANDEVA	Análisis de varianzas
BrEt	Bromuro de etidio
CAT	Catalasa
DIF	Frecuencia de Inducción Diferencial de MN
E ₂	Estradiol
ECETOC	<i>“European Centre for Ecotoxicology of Chemicals”</i>
ENC	Eritrocitos normocromáticos
EOx	Estrés oxidante
EPA	<i>“Environmental Protection Agency”</i>
EPC	Eritrocitos policromáticos
EPC-MN	Eritrocitos policromaticos micronucleados
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ExPS	Extractos proteínicos de soya
FDA	<i>“Food and Drugs Administration”</i>
GPx	Glutación peroxidasa
IARC	<i>“International Agency for Research on Cancer”</i>
i.g.	Intragástrica
i.p.	Intraperitoneal
MN	Micronúcleo (s)
NA	Naranja de acridina
NIF	Frecuencia de inducción neta
OECD	<i>“Organization for Economic Cooperacion and Development”</i>
RE	Receptores de estrógenos
RL	Radicales libres
SOD	Superóxido dismutasa

FÓRMULAS

Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(IV)	Cromo tetravalente
Cr(V)	Cromo pentavalente
Cr(VI)	Cromo hexavalente
CrO ₃	Trióxido de cromo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
OH ⁻	Ión hidroxilo
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
OH [•]	Radical hidroxilo

I. INTRODUCCIÓN

Se ha observado que algunos componentes vegetales al presentar propiedades antioxidantes pueden proteger del daño al material genético y de la inducción de algunos tipos de cáncer (Surh y Ferguson, 2003). Dentro de estos componentes se encuentra la soya (*Glycine max*) que presenta altas concentraciones de proteínas y antioxidantes como las isoflavonas, particularmente la genisteína la cual está asociada con la baja incidencia de cáncer de mama, próstata, colon, hígado y ovario (Navarro, 2001). Se ha planteado como posibles mecanismos de “protección” a la inducción de apoptosis de las células cancerosas y la captura de radicales libres (RL) (Shehata *et al.*, 2016).

En contra parte, la genotoxicidad inducida por compuestos de cromo hexavalente [Cr(VI)], se ha relacionado con el estrés oxidante (EOx) generado durante su reducción intracelular a cromo trivalente [Cr(III)] (O'Brien *et al.*, 2003). De ahí surge el interés de conocer si los extractos proteínicos de soya (ExPS) y la genisteína pueden proteger contra el daño genotóxico y citotóxico inducido por compuestos de Cr(VI) principalmente del trióxido de cromo (CrO₃).

1.1 Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que retrasa o inhibe la oxidación de otras moléculas y son capaces de donar electrones para estabilizar a los RL y neutralizar sus efectos dañinos. La principal característica estructural de éstos, es la presencia de iones hidroxilo (OH⁻) o sulfhidrilo (SH⁻) en la molécula original o en su forma reducida (Veskoukis *et al.*, 2012; Halliwell y Gutteridge, 2015; Pisoschi y Pop, 2015). Los mecanismos de defensa antioxidante pueden ser de naturaleza enzimática y no enzimática y actúan conjuntamente para así proteger a la célula. El componente de tipo enzimático se considera como la primera línea de defensa y se encarga de evitar la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), catalizando la transferencia de electrones de un sustrato hacia los RL (Yu, 1994; Chaudoére y Ferrari, 1999); en donde se incluyen a la superóxido dismutasa

(SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), cuya síntesis puede modificarse por ejercicio, dieta y edad (Filaire y Toumi, 2012).

Los antioxidantes de tipo no enzimáticos son un conjunto de moléculas tanto hidrófobas como hidrofílicas que tienen como función capturar RL y generar moléculas menos nocivas para la célula, mediante la adición de un electrón al RL con el objetivo de estabilizarlo (Bandyopadhyay *et al.*, 1999; Larkins, 1999).

Los antioxidantes pueden ser sintetizados por la célula (endógenos) o ingresar a través de la dieta (exógenos) (Ramos *et al.*, 2006; Veskoukis *et al.*, 2012). Dentro de los antioxidantes que se incorporan por la dieta están las isoflavonas como la genisteína que se encuentran principalmente en la soya (Marotte y Zeni, 2013). Se ha observado que una dieta rica en antioxidantes disminuye la incidencia de diferentes tipos de cáncer, así como de enfermedades degenerativas, por lo que ha surgido un gran interés hacia la evaluación de los productos naturales y su capacidad antioxidante (Avello y Suwalsky, 2006; Pisoschi y Pop, 2015).

1.1.1 Soya y sus isoflavonas

La soya (*Glycine max*) es una planta herbácea anual, proveniente de las regiones subtropicales y tropicales de Asia, perteneciente a la familia de las Fabaceae (Avila, 2011) caracterizada por presentar tallos rastreros o erectos de hasta 150 cm de altura, provista de pequeños pelos rojizos; hojas ovales, compuestas, tripinadas y pilosas; flores papilionáceas, amarillentas o violáceas, de pequeño tamaño, agrupadas en inflorescencias axilares; el fruto es una vaina arqueada vellosa con 2-6 semillas subglobosas lisas en su interior, de color variable entre blanco-amarillento y pardo (Mostacero *et al.*, 2002). La semilla de soya posee un alto contenido proteínico, importante para la alimentación humana y animal, siendo de gran importancia económica y social (Minuzzi *et al.*, 2007). Dentro del consumo de soya, el consumo en particular de sus extractos proteínicos ha crecido notablemente debido a que la proteína de soya se caracteriza por ser de buena calidad y por su alto valor nutricional, presenta propiedades benéficas a la salud, ya que su consumo se asocia con la prevención de enfermedades

cardiovasculares, osteoporosis y en el tratamiento de enfermedades renales (Torres-Torres y Tovar-Palacio, 2009). A excepción de estudio de Todden *et al.*, (2007) en el que observaron que altas concentraciones de proteína de soya podrían inducir daño genotóxico a los colonocitos, no hay estudios de los efectos de la proteína de soya sobre el ADN.

La soya presenta la mayor cantidad de isoflavonas, las cuales son un amplio grupo de compuestos bioactivos, no nutritivos, de estructura fenólica, no esteroideal (Vanegas *et al.*, 2008; Patisaul y Jefferson, 2010). El contenido de isoflavonas depende de las condiciones de cultivo y crecimiento, año de cosecha; así como, de la forma en que hayan sido procesadas (Liu y Herbert, 2002). Las isoflavonas que principalmente están presentes en la soya en su forma aglicona son la genisteína, daidzeína y gliciteína; que son las moléculas activas para los humanos (Valladares *et al.*, 2012; González y Durán, 2014). La genisteína (5,7- dihidroxi-3-(4-hidroxifenil)-4H1-benzopiran-4-ona) (Mendoza *et al.*, 2015) es una de las isoflavonas de mayor importancia por sus propiedades anticancerígenas, antioxidantes y captadoras de RL (Figura 1A).

Las isoflavonas presentes en los alimentos se encuentran inactivas, debido a que están en forma glicosilada (unidas a azúcares), las cuales se denominan daidzina, genistina y glicitina. Una vez ingeridas, éstas son hidrolizadas (mediante enzimas intestinales β -glucosidasas) a sus formas agliconas, daidzeína, genisteína, gliciteína, que son activas (Setchell *et al.*, 2005). Las formas agliconas pueden ser absorbidas, o continuar siendo metabolizadas a varios tipos específicos de metabolitos: la genisteína puede ser metabolizada a p-etil fenol (Cederroth y Nef, 2009). Luego siguen pasos de glicuronidación (unión al ácido glucurónico y en menor medida al ácido sulfúrico), eventos que toman lugar en el hígado, y también pueden ocurrir en la pared intestinal durante la misma absorción. Las isoflavonas llegan al hígado mediante la circulación enterohepática, donde pueden ser catalizadas por la UDP-glucuroniltransferasa (Setchell *et al.*, 2002). La mayoría de las isoflavonas absorbidas son excretadas en forma conjugada por la orina, pero un pequeño porcentaje pasa por la circulación enterohepática, reciclándose

nuevamente. Además de la orina, también pueden eliminarse por la bilis, plasma, heces, semen, saliva y leche materna (Murkies *et al.*, 1998).

Las isoflavonas son capaces de unirse a los receptores de estrógenos (RE) debido a su similitud estructural con el estradiol (E₂) (Figura 1B), por ello es que se clasifican como fitoestrógenos (Setchell y Cassidy, 1999; Quiñones *et al.*, 2012; Rahman y Hongsprabhas, 2016). Debido a esta capacidad de unión a los RE, las isoflavonas pueden actuar como agonistas o antagonistas de los RE, inhibiendo o promoviendo la proliferación celular (Molteni *et al.*, 1995; Setchell, 1998).

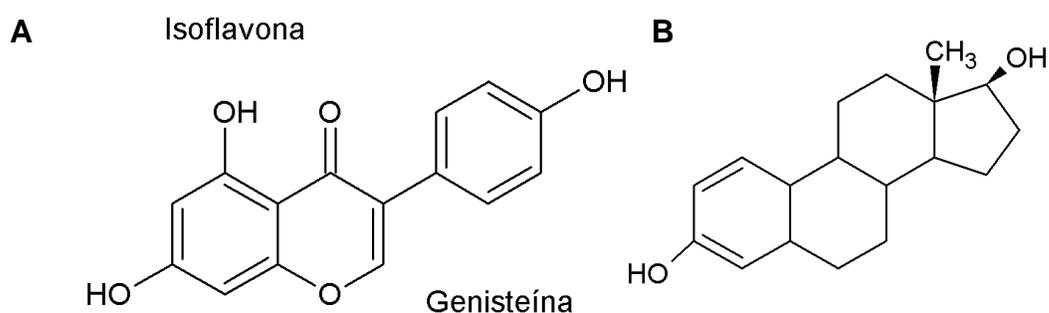


Figura 1. Estructura de la genisteína (isoflavona) y estradiol.

1.2 Estrés oxidante

El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros, conduce a una ruptura del control y señalización fisiológica que normalmente ejerce el sistema redox, conduciendo a un daño molecular el cual se le conoce como EOx (Jones, 2006). El EOx es responsable de la degeneración celular, debido a que los RL pueden reaccionar con biomoléculas, produciendo en milisegundos un daño celular irreversible que puede llevar a la muerte celular (Donaldson *et al.*, 1996; Turrens, 2003).

Un RL es cualquier molécula que cuenta con uno o más electrones desapareados en la órbita externa, es altamente reactiva y capaz de provocar una reacción en cadena que causa daño oxidante, desde células hasta tejidos (Bunker, 1992; González-Torres *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2006; Núñez, 2011). Los RL

endógenos, son producidos normal y continuamente durante el metabolismo celular, que se lleva a cabo principalmente en la mitocondria (Turrens, 2003) y juegan un importante papel en la defensa contra infecciones por bacterias y virus. En contra parte, se ha propuesto que la genisteína (una de las principales isoflavonas de soya), es capaz de neutralizar a los RL (Haya *et al.*, 2002; Carratú y Sanzini, 2005; Hernández *et al.*, 2009).

1.3 Estrés oxidante inducido por metales pesados

El EOx es promovido por la capacidad oxidante de los metales pesados (frecuentes contaminantes ambientales) asociado con la patogénesis de diversas enfermedades (Becerra-Torres *et al.*, 2014). La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha incluido en el grupo de agentes carcinógenos al arsénico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), plomo (Pb) y mercurio (Hg) (IARC, 1990). Los cuales pueden generar toxicidad en las células, tejidos u órganos, así como también genotoxicidad y carcinogenicidad, debido a que son capaces de incrementar la formación de RL y generar EOx (Conte *et al.*, 1998; Kawanishi *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006). La toxicidad y carcinogenicidad de algunos metales se debe a que éstos poseen la capacidad de interaccionar con el ADN y con proteínas nucleares, así mismo generan ERO que causan el deterioro oxidativo de diversas biomoléculas. Los compuestos de Fe(II), Cu(II), Cr(III), Cr(IV), Cr(V), Cr(VI), Co(II), Ni(II) y V(IV), mediante la reacción de Fenton producen ERO intracelulares de manera directa e indirecta. Durante esta reacción, el catión reacciona con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para generar un radical hidroxilo (OH[•]) altamente tóxico y un ion metálico oxidado. Otro mecanismo clave por el cual los metales como Cr(III), Cr(IV), Cr(V), Cr(VI), Co(I), Co(II) y V(IV) generan ERO es la reacción de Haber-Weiss. En esta reacción, el O₂^{•-} media la generación del OH[•] a partir del H₂O₂ y también participa en la reducción de Fe(III) que conduce a la reacción de Fenton (Figura 2).

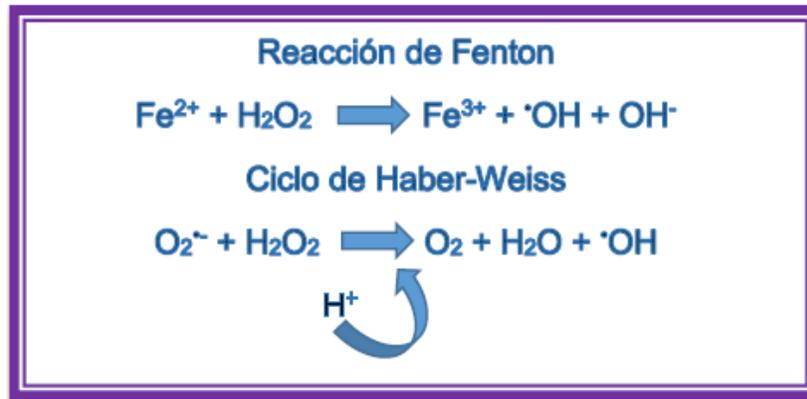


Figura 2. Reacción de Fenton y ciclo de Haber-Weiss.

1.3.1 Cromo hexavalente

Los compuestos de Cr(VI) son tóxicos y carcinogénicos en altas dosis, debido a su alto grado de oxidación y a su capacidad para permear membranas biológicas, ocasionando alteraciones en el genoma (Nordberg *et al.*, 2001; Caballero *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Bakiyaraj *et al.*, 2014). El Cr(VI) es uno de los contaminantes ambientales más importantes y se emplea en la manufactura de colorantes, fabricación de pinturas, curtido de cuero, producción de conservadores de la madera, en la industria textil, entre muchas otras aplicaciones (EPA, 2010; ATSDR, 2012). La exposición a los compuestos de Cr(VI) también se puede dar por agua, suelo y alimentos contaminados; así como, al contacto con el humo de cigarro (O'Brien *et al.*, 2003). Si bien el Cr(III) es considerado como micronutriente esencial implicado en el metabolismo de azúcares y grasas, se ha comprobado que el Cr(VI) es inductor de daño genotóxico (García-Rodríguez *et al.*, 2001). El Cr(VI) se absorbe fácilmente y es capaz de atravesar la membrana celular mediante transportadores aniónicos de fosfato/sulfato, en donde el ascorbato (Asc), el glutatión (GSH) y la cisteína (Cys) lo reducen a Cr(V), Cr(IV) y Cr(III). La reducción de Cr(VI) a Cr(III) puede dar lugar a la formación de RL (Figura 3) los cuales ocasionan daño oxidativo al ADN, en donde se incluyen a 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 (AC) (O'Brien *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006; ATSDR, 2012; Lee *et al.*, 2012; Lay y Levina, 2013).

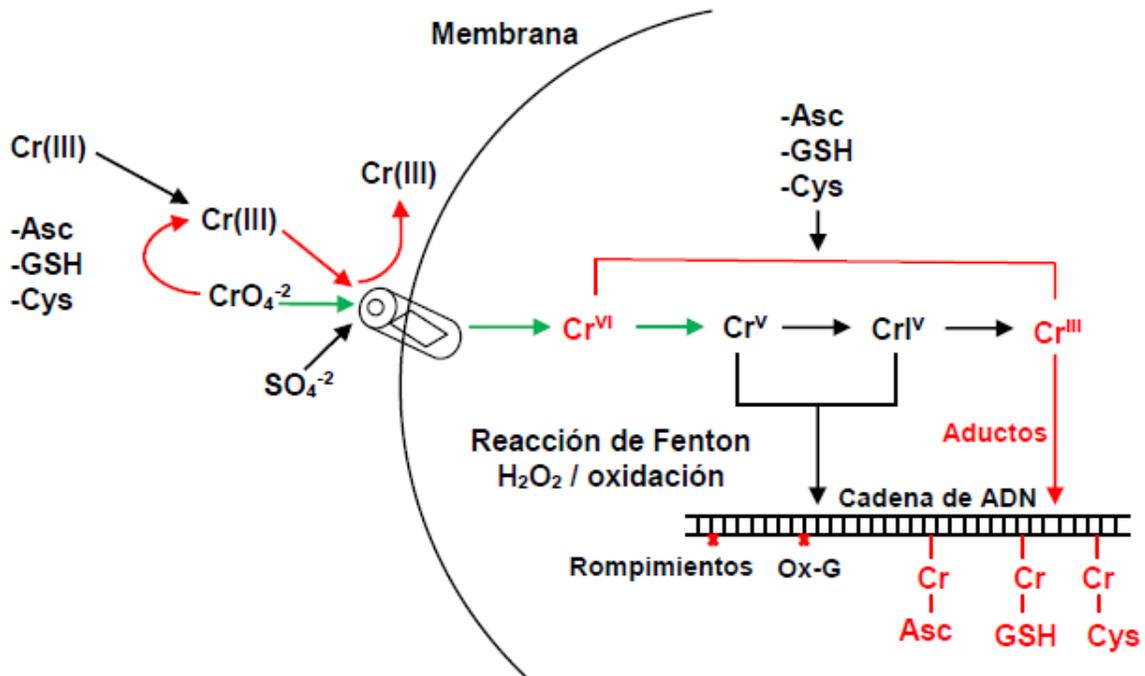


Figura 3. Inducción de daño al ADN por el Cr(VI). Modificada de Jomova y Valko, (2011).

1.4 Pruebas y ensayos para evaluar genotoxicidad y citotoxicidad

Un agente genotóxico es cualquier sustancia o producto capaz de lesionar la integridad del material genético y/o sus componentes asociados (Smith, 1996; Lodish *et al.*, 2002). La evaluación de daño genotóxico se realiza para identificar agentes contaminantes que representan un riesgo para la estabilidad del material genético; así como, compuestos propuestos para uso terapéutico y sustancias que podrían ser capaces de regular o reducir los efectos mutagénicos de algunos productos químicos (Sloczyńska *et al.*, 2014).

Para evaluar daño genotóxico se recomienda iniciar con ensayos de tamizaje como los son los de mutaciones, ensayos *in vitro* empleando células de mamíferos

(frecuencia de AC) *in vivo* empleando médula ósea o sangre periférica (frecuencia de micronúcleos (MN)) (IARC, 1990, FDA, 2000; OECD, 2016). Las pruebas de genotoxicidad no solo son indispensables para evaluar agentes genotóxicos y sus mecanismos inductores, sino también sustancias con propiedades protectoras o moduladoras de daño al ADN (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2006).

1.4.1 Ensayo de micronúcleos

El ensayo de MN, es una técnica ampliamente utilizada para la detección del daño genotóxico, producido por diferentes sustancias químicas y agentes físicos. Los MN son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que espontáneamente o por causa de agentes genotóxicos, quedan fuera del núcleo durante la división celular, su forma es generalmente redonda y alcanza un diámetro entre 0.4 a 1.6 micras (Schmid, 1975; Heddle *et al.*, 1991; Fuic y Mijic, 1999), pueden ser cromosomas completos rezagados por daño al uso mitótico (daño aneuploídico) (Figura 4A), o bien fragmentos de cromosomas sin centrómero (daño clastogénico) (Figura 4B); en cualquiera de los casos, no lograron incorporarse a ninguno de los núcleos de las células hijas. El ensayo de MN es una técnica *in vivo* que se puede realizar en cualquier tejido que este en proliferación, puede ser en médula ósea o en eritrocitos de sangre periférica de animales donde el bazo no elimine eritrocitos micronucleados. Cuando los eritrocitos policromáticos (EPC) son expulsados de la médula ósea, el núcleo se extruye. Si un MN se ha formado permanece en el citoplasma (Schmid, 1975, Mavournin *et al.*, 1990).

El ensayo de MN se caracteriza por su simplicidad, fiabilidad, sensibilidad y rapidez (Rocha *et al.*, 2011). Un incremento en la frecuencia de MN en animales tratados con agentes químicos, indica que estos agentes son inductores de daño cromosómico, sin embargo, no indica que tipo de daño cromosómico y que cromosomas estuvieron involucrados (Hayashi *et al.*, 2000). 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).

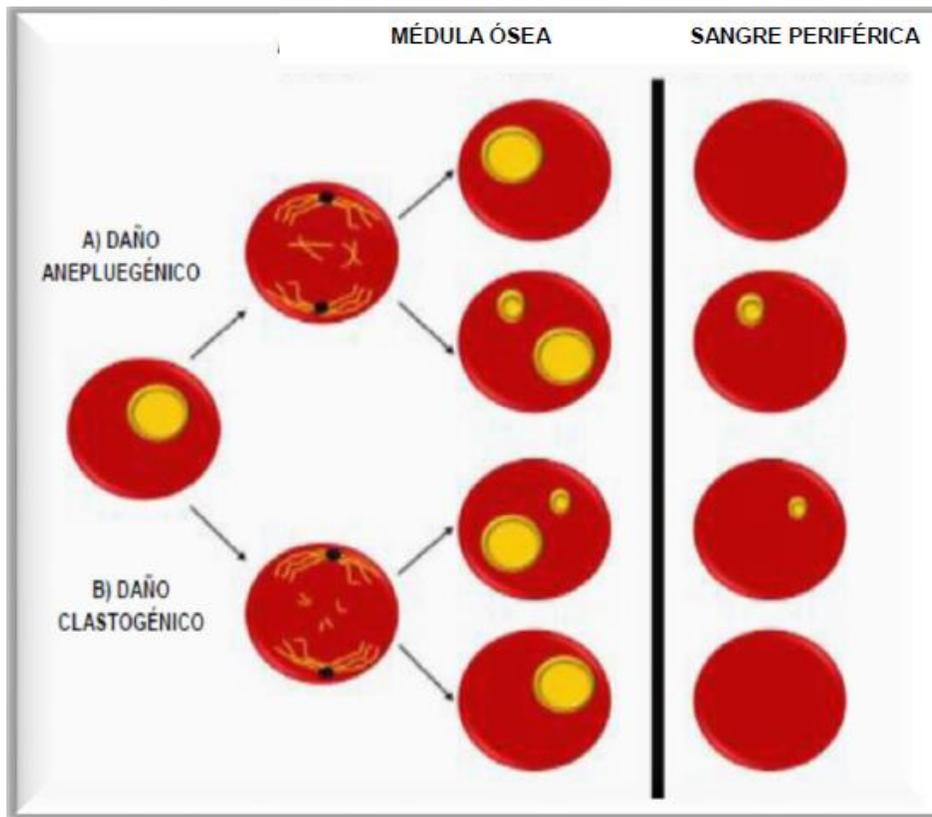


Figura 4. Formación de un micronúcleo. Tomado de Ramos-León, (2016).

1.4.2 Apoptosis y viabilidad celular

La apoptosis es un proceso genéticamente controlado mediante el cual las células inducen su propia muerte (Figura 5A), es importante para el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, juega un papel fundamental en el mecanismo de protección contra la carcinogénesis (eliminación de las células dañadas genéticamente), y se le ha considerado como un marcador de daño al ADN (Hayashi *et al.*, 1990). 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 (McGahon *et al.*, 1995; Alberts *et al.*, 2010).

Además de la apoptosis que es una forma de muerte celular programada se encuentra la necrosis (Figura 5B). La necrosis es un proceso violento, ya que las células se hinchan y se rompe la membrana plasmática, de modo que liberan todo su contenido sobre las células adyacentes, lo que provoca una respuesta inflamatoria (Allen *et al.*, 1997; Saraste y Pulkki, 2000).

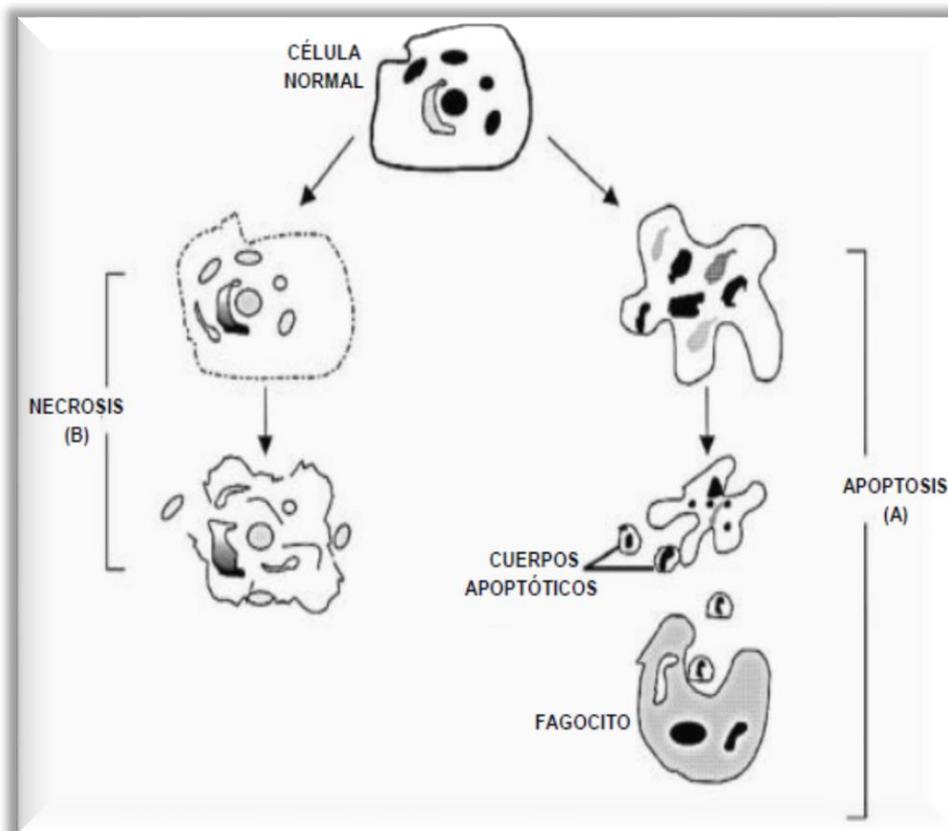


Figura 5. Morfología de la apoptosis y necrosis. Tomada de Elena (2002).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que ciertas plantas o sus componentes confieren efectos protectores o moduladores contra el daño al ADN. La soya es una planta a la que se le han conferido propiedades benéficas para la salud humana, ya que posee un alto contenido en proteínas y componentes antioxidantes como las isoflavonas, particularmente la genisteína. En contraparte, se ha propuesto que la genotoxicidad de los compuestos de Cr(VI) es debido al EOX generado durante su reducción a Cr(III). De ahí que surge la pregunta:

¿Los ExPS y la genisteína pueden disminuir el daño genotóxico y citotóxico inducido por compuestos de Cr(VI) como lo es el CrO₃?

III. HIPÓTESIS

Si la soya contiene ExPS e isoflavonas como la genisteína que presentan actividad antioxidante y el Cr(VI) puede inducir daño genotóxico mediante el EOX generado durante su reducción intracelular a Cr(III), entonces se espera que la administración de los ExPS y la genisteína en ratones Hsd:ICR, disminuyan el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃ mediante la reducción de los promedios de MN, de las células no viables, así como del incremento de la apoptosis y mantenimiento de la relación EPC/ENC.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Estudiar el efecto de la genisteína y de los ExPS sobre el daño genotóxico y citotóxico inducidos por CrO₃ en sangre periférica de ratones Hsd:ICR.

4.2 Particulares

- a) Establecer las dosis no genotóxicas ni citotóxicas de los ExPS y de la genisteína en sangre periférica de ratones hembra y macho.
- b) Evaluar la cinética de inducción de MN en EPC de sangre periférica después de la administración de los ExPS, genisteína y CrO₃ en ratones hembra y macho, mediante la cuantificación MN cada 24 h durante 72 h en ratones Hsd:ICR.
- c) Evaluar el efecto de los tratamientos con los ExPS y de la genisteína sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃, por medio del análisis de MN.
- d) Evaluar el efecto de los ExPS y de la genisteína sobre la apoptosis en sangre periférica de ratones previamente tratados con CrO₃ empleando la técnica de tinción diferencial con NA/BrEt.
- e) Evaluar el efecto de los ExPS y de la genisteína sobre el daño citotóxico inducido por el CrO₃, mediante la evaluación de la frecuencia de EPC con relación a los ENC y de la viabilidad celular en sangre periférica de ratones hembra y macho.

V. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Animales

Se emplearon ratones hembra y macho 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 (± 3 °C) y periodos de 12 horas luz/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 Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Se utilizaron los colorantes Naranja de Acridina (NA) [CAS No. 10127-02-3] y Bromuro de Etidio (BrEt) [CAS No. 1239-45-8]. Para los tratamientos se requirió agua destilada estéril y aceite de maíz [CAS No. 8001-30-7], CrO₃ [CAS No. 1333-82-0], genisteína [CAS No. 446-72-0] y ExPS [s/CAS].

5.3 Tratamientos

Las soluciones de CrO₃ y de los ExPS se prepararon con agua destilada estéril, mientras que la genisteína se disolvió en aceite de maíz. La administración de los

ExPS y de la genisteína se realizó por vía intragástrica (i.g.), mientras que CrO₃ por vía intraperitoneal (i.p.), en un volumen aproximado de 0.25 mL (Figura 10). Se emplearon grupos de hembras y de machos en cada tratamiento conformados al azar por cinco ratones que fueron tratados de acuerdo con los protocolos 1 (Figura 6) y 2 (Figura 7).

5.4 Establecimiento de las dosis

La dosis del CrO₃ fue establecida de acuerdo a investigaciones previas, en donde el compuesto induce daño genotóxico, sin causar la muerte de los organismos (García-Rodríguez *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2003; García-Rodríguez *et al.*, 2014).

La dosis inicial empleada para los ExPS fue de 60 mg/Kg tanto para hembras como para machos, ya que esta dosis además de no inducir daño genotóxico ni citotóxico también tiene un efecto protector frente al dolor nociceptivo térmico en ratas ovariectomizadas (Ángeles-Palacios, 2011).

En cuanto a la dosis empleada para la genisteína tanto para hembras como para machos, fue de 15 mg/Kg que es la dosis que no ha mostrado efectos en la respuesta inmune en ratones (Guo, 2001).

Protocolo 1

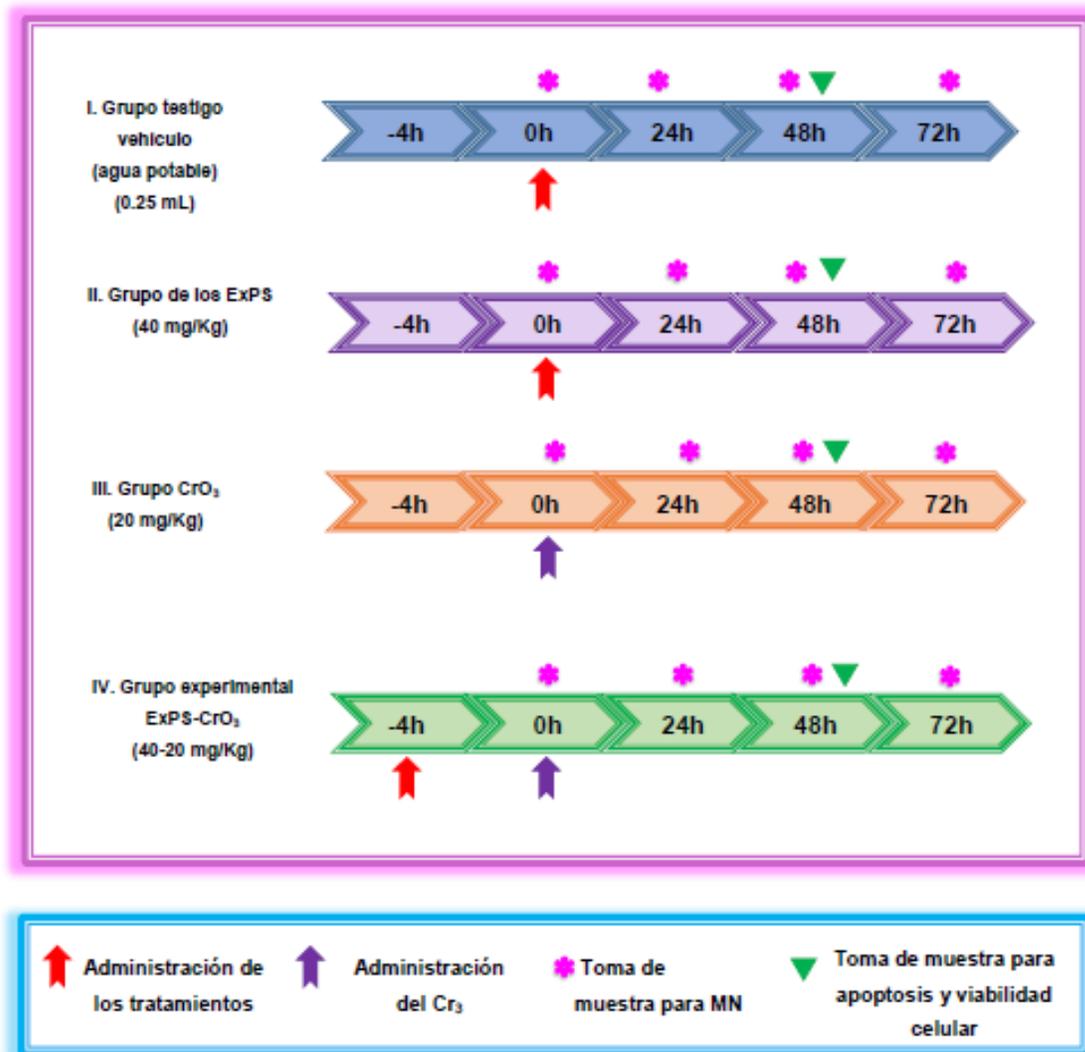


Figura 6. Protocolo para la administración de los tratamientos: los ExPS vía i.g. (40 mg/Kg) y CrO₃ vía i.p. (20 mg/Kg); testigo: tratado únicamente con agua potable por vía i.g. y la combinación de los tratamientos ExPS-CrO₃ en ratones hembra y macho; toma de muestras para MN, apoptosis y viabilidad celular. La administración de los ExPS se realizó 4 horas antes que el CrO₃.

Protocolo 2

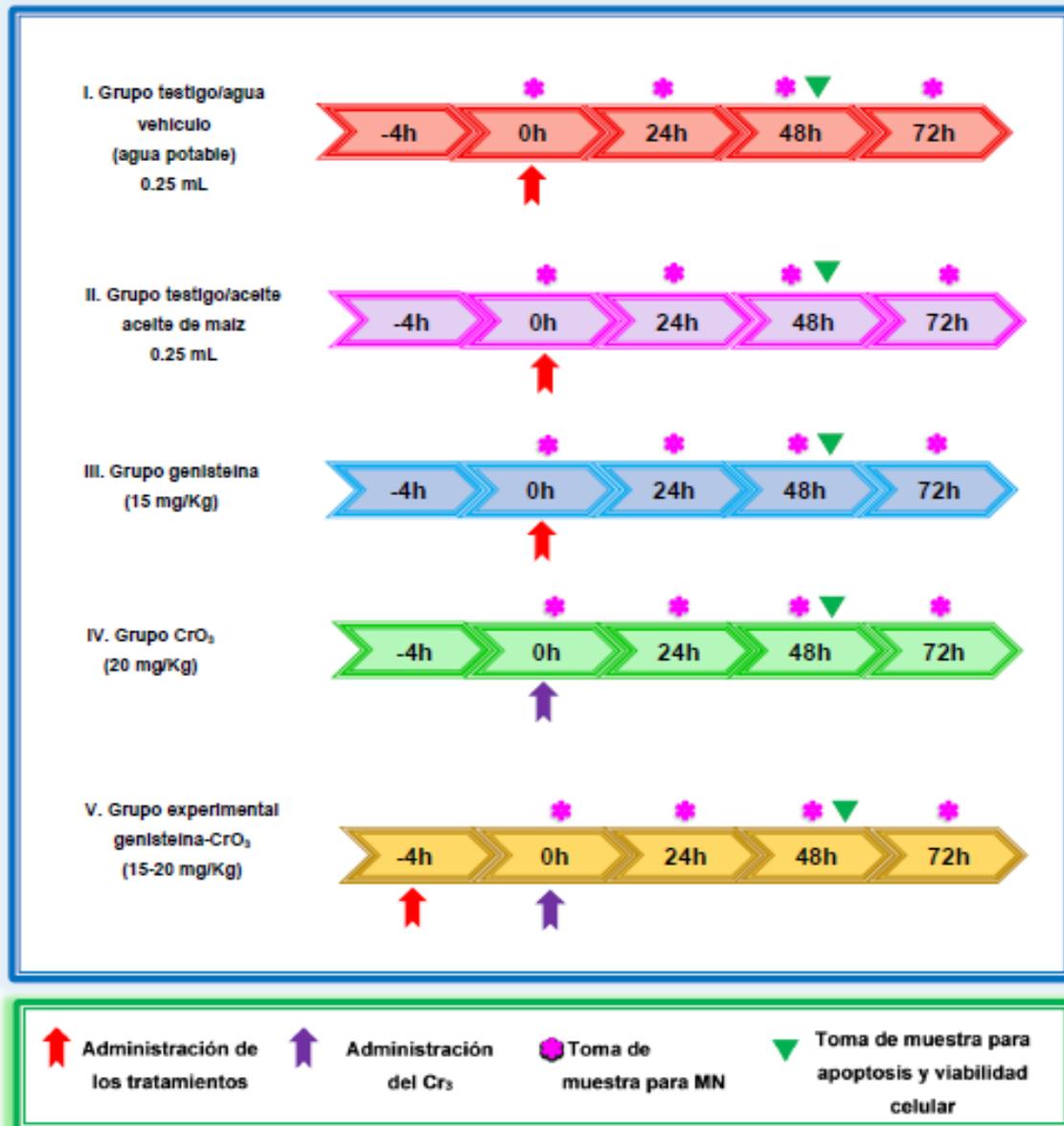


Figura 7. Protocolo para la administración de los tratamientos: genisteína vía i.g. (15 mg/Kg) y CrO₃ vía i.p. (20 mg/Kg); testigos: tratados únicamente con agua potable y aceite de maíz por vía i.g. y la combinación de los tratamientos genisteína-CrO₃ en ratones hembra y macho; toma de muestras para MN, apoptosis y viabilidad celular. La administración de la genisteína se realizó 4 horas antes que el CrO₃.

5.5 Ensayo de MN 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) (Figura 10). 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 8). Para el análisis del daño genotóxico se cuantificaron los EPC-MN que había en 4,000 EPC por ratón; para la evaluación de daño citotóxico se contaron los EPC presentes en 2,000 eritrocitos totales (EPC+ENC).

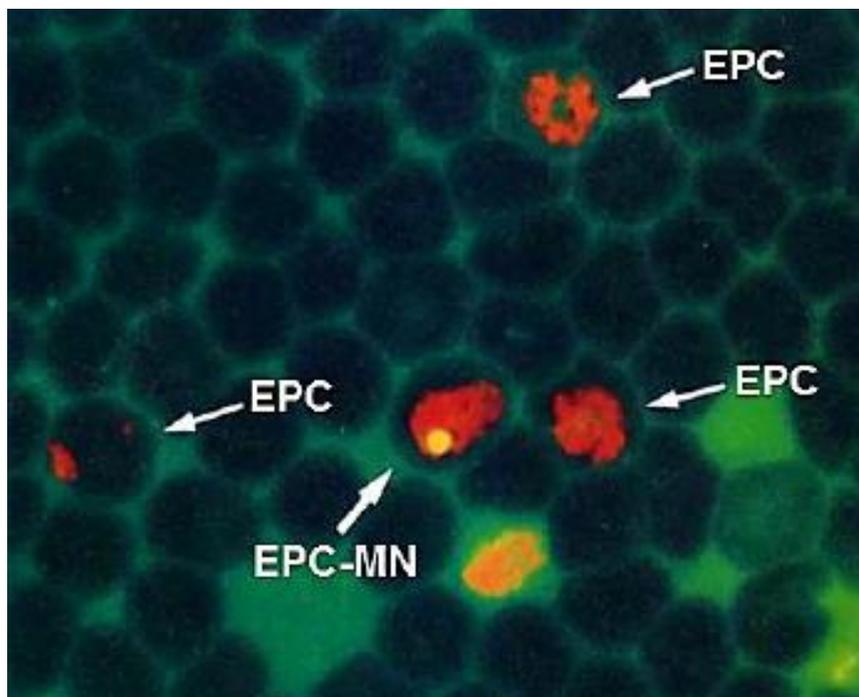


Figura 8. Evaluación de MN en eritrocitos de sangre periférica teñidos con NA. Tomada de Hayashi *et al.* (1990).

5.6 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/BrEt establecida por McGahon *et al.* (1995), con modificaciones de García-Rodríguez *et al.* (2013). Por cada ratón se obtuvo aproximadamente 25 μ L de sangre de la vena caudal, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 5,000 rpm para posteriormente teñir el botón celular con una solución de NA/BrEt (1:1). La evaluación de células se realizó inmediatamente bajo un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS CX31RBSFA) con una luz de excitación azul (480 nm) y un filtro de barrera amarillo (515 nm) (Figura 10). 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 9).

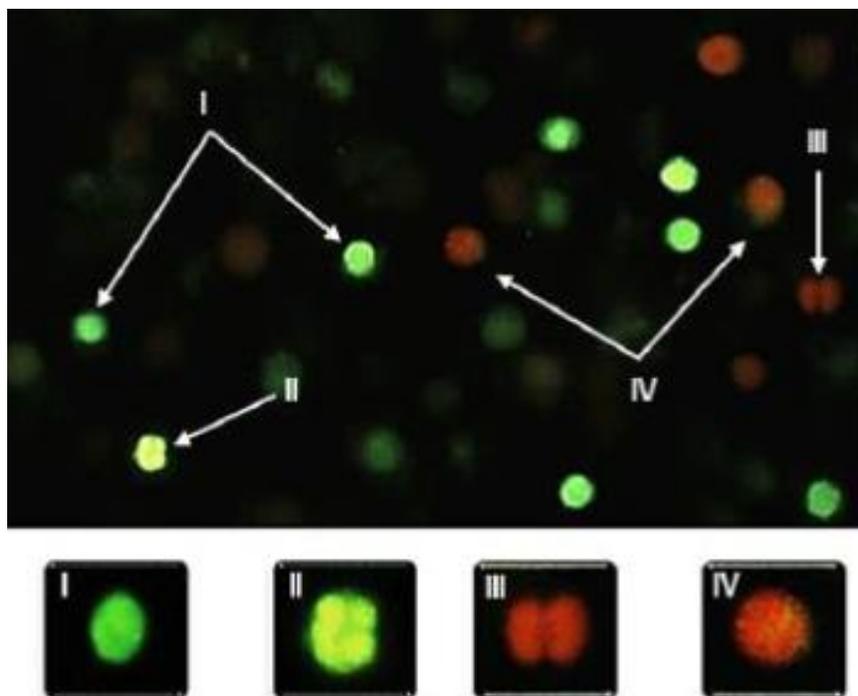


Figura 9. Leucocitos de sangre periférica de ratón teñidas con NA/BrEt. Se observan células viables (sanas y apoptóticas tempranas) y células no viables (apoptóticas tardías y necróticas) (vistas a 400x).
I) células sanas; II) apoptóticas tempranas; III) apoptóticas tardías; IV) necróticas.

Tomada de García-Rodríguez et al. (2016).

5.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de MN y de la relación EPC/ENC 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 y viabilidad celular se les analizó mediante una prueba de chi-cuadrada (χ^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 et al., 2001).

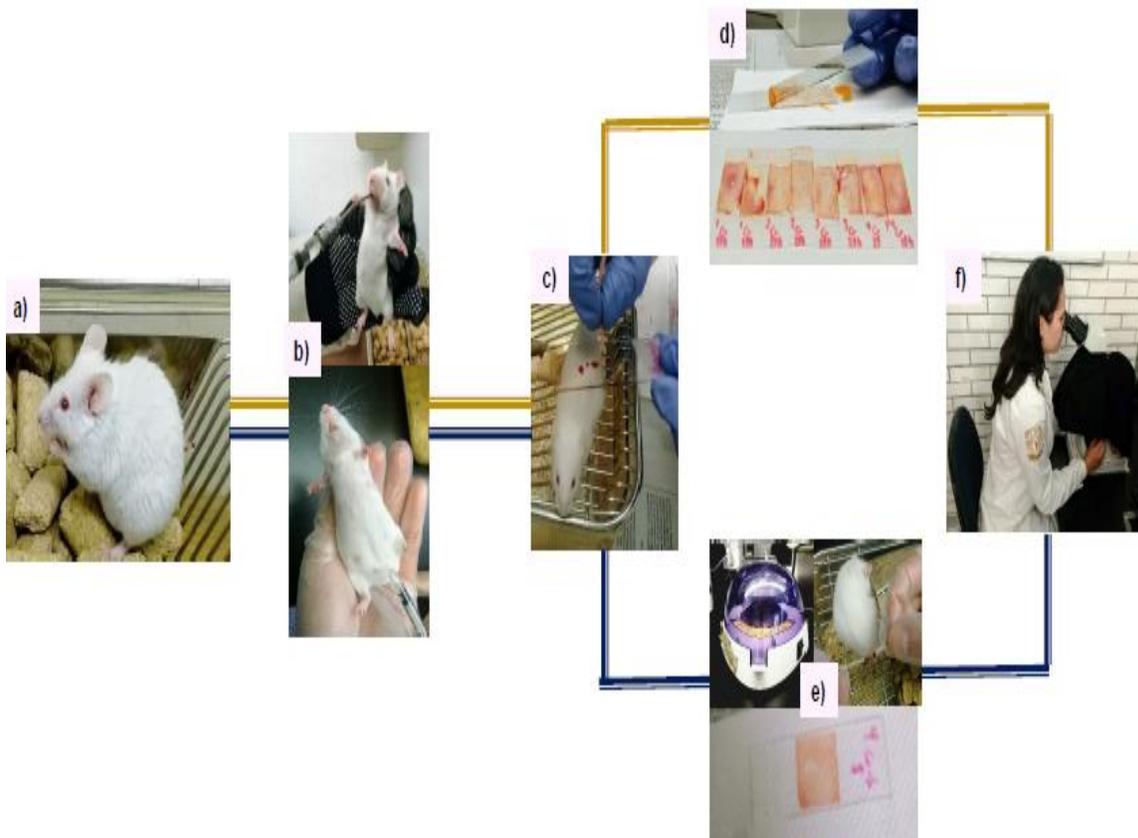


Figura 10. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico: a) ratones Hsd:ICR; b) administración por vía i.g. e i.p.; c) obtención de muestras; d) preparación de laminillas para MN; e) preparación de laminillas para apoptosis y viabilidad celular; f) observación bajo el microscopio de fluorescencia.

VI. RESULTADOS

6.1 Dosis de los ExPS

Se probaron diferentes dosis de los ExPS tanto en hembras como en machos para establecer la que se emplearía en el estudio. En los anexos (1 al 8) se muestran los resultados de MN, apoptosis y viabilidad celular. Se observa que la dosis de 60 mg/Kg incrementó los MN a la hora 48, en comparación con el grupo testigo (Anexo 1 y 5). También se observa que incrementó el porcentaje de células apoptóticas (Anexo 3 y 7, inciso A) con respecto al grupo testigo. Sin embargo, con la dosis de 40 mg/Kg no se incrementaron los MN, por el contrario, se disminuyeron levemente con respecto al grupo testigo (Anexo 2 y 6). En cuanto a la apoptosis se observan ligeras modificaciones que resultaran significativas en comparación con el grupo testigo (Anexo 3 y 7, inciso B). En cuanto a la viabilidad celular no se observaron cambios significativos. Con base en estos resultados se empleó la dosis de 40 mg/Kg.

6.2 Efecto de los ExPS sobre el daño genotóxico

6.2.1 Micronúcleos

♀ En la Tabla 1 se muestran los promedios de los MN evaluados en eritrocitos de sangre periférica de las 0 a las 72 horas en ratones hembra tratados con los ExPS, el CrO₃ y los ExPS-CrO₃. Se observa que la administración sola de los ExPS no incrementó los promedios de MN al compararse con el grupo testigo y con su propia hora 0, por el contrario, los disminuye al compararlo con el grupo testigo. El tratamiento del CrO₃ incrementó significativamente los promedios de MN con su propia hora 0 y a la hora 48 (alrededor de 2 MN) al compararse con el grupo testigo. Cuando se administraron los ExPS previo al tratamiento del CrO₃ se observa una disminución en los promedios de MN en todas las horas evaluadas en comparación con el grupo tratado solo con CrO₃, lo cual fue significativo a la hora 48.

Tabla 1. Promedios de micronúcleos en ratones hembra tratados con los ExPS, el CrO₃ y los ExPS-CrO₃.

Tratamiento	Dosis mg/Kg	hora	N	MN / 1,000 EPC (media ± d.e.)
Testigo	----	0	5	0.4 ± 0.1
		24	5	0.5 ± 0.2
		48	5	0.6 ± 0.2
		72	5	0.6 ± 0.2
ExPS	40	0	5	0.2 ± 0.1
		24	5	0.2 ± 0.1
		48	5	0.4 ± 0.1
		72	5	0.4 ± 0.1
CrO ₃	20	0	5	0.2 ± 0.1
		24	5	0.7 ± 0.2
		48	5	2.1 ± 0.4 ^{a, b, c}
		72	5	0.8 ± 0.2 ^b
ExPS-CrO ₃	40-20	0	5	0.1 ± 0.1
		24	5	0.4 ± 0.1
		48	5	0.8 ± 0.4 ^d
		72	5	0.4 ± 0.2

^a: p < 0.05 vs testigo hora 48; ^b: p < 0.05 vs CrO₃ hora 0; ^c: p < 0.05 vs ExPS-CrO₃ hora 48;

^d: p < 0.05 vs ExPS-CrO₃ hora 0.

Debido a la variabilidad que se observó a la hora 0 en las frecuencias de MN basales de los diferentes tratamientos se realizó el cálculo de la 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 restaron los MN evaluados a la hora 0 a los valores evaluados en las siguientes horas (García-Rodríguez *et al.* 2001). Este cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$NIF = MN_a X_i - MN_a X_0$$

Dónde:

a= grupo

X_i = tiempo de evaluación

X_0 = tiempo 0



En la Figura 11 se muestra el análisis de la NIF por tiempo y por grupo, calculado para 1,000 EPC. La administración de los ExPS y el CrO_3 corrobora lo descrito en el Cuadro 1. Cuando se administraron los ExPS previo a el CrO_3 se presentó una disminución de MN del 63% a la hora 48, al compararlo con el grupo tratado solo con CrO_3 .

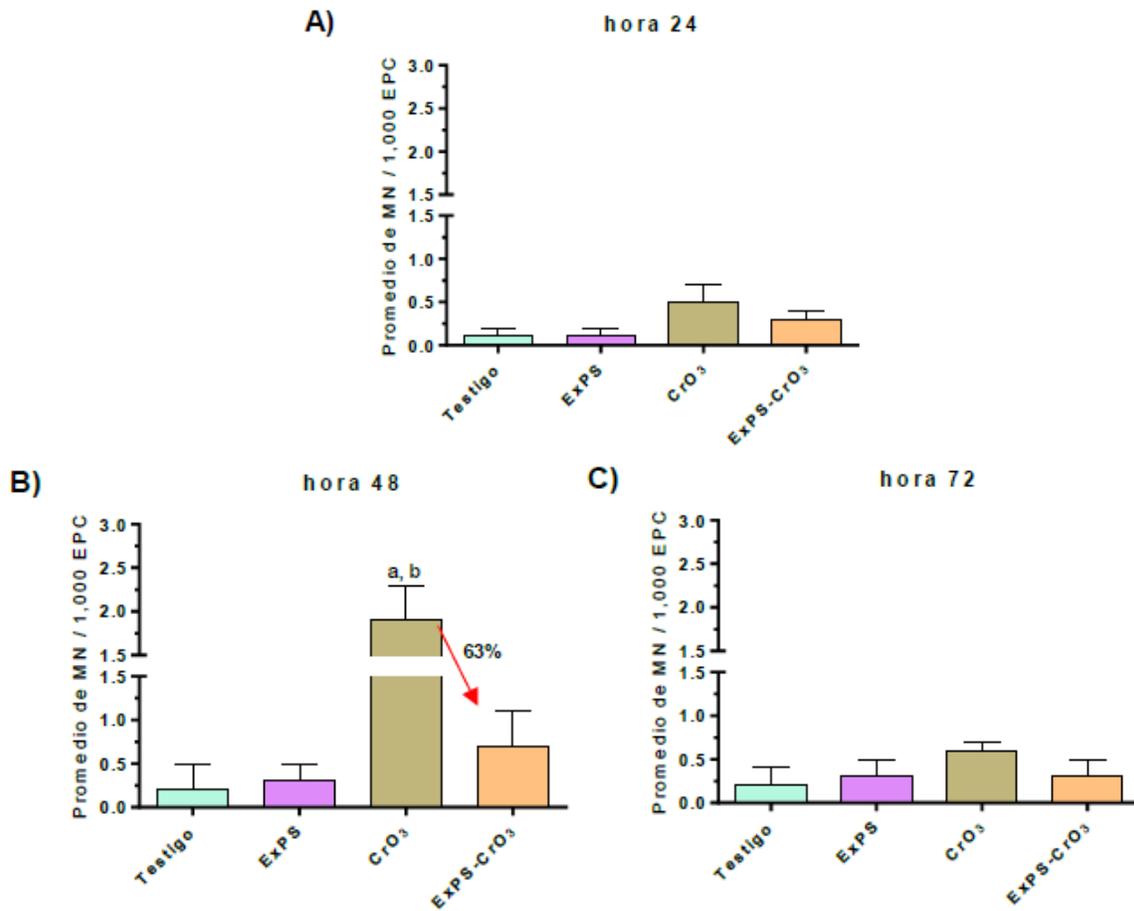


Figura 11. Análisis de NIF calculada por grupo de hembras en los diferentes tiempos evaluados: A) 24, B) 48 y C) 72. ^a: $p < 0.05$ vs testigo; ^b: $p < 0.05$ vs ExPS-CrO₃.

♂ En la Tabla 2 y Figura 12 se muestran los promedios de MN evaluados de las 0 a las 72 horas. La administración de los ExPS y el CrO₃ fue la misma que la observada en el grupo de las hembras. Al administrar los ExPS previo a los tratamientos de CrO₃ se observa una disminución de los MN del 81% en la hora 48 (Figura 12).

Tabla 2. Promedios de MN en ratones macho tratados con los ExPS, el CrO₃ y los ExPS-CrO₃.

Tratamiento	Dosis mg/Kg	hora	N	MN / 1,000 EPC (media ± d.e.)
Testigo	-----	0	5	0.2 ± 0.2
		24	5	0.5 ± 0.2
		48	5	0.6 ± 0.1
		72	5	0.5 ± 0.2
ExPS	40	0	5	0.3 ± 0.2
		24	5	0.5 ± 0.2
		48	5	0.6 ± 0.3
		72	5	0.4 ± 0.2
CrO ₃	20	0	5	0.3 ± 0.2
		24	5	0.6 ± 0.2
		48	5	2.3 ± 0.5 ^{a,b,c}
		72	5	0.8 ± 0.2
ExPS-CrO ₃	40-20	0	5	0.1 ± 0.1
		24	5	0.4 ± 0.1
		48	5	0.5 ± 0.2
		72	5	0.3 ± 0.2

^a: p < 0.05 vs testigo hora 48; ^b: p < 0.05 vs CrO₃ hora 0; ^c: p < 0.05 vs ExPS-CrO₃ hora 48.

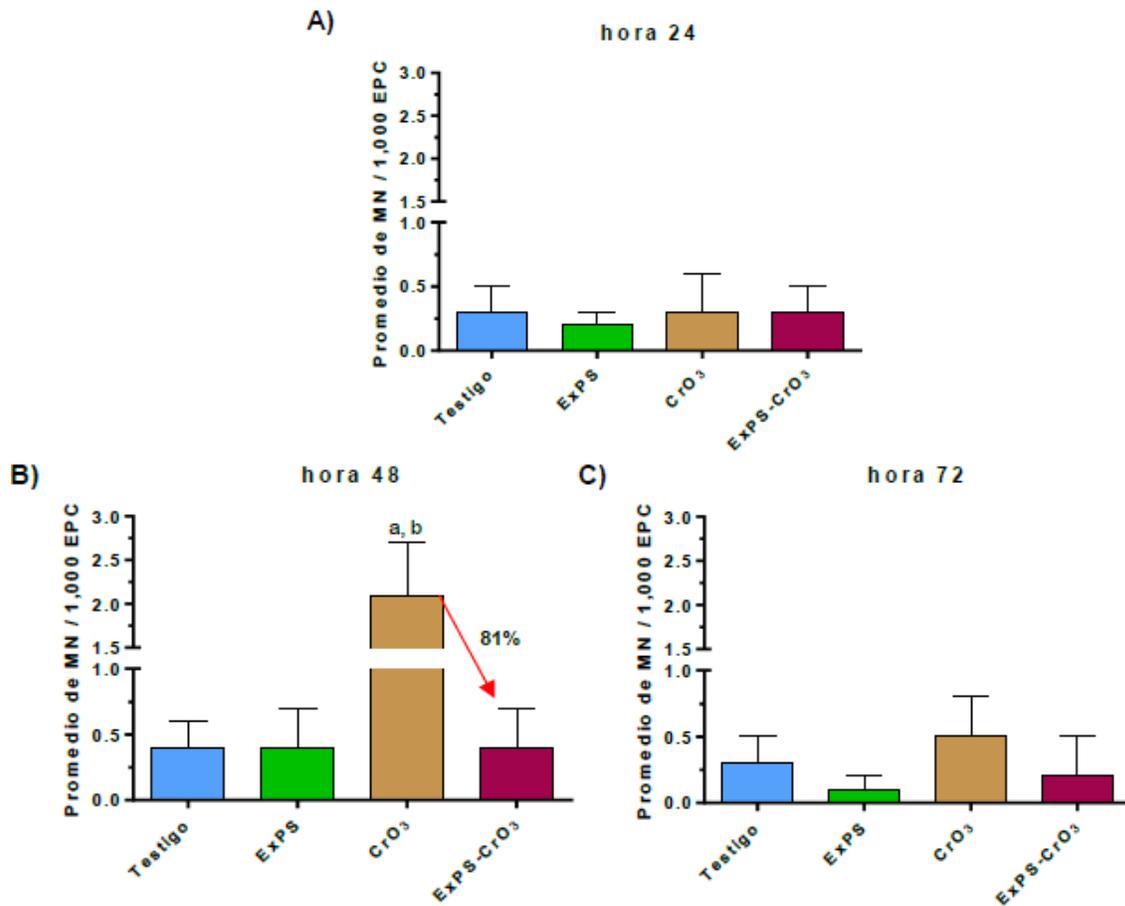


Figura 12. Análisis de NIF calculada por grupo de machos en los diferentes tiempos evaluados: A) 24, B) 48 y C) 72. ^a: $p < 0.05$ vs testigo; ^b: $p < 0.05$ vs ExPS-CrO₃.

Con la finalidad de descartar los MN inducidos por el manejo de los ratones durante el experimento se calculó la Frecuencia Diferencial de Inducción de MN (DIF por sus siglas en inglés). Este análisis consiste en restar los valores de MN observados en todas las horas de evaluación del grupo testigo a sus correspondientes horas de los diferentes tratamientos, con lo cual resultan únicamente los MN inducidos por los tratamientos. Este cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$DIF = MN_a X_i - MN_t X_i$$

Dónde:

- a= grupo
- X_i= tiempo de evaluación
- t= Grupo testigo

♀ En la Figura 13 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN al realizar el análisis del DIF por tiempo y por grupo de hembras calculado en 20,000 EPC. El grupo tratado con los ExPS no modificó los promedios de MN, mientras que el CrO₃ incrementó los promedios de MN de manera significativa en la hora 48 y 72, respecto con su propia hora 0. Sin embargo, cuando se administraron los ExPS previo del CrO₃ se disminuyeron los MN con respecto al grupo tratado solo con CrO₃.

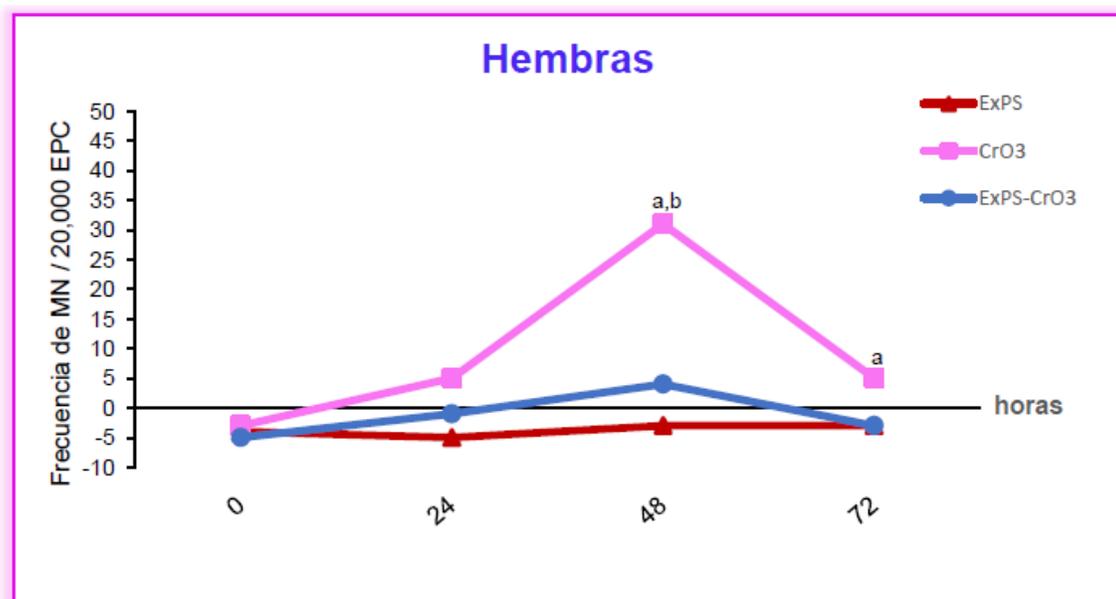


Figura 13. Análisis del DIF de MN calculado por tiempo y por grupo de hembras en 20,000 EPC.
^ap < 0.05 vs CrO₃ hora 0.

♂ En la Figura 14 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN al realizar el análisis del DIF en machos, como se puede observar el manejo de los animales no presenta efectos sobre los MN evaluados, ya que el grupo tratado con los ExPS tiende a disminuir los MN basales, de la misma manera que el grupo tratado con los ExPS previo al tratamiento con CrO₃. Por el contrario, el grupo tratado con CrO₃ incrementó significativamente los MN a partir de la hora 48. El tratamiento de los ExPS, CrO₃ y los ExPS-CrO₃, tienen un comportamiento similar a lo observado en la NIF.

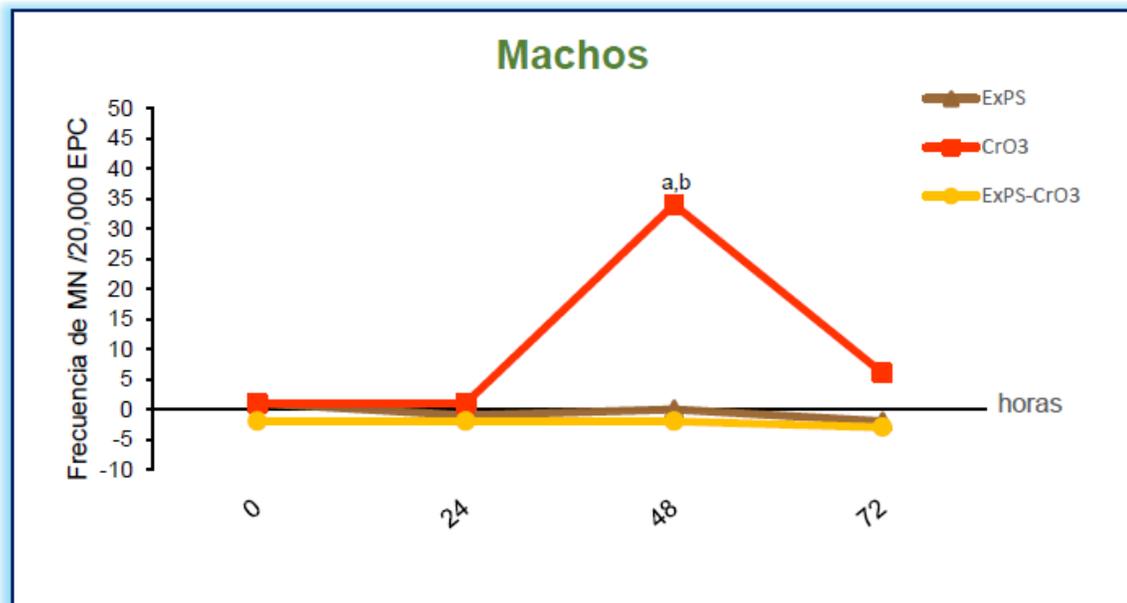


Figura 14. Análisis del DIF de MN calculado por tiempo y por grupo de machos en 20,000 EPC.
^a $p < 0.05$ vs CrO₃ hora 0; ^b $p < 0.05$ vs ExPS-CrO₃ hora 48.

6.2.2 Apoptosis

♀ En las Figuras 15 y 16 se muestran las evaluaciones de apoptosis en hembras cuando se administraron los tratamientos de los ExPS, CrO₃ y los ExPS-CrO₃ evaluados en la hora 48. Se observa que el tratamiento con los ExPS no modifica las células apoptóticas; sin embargo, la administración con el CrO₃ incrementó significativamente los promedios de células apoptóticas con respecto al grupo testigo. No obstante, cuando se administraron los ExPS previo al tratamiento con CrO₃ se disminuyeron las células apoptóticas en comparación con la administración sola con CrO₃. No se observaron modificaciones con ningún tratamiento en el promedio de células necróticas.

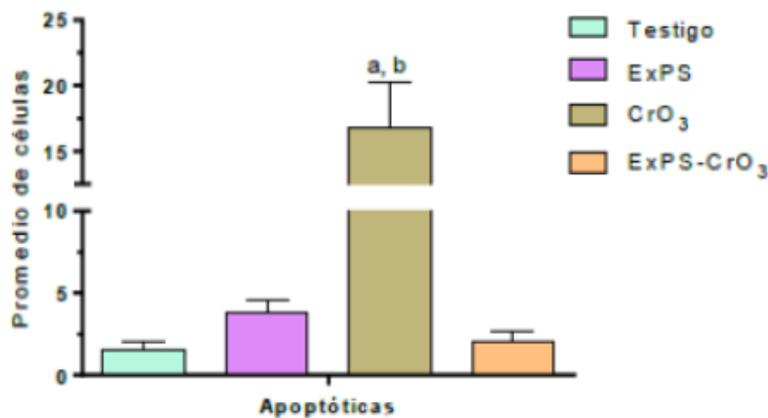


Figura 15. Análisis del promedio de células apoptóticas en hembras tratadas con ExPS, CrO₃ y ExPS-CrO₃. ^a: $p < 0.05$ vs testigo; ^b: $p < 0.05$ vs ExPS-CrO₃.

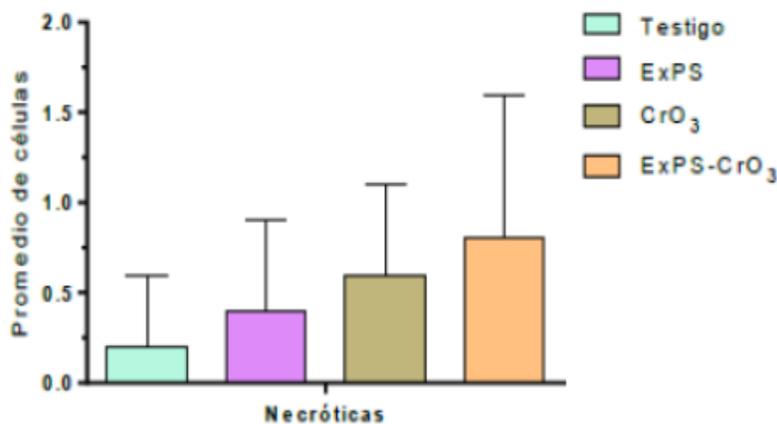


Figura 16. Análisis del promedio de células necróticas en hembras tratadas con los ExPS, CrO₃ y ExPS-CrO₃.

♂ Al realizar el análisis de apoptosis en machos (Figuras 17 y 18). La administración de los tratamientos con los ExPS y el CrO_3 incrementaron las células apoptóticas respecto al testigo; sin embargo, al administrar los ExPS previo al tratamiento con CrO_3 se disminuyeron las células apoptóticas con respecto al tratamiento con CrO_3 . No se observaron modificaciones con ningún tratamiento en el promedio de células necróticas.

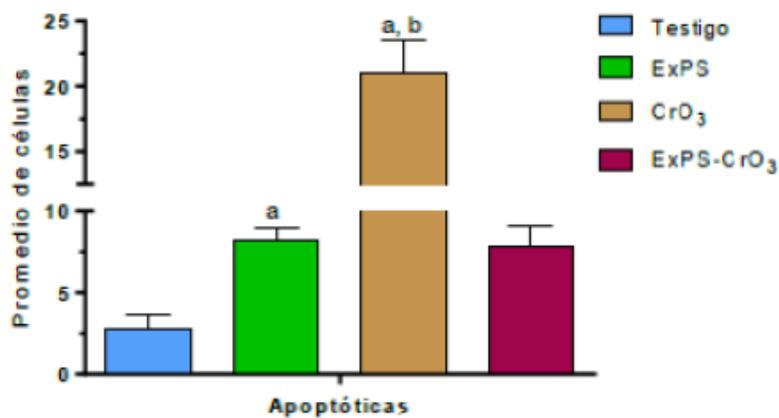


Figura 17. Análisis del promedio de células apoptóticas en machos tratados con ExPS, CrO_3 y ExPS- CrO_3 . ^a: $p < 0.05$ vs testigo; ^b: $p < 0.05$ vs ExPS- CrO_3 .

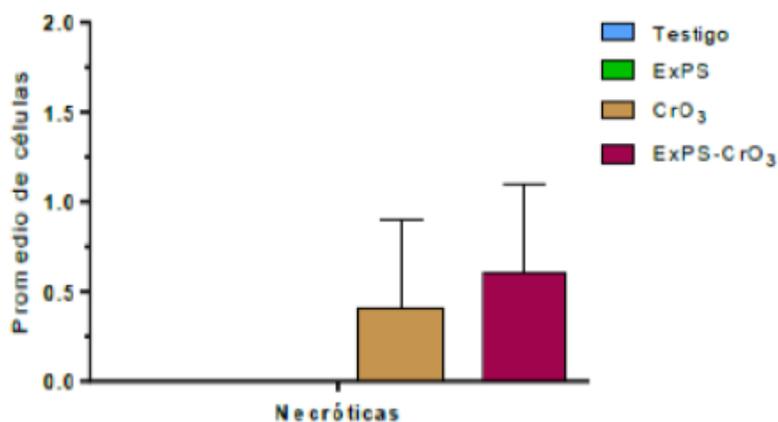


Figura 18. Análisis del promedio de células necróticas en machos tratados con los ExPS, CrO_3 y ExPS- CrO_3 .

6.3 Efecto de los ExPS sobre el daño citotóxico

6.3.1 Relación EPC/ENC

♀ En la Tabla 3 se observa la relación EPC/ENC en 1,000 eritrocitos totales, evaluados de las 0 a las 72 horas en hembras. Se observa que no hay diferencias significativas en ninguno de los tratamientos.

Tabla 3. Promedios de los EPC en ratones hembra tratados con los ExPS, CrO₃ y ExPS-CrO₃.

Tratamiento	Dosis mg/Kg	hora	N	EPC/ENC 1,000 células (media ± d.e.)
Testigo	----	0	5	65.2 ± 7.2
		24	5	61.4 ± 9.8
		48	5	60.5 ± 7.6
		72	5	69.8 ± 12.8
ExPS	40	0	5	52.7 ± 16.9
		24	5	53.2 ± 11.4
		48	5	51.4 ± 11.7
		72	5	65.6 ± 8.0
CrO ₃	20	0	5	65.6 ± 10.6
		24	5	64.2 ± 5.8
		48	5	63.0 ± 12.1
		72	5	61.8 ± 13.2
ExPS-CrO ₃	40-20	0	5	53.1 ± 4.7
		24	5	52.8 ± 5.2
		48	5	53.7 ± 4.5
		72	5	55.5 ± 5.9

♂ La relación EPC/ENC en machos (Tabla 4) se observa que las administraciones con el grupo testigo y con CrO₃ incrementaron los promedios de EPC al compararlos con su propia hora 0. Ninguno de los demás grupos presentó diferencias significativas.

Debido a que la relación EPC/ENC es muy variable para todos los grupos, se realizó la prueba de viabilidad celular empleando la técnica de tinción diferencial de NA/BrEt, modificada por García-Rodríguez *et al.*, 2013.

Tabla 4. Promedios de los EPC en ratones macho tratados con los ExPS, CrO₃ y ExPS-CrO₃.

Tratamiento	Dosis mg/Kg	hora	N	EPC/ENC 1,000 células (media ± d.e.)
Testigo	-----	0	5	53.4 ± 3.7
		24	5	59.6 ± 13.7
		48	5	60.3 ± 15.3
		72	5	73.8 ± 5.0 ^a
ExPS	40	0	5	70.7 ± 8.8
		24	5	83.3 ± 4.1
		48	5	67.0 ± 14.1
		72	5	72.1 ± 15.5
CrO ₃	20	0	5	52.0 ± 1.7
		24	5	55.5 ± 6.1
		48	5	82.6 ± 6.6 ^b
		72	5	71.6 ± 17.4
ExPS-CrO ₃	40-20	0	5	55.9 ± 6.6
		24	5	70.5 ± 14.8
		48	5	67.0 ± 8.7
		72	5	59.4 ± 9.9

^a: p < 0.05 vs testigo hora 0; ^b: p < 0.05 vs CrO₃ hora 0.

6.3.2 Viabilidad celular

♀ En las Figuras 19 y 20 se muestran los promedios de viabilidad celular evaluados en eritrocitos de sangre periférica a las 48 horas en hembras y machos. Aunque hay un ligero incremento de células no viables en los grupos con CrO_3 y ExPS- CrO_3 estos no son estadísticamente significativos.

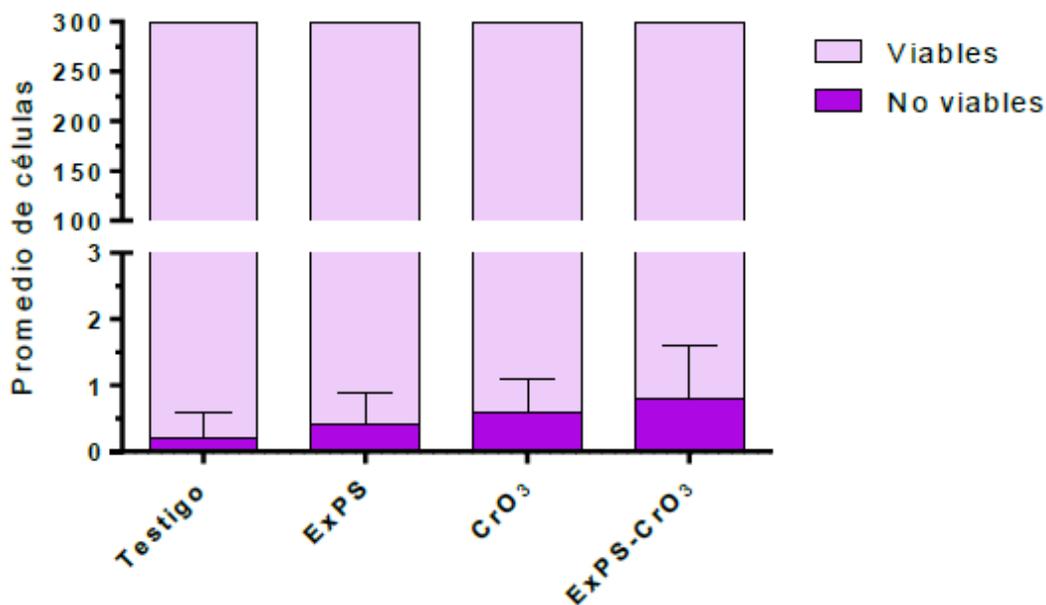


Figura 19. Promedios de células viables y no viables en ratones hembra tratados con ExPS, CrO_3 y ExPS- CrO_3 .

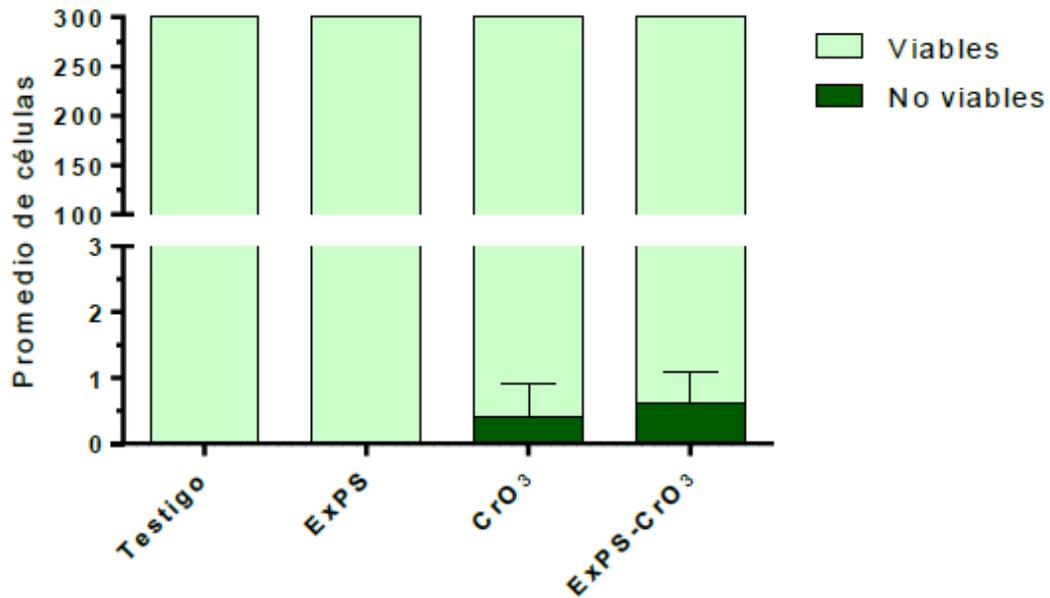


Figura 20. Promedios de células viables y no viables en ratones macho tratados con ExPS, CrO₃ y ExPS-CrO₃.

6.4 Efecto de la genisteína sobre el daño genotóxico

6.4.1 Micronúcleos

♀ En la Tabla 5 se muestran los promedios de MN evaluados de las 0 a las 72 horas en ratones hembra tratados con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃. Se observa que la administración con genisteína no modificó los promedios de MN al compararse con el testigo/aceite. La administración del CrO₃ incrementó significativamente los promedios de MN con su propia hora 0 y a la hora 48 (alrededor de 2 MN) al compararse con el grupo testigo/agua. Cuando se administró la genisteína previo al tratamiento con CrO₃ se muestra una disminución de los promedios de MN en todas las horas evaluadas, siendo total a la hora 72 al compararlo con el grupo tratado solo con CrO₃.

Tabla 5. Promedios de MN en ratones hembra tratados con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃.

Tratamiento	Dosis mg/Kg	hora	N	MN / 1,000 EPC (media ± d.e.)
Testigo/agua	-----	0	5	0.2 ± 0.1
		24	5	0.3 ± 0.3
		48	5	0.3 ± 0.2
		72	5	0.4 ± 0.3
Testigo/aceite	-----	0	5	0.1 ± 0.1
		24	5	0.1 ± 0.1
		48	5	0.2 ± 0.2
		72	5	0.2 ± 0.2
genisteína	40	0	5	0.2 ± 0.2
		24	5	0.5 ± 0.3
		48	5	0.6 ± 0.2
		72	5	0.5 ± 0.2
CrO ₃	20	0	5	0.2 ± 0.1
		24	5	0.6 ± 0.2
		48	5	2.1 ± 0.5 ^{a, b, c}
		72	5	0.6 ± 0.1 ^d
genisteína-CrO ₃	40-20	0	5	0.3 ± 0.2
		24	5	0.3 ± 0.3
		48	5	0.3 ± 0.3
		72	5	0.0 ± 0.0

^a: $p < 0.05$ vs testigo/agua hora 48; ^b: $p < 0.05$ vs CrO₃ hora 0;

^c: $p < 0.05$ vs genisteína-CrO₃ hora 48; ^d: $p < 0.05$ vs genisteína-CrO₃ hora 72.

♀ En la Figura 21 se muestra el análisis de la NIF de los MN calculada para 1,000 EPC. La administración de la genisteína y el CrO₃ corrobora lo descrito en el Cuadro 5. La administración de la genisteína previo del CrO₃ presentó una disminución de MN del 95% a la hora 48, al compararlo con el grupo tratado solo con CrO₃.

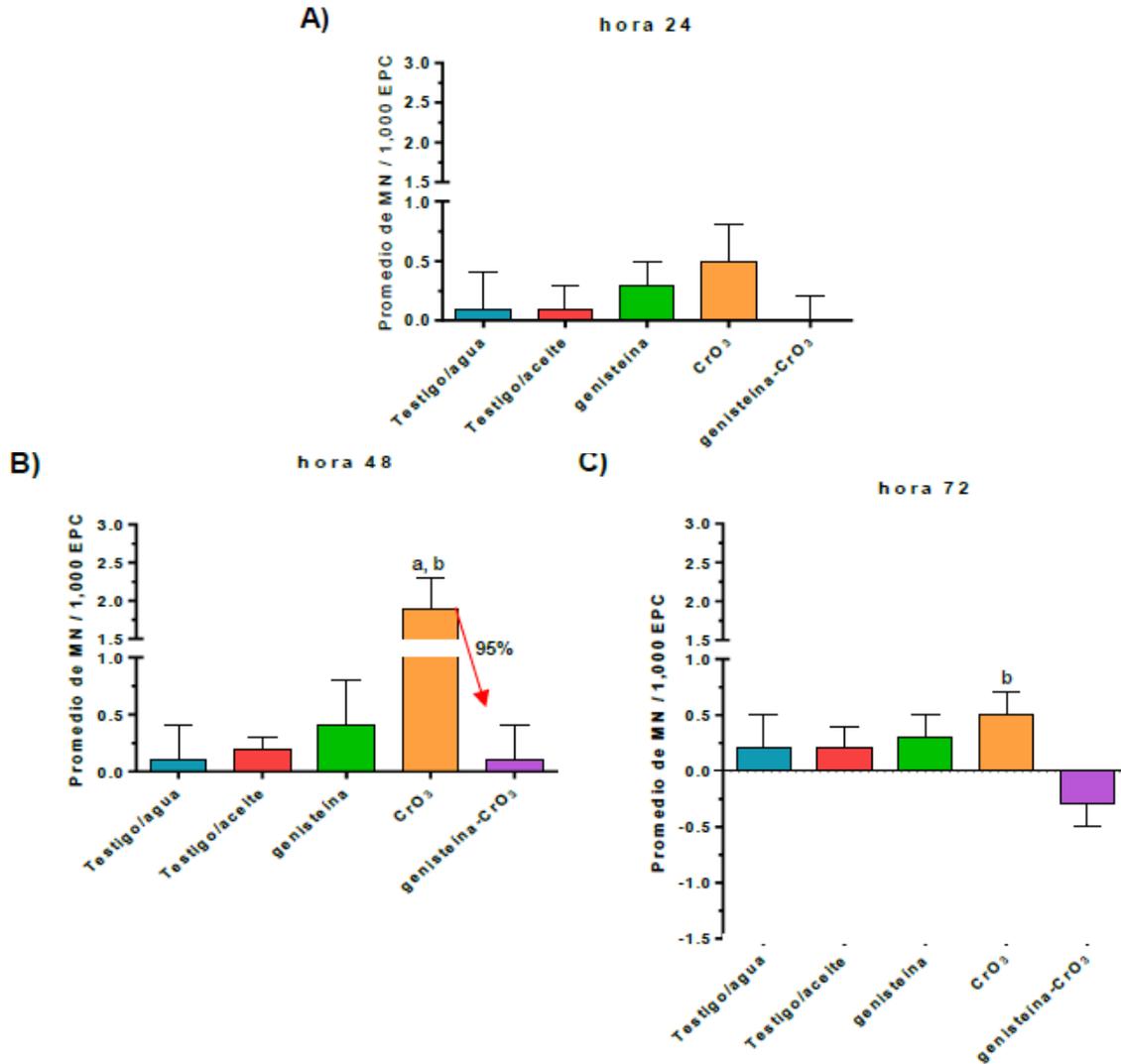


Figura 21. Análisis de NIF calculado por grupo de hembras en los diferentes tiempos evaluados: A) 24, B) 48 y C) 72. .^a: $p < 0.05$ vs testigo/agua; ^b: $p < 0.05$ vs genisteína-CrO₃.

♂ En la Tabla 6 y Figura 22 se muestran los promedios de MN evaluados de las 0 a las 72 horas. El tratamiento con genisteína no modifica los promedios de MN en ninguna de las horas evaluadas al compararlos con el grupo testigo/aceite y con su propia hora 0. En contraparte, el grupo tratado solo con CrO₃ incrementó significativamente el promedio de MN en la hora 24 y 48, al compararse con su propia hora cero y con el grupo testigo/agua (alrededor de 2 MN). Al administrar la genisteína previo al tratamiento del CrO₃ se observó una disminución de MN del 91% a la hora 48.

Tabla 6. Promedios de MN en ratones macho tratados con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃.

Tratamiento	Dosis mg/Kg	hora	N	MN / 1,000 EPC (media ± d.e.)
Testigo/agua	-----	0	5	0.0 ± 0.0
		24	5	0.1 ± 0.1
		48	5	0.3 ± 0.1
		72	5	0.2 ± 0.1
Testigo/aceite	-----	0	5	0.1 ± 0.1
		24	5	0.1 ± 0.1
		48	5	0.2 ± 0.2
		72	5	0.3 ± 0.1
genisteína	40	0	5	0.2 ± 0.1
		24	5	0.2 ± 0.2
		48	5	0.3 ± 0.2
		72	5	0.3 ± 0.2
CrO ₃	20	0	5	0.3 ± 0.2
		24	5	1.3 ± 0.3 ^{a, c, d}
		48	5	2.5 ± 0.3 ^{b, c, e}
		72	5	0.6 ± 0.1
genisteína-CrO ₃	40-20	0	5	0.2 ± 0.2
		24	5	0.3 ± 0.3
		48	5	0.4 ± 0.3
		72	5	0.3 ± 0.2

^a: $p < 0.05$ vs testigo/agua hora 24; ^b: $p < 0.05$ vs testigo/agua hora 48;

^c: $p < 0.05$ vs CrO₃ hora 0; ^d: $p < 0.05$ vs genisteína-CrO₃ hora 24;

^e: $p < 0.05$ vs genisteína-CrO₃ hora 48.

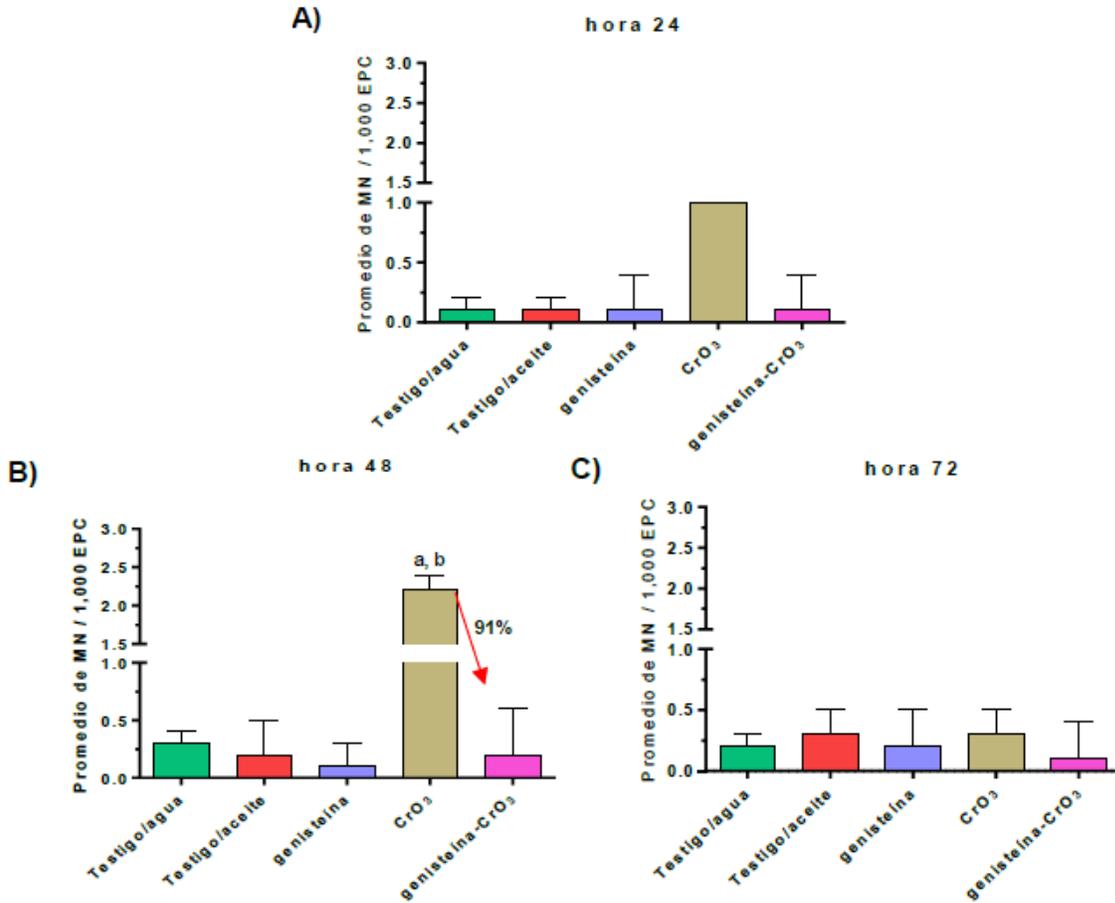


Figura 22. Análisis de NIF calculada por grupo de machos en los diferentes tiempos evaluados: A) 24, B) 48 y C) 72. ^a: $p < 0.05$ vs testigo/agua; ^b: $p < 0.05$ vs genisteína-CrO₃.

Con la finalidad de descartar los MN inducidos por el manejo de los ratones durante el experimento se calculó el DIF en hembras y machos tratados con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃.

♀ En la Figura 23 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN al realizar el análisis del DIF calculado en 20,000 EPC en hembras. El tratamiento con genisteína no modifica las frecuencias de MN mientras que el CrO₃ incrementa los MN de manera significativa en la hora 48 contra su propia hora 0. Cuando se administró la genisteína previo al CrO₃ se observa una disminución en las

frecuencias de MN con respecto al grupo de tratado solo con CrO_3 , siendo mayor y significativa en la hora 48.

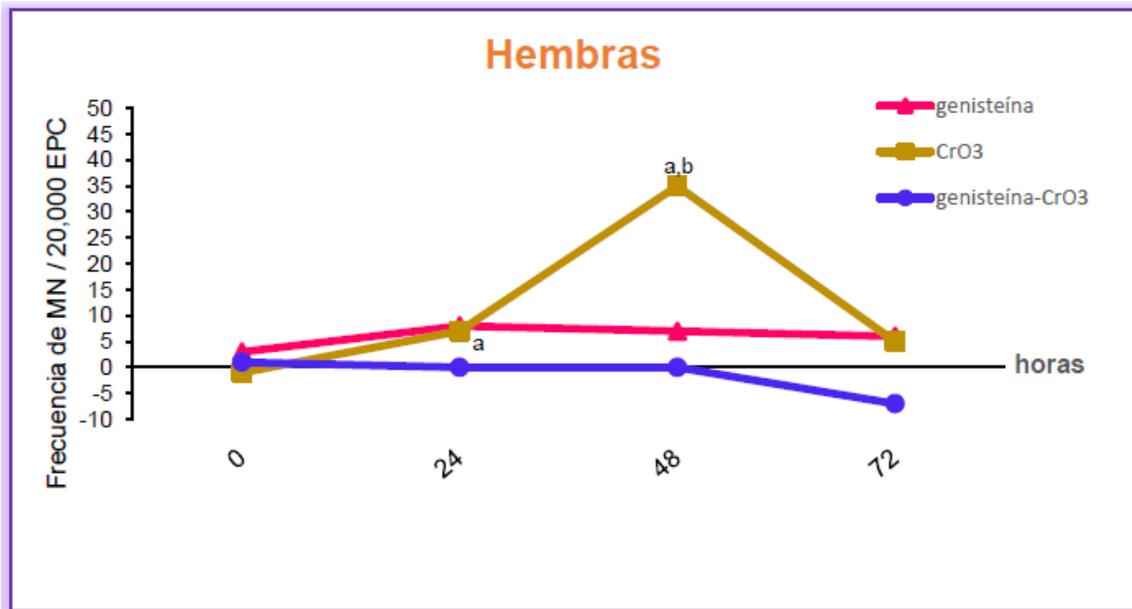


Figura 23. Análisis del DIF de MN calculado por tiempo y por grupo de hembras en 20,000 EPC.
^a: $p < 0.05$ vs CrO_3 hora 0; ^b: $p < 0.05$ vs genisteína- CrO_3 hora 48.

♂ El análisis del DIF en machos (Figura 24), en el grupo de genisteína se observa el mismo comportamiento que en las hembras; sin embargo, en la administración con el CrO_3 se incrementaron los MN en la hora 24 y 48 con respecto a su propia hora 0; no obstante, cuando se administró la genisteína previo del CrO_3 se disminuyeron significativamente las frecuencias de MN a las 24 y 48 horas.

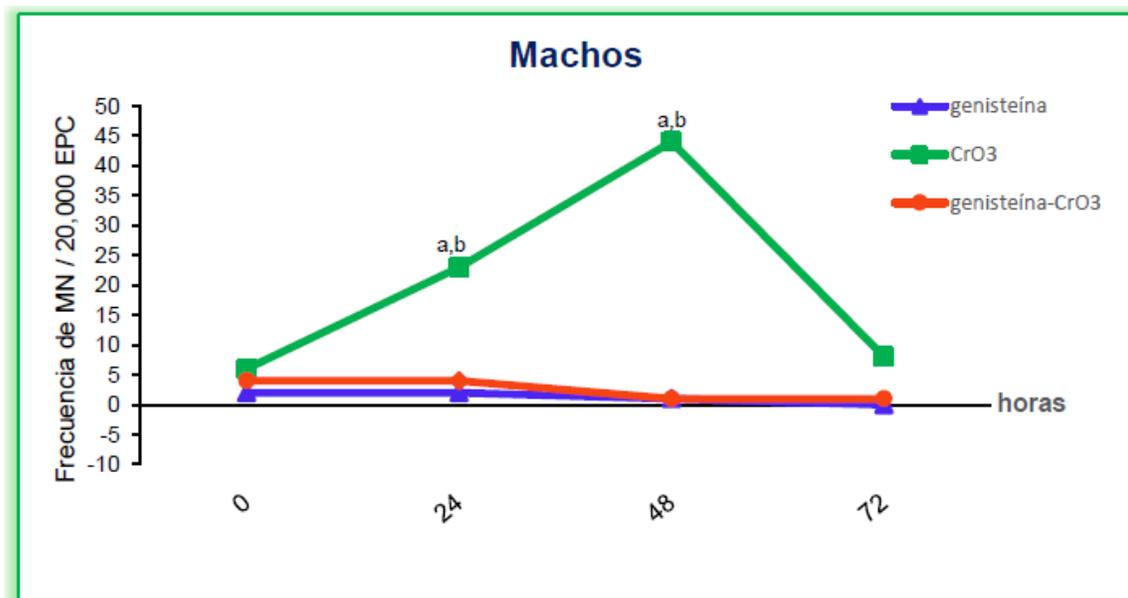


Figura 24. Análisis del DIF de MN calculado por tiempo y por grupo de machos en 20,000 EPC.

^a: $p < 0.05$ vs CrO₃ hora 0; ^b: $p < 0.05$ vs genisteína-CrO₃ hora 24;

^c: $p < 0.05$ vs genisteína-CrO₃ hora 48.

6.4.2 Apoptosis

♀ En las Figuras 25 y 26 se muestran los resultados obtenidos al realizar el análisis de apoptosis en hembras cuando se administraron los tratamientos de genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃ evaluados en la hora 48. El grupo tratado solo con genisteína no modificó el promedio de células apoptóticas; mientras que, la administración con el CrO₃ incrementó significativamente el promedio de células apoptóticas al compararlo con el grupo testigo/agua; sin embargo, cuando se administró la genisteína previo al tratamiento con CrO₃ se disminuyeron las células apoptóticas en comparación con la administración sola con CrO₃. No se observaron modificaciones con ningún tratamiento en el promedio de células necróticas.

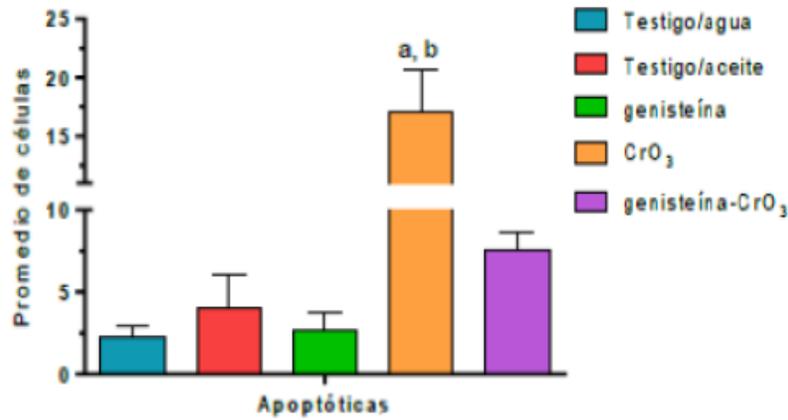


Figura 25. Análisis de los promedios de células apoptóticas en hembras tratadas con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃. ^a: $p < 0.05$ vs testigo/agua; ^b: $p < 0.05$ vs genisteína-CrO₃.

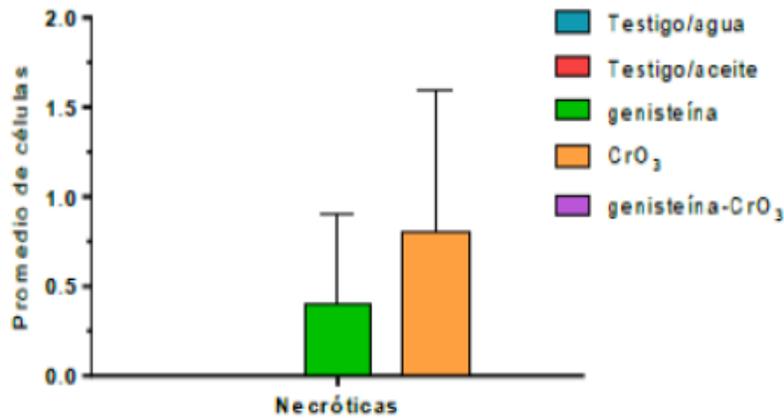


Figura 26. Análisis de los promedios de células necróticas en hembras tratadas con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃.

♂ En la evaluación de apoptosis en machos (Figuras 27 y 28). De manera contraria a las hembras, la genisteína modificó el promedio de células apoptóticas al compararlo con su grupo testigo/aceite. La administración con CrO₃ incrementó el promedio de células apoptóticas; sin embargo, con la administración de la genisteína previo al tratamiento con CrO₃ se disminuyeron las células apoptóticas en comparación con el tratamiento con CrO₃. No se observaron modificaciones con ningún tratamiento en el promedio de células necróticas.

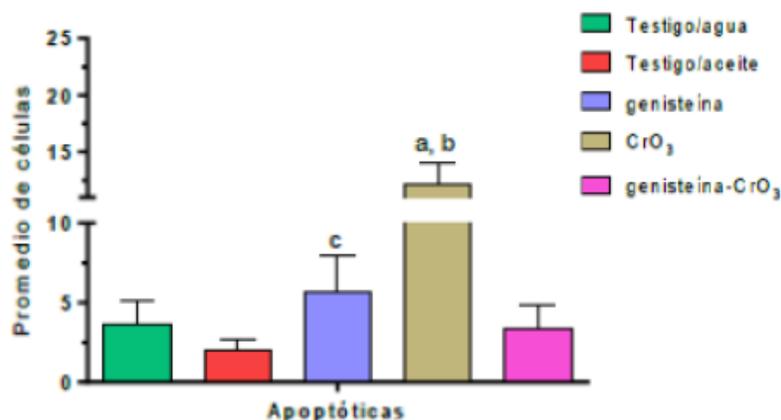


Figura 27. Análisis de los promedios de células apoptóticas en machos tratados con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃.

^a: $p < 0.05$ vs testigo/agua; ^b: $p < 0.05$ vs genisteína-CrO₃; ^c: $p < 0.05$ vs testigo/aceite.

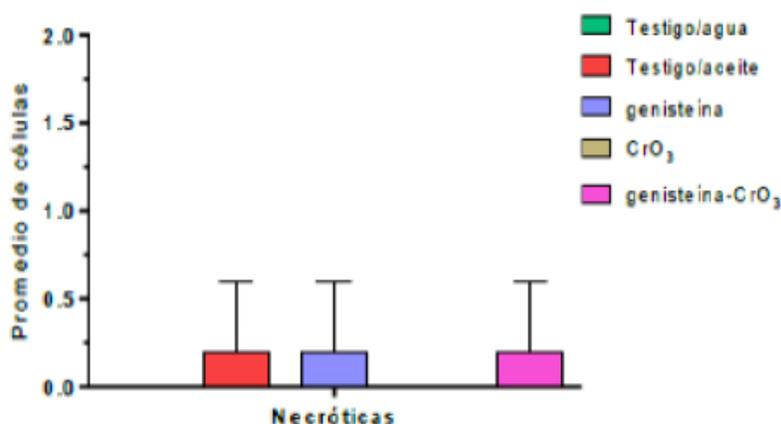


Figura 28. Análisis de los promedios de células necróticas en machos tratados con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃.

6.5 Efecto de la genisteína sobre el daño citotóxico

6.5.1 Relación EPC/ENC

♀ En la Tabla 7 se observa la relación EPC/ENC en 1,000 eritrocitos totales, evaluados de las 0 a las 72 horas en los grupos de hembras. El único tratamiento que disminuye significativamente el promedio de EPC es el CrO₃ al compararlo con su propia hora 0 y con el grupo testigo/agua en todas las horas evaluadas.

Tabla 7. Promedios de MN en ratones hembra tratados con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃.

Tratamiento	Dosis mg/Kg	hora	N	EPC/ENC 1,000 células (media ± d.e.)
Testigo/agua	-----	0	5	83.8 ± 10.8
		24	5	82.8 ± 15.6
		48	5	82.5 ± 12.0
		72	5	78.0 ± 18.2
Testigo/aceite	-----	0	5	57.6 ± 4.6
		24	5	60.2 ± 14.8
		48	5	65.3 ± 19.0
		72	5	54.7 ± 6.8
genisteína	40	0	5	58.2 ± 12.9
		24	5	60.7 ± 12.0
		48	5	73.9 ± 9.9
		72	5	78.3 ± 9.8
CrO ₃	20	0	5	29.1 ± 6.1
		24	5	52.3 ± 5.5 ^a
		48	5	56.3 ± 10.9 ^c
		72	5	50.0 ± 5.7 ^b
genisteína-CrO ₃	40-20	0	5	70.9 ± 12.3
		24	5	59.0 ± 7.3
		48	5	66.6 ± 11.6
		72	5	48.5 ± 9.6

^a: $p < 0.05$ vs testigo/agua hora 24; ^b: $p < 0.05$ vs testigo/agua hora 72;

^c: $p < 0.05$ vs CrO₃ hora 0.



La relación EPC/ENC en machos (Tabla 8), no se observaron modificaciones con ningún tratamiento en la relación EPC/ENC; sin embargo, estos datos se deben de tomar con reserva debido a la variabilidad de los datos. Para corroborar un posible efecto citotóxico se realizaron evaluaciones de viabilidad celular.

Tabla 8. Promedios de MN en ratones macho tratados con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃.

Tratamiento	Dosis mg/Kg	hora	N	EPC/ENC 1,000 células (media ± d.e.)
Testigo/agua	-----	0	5	49.7 ± 4.7
		24	5	53.4 ± 4.9
		48	5	59.2 ± 4.9
		72	5	57.4 ± 8.7
Testigo/aceite	-----	0	5	65.5 ± 7.9
		24	5	65.0 ± 9.8
		48	5	65.1 ± 18.7
		72	5	74.4 ± 10.1
genisteína	40	0	5	65.0 ± 16.7
		24	5	72.8 ± 16.8
		48	5	91.9 ± 3.8
		72	5	74.5 ± 16.5
CrO ₃	20	0	5	65.8 ± 14.0
		24	5	51.9 ± 4.6
		48	5	67.6 ± 17.4
		72	5	78.9 ± 10.7
genisteína-CrO ₃	40-20	0	5	69.8 ± 22.0
		24	5	60.4 ± 9.3
		48	5	66.2 ± 26.1
		72	5	65.7 ± 16.3

6.5.2 Viabilidad celular

♀ En las Figuras 29 y 30 se observan los promedios de viabilidad celular evaluados en células nucleadas de sangre periférica a las 48 horas en ratones hembras y machos. Aunque hay un ligero incremento de células no viables en los grupos con genisteína y CrO₃ en hembras y en el testigo/aceite, genisteína y genisteína-CrO₃ en machos estos no son estadísticamente significativos.

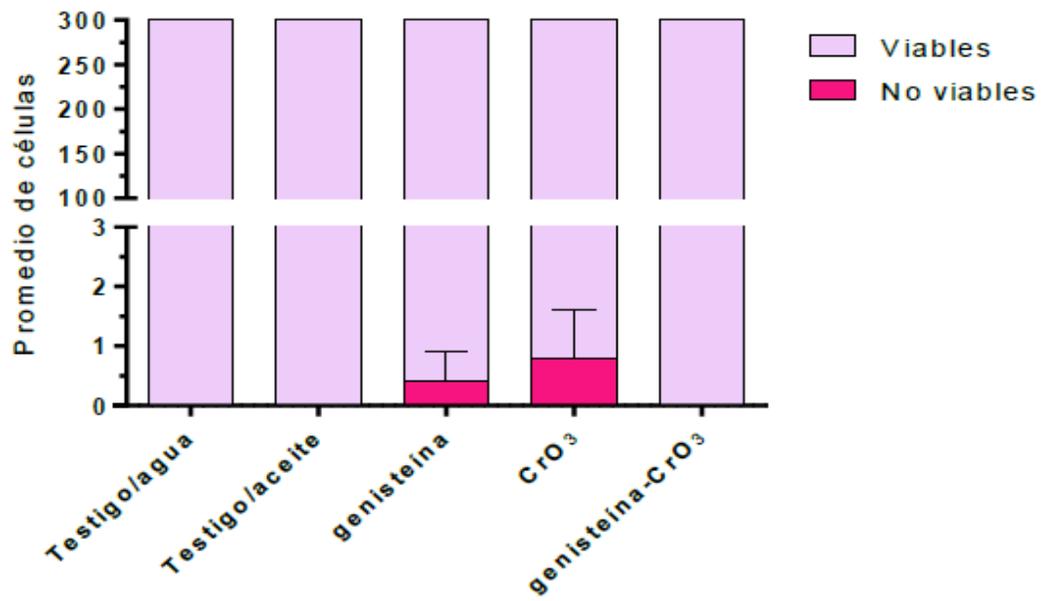


Figura 29. Promedios de células viables y no viables en ratones hembra tratadas con con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃

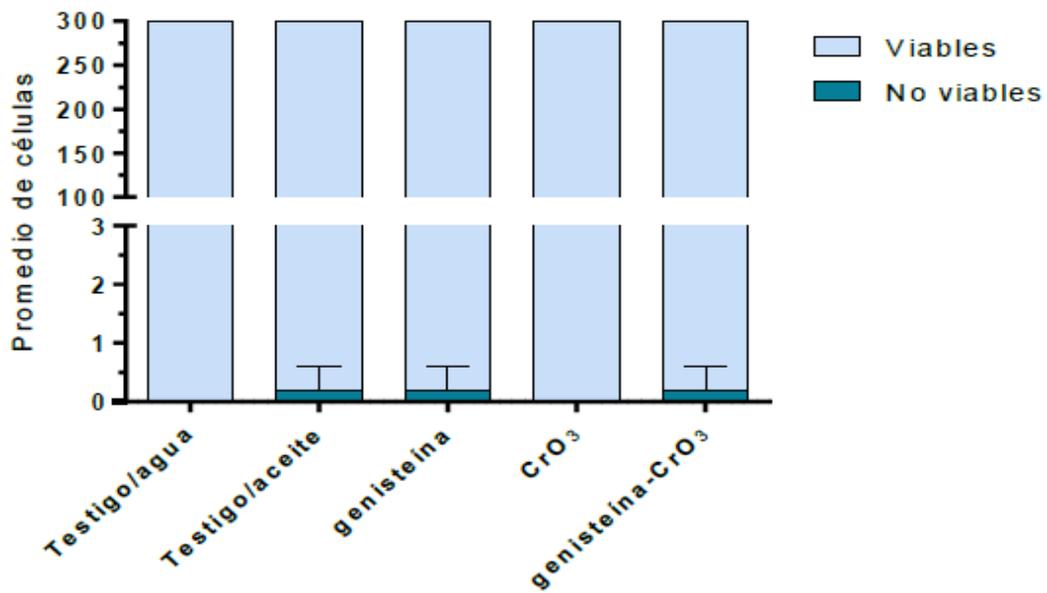


Figura 30. Promedios de células viables y no viables en ratones macho tratados con con genisteína, CrO₃ y genisteína-CrO₃.

VII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto de la genisteína y de los ExPS sobre el daño genotóxico y citotóxico inducidos por CrO₃ en sangre periférica de ratones Hsd:ICR. Se observó que la administración de 40 mg/Kg por vía i.g., de los ExPS en hembras y machos no indujo daño genotóxico, ya que no se incrementaron los promedios de MN; no obstante, Toden *et al.*, (2007), observó que en ratas macho, la ingesta de 15 ó 25 mg/Kg de proteína de soya durante 4 semanas incrementa el daño al ADN en células del colon mediante el ensayo cometa, espesor del moco colónico y los contenidos fecales se analizaron utilizando cromatografía de gases. Los ExPS no modifican la relación EPC/ENC; Si bien la OECD (1997) indica que al realizar la prueba de MN se determine también la frecuencia de EPC/ENC, este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (Krishna *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 2000). De ahí que se evaluó la viabilidad celular, sin embargo, la administración de los ExPS tampoco la modifican, lo que sugiere que los ExPS no inducen daño citotóxico. Sin embargo, los estudios son escasos en cuanto a los efectos de la proteína de soya sobre el daño genotóxico y citotóxico.

Cuando se administró 15 mg/Kg de genisteína (principal isoflavona de soya) por vía i.g., no se incrementaron los promedios de MN en hembras ni en machos. Record *et al.*, (1995) observaron que la administración *in vivo* de 20 mg/Kg de genisteína durante 5 días por vía oral en ratones hembras de la cepa C57BL/6J, no induce MN, además, las concentraciones plasmáticas fueron mucho mayores (9200 nM) que la más alta reportada para humanos que consumen habitualmente alimentos a base de soya, que fue de 276 nM (Adlercreutz *et al.*, 1993). En otros estudios *in vivo* se mostró que la genisteína por vía oral con dosis de 10, 50 ó 100 mg/Kg administrada diariamente durante una semana disminuye la disfunción cognitiva inducida por lipopolisacáridos (LPS) y aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes como el GSH, CAT y SOD (Marahmadi *et al.*, 2018).; sin

embargo, los efectos de la genisteína son dependientes de la dosis, ya que a pesar de no presentar efectos genotóxicos en algunos estudios se ha observado que la genisteína en dosis mayores presenta daño al ADN. Virgilio *et al.*, (2004) observaron que la concentración de 25 μM la genisteína es genotóxica debido a que aumenta la frecuencia de MN (3 veces más que el grupo control) y a 250 μM actúa como un compuesto clastogénico ya que induce fragmentos de cromosomas, observaron que 50 μM de genisteína no protege contra el daño genotóxico inducido por el H_2O_2 mediante el ensayo cometa, tampoco la genisteína presentó capacidad antioxidante. Investigaciones *in vitro* e *in vivo* reportadas para genisteína en cuanto a la genotoxicidad y la carcinogenicidad humana es limitado y parece insignificante (Munro *et al.*, 2003).

Cuando se analizó el efecto de la genisteína sobre la apoptosis, únicamente los machos incrementaron las células apoptóticas. En estudios donde utilizaron líneas celulares de cáncer de pulmón (A549) y de cáncer de cuello uterino (HeLa), fueron tratadas con 0, 15, 30 y 60 μM durante 24 horas, estudiaron el mecanismo del efecto proapoptótico de la genisteína mediante la interacción de APE1-p53 y observaron que la genisteína induce apoptosis al incrementar los niveles de p53 a nivel intracelular (Zhu *et al.*, 2005). En estudios realizados por Yoon *et al.*, (2000) demostraron que 50 μM de genisteína, durante 24 horas, induce apoptosis en células RPE-J mediante la reducción del potencial de membrana mitocondrial, liberación del citocromo c al citosol, ya que se abre el PTP (poro de transición de permeabilidad mitocondrial), suprime la fragmentación del ADN, activación de la caspasa-3 y condensación nuclear. Das *et al.*, (2006), reportaron que en la línea celular SH-SY5Y en células humanas de neuroblastoma maligno (tipo N) con 100 μM de genisteína, durante 24 horas, induce apoptosis mediante la liberación mitocondrial del citocromo c y la activación de la caspasa 3 y 9. Ramos (2007) indicó que las concentraciones en donde la genisteína induce apoptosis son entre 30 y 200 $\mu\text{M/L}$ en diferentes líneas de cáncer de mama (Li *et al.*, 1999; Xu y Loo, 2001).

En contra parte, se corrobora el daño genotóxico reportado para los compuestos de Cr(VI) y particularmente para el CrO₃, ya que incrementan los promedios de MN en todas las horas evaluadas (O'Brien *et al.*, 2003; Henkler *et al.*, 2010; García-Rodríguez *et al.*, 2001). Sin embargo, se observó que el mayor efecto sobre la inducción de MN se presentó en la hora 48, esto se puede atribuir a que la mayor distribución y biotransformación de este metal se presenta a esta hora después de su administración (Heddle *et al.*, 1983; Hayashi *et al.*, 1990). El mecanismo de daño genotóxico de los compuestos de Cr(VI), se ha planteado con base en que éstos tienen la capacidad de ingresar a la célula mediante canales transportadores de aniones. Dentro de la célula, el Cr(VI) es reducido por reductantes celulares como GSH, Asc y Cys, a Cr(V), Cr(IV) y Cr(III); estos intermediarios son altamente reactivos y participan en la producción de ERO y RL, además de interactuar directamente con las bases nitrogenadas y fosfatos del ADN, ocasionando así un significativo daño oxidante al ADN como modificación de bases, rupturas, entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas, formación de aductos, cambios oxidantes de nucleótidos, MN y AC (Shi *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 1999; Ding y Shi 2002; Wang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). La administración con CrO₃ incrementó las células apoptóticas en hembras y en machos. En estudios previos se observó que la administración con CrO₃ incrementa las células apoptóticas *in vivo* (García-Rodríguez *et al.*, 2013) e *in vitro* (Hayashi *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2015). La apoptosis se relaciona con el daño al ADN, la alteración de los estados oxidativos intracelulares tiene el potencial para desencadenar o sensibilizar una célula a la apoptosis. Por lo que las ERO generadas a partir del Cr(VI) durante su reducción, puede jugar un papel importante en la vía de señalización de apoptosis (Hayashi *et al.*, 2004; García-Rodríguez *et al.*, 2013). No se observan efectos citotóxicos con el CrO₃, ya que no se modificó la relación de EPC/ENC y la viabilidad celular; sin embargo, Xiao *et al.*, (2013) observaron que el Cr(VI) disminuye la viabilidad con base a dosis-respuesta en linfocitos de sangre periférica de ratas macho con concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 400 µM mediante el ensayo MTT; además, mostraron que el Cr(VI) induce daño

mitocondrial tomando como biomarcadores a los enlaces cruzados ADN-proteína y p53 ya que estos se expresan en el desarrollo de cánceres inducidos por Cr (VI). Únicamente se observa daño citotóxico inducido por el CrO₃ en hembras del grupo de la genisteína ya que se disminuye la relación EPC con respecto a los ENC. Esto concuerda con los estudios de Rudolf y Cervinka (2006) donde observaron que el Cr(VI) induce daño citotóxico en fibroblastos primarios de la piel y Patlolla *et al.*, (2009) y lo demostraron en células de carcinoma de hígado (HepG2).

El tratamiento con los ExPS previo del CrO₃ se muestra una protección 18% mayor en machos que en hembras ya que se disminuyen los promedios de MN. En estudios *in vitro* se ha mostrado que una dieta a base de proteína de soya incrementa la apoptosis en células epiteliales de mama, este incremento fue acompañado por el aumento en la expresión del gen supresor tumoral *PTEN*, además de que se observó una pérdida o reducción de la expresión del gen *PTEN* que está asociado con cáncer de útero, próstata, pulmón, mama y ovario (Li *et al.*, 1997; Perren *et al.*, 1999; Kurose *et al.*, 2002; Dave *et al.*, 2005). Cuando se evaluó la citotoxicidad los ExPS previo al tratamiento con CrO₃ en hembras y machos no modificaron la relación EPC/ENC ni la viabilidad celular; por lo tanto, los ExPS previo al CrO₃ no presenta efectos citotóxicos.

La genisteína protege contra el daño genotóxico del CrO₃ debido a que se disminuyen los promedios de MN. Pugalendhi *et al.*, (2009) administraron 20 mg/Kg de genisteína por vía oral durante 5 días a ratas hembras Wistar y demostraron el potente efecto antígenotóxico de la genisteína contra la genotoxicidad inducida por el carcinógeno 7,12-dimetilbenceno[a]antraceno (DMBA), el cual se ha descrito que causa daño oxidativo al ADN, proteínas y lípidos (Ray y Husain, 2002), induce genotoxicidad en médula ósea de ratas (Chidambaram y Baradarajan, 1996), también Pugalendhi *et al.*, (2009) mostraron que la genisteína disminuye las frecuencias de MN, las anomalías cromosómicas, suprime la producción de ERO generadas durante la activación metabólica de DMBA y aumenta el mecanismo de defensa antioxidante contra DMBA. En estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de isoflavonas de soya

se asocia con menor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Valladares *et al.*, 2012). Steiner *et al.*, (2007) utilizaron líneas celulares de mama MCF-10A (no neoplásicas) y MCF-7 (neoplásicas) donde observaron que la genisteína en MCF-10A bloquea la expresión de cáncer de mama a través de Glutathion S-Transferasa (GST); además, reduce las lesiones genotóxicas de carcinógenos 4-HNE y BPDE. Fahad *et al.*, (2015) observaron que dosis de 25, 50 ó 100 mg/mL de genisteína *ad libitum* durante 21 días en ratas macho albinas suizas protege contra la hepatotoxicidad inducida por N-nitrosodimetilamina (NDEA), debido a que disminuyó la actividad enzimática de glutámico transaminasa oxaloacética (SGOT), transaminasa glutámico pirúvica sérica (SGPT), fosfatasa alcalina (ALP) y lactato deshidrogenasa (LDH) en suero sanguíneo, estas enzimas funcionan como marcador de daño hepático. Se ha sugerido que NDEA causa estrés oxidativo generando ERO (Bansal *et al.*, 2000); por lo tanto, al administrar la genisteína previo a NDEA se observa una disminución en la peroxidación lipídica y el contenido de proteína carbonilo, lo que confirma el efecto antioxidante de la genisteína (Patel *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). Además, en este mismo estudio los resultados de ensayo cometa en hepatocitos mostró la disminución de la longitud de la cola en los cometas y en secciones histológicas de hígado con lo cual se demostró el efecto protector de la genisteína (Fahad *et al.*, 2015).

Sin embargo, cuando se administra la genisteína previo del CrO₃ se disminuyen las células apoptóticas al compararse con el grupo tratado con CrO₃ en hembras y machos. Estudios en linfocitos humanos de sangre periférica, con concentración de 100 µM de genisteína, protege a las células normales contra el daño al ADN inducido por agentes citotóxicos como el Cisplatino y la Mitomicina-C, la genisteína ejerce su actividad al disminuir la expresión de Caspasa-3. Por lo tanto, el potencial antiapoptótico de la genisteína tiene una función quimioprotectora en células normales durante el tratamiento de cáncer (Subbiah y Raghunathan, 2008). La administración de la genisteína previo al tratamiento con CrO₃, no modifico la relación EPC con respecto a los ENC y la viabilidad celular. Sin embargo, Virgilio *et al.*,(2004) observaron que 75 µM de genisteína disminuye la

viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, en la línea celular V79. Das *et al.*, (2006) observaron que 100 μM de genisteína durante 24 horas disminuye la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión con colorante azul tripán. Otros estudios demostraron que la genisteína disminuye la viabilidad celular a través del aumento en la expresión de la caspasa-3, inducción de apoptosis y necrosis, en líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP y DU145), con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 y 70 $\mu\text{M/L}$, durante 24 ó 48 horas.

Por otro lado, se puede observar que la misma administración en hembras y machos tiene diferentes resultados ya que se observó una mayor protección en los machos tratados con los ExPS, estas diferencias se pueden explicar con base a las diferencias hormonales entre los dos sexos, y los efectos que estas hormonas tienen en los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción, especialmente la presencia o ausencia de testosterona o estrógeno (Becerro, 2008). Los niveles de estrógenos en los machos son menores que en las hembras, se ha propuesto que los estrógenos protegen contra el EOx, además, lo disminuyen y mejoran los niveles y actividad de algunos antioxidantes como SOD y GPx (Viña *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2013).

VIII. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

- a) Se corroboró el daño genotóxico y citotóxico de 20 mg/Kg del CrO₃, en hembras y machos, ya que se incrementaron los promedios de MN y las células apoptóticas.
- b) La administración de los ExPS (60 ó 40 mg/Kg) y de la genisteína (15 mg/Kg) no inducen daño genotóxico en ratones hembra y macho, ya que no incrementan los promedios de MN.
- c) La administración de los ExPS (40 mg/Kg) y de la genisteína (15 mg/Kg) incrementan las células apoptóticas únicamente en machos.
- d) La administración de los ExPS (40 mg/Kg) y de la genisteína (15 mg/Kg) disminuyen el daño genotóxico inducido por el CrO₃, ya que se reducen los promedios de MN.
- e) La reducción del daño genotóxico del CrO₃ es mas significativo con el tratamiento de ExPS en machos.
- f) El hecho de no observar un incremento de células apoptóticas cuando se administraron los ExPS y la genisteína previo al tratamiento con CrO₃, sino por el contrario se redujeron, sugiere que la disminución de MN no está mediada por la activación de la apoptosis.

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): 19-30.
- ✚ Adlercreutz H., Fotsis T. y Lampe J., (1993). Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography mass spectrometry. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 53(1): 5-18.
- ✚ Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P., (2010). Biología molecular de la célula. 5a Edición. Barcelona: Ediciones Omega, 1115-1129.
- ✚ Allen R., Hunter W. y Agrawal D., (1997). Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 37(1): 215-228.
- ✚ Angeles-Palacios R., Bacalla L., Campos K., Cusihuamán Y., Osorio M. y Flores D., (2011). Efecto antinociceptivo de estradiol y Glycine max L. (soya) en ratas ovariectomizadas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 72(1): 17-22.
- ✚ 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(1): 161-172.
- ✚ Avila M., (2011). Determinación de las características agronómicas de varios cultivares de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) evaluados en la zona de Pueblo Nuevo, provincia de Los Rios. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Agrarias, 3-5.
- ✚ Bakiyaraj R., Baskaran L., Chidambaram A., Mahakavi T. y Santhoshkumar M., (2014). Bioremediation of Chromium by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Microbiology and Applied Science*, 3(9): 715-719.
- ✚ Bandyopadhyay U., Das D. y Banerjee R., (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*, 77(1): 658-666.

- ✚ Bansal A., Trivedi R. y Soni G., (2000). Hepatic and renal oxidative stress in acute toxicity of N-nitrosodiethylamine in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38(1): 916-920.
- ✚ Becerra-Torres S., Soria-Fregozo C., Jramillo-Juárez F. y Moreno-Hernández-Duque J., (2014). Transtornos a la salud inducidos por cromo y el uso de antioxidantes en su prevención o tratamiento. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 2(2): 19-30.
- ✚ Becerro M., (2008). Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 1(1): 22-36.
- ✚ Bolognesi C. y Hayashi M., (2011). Micronucleus assay in aquatic animal. *Mutagenesis*, 26(1): 205-213.
- ✚ Bunker V., (1992). Free radicals, antioxidants and ageing. *Medical Laboratory Sciences*, 49(4): 299-312.
- ✚ Caballero G., Silva J., Cervantes C., Ramírez M., (2012). Distribución de los genes *chrA* en bacterias de origen nosocomial. *Ciencia Nicolaita*, 56(1):79-90.
- ✚ Carratú B. y Sanzini E., (2005). Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Ann Ist Super Sanita*, 41(1): 7-16.
- ✚ Cederroth C. y Nef S., (2009). Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1): 30-42.
- ✚ Chaudoère J. y Ferrari R., (1999). Intracellular antioxidants from chemical biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*, 37(1): 949-962.
- ✚ Chen A. y Donovan S., (2004). Genistein at a concentration present in soy infant formula inhibits Caco-2Bbe cell proliferation by causing G2/M cell cycle arrest. *Journal of Nutrition*, 134(1): 1303-8.
- ✚ Chidambaram N., Baradarajan A., (1996). Influence of selenium on glutathione and some associated enzymes. *Environmental Health Perspectives*, 4(1): 965-970.
- ✚ Conte C., Mutti I., Puglisi P., Ferrarin A., Regina G., Maestri E. y Marmiroli N., (1998). DNA fingerprinting analysis by a pcr based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere*, 37(1): 2739-2749.
- ✚ Das A., Banik N. y Ray S., (2006). Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. *International Journal of Cancer*, 119(1): 2575-2585.

- ✚ Das J., Kang M., Kim E., Kwon D., Choi Y., Kim J., (2015). Hexavalent chromium induces apoptosis in male somatic and spermatogonial stem cells via redox imbalance. *Scientific Reports*, 5(1): 1-14.
- ✚ Dave B., Eason R., Till S., Geng Y., Velarde M., Badger T., Simmen R., (2005). The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor *PTEN*. *Carcinogenesis*, 26(10): 1793-1803.
- ✚ Ding M. y Shi X., (2002). Molecular mechanisms of Cr(VI) induced carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 234(1): 293-300.
- ✚ Donaldson K., Beswick P. y Gilmour P., (1996). Free radical activity associated with the Surface of particules: a unifying factor in determinig biological activity. *Toxicology Letters*, 888(1-3), 293-298.
- ✚ Elena G., (2002). Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Revista Argentina de Anestesiología*, 60(6): 391-401.
- ✚ EPA., (1998). Health effects test guidelines OPPTS 870.5395. Mammalian erythrocyte micronucleus test. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101). Washington, DC, EPA 712-C-, 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-, 322.
- ✚ Fahad A., Rahul, Falaq N., Smita J., Yasir H., (2015). Protective effect of genistein against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in Swiss albino rats. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(1): 51-57.
- ✚ FDA., (2000). Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. USA: *Redbook Center for Food Safety and Applied Nutrition*, 1-6.
- ✚ FDA., (2000). Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use, USA.: *Redbook.Center for Food Safety and Applied Nutrition*, 1-6.
- ✚ Ferrer A., (2003). Intoxicación por metales Metal poisoning. *Unidad de Toxicología Clínica*, 26(1): 141-153.
- ✚ Filaire E. y Toumi H., (2012). Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: Friend or enemy?. *Joint Bone Spine*, 79(1): 6-341.
- ✚ Flora S., (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(4): 191-206.

- ✚ Fuic A. y Mijic A., (1999). *In vitro* and *in vivo* micronucleus tests in genotoxicity research. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 50(1): 299-306.
- ✚ 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*, (1):9.
- ✚ 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*, (1):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): 145-151.
- ✚ García-Rodríguez M.C. y Altamirano-Lozano M.A., (2006). La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón in vivo. *Bioquímica*, 32(1): 15-24.
- ✚ García-Rodríguez, M. C. García-Cárdenas G. P., Montañero-Rodríguez A. R. y Altamirano-Lozano M. A., (2014). Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio [I]) en ratones de la cepa CD-1 : micronúcleos , apoptosis y viabilidad celular, *Acta Universitaria*, 24(55): 91-96.
- ✚ Gatto N., Kelsh M., Mai D., Suh M. y Proctor D., (2010). Occupational exposure to hexavalent chromium and cancers of the gastrointestinal tract: A meta-analysis. *Cancer Epidemiology*, 34(4): 388-399.
- ✚ González N. y Durán S., (2014). Isoflavonas de soya y evidencias sobre la protección cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 29(6): 1271-1282.
- ✚ González-Torres M. C., Betancourt-Rule M. y Ortiz-Muñiz R., (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1): 3-9.
- ✚ Guo T., McCAY J., Zhang L., Brown R., You L., Karrow N., Germolec D. y White K., (2001). Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice. *Journal of Nutrition*, 131(1): 3251-3258.

- ✚ Halliwell B. y Gutteridge J., (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5a edición. New York: Oxford University Press, 1-944.
- ✚ Hayashi M., MacGregor J., Gatehouse D., Adler I., Blakey D., Dertinger S., 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): 234-52.
- ✚ Hayashi M., MacGregor J., Gatehouse D., Adler I., Blakey D., Dertinger S., 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): 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 /Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 245(1): 245-249.
- ✚ Hayashi Y., Kondo T., Zhao Q., Ogawa R., Cui Z., Feril L. y Kasuya M., (2004). Signal transduction of p-53 independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197(2): 96-106.
- ✚ Heddle J., Cimino M., Hayashi M., Romagna F., Shelby M., Tucker J. y McGregor J., (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 18(1): 277-291.
- ✚ 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/Reviews in Genetic Toxicology*, 123(1): 61-118.
- ✚ Henkler F., Brinkmann J. y Luch A., (2010). The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis Induced by Metals and Xenobiotics Cancers. *Cancers (Basel)*, 2(1): 376-396.
- ✚ Hernández-Elizondo J., Mariscal-Arcas M., Rivas A., Feriche B., Velasco J. y Olea-Serrano F., (2009). Estimación de la ingesta de fitoestrógenos en población femenina, *Nutrición Hospitalaria*, 24(4): 445-451.

- ✚ IARC., (1990). Chromium and chromium compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans and their Supplements, 49(1): 49-256.
- ✚ Islam E., Yang X., He L. y Mahmood Q., (2007). Assessing potential dietary toxicity of heavy metals in selected vegetables and food crops. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(1): 1-13.
- ✚ Jomova K. y Valko M., (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(1): 65-87.
- ✚ Jones D., (2006). Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants y Redox Signaling*, 8(1): 1865-1879.
- ✚ Kawanishi S., Oikawa S. y Murata M., (2005). Evaluation for safety of antioxidant chemopreventive agents. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7(1): 1728-1739.
- ✚ 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(1): 155-166.
- ✚ 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(1): 155-166.
- ✚ Krishna G., Nath J. y Ong T., (1986). Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C Inhibition. *Cancer Research*, 46(1): 2670-2674.
- ✚ Kurose K., Gilley K., Matsumoto S., Watson P., Zhou X. y Eng C., (2002). Frequent somatic mutations in *PTEN* and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinoma. *Nature Genetics*, 32(1): 355-357.
- ✚ Larkins N., (1999). Free radical biology and pathology. *Journal of Equine Veterinary Science*, 19(1): 84-89.
- ✚ Lay P. A. y Levina A., (2013). Metal Carcinogens», en Comprehensive Inorganic Chemistry II. *Elsevier*, 835-856.
- ✚ Lee J., Son Y., Pratheeshkumar P. y Shi X., (2012). Oxidative stress and metal carcinogenesis, *Free Radical Biology and Medicine*, 53(4): 742-757.
- ✚ Lee J., Son Y., Pratheeshkumar P. y Shi X., (2012). Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(1): 742-757.
- ✚ Li J., Yen C. y Liaw D., (1997). PTEN, a putative tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275(1): 1943-1947.

- ✚ Li Y., Sarkar F., (2002). Gene expression profiles of genistein-treated PC3 prostate cancer cells. *The Journal of Nutrition*, 132(1): 3623-31.
- ✚ Li Y., Upadhyay S., Bhuiyan M., Sarkar F., (1999). Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene*, 18(1): 3166-72.
- ✚ Lian F., Li Y., Bhuiyan M. y Sarkar F., (1999). p53-independent apoptosis induced by genistein in lung cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 33(1): 125-31.
- ✚ Liu M., Albanese C., Anderson C., Hilty K., Webb P., Uht R., Price R., Pestell R., Kushner P., (2002). Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *Journal Biological Chemistry*, 277(1): 24353-60.
- ✚ Lodish H., Berk A., Zipursky S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J., (2002). *Biología Celular y Molecular*. 4ª ed. España: Médica Panamericana, 1-1030.
- ✚ Marahmadi S., Shahmohammadi A., Rousta A. Azadi M., Fahanik-Babaei J., Baluchnejadmojarad T. y Roghani M., (2018). Soy isoflavone genistein attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairments in the rat via exerting anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *Citokine*, 104(1): 151-159.
- ✚ Marotte C. y Zeni S., (2013). Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 47(4): 661-74.
- ✚ Mavournin K., Blakey D., Cimino M., Salamone M. y Heddle J., (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(1): 29-80.
- ✚ McGahon A., Martin S., Bissonnette R., Mahboubi A., Shi Y., Mogil R., Nishioka W. y Green D., (1995). The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. *Methods in Cell Biology*. Academic Press, (1):153-174.
- ✚ Mendoza D., Roa M. y Ahumada B., (2015). Efecto de las isoflavonas de la soja en la salud ósea en adultos y niños. *Salud Uninorte*. 31(1): 138-152.
- ✚ Minuzzi A., Mora F., Rangel M., Braccini A. y Scapim C., (2007). Características fisiológicas, contenido de Aceite y proteína en genotipos de soja, evaluadas en diferentes sitios y épocas de cosecha, Brasil. *Agricultura Técnica*, 67(4): 353-361.
- ✚ Mostacero J., Mejía F. y Gamarra O., (2002). *Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú*. Vol. I. 1º ed. Perú, 1-667.

- ✚ Munro I., Harwood M., Hlywka J., Stephen A., Doull J., Flamm G. y Adlercreutz H., (2003). Soy isoflavones: a safety review. *Nutrition Reviews*, 61(1): 1-33.
- ✚ Murkies A., Wilcox G. y Davis S., (1998). Clinical review 92: Phytoestrogens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(2): 297-303.
- ✚ Navarro A., (2001). Fitoestrógenos y su utilidad para el tratamiento del síndrome climatérico. *Revista Cubana Endocrinología*, 12(2): 128-131.
- ✚ Nordberg G., Langard S., Sunderman F., Mager S., Osinsky D., Markkanen P., Dinman B., (2001). Metales: propiedades químicas y toxicidad. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, 1-76.
- ✚ Núñez A., (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública*, 37: 644-60
- ✚ O'Brien T., Ceryak S. y Patierno S., (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1): 3-36.
- ✚ O'Brien T., Ceryak S. y Patierno S., (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1): 3-36.
- ✚ OECD., (1997). Guideline for Testing of Chemicals. No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study II: chromium (VI).
- ✚ OECD., (2016). Mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals 474. of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study II: chromium (VI).
- ✚ Onozawa M., Fukuda K., Ohtani M., Akaza H., Sugimura T., Wakabayashi K., (1998). Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, (1): 360-3.
- ✚ Patel R., Boersma B. y Crawford J., (2001). Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(1): 1570-1581.
- ✚ Patisaul H. y Jefferson W., (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol*, 31(4): 19-400.

- ✚ Perren A., Weng L., Boag A., (1999). Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *American Journal of Pathology*, 155(1): 1253-1260.
- ✚ Pisoschi A. y Pop A., (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97(1): 55-74.
- ✚ Pugalendhi P., Manoharan S., Panjamurthy K., Balakrishnan S., Nirmal M., (2009), Antigenotoxic effect of genistein against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced genotoxicity in bone marrow cells of female wistar rats. *Pharmacological Reports*, 61(1): 296-303.
- ✚ Quiñones M., Miguel M. y Aleixandre A., (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1): 76-89.
- ✚ Rahman M. y Hongsprabhas P., (2016). Genistein as antioxidant and antibrowning agents *in vivo* and *in vitro*: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 82(1): 379-392.
- ✚ Ramos M., Bautista C., Gómez B. y Zamora A., (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en Salud*, 8(1): 7-15.
- ✚ Ramos M., Batista C., Gómez B. y Zamora A., (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en salud*, 8(1): 7-15.
- ✚ Ramos S., (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cáncer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1): 427-442.
- ✚ Ramos-León Javier., (2016). Efecto de los flavonoides de *Camellia sinensis* (miricetina, quercetina y rutina) sobre la inducción de micronúcleos y apoptosis en ratones tratados con trióxido de cromo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM, 22.
- ✚ Raschke M., Rowland I. y Magee P., (2006). Genistein protects prostrate cells against hydrogenperoxide induced DNA damage and induces expression of genes involved in the defense against oxidative stress. *Carcinogenesis*, 27(1): 2322-2330.
- ✚ Ray G., Husain S., (2002). Oxidant, antioxidants and carcinogenesis. *Indian Journal Experimental Biology*, 40(1): 1213-1232.
- ✚ Record I., Jannes M., Dreosti I., King R., (1995). Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein *in vitro* but not *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology*, 33(1): 919-922.

- ✚ Rocha C., Da L., Pionheiro R., Bahía M. y Burbano R., (2011). Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of *Colossoma macropomum* exposed to methylmercury. *Genetics and Molecular Biology*, 34(4): 694-697.
- ✚ Rudolf E. y Cervinka M., (2006). The role of intracellular zinc in chromium(VI)-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 162(1): 212-227.
- ✚ Sánchez M., Zacarias M., Arronte A. y Mendoza V., (2013). Efecto de la terapia hormonal con estrógenos en el estrés oxidativo y la calidad de vida en mujeres posmenopáusicas. *Revista Ginecología y Obstetricia de México*, 81(1): 11-22.
- ✚ Saraste A. y Pulkki K., (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3): 528-537.
- ✚ Schmid W., (1975). The micronucleus test. *Mutation Research /Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 31(1): 9-15.
- ✚ Setchell K. y Cassidy A., (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*, 129(3): 758-67.
- ✚ Setchell K., Brown N. y Lydeking-Olsen E., (2002). The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition*, 132(1): 3577-84.
- ✚ Setchell K., Brzezinski A., Brown N., Desai P., Melhem M., Meredith T., (2005). Pharmacokinetics of a slow release formulation of soybean isoflavones in healthy postmenopausal women. *Agricultural and Food Chemistry*, 53(1): 1938-44.
- ✚ Shehata E., Yosra E., Saly G. y Ossama Y., (2016). Self-emulsifying phospholipid pre-concentrates (SEPPs) for improved oral delivery of the anticancer genistein: Development, appraisal and ex-vivo intestinal permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(2): 745-756.
- ✚ Shi X. y Dalal N., (1999). One electron reduction of chromate by NADPH dependent glutathione reductase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 40(1): 1-12.
- ✚ Shi X., (1990). Reduction of Chromium (VI) and its Relationship to Carcinogenesis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 2(1): 87-104.
- ✚ Slade P., Hailer M., Martin B. y Sugden K., (2005). Guanine-specific oxidation of double-stranded DNA by Cr(VI) and ascorbic acid forms spiroiminodihydroantoin and 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Chemical Research Toxicology*, 18(1): 1140-1149.

- ✚ Sloczyńska K., Powroznik B., Pekala E., Waszkielewicz A., (2014). Antimutagenic compounds and their posible mechanisms of action. *Journal of Applied Genetics*, 55(1): 273-285.
- ✚ Smith M., (1996). The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. *Environmental Health Perspectives*, 104(1): 1219-1225.
- ✚ Steiner C., Peters W., Gallagher E., Magee P., Rowland I., Zobel B., (2007). Genistein protects human mammary epithelial cells from benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and 4-hydroxy-2-nonenal genotoxicity by modulating the glutathione/glutathione-S-transferase system. *Carcinogenesis*, 28(3): 738-748.
- ✚ Su S., Yeh T., Lei H. y Chow N., (2002). The potential of soybean foods as a chemoprevention approach for human urinary tract cancer. *Clinical Cancer Research*, 6(1): 230-6.
- ✚ Subbiah U. y Raghunathan M., (2008). Chemoprotective action of resveratrol and genistein from apoptosis induced in human peripheral blood lymphocytes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 25(4): 425-434.
- ✚ Surh Y. y Ferguson L., (2003). Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential-highlights of a symposium. *Mutation Research /Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523(1): 195-225.
- ✚ Toden S., Bird A., Topping D. y Conlon M., (2007). Differential effects of dietary whey, casein and soya on colonic DNA damage and large bowel SCFA in rats fed diets low and high in resistant starch. *British Journal of Nutrition*, 97(1): 535-543.
- ✚ Torres-Torres N, y Tovar-Palacio A., (2009). La historia del uso de la soya en México, su valor nutricional y su efecto en la salud. *Salud Pública de México*, 51(3): 246-254.
- ✚ Turrens F., (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal Physiology*, 552(2): 335-344.
- ✚ Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin D., Mazur M. y Telser J., (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal Biochemistry Cell Biology*, 39(1): 44-84.
- ✚ Valladares L., Garrido A. y Sierralta W., (2012). Isoflavonas de soya y salud humana: cáncer de mama y sincronización de la pubertad. *Revista Médica de Chile*, 512-516.

- ✚ Vanegas P., Restrepo M. y López V., (2009). Características de las bebidas con proteína de soya. *Revista Facultad Nacional de Medellín*, 62(2): 5165-5175.
- ✚ Veskokoukis A., Tsatsakis A. y Kouretas D., (2012). Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress and Chaperones*, 17(1): 11-21.
- ✚ Viña J., Sastre J., Pallardó F. y Borrás C., (2004). Posibles mecanismos por los que las mujeres viven más que los varones. *Revista Española de Geriatria Gerontología*, 39(6): 381-4.
- ✚ Virgilio A., Iwami K., Wätjem W., Kahl R. y Degen G., (2004). Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicology Letters*, 151(1): 151-162.
- ✚ Wang X., Son Y., Chang Q., Sun L., Hitron J., Budhraj A., Zhang Z., Ke Z., Chen F. y Luo J., Shi X., (2011). NADPH oxidase activation is required in reactive oxygen species generation and cell transformation induced by hexavalent chromium. *Toxicological Sciences*, 123(1): 399-410.
- ✚ Xiao F., Chen D., Luo L., Zhong X., Xie Y., Zou L., Zeng M., Guan L. y Zhong C., (2013). Time-order effects of vitamin C on hexavalent chromium- induced mitochondrial damage and DNA-protein crosslinks in cultured rat peripheral blood lymphocytes. *Molecular Medicine Reports*, 8(1): 53-60.
- ✚ Xu J. y Loo G., (2001). Different effects of genistein on molecular markers related to apoptosis in two phenotypically dissimilar breast cancer cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82(1): 78-88.
- ✚ Yoon H., Moon S., Kim N., Park B., Jeong M. y Yoo Y., (2000). Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(1): 151-156.
- ✚ Yu P., (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1): 139-162.
- ✚ Zgu J., Zhang C., Qing Y., Cheng Y., Jiang X., Li M., Yang Z. y Wang D., (2015). Genistein induces apoptosis by stabilizing intracellular p53 protein through an APE1-mediated pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 86(1): 209-218.
- ✚ Zhang H., Wang L. y Sun Y., (2003). Why B-ring is the active centre for Genistein to scavenge peroxy radical: a DFT study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(1): 909-911.

X. ANEXOS

ANEXO 1

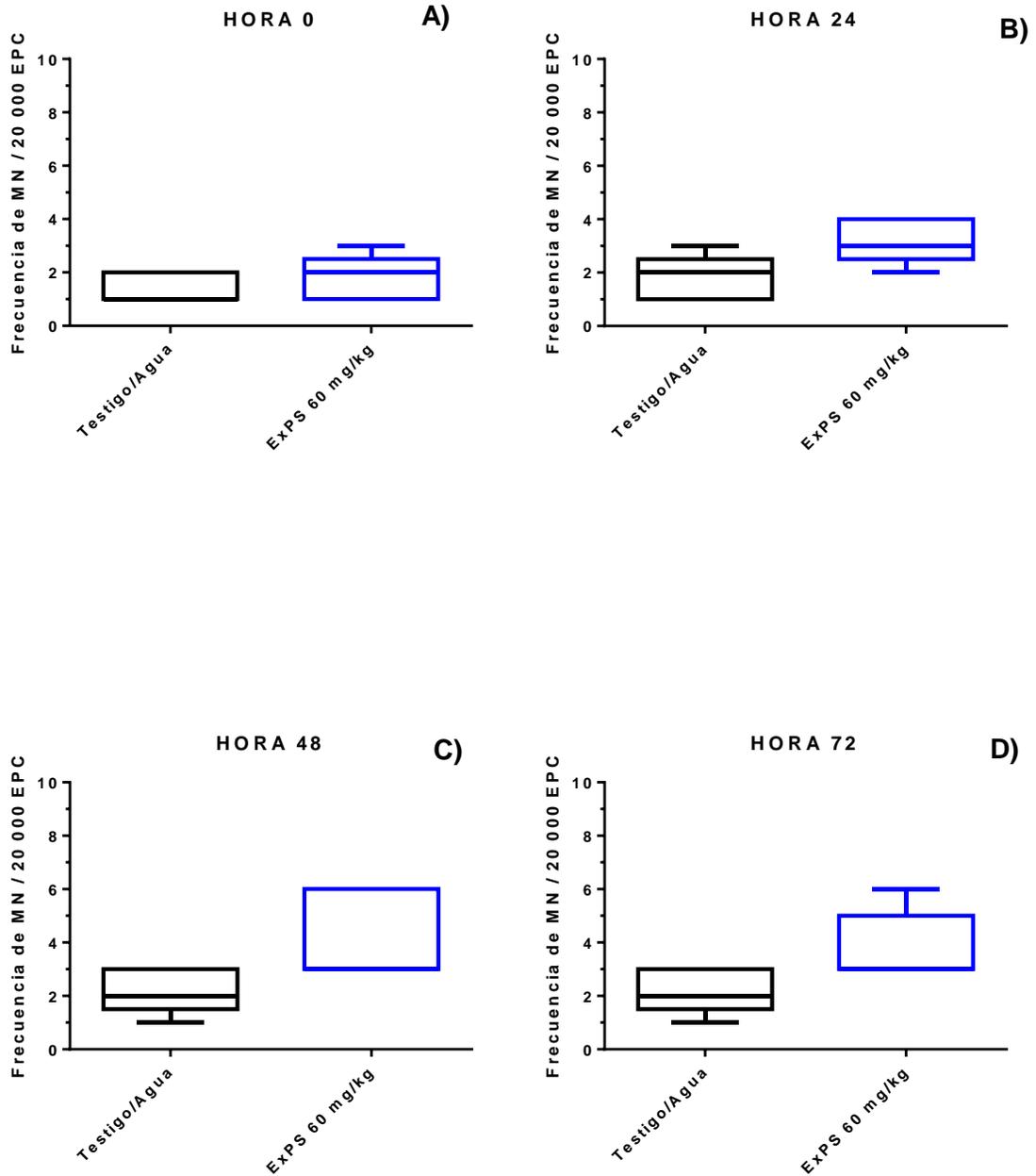


Gráfico de caja con bigote en donde se representan y comparan las distribuciones de los MN evaluados en 20,000 EPC cuando se administró 60 mg/Kg de los ExPS, en ratones hembra. A) Distribución de MN a la hora 0; B) Distribución de MN a la hora 24; C) Distribución de MN a la hora 48; D) Distribución de MN a la hora 72.

ANEXO 2

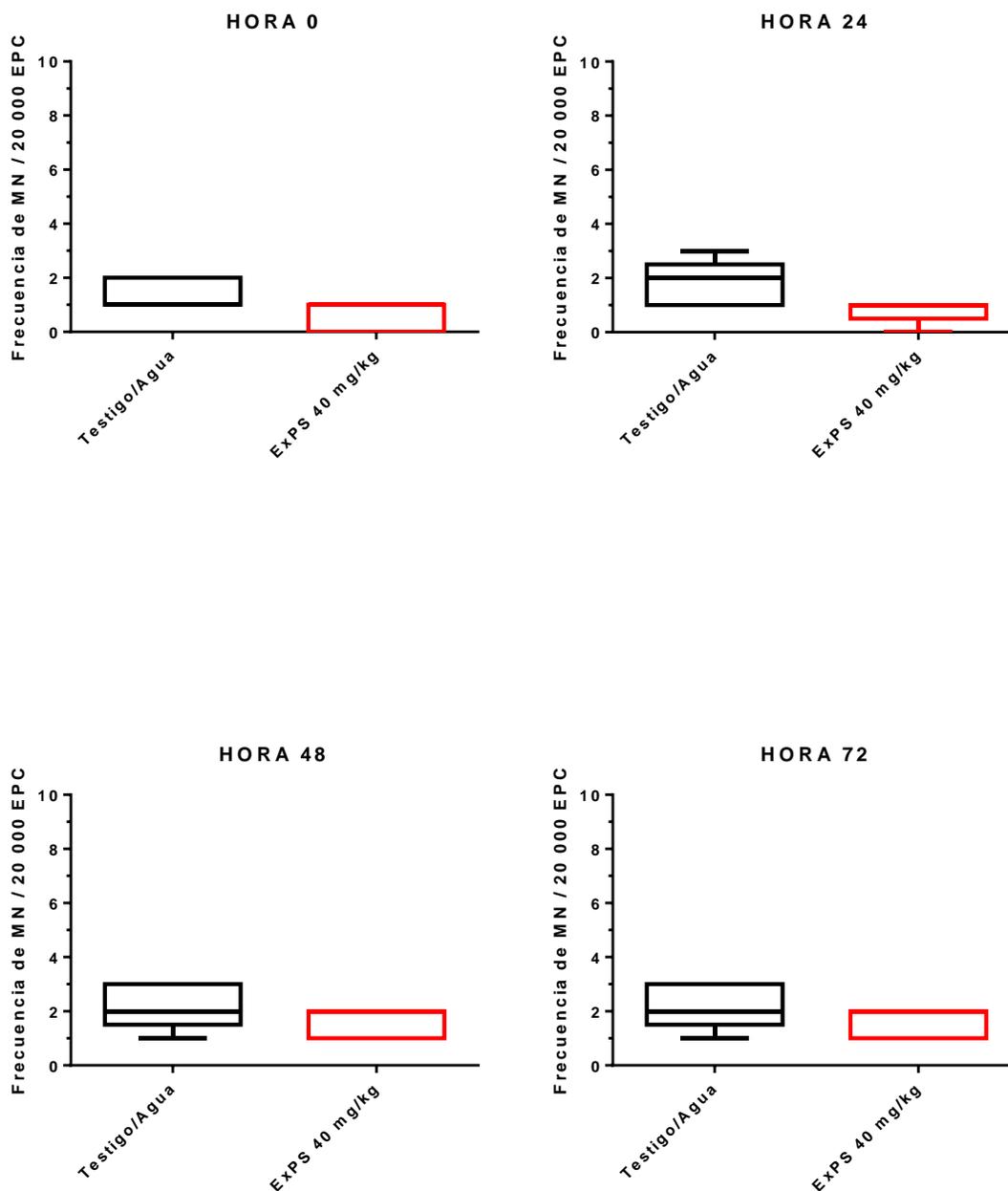
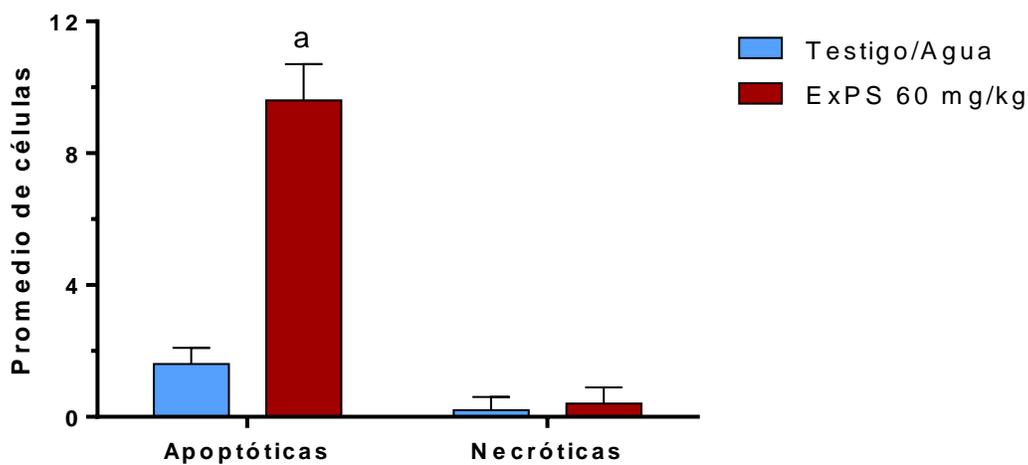


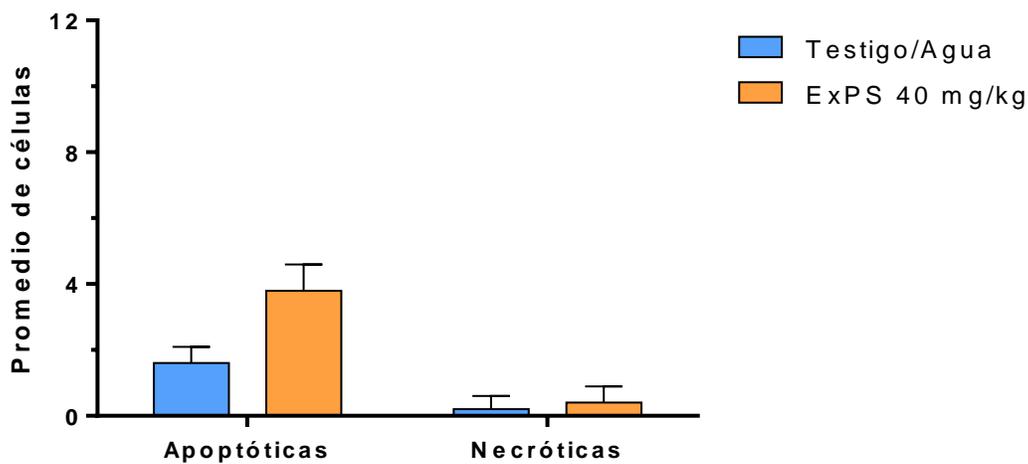
Gráfico de caja con bigote en donde se representan y comparan las distribuciones de los MN evaluados en 20,000 EPC cuando se administró 40 mg/Kg de los ExPS, en ratones hembra. A) Distribución de MN a la hora 0; B) Distribución de MN a la hora 24; C) Distribución de MN a la hora 48; D) Distribución de MN a la hora 72.

ANEXO 3

A)



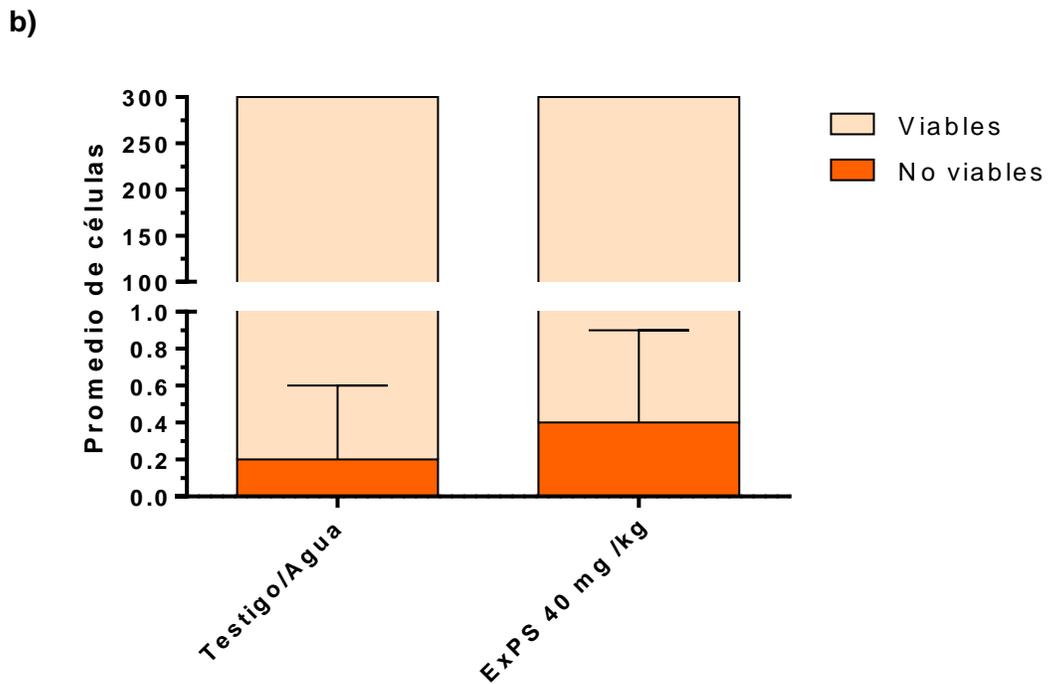
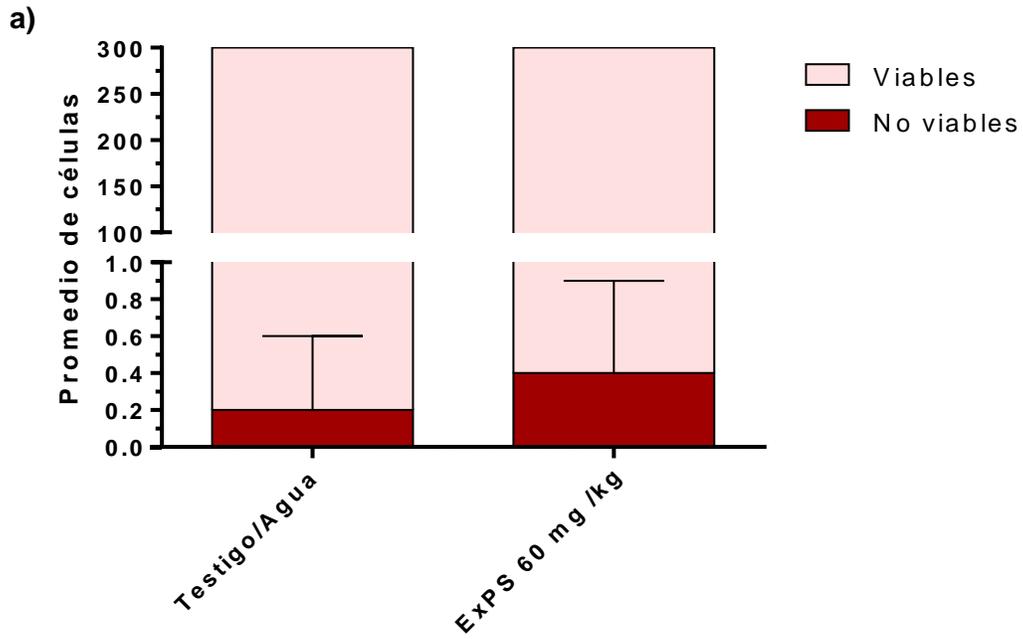
B)



A) Análisis del porcentaje de las células sanas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas, evaluadas en células nucleadas de sangre periférica en ratones hembra tratados con 60 mg/Kg de los ExPS. ^a: p < vs Testigo/Agua.

B) Análisis del porcentaje de las células sanas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas, evaluadas en células nucleadas de sangre periférica en ratones hembra tratados con 40 mg/Kg de los ExPS.

ANEXO 4



a) Porcentaje de células viables y no viables, evaluadas en sangre periférica de ratones hembra tratados con 60 mg/Kg de los ExPS.

b) Porcentaje de células viables y no viables, evaluadas en sangre periférica de ratones hembra tratados con 40 mg/Kg de los ExPS.

ANEXO 5

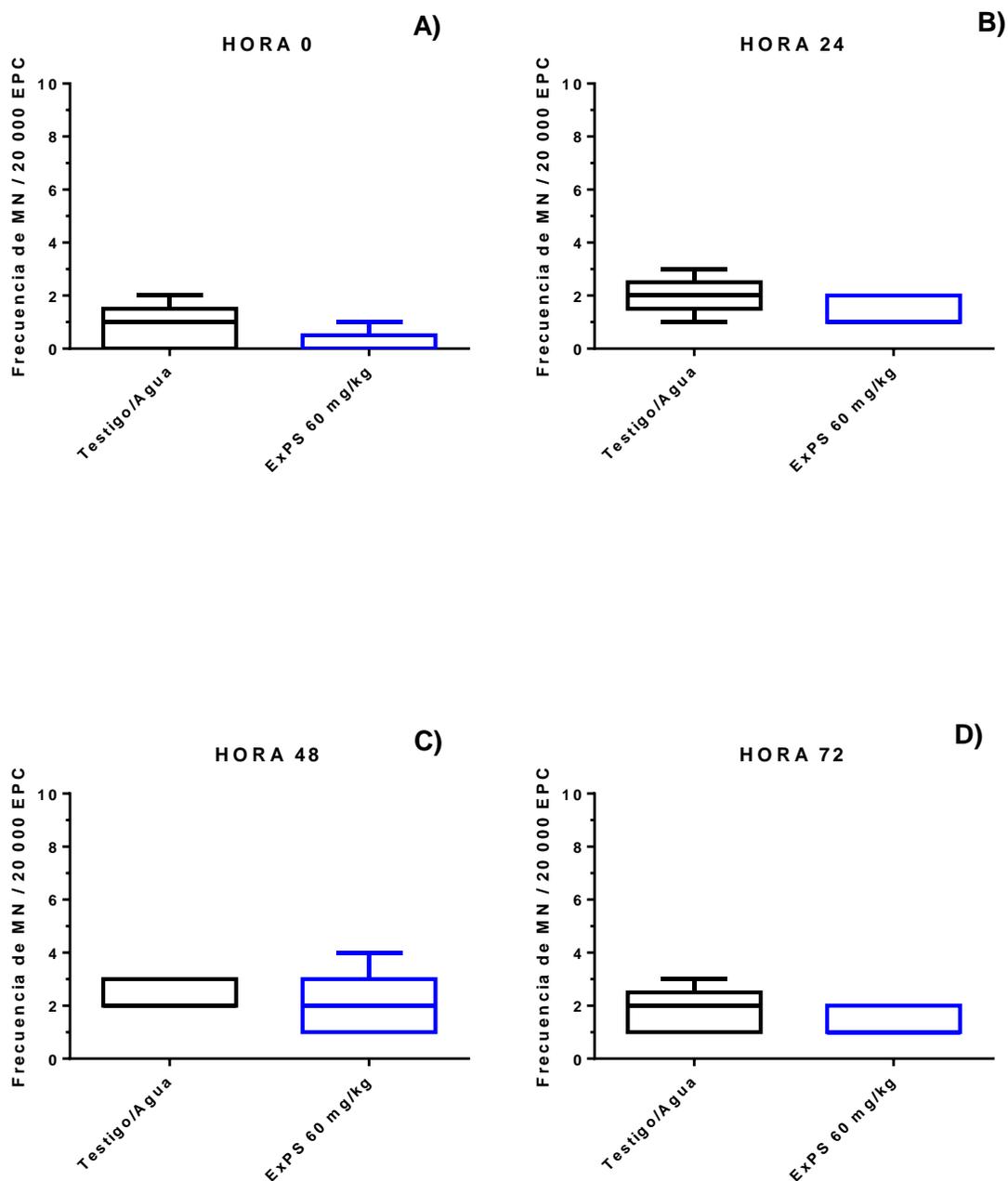


Gráfico de caja con bigote en donde se representan y comparan las distribuciones de los MN evaluados en 20,000 EPC cuando se administró 60 mg/Kg de los ExPS, en ratones macho. A) Distribución de MN a la hora 0; B) Distribución de MN a la hora 24; C) Distribución de MN a la hora 48; D) Distribución de MN a la hora 72.

ANEXO 6

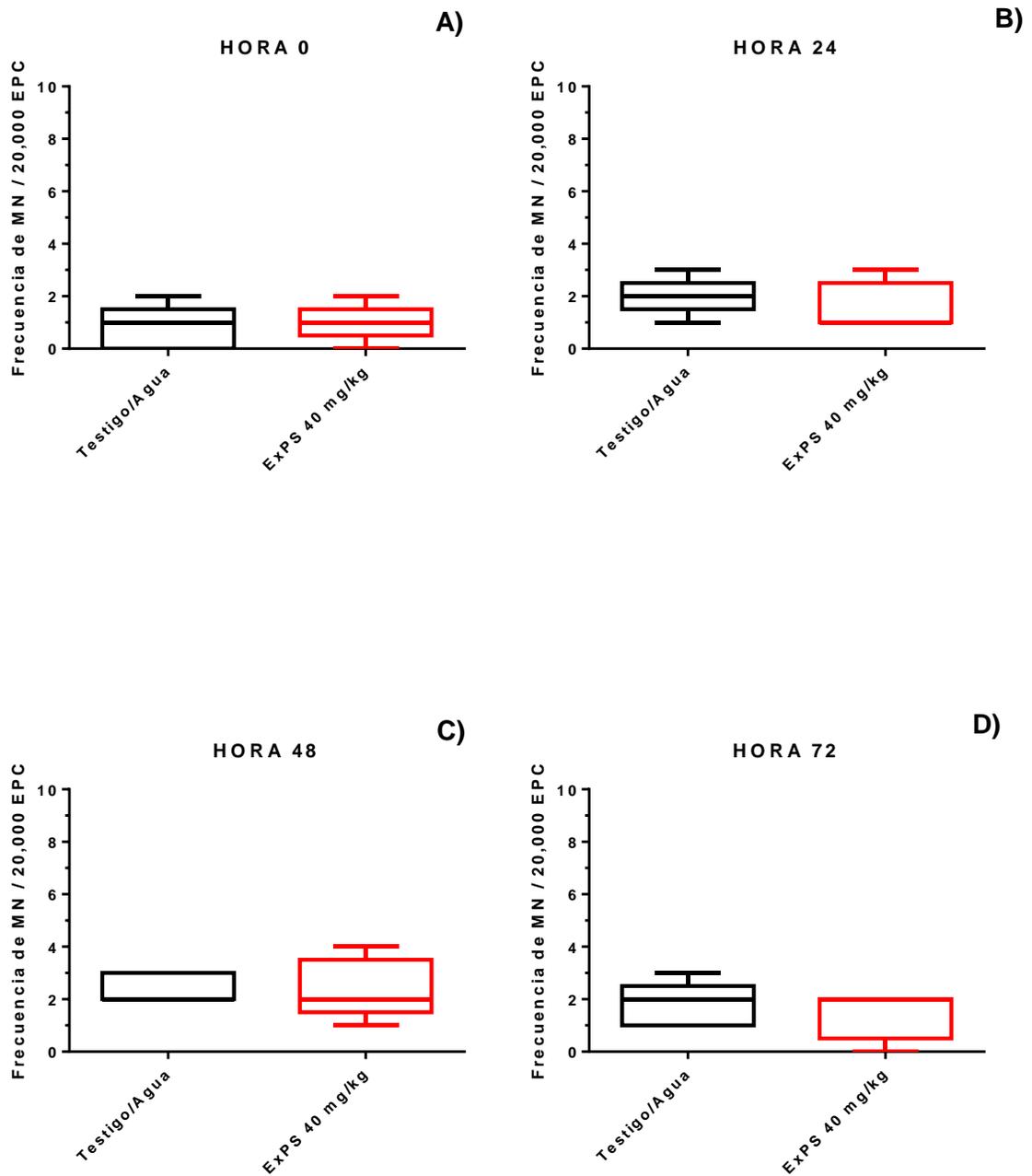
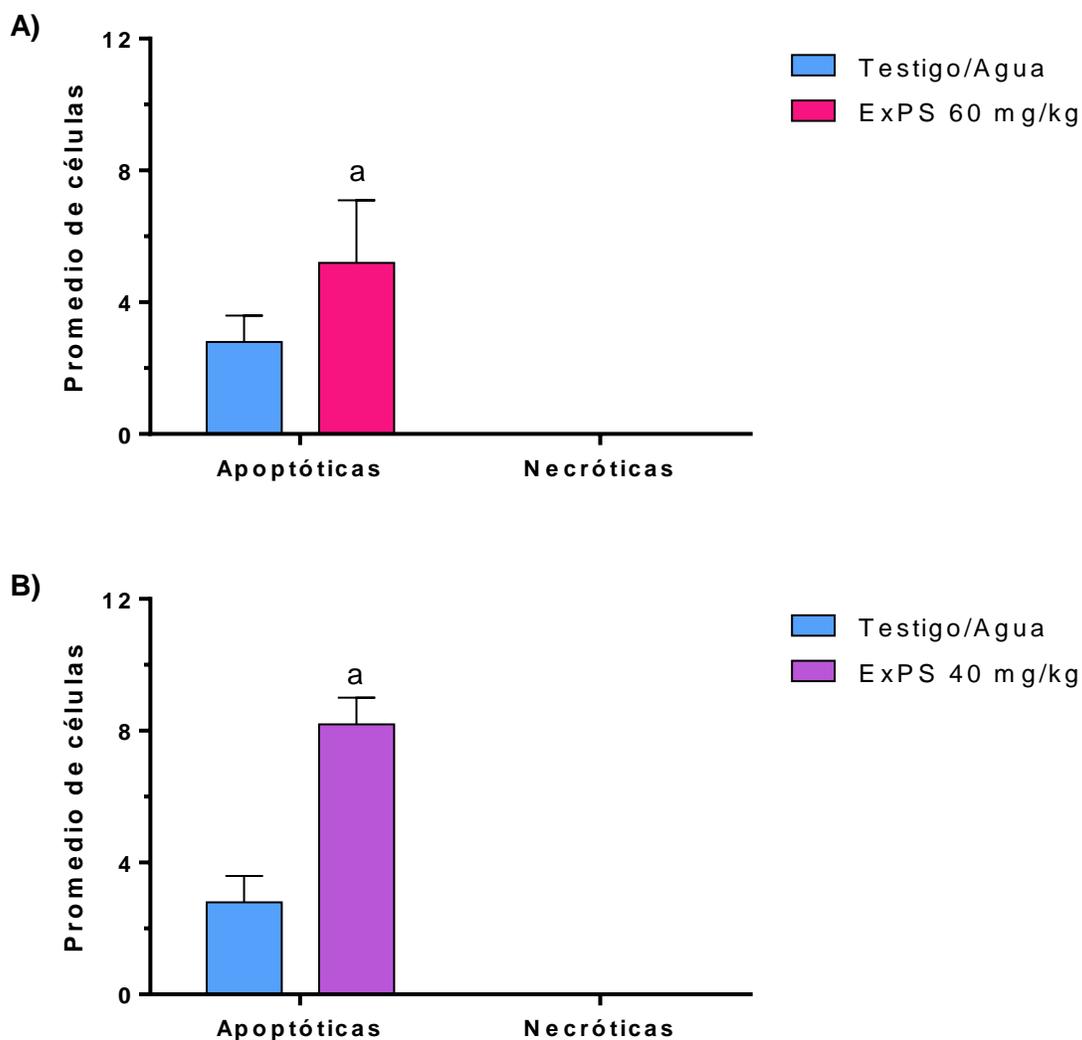


Gráfico de caja con bigote en donde se representan y comparan las distribuciones de los MN evaluados en 20 000 EPC cuando se administró 40 mg/Kg de los ExPS, en ratones macho. A) Distribución de MN a la hora 0; B) Distribución de MN a la hora 24; C) Distribución de MN a la hora 48; D) Distribución de MN a la hora 72.

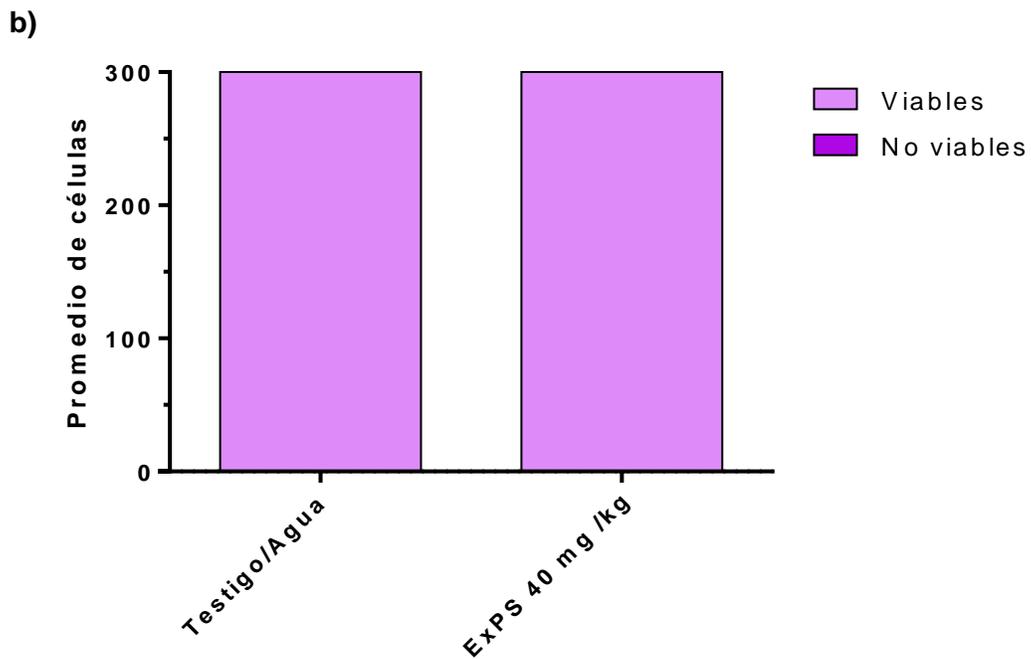
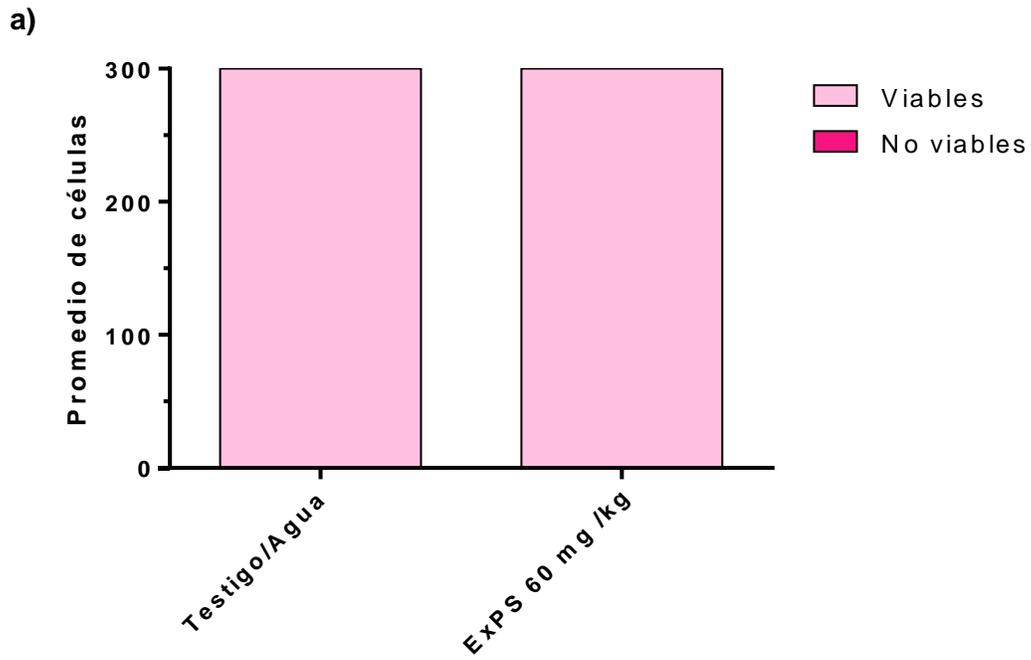
ANEXO 7



A) Análisis del porcentaje de las células sanas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas, evaluadas en células nucleadas de sangre periférica en ratones macho tratados con 60 mg/Kg de los ExPS. ^a: $p < vs$ Testigo/Agua.

B) Análisis del porcentaje de las células sanas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas, evaluadas en células nucleadas de sangre periférica en ratones macho tratados con 40 mg/Kg de los ExPS. ^a: $p < vs$ Testigo/Agua.

ANEXO 8



a) Porcentaje de células viabiles y no viabiles, evaluadas en sangre periférica de ratones macho tratados con 60 mg/Kg de los ExPS.

b) Porcentaje de células viabiles y no viabiles, evaluadas en sangre periférica de ratones macho tratados con 40 mg/Kg de los ExPS.

ANEXO 9

Este trabajo se presentó de manera parcial o total en los siguientes eventos académicos:

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

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

Lugar y Fecha: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Iztapalapa. México, Ciudad de México. Del 9 al 11 de agosto de 2017.

Evento: XXII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud.

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 Griselda, Parra Aguilar Thelma Jacqueline, Valle Castillo Gabriela Abigail, Hernández-Luis Francisco, López-Sánchez Marcela Alejandra y García-Rodríguez María del Carmen.

Organizador: Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. UAM Iztapalapa.

Lugar y fecha: Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México, Ciudad de México. Del 18 al 22 de septiembre de 2017.

Evento: Congreso Nacional de Genética 2017.

Título de la ponencia: ESTUDIO IN VIVO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA SOYA (GLYCINE MAX) Y DE LA (+)-CATEQUINA SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO POR CROMO HEXAVALENTE.

Autores: Valle-Castillo GA, Nicolás-Méndez T, García-Rodríguez MC.

Organizador: Sociedad Mexicana de Genética A.C. Universidad Autónoma de Campeche.

Lugar y fecha: Universidad Autónoma de Campeche. Ciudad de San Francisco de Campeche. Del 2 al 5 de octubre de 2017.

Evento: XVIII Reunión Internacional de Ciencias Médicas.

Título de la ponencia: EFECTO DE LOS EXTRACTOS PROTEÍNICOS DE SOYA SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO POR CROMO HEXAVALENTE.

Autores: Gabriela Abigail Valle-Castillo, María del Carmen García-Rodríguez.

Organizador: Departamento de Ciencias Médicas. División de Ciencias de la Salud. Universidad de Guanajuato.

Lugar y Fecha: Universidad de Guanajuato. Campus León. León Guanajuato. Del 18 al 20 de abril de 2018.



XX FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

Del 9 al 11 de agosto de 2017



Título
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 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
<p>Introducción</p> <p>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.</p> <p>Material y Método</p> <p>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 <i>et al.</i> (1990)^[1].</p> <p>Resultados</p> <p>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 CrO₃, el cual mostró un incremento significativo de MN en comparación con el grupo testigo. Al evaluar la relación de los eritrocitos policromáticos y normocromáticos no se observaron efectos significativos en ninguno de los grupos estudiados.</p> <p>Conclusiones</p> <p>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.</p> <p>[1] Hayashi <i>et al.</i>, 1990. <i>Mutat Res</i>; 245:245-249.</p>
Palabras clave
Antioxidante, quinazolina, proteína de soya, cromo hexavalente, micronúcleos, apoptosis.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Iztapalapa

MEMORIAS

XXII

*Simposio del Departamento
de Ciencias de la Salud*



UAM *Iztapalapa*

18 y 19 de Septiembre

13 al 15 de Diciembre

Sala Caicacalli



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 Griselda¹, Parra Aguilar Thelma Jacqueline¹, Valle Castillo Gabriela Abigail¹
Hernández-Luis Francisco², López-Sánchez Marcela Alejandra² y García-Rodríguez María del Carmen^{1,*}

¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. CDMX, México,

²Departamento de Farmacia, Facultad de Química. UNAM, CDMX, México.

*carmen.garcia@unam.mx

Los seres vivos están expuestos a una gran variedad de contaminantes ambientales asociados al desarrollo de enfermedades relacionadas con el daño al ADN. En contra parte, se ha observado que tanto las Vitaminas C y E, como los extractos de soya presentan un alto contenido de antioxidantes que podrían contrarrestar dicho daño. En la Facultad de Química de la UNAM se han sintetizado nuevos compuestos quinolínicos con la finalidad de potenciar sus efectos terapéuticos mediante la adición de grupos hidroxilo y metoxilo; que de igual manera podrían modular el daño al ADN. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue evaluar la actividad genotóxica de compuestos quinolínicos, extractos de soya y vitaminas (C y E) en sangre periférica de ratones de la cepa Hsd:ICR. 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)^[1]. La administración de compuestos de soya y vitaminas (C y E) disminuyen significativamente las frecuencias de MN en comparación con sus testigos. Por otra parte, el tratamiento con la TAQ-MLB13 aumenta significativamente las frecuencias de MN, sin embargo, de acuerdo con la FDA, este incremento no determina genotoxicidad. Se empleó un grupo testigo positivo al que se le administraron 20 mg/kg de CrO₃, el cual mostró un incremento significativo de MN. Al evaluar la relación de los eritrocitos policromáticos y normocromáticos no se observaron efectos significativos en ninguno de los grupos estudiados con excepción del testigo positivo. 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, sugiere un efecto sinérgico con su vehículo DMSO. 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.

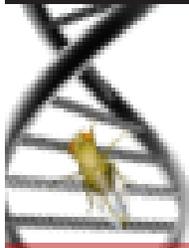
Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216 y por CB-SEP-CONACyT 220664.

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

Departamento de Ciencias de la Salud – UAM Iztapalapa

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



ESTUDIO *IN VIVO* DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA SOYA (*GLYCINE MAX*) Y DE LA (+)-CATEQUINA SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO POR CROMO HEXAVALENTE

Valle-Castillo GA, Nicolás-Méndez T, García-Rodríguez MC*

Laboratorio de Antimutagénesis Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis, Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, 09230, Batalla 5 de Mayo S/N, Iztapalapa, Ejercito de Oriente, Ciudad de México, CDMX.

*carmen.garcia@unam.mx

Algunas sustancias antioxidantes han sido asociadas con la modulación y protección de algunos tipos de cáncer. Se ha observado que la soya tiene un alto contenido de polifenoles con potencial antioxidante y particularmente la (+)-catequina es capaz de eliminar radicales libres. En contraparte, se ha observado que el cromo hexavalente [Cr(VI)] genera estrés oxidante que ha asociado al daño genotóxico. En este estudio se evaluó el efecto de la proteína de soya y la (+)-catequina sobre el daño genotóxico inducido por compuestos de Cr(VI). El daño genotóxico se evaluó mediante el ensayo de MN de acuerdo a Hayashi *et al.*, (1990)¹ y la apoptosis mediante la técnica modificada por García-Rodríguez *et al.*, (2013)². Grupos de cinco ratones fueron tratados de la siguiente manera: a) testigo, se les administró únicamente el vehículo; b) proteína de soya (40 mg/Kg); c) (+)-catequina (20 mg/Kg); d) CrO₃ (20 mg/kg); e) proteína de soya-CrO₃; f) (+)-catequina-CrO₃. Las evaluaciones se realizaron en muestras de sangre periférica a las 0, 24, 48 y 72 horas. En los grupos tratados solo con la proteína de soya y la (+)-catequina no se observaron cambios significativos en las frecuencias de MN, células apoptóticas y viabilidad celular. El tratamiento con CrO₃ incrementó las frecuencias de MN y las células apoptóticas, además de disminuir la viabilidad celular. La administración de la proteína de soya previo al tratamiento con CrO₃ disminuyó la frecuencia de MN y la viabilidad celular. Mientras que, el tratamiento de (+)-catequina previo al de CrO₃ disminuyó las frecuencias de MN, células apoptóticas y viabilidad celular únicamente a la hora 72. Los resultados sugieren que la administración de (+)-catequina puede proteger contra el daño genotóxico inducido por compuestos de Cr(VI); sin embargo se sugiere realizar estudios complementarios para corroborar los posibles efectos antigenotóxicos de la proteína de soya. **Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIITIN219216.**

¹Hayashi *et al.*, 1990. *Mutat Res*; 245:245249.

²García-Rodríguez *et al.*, 2013. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:19.

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



Universidad de Guanajuato, Campus León,
División Ciencias de la Salud, Departamento de Ciencias Médicas.

XVIII Reunión Internacional de Ciencias Médicas

18-20 abril 2018

Auditorio Jorge Ibarguengoitia del Departamento de
Estudios Culturales de la Universidad de Guanajuato, Campus León.



www.reunioncienciasmedicasugto.org.mx



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO

64. Efecto de los extractos proteínicos de soya sobre el daño genotóxico inducido por Cromo Hexavalente

Gabriela Abigail Valle-Castillo, María del Carmen García-Rodríguez

Laboratorio de Antimutagénesis Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis, Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

gaby.9302@hotmail.com

Introducción. Los extractos proteínicos de soya poseen propiedades benéficas para la salud humana por su alto contenido de polifenoles. Se ha observado que la administración de extractos de polifenoles obtenidos del té verde son capaces de proteger del daño genotóxico inducido por el cromo hexavalente [Cr(VI)].

Objetivo. En este estudio se evaluó el efecto de los extractos proteínicos de soya en ratones de la cepa Hsd:ICR sobre el daño genotóxico inducido por compuestos de Cr(VI).

Materiales y Métodos. El daño genotóxico se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos (MN) [1] y la apoptosis [2]. Grupos de cinco ratones hembras y machos fueron separados en grupos que se trataron de la siguiente manera: a) testigo, se les administró únicamente el vehículo; b) extractos proteínicos de soya (40 mg/kg, vía i.g.); c) CrO₃ (20 mg/kg, vía i.p.); e) extractos proteínicos de soya-CrO₃ (mismas dosis y vías que los grupos tratados por separado). Las evaluaciones se realizaron en muestras de sangre periférica a las 0, 24, 48 y 72 horas.

Resultados. En los grupos de hembras y machos tratados solo con los extractos proteínicos de soya no se modificaron de manera significativa las frecuencias de MN y las células apoptóticas. Por el contrario, el tratamiento con CrO₃ en hembras y machos, incrementa las frecuencias de MN y las células apoptóticas. Cuando se administraron los extractos proteínicos de soya previo al tratamiento con CrO₃ en hembras y machos, se observó una disminución en las frecuencias de MN y células apoptóticas, teniendo mayor efecto en los machos.

Conclusiones. Los resultados sugieren que la administración de los extractos proteínicos de soya en ratones hembra y macho protegen del daño genotóxico inducido por compuestos de Cr(VI), y que este efecto es más consistente en machos.

[1]Hayashi *et al.*, 1990. *Mutat Res*; 245:245249.

[2]García-Rodríguez *et al.*, 2013. *Oxid Med Cell Longev*; 2013:19.

