



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS A CORTO Y MEDIANO PLAZO DEL ÁCIDO  
ASCÓRBICO Y DEL ALFA-TOCOFEROL SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO DEL ADN  
EN RATONES Hsd:ICR EXPUESTOS A CROMO HEXAVALENTE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**LOURDES MONTSERRAT HERNÁNDEZ CORTÉS**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**DRA. RAQUEL RETANA UGALDE  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNAM**

**CD. MX.**

**ENERO 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS A CORTO Y MEDIANO PLAZO DEL ÁCIDO  
ASCÓRBICO Y DEL ALFA-TOCOFEROL SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO DEL ADN  
EN RATONES Hsd:ICR EXPUESTOS A CROMO HEXAVALENTE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**LOURDES MONTSERRAT HERNÁNDEZ CORTÉS**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNAM**

**MÉXICO, CD. MX.**

**ENERO 2020**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FES-ZARAGOZA

OFICIO CPCB/1275/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

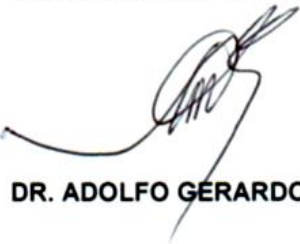
Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **07 de octubre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de (**Biología Experimental**) del estudiante **HERNÁNDEZ CORTÉS LOURDES MONTSERRAT** con número de cuenta **308265598** con la tesis titulada "**Efecto de los tratamientos a corto y mediano plazo del ácido ascórbico y del alfa-tocoferol sobre el daño oxidativo del ADN en ratones Hsd:ICR expuestos a cromo hexavalente**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
Vocal: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO  
Secretario: DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ  
Suplente: DRA. MARCELA ROJAS LEMUS  
Suplente: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 25 de noviembre de 2019

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



c. c. p. Expediente del alumno

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

*Al **Posgrado de Ciencias Biológicas**, UNAM, por permitirme realizar mis estudios de maestría y darme la oportunidad de iniciarme en la investigación científica y crecer académica y personalmente.*

*Al **CONACyT** (No. de becario 628896 / CVU 853736) por la beca recibida para desarrollar mi proyecto científico y al **PAEP** por el financiamiento brindado para participar en el congreso "49<sup>th</sup> Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS)" realizado en San Antonio, Texas, USA (2018).*

*A la DGAPA a través del **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la UNAM **IN219216** y **IN224719**. 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" y "Efecto de los polifenoles sobre la regulación del sistema antioxidante endógeno, la reparación del daño oxidante del ADN y las vías de inducción de apoptosis en ratones Hsd:ICR expuestos a Cr(VI)".*

*A la **Dra. María del Carmen García Rodríguez**, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación y de realizar este trabajo. Por motivarme para superarme profesionalmente e incrementar mi experiencia en la investigación. Por la paciencia y también por los regaños, pero sobre todo por tu amistad.*

*A mí comité tutorial, **Dra. Rocío Ortiz Muñoz** y la **Dra. Raquel Retana Ugalde**, a quienes agradezco sus comentarios, sugerencias y asesoría que me brindaron a lo largo de este proyecto. De igual forma agradezco a los miembros del jurado, **Dr. José Pedraza Chaverri**, **Dr. Mario Altamirano Lozano**, **Dra. Rocío Ortiz Muñoz**, **Dra. Marcela Rojas Lemus** y **Dr. Hugo López Muñoz** por sus valiosas aportaciones y correcciones durante la revisión de la tesis.*

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

*Dedico y agradezco, no sólo este trabajo, sino toda mi vida a mis padres, **Cirilo Cristobalito Hernández Martínez y Laura de la Soledad Cortés Romero**, por seguir siendo los pilares en mi vida, porque sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. Gracias por enseñarnos que la mejor herencia que nos podían dar es el estudio, porque nunca se rindieron para sacarnos adelante, al contrario, nos enseñaron que a pesar de las adversidades que se presenten en la vida podríamos salir adelante con esfuerzo, perseverancia y dedicación. Gracias por enseñarme a afrontar la vida con alegría, por su sabiduría y por ser un ejemplo de fortaleza y perseverancia. Su apoyo, enseñanzas y amor que siempre me dieron han hecho de mí lo que soy. No hay forma de agradecer todo lo que me dieron. Innegablemente cada paso que dé, cada proyecto realizado y cada meta cumplida les pertenece. Nunca me dejarán de hacer falta. Los amo infinitamente.*

*A mis hermanos:*

***Orlando**, gracias por ser de mis primeros maestros, porque desde que era una niña te has encargado de enseñarme tantas cosas y aún lo sigues haciendo, porque sé que tú y Laura hicieron y dejaron de hacer muchas cosas por ayudar a papá y mamá a sacarnos adelante con nuestros estudios. Porque siempre estás ahí para escucharme y darme algún consejo, gracias por motivarme a seguir estudiando y a superarme cada día.*

***Laura**, gracias por siempre estar al pendiente mí ya sea escuchándome o con un desayuno después de mis desveladas, por tu comprensión, amor maternal, por ser mi cómplice y por darme ánimos para seguir adelante y dar un poco más de mí. Gracias por los sacrificios que hicieron. Porque sé que siempre podré contar contigo.*

***Brenda**, por ser mi compañera, cómplice y amiga, a pesar de que a veces tengamos formas diferentes de ver las cosas sé que siempre me apoyas. Por acompañarme durante mis desveladas con tus pláticas sin fin, aunque te ganara el sueño después y por escucharme en algunos de mis ensayos. Porque siempre tienes una sonrisa que compartir en mis momentos tristes.*

A **Saúl**, mi sobrino consentido, porque siempre iluminas y alegras mis días con tu sonrisa y ocurrencias que tienes, a pesar de tus casi 5 años que tienes me has enseñado a que a veces no hay que darles tanta importancia a las cosas, porque tú me impulsas a sacar la mejor versión de mí. Te amo mi niño hermoso.

Los amo mucho familia muégano, 6 ∞

A mi **familia paterna y materna**, tíos, primos y sobrinos, porque no sólo es el parentesco lo que nos une, sino cada momento que hemos compartido juntos, los más difíciles y también los más felices, porque siempre me ha apoyado y han estado al pendiente de mí, por el cariño que siempre me brindan. Los quiero mucho.

A **Fany**, por compartir conmigo esta etapa y por permitirme conocerte mejor, por todas las aventuras que pasamos durante esta etapa, dentro y fuera del laboratorio. Gracias por tu amistad y por estar en los momentos más difíciles. Te quiero mucho.

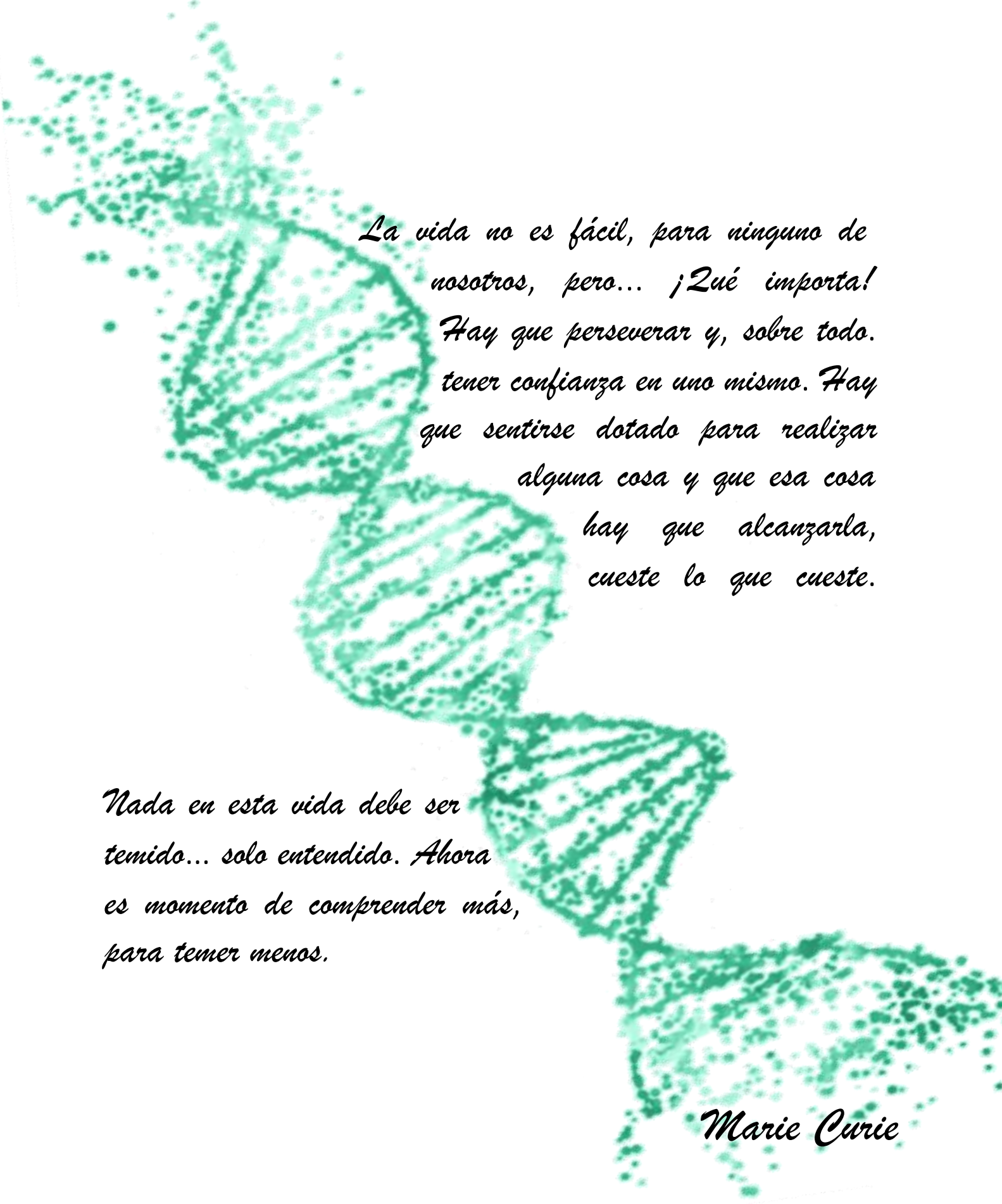
A **Tona**, porque contigo comencé esta etapa, gracias por siempre creer y ayudarme a creer en mí, por decirme lo que pensabas. Gracias por las risas, regaños y también por brindarme tu apoyo en mis peores momentos. Te quiero mucho.

A **Andrea, María, Shirley, Brenda, Janet, Mariana, Javier, Noé, Rodrigo, Gaby Serrano y Rosita**, gracias por todos los momentos (buenos y otros no tanto) que he compartido con cada uno de ustedes en las diferentes etapas de mi vida, momentos que atesoro con gran cariño, porque a pesar de la distancia y el tiempo seguimos teniendo una gran amistad y siempre están ahí con algún mensaje o llamada, valoro mucho su amistad. Los quiero mucho a cada uno de ustedes.

A los integrantes del laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis, **Gaby, Gris, Manuel y Thelma**, gracias por compartir y hacer más amenas las tantas horas de trabajo, por su apoyo durante los experimentos, aun cuando ya se habían titulado. Gracias por su amistad.

Y por último y no menos importante agradezco a **Maricela Cabrera** y a la **Mtra. Isabel de Jesús Herrera** por la paciencia que me han tenido, el apoyo que me han brindado y las pláticas en los momentos más adversos.





*La vida no es fácil, para ninguno de nosotros, pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.*

*Nada en esta vida debe ser temido... solo entendido. Ahora es momento de comprender más, para temer menos.*

*Marie Curie*

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

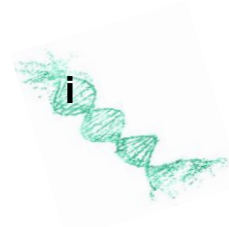
# Índice

	Pág.
Índice de abreviaturas .....	i
Resumen .....	iv
Abstract .....	vi
1. Introducción.....	1
1.1. Genotoxicidad .....	1
1.2. Estrés oxidante .....	2
1.3. Especies reactivas de oxígeno y radicales libres.....	3
1.4. Metales y estrés oxidante .....	3
1.4.1. Cromo.....	5
1.5. Evaluación del daño genotóxico .....	8
1.5.1. Ensayo de micronúcleos.....	8
1.5.2. Apoptosis y necrosis.....	9
1.5.3. 8-hidroxi-2'deoxiguanosina .....	11
1.6. Antioxidantes .....	11
1.6.1. Ácido ascórbico .....	13
1.6.2. $\alpha$ -tocoferol.....	15
2. Planteamiento del problema.....	18
3. Hipótesis.....	18
4. Objetivos .....	19
4.1. Objetivo general.....	19
4.2. Objetivos particulares.....	19
5. Material y método.....	20
5.1. Animales .....	20
5.2. Reactivos .....	20
5.3. Tratamientos .....	21
5.4. Ensayo de MN .....	24
5.5. Evaluación de viabilidad y muerte celular .....	24
5.6. Determinación del 8-OHdG.....	25

5.7. Determinación de la capacidad antioxidante total.....	25
5.8. Determinación de la concentración intracelular de glutatión total .....	25
5.9. Análisis estadístico.....	26
6. Resultados .....	27
6.1. Peso de los ratones tratados con AA, $\alpha$ -TOH y $\text{CrO}_3$ .....	27
6.2. Consumo de líquidos de los ratones tratados con AA, $\alpha$ -TOH y $\text{CrO}_3$ .....	28
6.3. Consumo de alimento de los ratones tratados con AA, $\alpha$ -TOH y $\text{CrO}_3$ .....	29
6.4. Evaluación de MN .....	30
6.5. Evaluación de apoptosis y necrosis .....	36
6.6. Evaluación de la relación EPC/ENC y de la viabilidad celular .....	40
6.7. Capacidad antioxidante total.....	43
6.8. Niveles de glutatión total .....	44
6.9. Niveles de 8-OHdG .....	46
7. Discusión.....	51
8. Resumen de resultados.....	62
9. Conclusiones y comentarios finales .....	63
10.Referencias bibliográficas .....	64
11.Anexos .....	77
Anexo 1 .....	77
Anexo 2.....	78
Anexo 3.....	79
Anexo 4.....	80
Anexo 5.....	81

## Índice de abreviaturas

$\cdot\text{O}_2^-$	Radical anión superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
8-OHdG	8-hidroxi-2'deoxiguanosina
8-OHdG-AChE	8-OHdG-acetilcolinesterasa
8-oxo-Gua	8-oxo-7,8-dihidroguanina
A $\cdot$	Radical ascorbilo
AA	Ácido ascórbico
ABTS	3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANDEVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
Bcl2	"B-cell lymphoma 2"
BER	Reparación por escisión de bases
BrEt	Bromuro de etidio
CAT	Catalasa
Cr	Cromo
Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(IV)	Cromo tetravalente
Cr(V)	Cromo pentavalente
Cr(VI)	Cromo hexavalente
CrO <sub>3</sub>	Trióxido de cromo
DHA	Ácido dehidroascórbico
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico; reactivo Ellman



ECETOC	“European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
ELISA	“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”
ENC	Eritrocito normocromático
EOx	Estrés oxidante
EPA	“Environmental Protection Agency”
EPC	Eritrocito policromático
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FDA	“Food and Drugs Administration”
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GS•	Glutación tiilo
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
i.g.	Intragástrica
i.p.	Intraperitoneal
LD <sub>50</sub>	Dosis Letal 50
LOO•	Radical lipo-peroxilo
LOOH	Lipoperóxido
MN	Micronúcleo
NA	Naranja de acridina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
OECD	“Organization for Economic Cooperation and Development”
PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Fosfato



RL	Radical libre
ROO•	Radicales peroxilo
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	Sulfato
SOD	Superóxido dismutasa
TNB	ácido 2-nitro-5-tiobenzoico
TrxR	Tiorredoxina reductasa
UI	Unidades Internacionales
UV	Ultravioleta
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentóxido de vanadio



## Resumen

Se ha propuesto que el daño genotóxico y citotóxico inducido por los compuestos de Cr(VI) es en parte producido por el estrés oxidante generado durante su reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III). De ahí que la eliminación de las moléculas reactivas podría representar una estrategia importante en el proceso de antigenotoxicidad. Particularmente, se ha observado que los tratamientos agudos del ácido ascórbico (AA) y del alfa-tocoferol ( $\alpha$ -TOH) administrados por vía intraperitoneal (i.p.) e intragástrica (i.g.) respectivamente, tienen efectos protectores parciales contra el daño genotóxico inducido por metales como el  $V_2O_5$  y  $CrO_3$ . Recientemente, se ha planteado que los tratamientos con antioxidantes por tiempos prolongados pueden mejorar su efecto protector, por ello, es de interés investigar si el efecto protector del AA y  $\alpha$ -TOH sobre el daño oxidante del ADN en ratones expuestos a Cr(VI) se incrementa al prolongar los tiempos de tratamientos (corto y mediano plazo) por vía oral y, dado que aún no están bien establecidas las posibles vías de protección también es de interés estudiarlas simultáneamente. Grupos de cinco ratones Hsd:ICR fueron tratados durante 10 días (corto plazo) o 26 días (mediano plazo) con: a) vehículo (agua potable estéril o aceite de maíz para compuestos liposolubles); b) 100 mg/kg de AA vía oral *ad libitum*; c) 20 mg/kg de  $\alpha$ -TOH vía oral *ad libitum*; d) 20 mg/kg de  $CrO_3$  i.p.; e) 100 mg/kg de AA previo al tratamiento de 20 mg/kg de  $CrO_3$ ; f) 20 mg/kg de  $\alpha$ -TOH previo al tratamiento de 20 mg/kg de  $CrO_3$ . Las evaluaciones para micronúcleos (MN) y la relación entre eritrocitos policromáticos y normocromáticos (EPC/ENC), se realizaron con muestras de sangre periférica tomadas de la vena caudal los días 0, 4, 6, 8 y 10 del tratamiento a corto plazo y los días 0, 12, 22, 24 y 26 del tratamiento a mediano plazo. Las evaluaciones de apoptosis, viabilidad celular, niveles 8-hidroxi-2'deoxiguanosina (8-OHdG) y niveles de antioxidantes endógenos se realizaron el día 8 del tratamiento a corto plazo y 24 del tratamiento a mediano plazo. Se corroboró el daño genotóxico y citotóxico del  $CrO_3$ , ya que se incrementó significativamente el promedio de MN, los niveles de 8-OHdG, las células apoptóticas y necróticas, además de que se modificó la relación EPC/ENC y disminuyó la viabilidad celular. En contraparte, los tratamientos a corto y mediano plazo con AA o  $\alpha$ -TOH, no indujeron daño genotóxico ni citotóxico. Con el tratamiento de AA previo al  $CrO_3$  se redujeron los promedios de MN (tratamiento a corto plazo y mediano





plazo; 80 y 70%, respectivamente), mientras que, en el tratamiento con  $\alpha$ -TOH previo al  $\text{CrO}_3$ , se observó una menor disminución en el tratamiento a corto y mediano plazo (43 y 57%, respectivamente). De igual manera, los niveles de 8-OHdG se restablecieron en estos grupos y se observó una disminución significativa en las células apoptóticas y necróticas en comparación con el grupo tratado sólo con  $\text{CrO}_3$ . Por otra parte, la administración de  $\text{CrO}_3$  no tuvo efecto sobre la capacidad antioxidante total, sin embargo, reduce significativamente los niveles de glutatión total. Los tratamientos solos con AA o  $\alpha$ -TOH presentaron efectos sobre los niveles de glutatión total; AA a mediano plazo los disminuye y  $\alpha$ -TOH los incrementó tanto a corto como a mediano plazo. Por el contrario, los grupos combinados a corto y mediano plazo incrementaron la capacidad antioxidante total y los niveles de glutatión total. Se encontró que los tratamientos de AA y  $\alpha$ -TOH, a corto y mediano plazo, protegen del daño genotóxico y citotóxico inducido por el  $\text{CrO}_3$ . La vía de protección del daño genotóxico podría deberse a la neutralización directa del  $\bullet\text{OH}$  o indirecta mediante la modulación del sistema antioxidante endógeno que inhibió su formación, ya que no se incrementaron los niveles del aducto 8-OHdG y los promedios de células apoptóticas cuando se administraron los tratamientos de AA y del  $\alpha$ -TOH previo al tratamiento con el  $\text{CrO}_3$ . El tratamiento de AA a corto plazo tuvo una mayor eficacia en la protección del daño genotóxico y citotóxico inducido por el  $\text{CrO}_3$ . Además de que, los tratamientos a corto y mediano plazo mostraron una mayor protección que lo reportado para los tratamientos agudos.



## Abstract

It has been proposed that the genotoxic and cytotoxic damage induced by Cr(VI) compounds is partly due to the oxidative stress generated during their intracellular reduction from Cr(VI) to Cr(III). Hence, the removal of reactive molecules could represent an important strategy in the antigenotoxicity process. Particularly, it has been observed that acute treatments of ascorbic acid (AA) and alpha-tocopherol ( $\alpha$ -TOH) administered intraperitoneally (i.p.) and intragastrically (i.g.) respectively, have partial protective effects against metal-induced genotoxic damage heavy as  $V_2O_5$  and  $CrO_3$ . Recently, it has been suggested that long-term antioxidant treatments may improve its effect, therefore, it is of interest to investigate whether the protective effect of AA and  $\alpha$ -TOH on oxidative DNA damage in mice exposed to Cr(VI) is increased by prolonging treatment times (short and medium terms) orally, and since the possible routes of protection are not yet well established it is also of interest to study them simultaneously. Groups of five Hsd:ICR mice were treated for 10 days (short-term) or 26 days (medium-term) with: a) vehicle (sterile drinking water or corn oil for hydrophobic compounds); b) 100 mg/kg AA orally *ad libitum*; c) 20 mg/kg of  $\alpha$ -TOH orally *ad libitum*; d) 20 mg/kg of  $CrO_3$  i.p.; e) 100 mg/kg of AA prior to the treatment of 20 mg/kg of  $CrO_3$ ; f) 20 mg/kg of  $\alpha$ -TOH prior to the treatment of 20 mg/kg of  $CrO_3$ . Evaluations for micronuclei (MN) and the relationship between polychromatic and normochromatic erythrocytes (PCE/NCE) were performed with peripheral blood samples taken from the caudal vein on days 0, 4, 6, 8 and 10 of short-term treatment and on days 0, 12, 22, 24 and 26 of the medium-term treatment. Evaluations of apoptosis, cell viability, 8-hydroxy-2'deoxyguanosine levels (8-OHdG) and endogenous antioxidant levels were performed on day 8 for the short-term treatment and 24 for the medium-term treatment. The genotoxic and cytotoxic damage of  $CrO_3$  was corroborated, as the average of MN, 8-OHdG levels, apoptotic and necrotic cells were significantly increased, in addition the PCE/NCE ratio was modified and cell viability was decreased. In contrast, short- and medium-term treatments with AA or  $\alpha$ -TOH do not induce genotoxic or cytotoxic damage. The treatment of AA prior to  $CrO_3$  reduces the averages of MN (short-term and medium-term treatment; 80 and 70%, respectively), and, in the treatment with  $\alpha$ -TOH prior to  $CrO_3$ , a lower decrease in the short- and medium-term treatment was observed (43 and 57% respectively). Similarly, 8-OHdG levels were



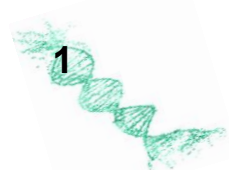
restored in these groups and a significant decrease was observed in apoptotic and necrotic cells compared with the group treated only with CrO<sub>3</sub>. On the other hand, the administration of CrO<sub>3</sub> had no effect on the total antioxidant capacity, however, it significantly reduced total glutathione levels. The treatments alone with AA or α-TOH had effects on total glutathione levels; medium-term AA decreases them and α-TOH increased them both in the short- and medium-term. In contrast, the combined groups in the short- and medium-term increased total antioxidant capacity and total glutathione levels. It was found that AA and α-TOH treatments, in the short- and medium-term, protect against genotoxic and cytotoxic damage induced by CrO<sub>3</sub>. The path of protection of genotoxic damage could be due to the direct neutralization of •OH or indirectly by modulating the endogenous antioxidant system that inhibited its formation, since the levels of the 8-OHdG adduct and apoptotic cell averages were not increased when administered the treatments of AA and α-TOH prior to treatment with CrO<sub>3</sub>. The short-term treatment of AA was more effective in protecting genotoxic and cytotoxic damage induced by CrO<sub>3</sub>. In addition to that, short- and medium-term treatments showed greater protection compared to those reported for acute treatments.

## 1. Introducción

El crecimiento demográfico, la industria y las nuevas tecnologías han provocado el incremento en la producción y emisión de contaminantes como los metales. Uno de los mecanismos propuestos de daño genotóxico de los metales es mediante estrés oxidante (EOx) (EPA, 1998; Valko *et al.* 2006). De ahí que la eliminación de las moléculas reactivas podría representar una estrategia importante en el proceso de antigenotoxicidad (García-Rodríguez *et al.* 2012b). Particularmente, el ácido ascórbico (AA) y el  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH) presentan un alto potencial antioxidante (Zhou *et al.* 2005). Se ha observado que los tratamientos agudos de AA (intraperitoneal; i.p.) y  $\alpha$ -TOH (vía intragástrica; i.g.) disminuyen el daño genotóxico inducido por metales como pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) y trióxido de cromo ( $CrO_3$ ) (García-Rodríguez *et al.* 2015; García-Rodríguez *et al.* 2016). Además, se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes por tiempos prolongados puede mejorar su efecto. Por ello resulta de interés estudiar si el efecto protector del AA y  $\alpha$ -TOH es más eficiente al administrar tratamientos más prolongados (corto y mediano plazo) por vía oral. De igual manera, debido a que aún no se han esclarecido las posibles vías de protección de estos compuestos sobre el daño genotóxico y citotóxico inducidos por los compuestos de Cr(VI), es también de interés explorarlos.

### 1.1. Genotoxicidad

El término genotoxicidad es empleado para referir la capacidad de los compuestos para afectar la estructura del ADN o componentes celulares responsables de regular la fidelidad del genoma. A los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética se les llama genotóxicos y pueden ser de origen físico, químico o biológico. De acuerdo con su modo de acción o efecto se les puede clasificar como mutágenos, carcinógenos o teratógenos, capaces de inducir cambios permanentes en el material genético, lo cual puede conducir a cambios heredables en su función. La acción o capacidad de inducir daño, de estos genotóxicos, depende de la dosis recibida, el tiempo, vía de exposición, la distribución y de la retención, así como de la eficiencia de los sistemas de activación metabólica, de



desintoxicación y reactividad de la sustancia con macromoléculas de las células (Abrevaya, 2008; Hernández-Rincón, 2010).

La respuesta celular al daño en el ADN es fundamental para su supervivencia. Una vez reconocido el daño, se inician determinados procesos de señalización que desencadenan los primeros pasos para reparar el daño antes de la replicación o la segregación de los cromosomas, ya que, de no ser el caso, se puede fijar el daño y por lo tanto conducir a mutaciones (Giono y Nieto, 2016). Esta respuesta depende del tipo celular, la intensidad, duración y naturaleza del daño recibido (Harper y Elledge, 2007).

## 1.2. Estrés oxidante

Los organismos aeróbicos obtienen la mayor parte de su energía a partir de reacciones de oxidación, sin embargo, cuando existe un exceso de estas reacciones se puede generar el EOx (Ramos *et al.* 2006). El EOx se define como el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, lo que lleva a una interrupción de la señalización y control redox o daño molecular, que puede provocar daño oxidante a las macromoléculas (lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos) y alterar los procesos celulares (Jones, 2006; Sies y Jones, 2007). El EOx se puede producir durante las reacciones metabólicas normales del organismo, mientras las células del organismo obtienen energía, así como también por la exposición a situaciones de hipoxia, ejercicio intenso, isquemia, radiaciones ionizantes, contaminación ambiental, metales (como los compuestos de cromo), entre otros (Avello y Suwalsky, 2006; Pisoschi y Pop, 2015).

Se ha demostrado que en las células con EOx se genera daño directamente en el ADN por el incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs) y radicales libres (RL) que interactúan con el material genético, e indirectamente, mediante alteraciones en los componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad de los cromosomas. Dentro de los daños que inducen las EROs se encuentra el daño al ADN, que, de no ser reparado, puede producir consecuencias biológicas como mutaciones, envejecimiento celular, carcinogénesis e incluso puede llevar a la muerte celular (Klauning y Kamendulis, 2004, Wang *et al.* 2015).



### 1.3. Especies reactivas de oxígeno y radicales libres

El oxígeno es un compuesto esencial en el metabolismo de todos los organismos aerobios, ya que participa en diversas reacciones de oxidación, incluyendo la respiración celular. En los procesos biológicos en los que se encuentra involucrado el oxígeno molecular ( $O_2$ ), el cual se reduce, dando origen a las llamadas EROs (Valko *et al.* 2007; Page *et al.* 2010). El término “EROs” se les da a aquellas especies que son agentes oxidantes, y pueden o no ser fácilmente convertidos a radicales, por lo que las EROs incluye a radicales y no radicales. Estas moléculas poseen al menos un electrón de mayor contenido energético que el correspondiente en su estado fundamental, lo que las hace moléculas oxidantes que pueden generar RL (Valko *et al.* 2007). Las EROs pueden producirse durante las reacciones metabólicas endógenas de las células aeróbicas, tales como el radical anión superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y radicales peroxilo ( $ROO\cdot$ ), como productos de la reducción biológica del  $O_2$  (Page *et al.* 2010). Si bien nuestro propio cuerpo produce EROs en cantidades moderadas, las EROs pueden incrementarse por fuentes exógenas como tabaco, antibióticos, drogas, alcohol, estrés, contaminantes, metales, quimioterapia y exposición a radiación ultravioleta (UV) e ionizante (Chehue *et al.* 2013).

Por otra parte, los RL son especies químicas que contienen un electrón no apareado en su órbita externa, esta característica los hace sumamente reactivos y capaces de provocar una reacción en cadena que causa daño oxidante a las distintas estructuras celulares. Particularmente, los RL derivados del oxígeno son altamente tóxicos y son capaces de reaccionar con diversas moléculas orgánicas, lo que provoca alteraciones estructurales, que a su vez conducen a alteraciones funcionales que afectan la fisiología de las células (Halliwell y Gutteridge, 1999; Valko *et al.* 2007).

### 1.4. Metales y estrés oxidante

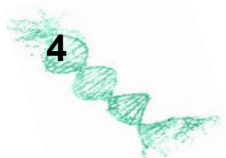
Los metales son componentes naturales inmersos en la corteza terrestre y están presentes en el ambiente debido tanto a fuentes naturales como antropogénicas. Algunos de los metales son micronutrientes esenciales para algunos seres vivos, como son el



hierro, cadmio, zinc, arsénico, vanadio, cobre, cromo, entre otros (Friberg *et al.* 1990; EPA, 1998). Aunque es mayor la exposición a estos agentes en la actividad industrial, la población en general también entra en contacto con estos agentes mediante el agua, los alimentos y el aire, de manera que afectan las funciones biológicas importantes (Sullivan y Krieger, 2001; Beyersmann y Hartwing, 2008). Es por lo que la contaminación por metales es considerada un problema de salud ambiental, ya que la gravedad tóxica de estos elementos se debe a su capacidad de bioacumularse y a la facilidad con que reaccionan con moléculas orgánicas, específicamente con sus grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo (Zarei *et al.* 2013). El resultado de estas uniones ocasiona principalmente alteración metabólica, incremento de EOX y genotoxicidad, dependiendo de las dosis absorbidas, así como la vía de exposición y la naturaleza química del metal (Newman e Intosh, 1991; Navarro-Aviñó *et al.* 2007). Además, la formación de RL mediada por metales puede causar diversas modificaciones a las bases de ADN (Valko *et al.* 2006).

Aunque la principal fuente endógena de generación de EROs es mediante la respiración celular, los metales son también fuentes importantes de EROs. Los estudios se han centrado en la dilucidación de los mecanismos implicados en la toxicidad y la carcinogenicidad inducida por metales, demostrando que los metales como el Cr desempeñan un papel fundamental en la generación de EROs y EOX en sistemas biológicos (Matés *et al.* 2010; Jomova y Valko, 2011). Se ha demostrado que el Cr induce apoptosis mediante la generación de EROs, acumulación de calcio y desregulación de Bcl-2 (Rana, 2008).

La toxicidad y el comportamiento oxidante de los metales en las células están determinadas por la reacción química de Fenton y el ciclo de Haber-Weiss, en las que participan el  $\bullet\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la formación del  $\bullet\text{OH}$  (Figura 1) (Valko *et al.* 2005).



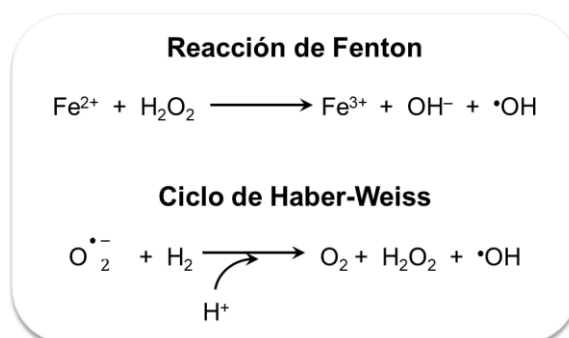


Figura 1. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss.

### 1.4.1. Cromo

El Cr y sus compuestos se usan ampliamente en la industria para la producción de acero inoxidable, cromado y pintura en aerosol. Los efectos en la salud, la toxicidad y la carcinogenicidad de Cr se relacionan principalmente con su estado de oxidación en el momento de la exposición. Ya que el Cr presenta distintos estados de oxidación, de los cuales el cromo trivalente [Cr(III)] y el cromo hexavalente [Cr(VI)] son los más estables y sus compuestos son los de mayor importancia biológica. La forma trivalente es necesaria para los humanos en bajas concentraciones para el metabolismo de los azúcares y otros carbohidratos. Es inocuo debido a su baja permeabilidad en las membranas celulares y a que no es corrosivo (Valko *et al.* 2005). La deficiencia de Cr(III) en los seres humanos se ha asociado con enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Hummel *et al.* 2007; Holmes *et al.* 2008). Por el contrario, los compuestos del Cr(VI) son conocidos por ser tóxicos, genotóxicos y cancerígenos. Debido a que son utilizados ampliamente en la industria, representan una amenaza para la salud humana (OSHA, 2006; Myers, 2012).

Los compuestos de Cr(VI) tienen la capacidad de entrar en las células y atravesar la membrana celular por canales aniónicos no específicos, debido a su similitud estructural con aniones como  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{2-}$  (Castillo *et al.* 2002). Al entrar, el Cr(VI) se reduce por reductores celulares tales como glutatión (GSH), ascorbato y NADPH, a sus estados de oxidación más bajos, Cr(V), Cr(IV) y Cr(III) (Shi *et al.* 1999). Estos estados intermedios de Cr son reactivos y participan en la producción de EROs, y causan varios tipos de daño oxidante al ADN, tales como la modificación de bases, rupturas de una sola hebra, enlaces cruzados entre ADN y ADN, enlaces cruzados entre ADN y proteínas, aductos



de ADN, y cambios oxidantes de nucleótidos, así como aberraciones cromosómicas y peroxidación lipídica (Shi y Dalal, 1990, Ding y Shi, 2002, Nickens *et al.* 2010). Por lo que el proceso clave involucrado en la carcinogenicidad mediada por Cr es la reducción de Cr(VI) a Cr(III) por reductores celulares (Figura 2). Hay informes que demuestran que Cr(VI) induce la muerte celular por EOX (Son *et al.* 2011; Wang X *et al.* 2011)

Por su parte, el Cr(III) tiene gran afinidad con las bases y fosfatos de la cadena de ADN y puede formar aductos de ADN-Cr, así como entrecruzamientos e interacción con proteínas (O'Brien *et al.* 2003). Además del daño genotóxico que se genera por la interacción directa del Cr(III) con el ADN, la exposición a Cr(VI) también puede desencadenar la generación de EROs, como el radical glutatión tiilo ( $GS^{\bullet}$ ) y otras EROs que se generan a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. El Cr(V) y el Cr(IV) son intermediarios reactivos de la reducción de Cr(VI) que participan en reacciones Fenton y generan  $\bullet OH$ , el cual es altamente reactivo y capaz de dañar al ADN. La generación de  $\bullet OH$  también puede darse por reacciones Haber-Weiss en la que el Cr(VI) es reducido por  $\bullet O_2^-$  para generar Cr(V), éste a su vez reacciona con  $H_2O_2$  para producir el  $\bullet OH$  y generar nuevamente Cr(VI). Por lo anterior, se ha planteado que el principal mecanismo de inducción del daño genotóxico del Cr(VI), es la producción de EROs incluyendo los RL que interaccionan con el ADN (Shi y Dalal, 1990; O'Brien *et al.* 2003).

Las poblaciones humanas se encuentran expuestas principalmente a Cr(III) y Cr(VI), a través del agua, aire, consumo de alimentos o suplementos alimenticios contaminados (Nickens *et al.* 2010). La exposición a Cr(VI) está relacionada con el ambiente ocupacional y por las emisiones de los automóviles y el humo de los cigarrillos. Se ha estimado el aire urbano contiene concentraciones de cromo de 0 a 30  $ng/m^3$  y los cigarrillos producidos en Estados Unidos contienen Cr en cantidades de entre 0.24 y 6.3 mg Cr/kg y como consecuencia de fumar, la concentración de Cr puede ser de 10 a 400 veces más que el aire libre (IARC, 1997; ATSDR, 2008). Por otra parte, el límite de exposición ocupacional permisible en México en una jornada laboral de 8 horas es de 10  $\mu g/m^3$  [Cr(VI) insoluble] y 50  $\mu g/m^3$  [Cr(VI) soluble] (OSHA, 2013).



La exposición a Cr(VI) se relaciona con un alto riesgo de enfermedades respiratorias, irritación de ojos, nariz y garganta, gastritis, dermatitis y cáncer de pulmón y nasal (OSHA, 2013). Particularmente la exposición ocupacional a CrO<sub>3</sub> produce irritación nasal y atrofia de la mucosa, además de una disminución en la función pulmonar (ATSDR, 2008; Nickens et al. 2010).

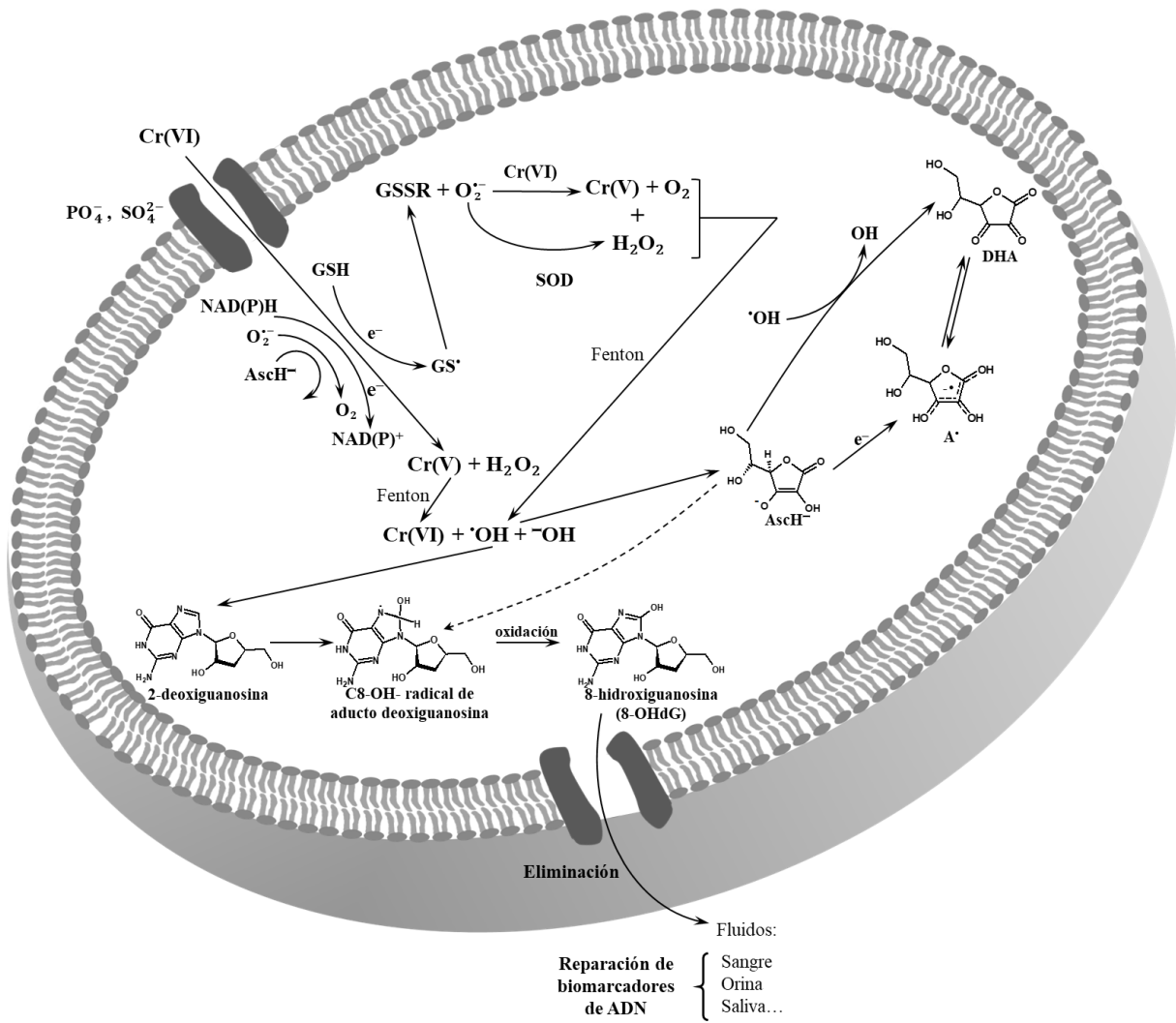


Figura 2. Metabolismo y genotoxicidad del cromo (Modificado de García-Rodríguez et al. 2017).

## 1.5. Evaluación del daño genotóxico

La inducción de daño genotóxico por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se lleva a cabo en varias etapas; ingreso, absorción, distribución y efecto en “blanco”. Una vez dentro de la célula puede inducir daño directo o indirecto mediante la activación de enzimas (Ames, 1989). Las pruebas de genotoxicidad no sólo son indispensables para evaluar agentes genotóxicos y sus mecanismos inductores de daño, sino también para evaluar sustancias con propiedades protectoras o moduladoras de daño al ADN (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2006).

Los principales ensayos recomendados para evaluar daño genotóxico son: a) ensayos para evaluar mutaciones (bacterias; prueba de Ames), b) ensayos *in vitro*, para evaluar daño cromosómico (frecuencia de aberraciones cromosómicas; células de mamífero) y c) ensayos *in vivo* (médula ósea o sangre periférica; frecuencia de micronúcleos (MN) (Mavournin, 1990; Krishna y Hayashi, 2000; Müller *et al.* 1996).

### 1.5.1. Ensayo de micronúcleos

Los MN son cuerpos que están en el citoplasma y que contienen ya sea un cromosoma o parte de un cromosoma, que durante la división celular no se unieron al núcleo de la célula hija (Khrisna y Hayashi, 2000).

Los MN se pueden originar por alguno de estos eventos:

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



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

Cuando los eritrocitos policromáticos o jóvenes (EPC) son expulsados de la medula ósea, el núcleo queda extruido y si un MN se ha formado, permanece en el citoplasma. Estos eritrocitos aún contienen ARN y son basófilos, lo que los diferencia fácilmente de los eritrocitos normocromáticos o maduros (ENC) en los que se ha degradado el ARN y son acidófilos (Hayashi *et al.* 1990).

El ensayo de MN es una de las técnicas más adecuadas para identificar la respuesta integrada a la compleja mezcla de contaminantes y es un índice valioso para la detección de daño genético acumulado durante la vida de las células (Bolognesi y Hayashi, 2011). Se caracteriza por su simplicidad, fiabilidad, sensibilidad y rapidez. Además, es ampliamente utilizado para detectar la genotoxicidad de contaminantes, tanto clastogénicos como aneugénicos y para evaluar las aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (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, la presencia de MN indica un daño cromosómico, pero no distingue el tipo, ni qué cromosomas estuvieron involucrados (Hayashi *et al.* 2000).

### 1.5.2. Apoptosis y necrosis

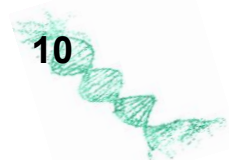
La muerte celular en los tejidos de los organismos es un evento natural y no produce alteraciones de las funciones, por el contrario, la cantidad de células en los diferentes tejidos está determinada por un balance homeostático entre la proliferación de las células nuevas y la muerte de las células no funcionales. Por lo que, el equilibrio entre la proliferación y la muerte es fundamental para mantener el correcto funcionamiento de los tejidos. Existen diversos tipos de muerte celular, siendo las más comunes y estudiadas la apoptosis y necrosis, la necrosis se produce como consecuencia de una lesión celular masiva y la apoptosis es un mecanismo controlado de muerte celular (Elena, 2002; Degterev y Yuan, 2008).



La apoptosis es el tipo de muerte celular programada que regula el desarrollo normal y la homeostasis de los organismos multicelulares. Uno de sus propósitos es la auto-“eliminación” de células dañadas o senescentes (Norbury y Hickson, 2001). Este proceso implica consumo de ATP, debido a las cascadas de señalización, mediado principalmente por caspasas. Los cambios morfológicos característicos de la apoptosis son: la condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo y del ADN, dando origen a los cuerpos apoptóticos que contienen material celular degradado (Ramírez y Rojas, 2010). Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el inicio y desarrollo de la apoptosis son variados, y dependen de un estímulo inicial, como la respuesta al estrés celular ocasionado por la exposición a compuestos tóxicos (Robertson y Orrenuis, 2000).

Por su parte, la necrosis ocurre de manera aguda, de forma no fisiológica, mediante una agresión que causa lesión en una porción importante del tejido. Este proceso es desencadenado por toxinas, hipoxia severa, agresión masiva y cualquier otra condición que genere disminución de ATP (Elena, 2002). En este proceso se crean cambios histológicos, debido a que hay ganancia de volumen celular, como la desorganización y lisis del citoplasma, con dilatación del retículo endoplasmático y las mitocondrias, disolución de la cromatina y pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática, por lo que hay salida del material intracelular. El ADN es fragmentado al azar. Debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular, el contenido del citoplasma es vertido al espacio extracelular, se genera el proceso de inflamación, en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitosis (Elena, 2002; Ramírez y Rojas, 2010).

El análisis de la muerte celular puede ser llevado a cabo en sistemas *in vivo* e *in vitro*. Existen varios métodos que permiten la adecuada diferenciación entre la muerte por apoptosis y necrosis (Allen *et al.* 1997). Uno de ellos es el método por tinción diferencial con los fluorocromos naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BrEt). El colorante NA tiene la capacidad de introducirse a las células, tanto viables, como no viables obteniendo una fluorescencia verde al intercalarse dentro del ADN, o bien, una fluorescencia roja-naranja si se une al ARN. El BrEt se introduce únicamente a las células no viables debido a la pérdida de integridad de la membrana plasmática, de tal manera que puede intercalarse en el ADN dando una fluorescencia roja (Baskic *et al.* 2006).



### 1.5.3. 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

El  $\cdot\text{OH}$  puede causar la hidroxilación de residuos de desoxiguanosina en el ADN, que, a su vez, causa transversiones del nucleótido guanina por timina durante la replicación, dando como resultado la formación de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) (Evans *et al.* 2004). El 8-OHdG es una de las lesiones que más ha llamado la atención debido a su gran potencial mutagénico y a que es frecuentemente encontrada en ciertos tipos de cáncer en humanos (Hollstein *et al.* 1996; Evans *et al.* 2004). El 8-OHdG es posteriormente eliminado por escisión de bases y excretado por la orina, saliva y plasma en donde es frecuentemente medido, lo que hace del 8-OHdG uno de los marcadores de daño oxidante al ADN más utilizado (Evans *et al.* 2004). Diversos estudios han demostrado que la 8-OHdG se puede utilizar como biomarcador para evaluar el daño oxidante al ADN, causado por RL *in vivo* e *in vitro*. El daño oxidante a la guanina puede medirse directamente como aducto en el ADN (8-oxo-Gua; 8-oxo-7,8-dihidroguanina) o como 8-OHdG en la sangre, plasma y saliva cuando la lesión ya fue reparada, mediante técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) así como por métodos inmunoquímicos (Marnett, 2000; Ock *et al.* 2012).

## 1.6. Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que pueden retrasar o prevenir la oxidación de un sustrato, ya que tienen la capacidad de detener los efectos de la actividad de las EROs, mediante la donación de un electrón o átomos de hidrogeno a la sustancia oxidante (Godic *et al.* 2014; Siti *et al.* 2015). La función antioxidante implica reducir el EOX, el daño al ADN, así como otros parámetros de daño celular. Además, los antioxidantes pueden actuar al prevenir la formación de EROs, interceptar el ataque de EROs, secuestrar los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas, amplificar la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de EROs, facilitar la reparación del daño causado por EROs, por último, mantener un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 1995; Pisoschi y Pop, 2015). De acuerdo con varios criterios de clasificación, los antioxidantes pueden ser enzimáticos o



no enzimáticos, preventivos o de reparación, primarios o secundarios, hidrosolubles o liposolubles, naturales o sintéticos, endógenos o exógenos (Pisoschi y Pop, 2015).

El sistema de defensa antioxidantes enzimático incluye a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la tioredoxina reductasa (TrxR) y la glutatión reductasa (GR) (Robbins y Zhao, 2011). La SOD es una de las enzimas que participan en la transformación de EROs, cataliza la transformación del  $\bullet\text{O}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y se encuentra en el citosol y en la matriz mitocondrial. Por su parte la GPx, que también se encuentra en el citosol y en las mitocondrias, cataliza la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y lipoperóxidos (LOOH) y utiliza a GSH como agente reductor, transformándolo a su forma oxidada (GSSG). La CAT se localiza predominantemente en los peroxisomas, donde el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se genera a una velocidad relativamente alta. Esta enzima cataliza la conversión de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y  $\text{O}_2$  (Forman *et al.* 2009; Rizzo *et al.* 2010).

El sistema de antioxidantes no enzimático está determinado por una serie de compuestos llamados depuradores de RL, los cuales intervienen y retrasan la producción y acción de los RL. Algunos de estos antioxidantes son el GSH, ácido lipoico, la bilirrubina, las ubiquinonas, los flavonoides, el  $\alpha$ -TOH, el AA, el  $\beta$ -caroteno, entre otros (Lademann *et al.* 2011). El GSH, es un tripéptido formado por los de residuos de aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys), es el tiol no proteico más abundante a nivel intracelular, y se encuentra principalmente en las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el núcleo (Martínez-Sarrasague *et al.* 2006). El GSH interviene en la protección celular contra el daño oxidante de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Esta molécula actúa mediante la interacción con radicales como el  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\bullet\text{OH}$  y el óxido nítrico, además de presentar una interacción sinérgica con otros agentes antioxidantes como el AA,  $\alpha$ -TOH y la SOD. Así mismo, el GSH protege contra el daño oxidante reduciendo las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e incluso proporciona un electrón para la reducción de peróxidos en la reacción catalizada por la GPx. El producto final de la oxidación de GSH, el GSSG, (constituido por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro) es regenerado por la GR. Esta enzima transfiere electrones de NADPH al GSSG, el cual es reducido a GSH, de modo que, durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR, el GSH no es consumido sino reciclado (Martínez-Sámamo *et al.*, 2011).



Por otra parte, los antioxidantes endógenos son aquellos que son sintetizados por la célula (SOD, CAT, GPx, GSH, ácido úrico, bilirrubina, melatonina, ácido lipoico). Estas son moléculas nucleofílicas con gran afinidad que se comportan como compuestos muy susceptibles para que los oxiden las especies reactivas, mientras que los antioxidantes exógenos son los que se obtienen a través de la dieta (flavonoides,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -TOH y AA) (Ramos *et al.* 2006). Los antioxidantes, endógenos y exógenos, ofrecen electrones con gran afinidad para los oxidantes y hacer que reaccionen con el antioxidante en lugar de que reaccionen y oxiden a las macromoléculas. Por lo tanto, se ha propuesto que los antioxidantes están involucrados en mecanismos de protección de daño genotóxico (Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009; Forman *et al.* 2009).

La defensa antioxidante contra RL inducidas por metales, y sus efectos citotóxicos y genotóxicos, representan un aspecto importante en la investigación en salud (Mekkawy *et al.* 2012). Antioxidantes exógenos como el  $\alpha$ -TOH y el AA, forman una parte del sistema antioxidante por su capacidad para neutralizar o controlar la toxicidad de xenobióticos y de las EROs, además de evitar el daño celular (Kadry *et al.* 2012). Se ha demostrado de manera clínica y experimental, que los antioxidantes exógenos como el  $\alpha$ -TOH (vitamina E) y el AA (vitamina C) pueden tener efectos beneficiosos en la protección contra enfermedades relacionadas con el daño oxidante del ADN (Zhou *et al.* 2005).

### 1.6.1. Ácido ascórbico

El AA, vitamina C, es un antioxidante exógeno reconocido. El AA es una cetolactona soluble en agua con dos grupos hidroxilo ionizables que se someten fácilmente a dos oxidaciones consecutivas de un electrón para formar el radical ascorbilo ( $A\bullet$ ), poco reactivo, y el ácido dehidroascórbico (DHA) (Du *et al.* 2012).

Las propiedades antioxidantes del AA se deben principalmente a la capacidad de eliminación de EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERN) antes de que lleguen a las macromoléculas, protegiendo del daño oxidante a las membranas lipídicas y las proteínas (Berger *et al.* 1997; García *et al.* 2006). Debido a su naturaleza hidrosoluble, el AA es capaz de remover los RL del plasma, citoplasma y mitocondrias, atrapa iones  $O_2^-$  y radical





lipoperoxilo ( $\text{LOO}^\bullet$ ) antes de que inicie la peroxidación lipídica. De esta forma protege a las membranas celulares y atenúa la progresión de las enfermedades relacionadas con el daño al ADN y con el EOX (Padayatty *et al.* 2002; Johnston, 2003). Además, el AA tiene efectos antiinflamatorios, neuroprotectores, inmunorregulador, anticancerígeno, actúa como cofactor de una serie de enzimas, en particular las hidroxilasas involucradas en la síntesis de colágeno, entre otras (Chehue *et al.* 2013).

Se ha propuesto que el mecanismo antioxidante del AA es mediante la neutralización en fase acuosa de las especies reactivas, así como la regeneración de otros antioxidantes como el  $\alpha$ -TOH,  $\beta$ -carotenos, GSH y ácido úrico. Tanto el AA, como el ascorbato (forma aniónica del AA) pueden donar sus electrones a especies reactivas potencialmente dañinas para neutralizarlas y formar el  $\text{A}^\bullet$ . El  $\text{A}^\bullet$  es una molécula de baja reactividad, debido a que su electrón desapareado se encuentra estabilizado por resonancia y a que puede regenerarse hasta formar nuevamente AA o donar un segundo electrón y formar DHA. El DHA puede reducirse y formar nuevamente AA, por reacción directa libre de enzimas o a través de la acción de las enzimas NADH y GSH (Figura 3) (May, 2012).

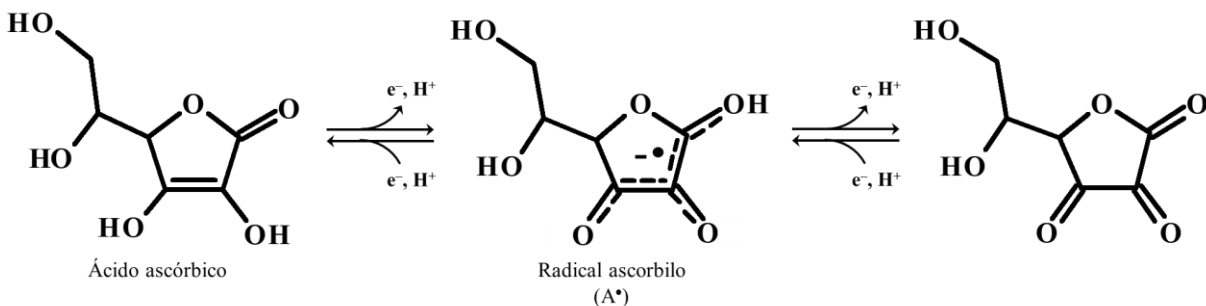


Figura 3. Mecanismo antioxidante del AA y regeneración del AA.

El AA es un nutriente requerido para una variedad de funciones biológicas. La mayoría de los mamíferos y de las plantas sintetizan AA de forma endógena a partir de la glucosa y de la galactosa. Sin embargo, los humanos y otros primates han perdido la capacidad de sintetizar AA, por lo que dependen de la dieta como fuente de AA para prevenir el escorbuto, causado por su deficiencia, algunos tipos de cáncer y para mantener la salud en general. Todas las frutas y verduras contienen cierta cantidad de vitamina C. Entre los alimentos de mayor contenido de AA están, entre otros, los cítricos (naranjas, limas,

limones, toronjas), la guayaba, la piña, la fresa, el kiwi, el mango, la sandía, el melón, el chile poblano, el tomate, el brócoli, la espinaca, el nopal y la papa (Chehue *et al.* 2013).

La ingesta diaria recomendada es de 90 mg/día para hombres y de 75 mg/día para mujeres, en pacientes con enfermedades crónicas como el cáncer o la diabetes, los fumadores, mujeres embarazadas o personas con intensa actividad física, se necesitan dosis mayores en su dieta habitual (Institute of Medicine (US), 2000; Lee, 2009). El AA es absorbido en el intestino delgado, específicamente en el duodeno. Entra en la sangre por transporte activo y por difusión (Combs y McClung, 2017). En ingestas normales (30-180 mg), el AA se absorbe (biodisponibilidad) en un 70-90% (Chehue *et al.* 2013).

### 1.6.2. $\alpha$ -tocoferol

El  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH) es la forma biológicamente más activa de los tocoferoles y tocotrienoles que forman la familia de las moléculas de la vitamina E. El  $\alpha$ -TOH se caracteriza por tener en su estructura química un anillo cromanol y una larga cadena lateral totalmente saturada, además de tres grupos metilo y un grupo fenólico en el anillo, el  $\alpha$ -TOH es capaz de neutralizar los RL por la reducción de un electrón (Sayago *et al.* 2007; Yang *et al.* 2012).

El  $\alpha$ -TOH actúa como antioxidante liposoluble en el metabolismo de todas las células, por lo que es el principal antioxidante de las membranas biológicas, protegiendo los fosfolípidos de las membranas el ataque de los RL y con ello del EOX. Además de su actividad antioxidante, se ha visto que el  $\alpha$ -TOH, tiene efectos antiinflamatorios, actúa como agente anticoagulante, estimula la formación de glóbulos rojos, la respuesta inmune y el funcionamiento en la regulación enzimática, entre otras funciones (Chazot y Kopple, 2013; Chehue *et al.* 2013; Combs y McClung, 2017).

La actividad antioxidante de la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) se debe principalmente a su capacidad de donar sus hidrógenos fenólicos a los RL de lípidos. Particularmente el  $\alpha$ -TOH actúa como un antioxidante mediante la interrupción de la autooxidación lipídica, ya que es capaz de romper la cadena oxidativa al donar su hidrógeno fenólico al LOO<sup>•</sup> que propaga la cadena en membranas y lipoproteínas.



Además, reemplaza el  $\text{LOO}^\bullet$  con el radical  $\alpha$ -tocoferoxil ( $\alpha\text{-TO}^\bullet$ ), menos reactivo (Figura 4). El electrón desapareado se estabiliza por resonancia, este radical es relativamente estable y poco reactivo, incapaz de desencadenar la peroxidación lipídica por sí solo. El  $\alpha\text{-TO}^\bullet$  también puede ser estabilizado, al aceptar un electrón proveniente del ascorbato, restituyendo la estructura del  $\alpha\text{-TOH}$  (Kojo, 2004; Sierra-Vargas *et al.* 2004).

Debido a que el  $\alpha\text{-TOH}$  es un antioxidante exógeno y esencial, debe obtenerse a través de la dieta en pequeñas cantidades. El  $\alpha\text{-TOH}$  coexiste naturalmente con otros lípidos y se encuentra principalmente en aceites vegetales ricos en ácidos grasos insaturados (germen de trigo, girasol, semilla de algodón, cártamo, canola, olivo, soya y maíz), hojas y partes verdes de las plantas y, en menor medida, en grasas animales y aceites de pescado (Kamal-Eldin y Budilarto, 2015; Sayago *et al.* 2007). La dosis diaria recomendada es de 15 mg/día (Institute of Medicine (US), 2000).

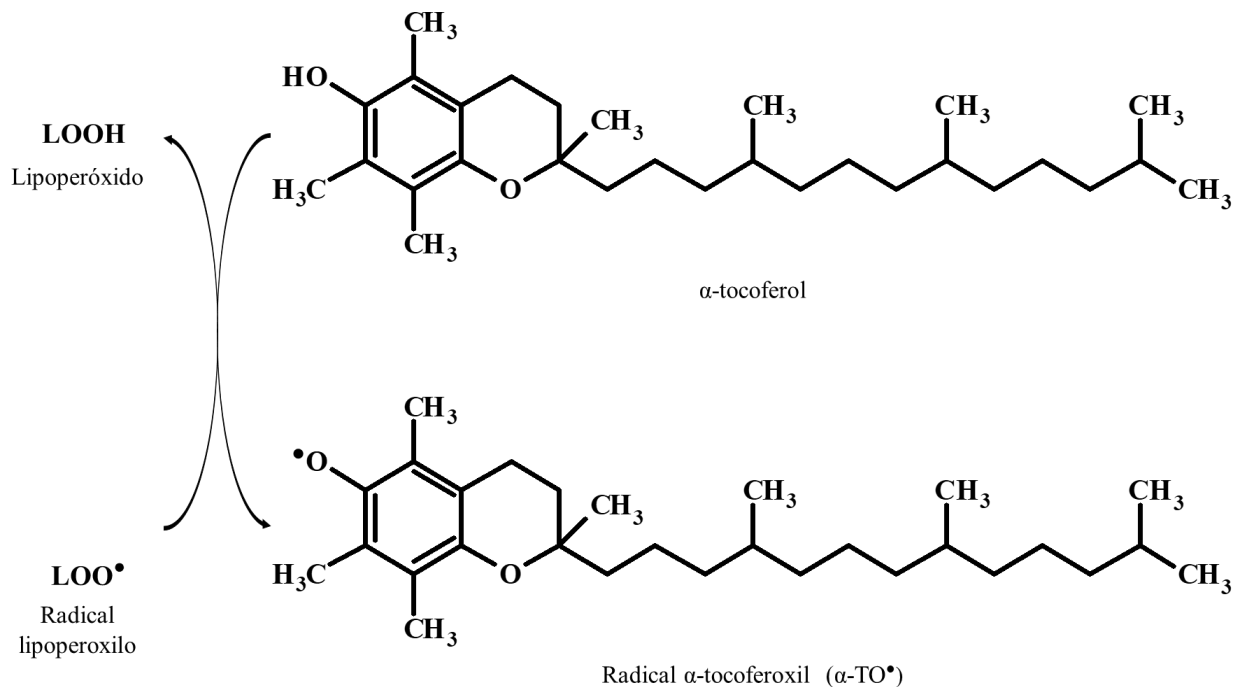


Figura 4. Mecanismo antioxidante del  $\alpha\text{-TOH}$ .

En los alimentos, los tocoferoles están asociados con las estructuras lipídicas, y su absorción, transporte y suministro de tejidos están estrechamente relacionados con el metabolismo general de los lípidos y las lipoproteínas. El sitio primario de absorción del

$\alpha$ -TOH es el intestino delgado. La absorción en la luz intestinal depende del proceso de digestión de las grasas y la absorción por los eritrocitos, sin embargo, sólo se absorbe un 20-40%. Para liberar los ácidos grasos libres de los triglicéridos, la dieta requiere esterasas pancreáticas para el desarrollo hidrolítico de los ésteres de tocoferol. Además, para la absorción, es necesaria la presencia de sales biliares, enzimas pancreáticas que son necesarias y la formación de micelas. Al igual que otras sustancias hidrófobas, el  $\alpha$ -TOH parece ser absorbido por difusión pasiva que depende de la solubilización micelar y, por lo tanto, de la presencia de sales biliares y jugo pancreático (Blé-Castillo *et al.* 2007; Sayago *et al.* 2007; Combs y McClung, 2017).

## 2. Planteamiento del problema

Las poblaciones humanas nos encontramos expuestas a metales con potencial cancerígeno como los compuestos del Cr(VI). Se ha propuesto que el daño genotóxico y citotóxico inducido por los compuestos de Cr(VI) es mediante el EOX generado durante su reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III). Estudios previos han mostrado que tratamientos agudos del AA y de  $\alpha$ -TOH administrados por vía intraperitoneal e intragástrica, respectivamente, tienen efectos protectores contra el daño genotóxico inducido por metales como el  $V_2O_5$  y  $CrO_3$ . Además, se ha mostrado que el tratamiento con antioxidantes por tiempos prolongados puede mejorar su efecto. Por lo que es de interés investigar si el efecto protector del AA y  $\alpha$ -TOH es más eficiente al administrar tratamientos más prolongados (corto y mediano plazo) por vía oral. De igual manera, debido a que aún no han sido esclarecidas las posibles vías de protección de estos compuestos sobre los daños genotóxicos y citotóxicos de los compuestos de Cr(VI) es también de interés explorarlos. Por lo que la pregunta del estudio es:

**¿Qué efectos presentan los tratamientos a corto y mediano plazo del ácido ascórbico y del alfa-tocoferol sobre el daño oxidante del ADN en ratones Hsd:ICR expuestos a cromo hexavalente?**

## 3. Hipótesis

Si los tratamientos agudos administrados intraperitonealmente con AA e intragástricamente con  $\alpha$ -TOH disminuyen la genotoxicidad inducida por metales como los compuestos de Cr(VI), entonces se espera que al prolongar los tiempos del tratamiento (corto y mediano plazo) con AA y  $\alpha$ -TOH administrados por separado por vía oral, se disminuya más eficazmente el daño genotóxico inducido por el  $CrO_3$ , mediante el restablecimiento de los niveles antioxidantes, la eliminación del aducto 8-OHdG y la activación de apoptosis.



## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de los tratamientos a corto y mediano plazo del AA y del  $\alpha$ -TOH sobre el daño oxidante del ADN en ratones Hsd:ICR expuestos a Cr(VI).

### 4.2. Objetivos particulares

- Corroborar los efectos genotóxicos y citotóxicos del CrO<sub>3</sub> mediante la frecuencia de MN, la apoptosis, los niveles de 8-OHdG, las frecuencias de los EPC con relación a los ENC y la viabilidad celular en sangre periférica.
- Evaluar el efecto del CrO<sub>3</sub> sobre los niveles de antioxidantes totales y el glutatión total en plasma de sangre periférica.
- Establecer los protocolos de la administración a corto y mediano plazo del AA y  $\alpha$ -TOH que no tengan efectos genotóxicos, citotóxicos y no afecten los niveles de antioxidantes totales y glutatión total, mediante la frecuencia de MN, apoptosis, niveles de 8-OHdG, las frecuencias de los EPC con relación a los ENC y la viabilidad celular en sangre periférica.
- Evaluar el efecto del tratamiento a corto y mediano plazo del AA y  $\alpha$ -TOH sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO<sub>3</sub>, mediante la frecuencia de MN, apoptosis, niveles de 8-OHdG, las frecuencias de EPC con relación a los ENC y la viabilidad celular en sangre periférica.
- Evaluar el efecto del tratamiento a corto y mediano plazo del AA y  $\alpha$ -TOH sobre los niveles de antioxidantes totales y glutatión total en ratones tratados con CrO<sub>3</sub>.

## 5. Material y método

### 5.1. Animales

Se emplearon ratones macho y hembra sexualmente maduros de la cepa CD-1, de entre 45 y 60 días de edad. Se desarrolló el pie de cría en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, con animales obtenidos del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Los ratones se alimentaron con nutricubos (Harlan® Teklad global 18% de proteína), con libre acceso al agua. Se mantuvieron bajo condiciones ambientales de temperatura y circulación de aire controladas, así como períodos de luz-obscuridad 12-12 horas.

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo se establecieron con base a los lineamientos de los programas ECETOC, la EPA, la OECD, la FDA y la NOM-062-ZOO-1999. El comité de bioética de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza aprobó los protocolos experimentales en el estudio (número de registro: FESZ/DEPI/363/14).

### 5.2. Reactivos

Los reactivos empleados en el estudio se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Colorante NA [CAS No 10127-02-3]; BrEt [CAS No 1239-45-8]; Aceite de maíz para compuestos liposolubles [CAS No. 8001-30-7],  $\alpha$ -TOH ( $C_{29}H_{50}O_2$ ) [CAS No. 10191-41-0], AA ( $C_6H_8O_6$ ) [CAS No. 50-81-7] y  $CrO_3$  [CAS No. 133-82-0]. Para la evaluación de niveles de 8-OHdG se empleó el kit DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Cayman [No. 589320], para la determinación de la capacidad de antioxidantes totales se empleó el kit Cayman [No. 709001] y para medir los niveles de glutatión total se empleó el kit de glutatión de Cayman [No. 703002].



### 5.3. Tratamientos

El  $\text{CrO}_3$  se administró en una dosis de 20 mg/kg de peso por vía i.p. con base en los resultados de estudios previos en los que se ha observado daño genotóxico (García-Rodríguez *et al.* 2001); mientras que el AA y el  $\alpha$ -TOH se administraron en dosis de 100 mg/kg y 20 mg/kg, respectivamente, vía oral *ad libitum* por ser la vía común por la que ingresan a nuestro organismo. Los tratamientos de  $\text{CrO}_3$  y AA se prepararon en solución a partir de su disolución en agua potable estéril, mientras que el  $\alpha$ -TOH se añadió en los nutricubos de los ratones a partir de su disolución en aceite de maíz.

Los grupos experimentales fueron conformados por cinco ratones tratados cada uno, para lo cual se plantearon los protocolos para los diferentes tiempos de administración. Para el caso de la administración de los tratamientos a corto plazo, la administración de cada antioxidante (AA o  $\alpha$ -TOH), se dio en cuatro dosis cada tercer día vía oral *ad libitum*, mientras que el  $\text{CrO}_3$  se administró en una única dosis. En los grupos combinados la administración de los antioxidantes se realizó previo a la administración de  $\text{CrO}_3$  (Figura 5). Cuando la administración de los tratamientos fue a mediano plazo, se administraron en doce dosis de AA o  $\alpha$ -TOH cada tercer día vía oral *ad libitum*. En los grupos combinados la administración de los antioxidantes fue previa a la administración del  $\text{CrO}_3$  (Figura 6). Tanto para el tratamiento a corto y mediano plazo se midió el consumo diario del alimento y agua.





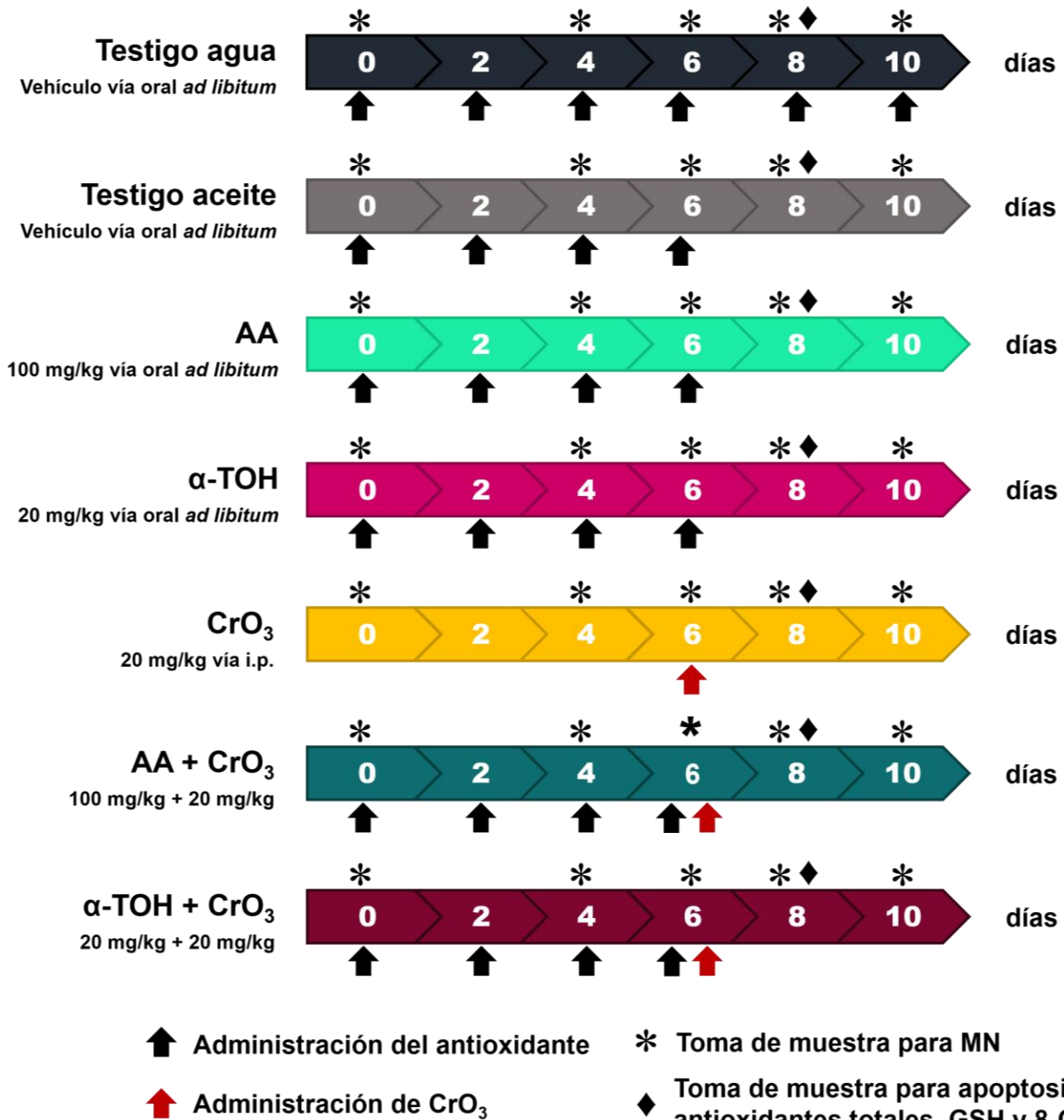


Figura 5. Protocolo para la administración de los tratamientos a corto plazo.



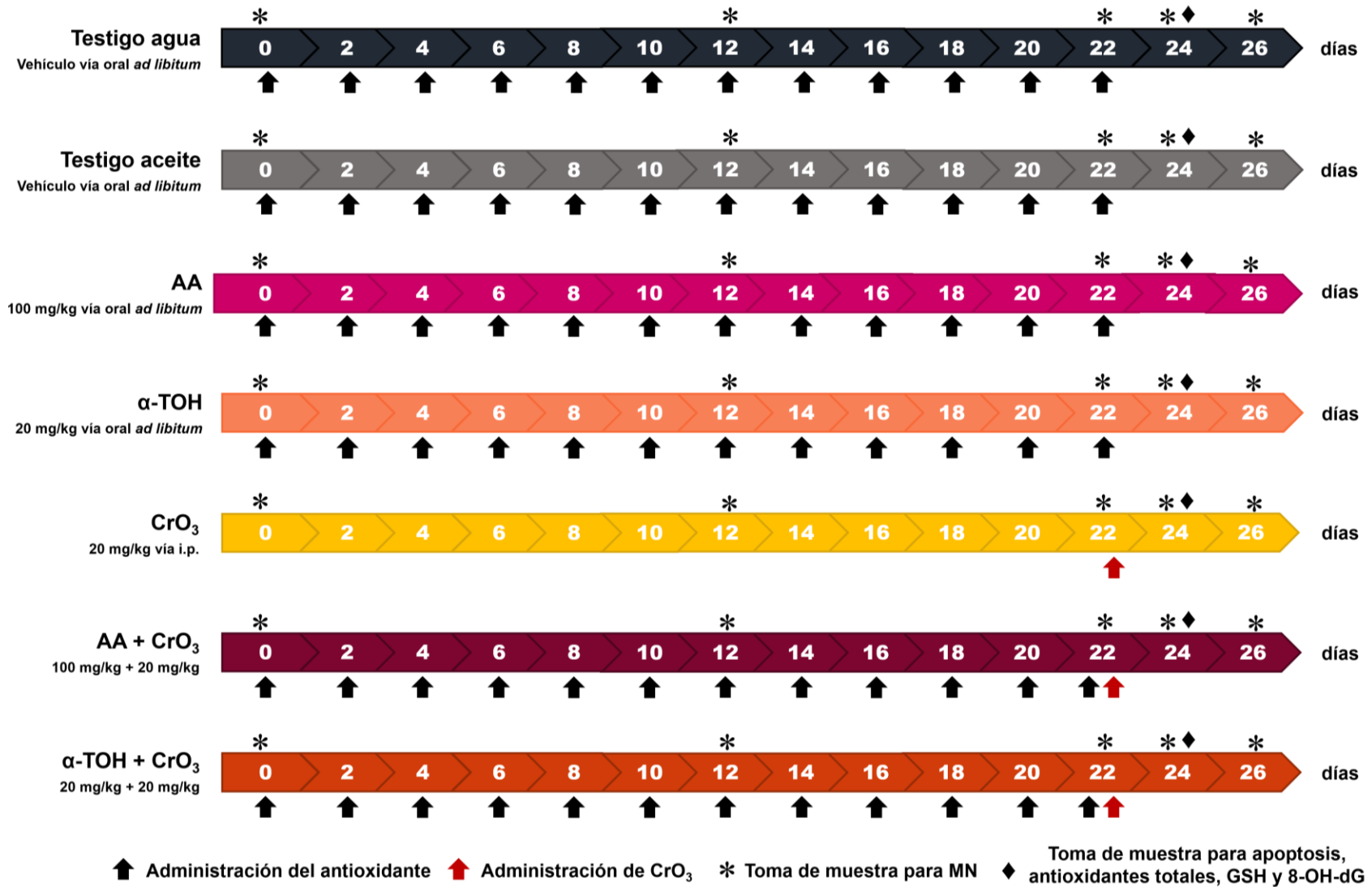


Figura 6. Protocolo para la administración de los tratamientos a mediano plazo.



#### 5.4. Ensayo de MN

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

#### 5.5. Evaluación de viabilidad y muerte celular

Las evaluaciones de viabilidad, apoptosis y necrosis se realizaron con la técnica de McGahon *et al.* (1995) con las modificaciones descritas por García-Rodríguez *et al.* (2013). Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los ratones únicamente a las 48 horas después de la administración de los tratamientos y se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 xg. Se retiró el sobrenadante e inmediatamente se agregó la mezcla de colorantes de NA/BrEt. Las muestras se colocaron en portaobjetos y se evaluaron inmediatamente bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2) con una emisión de luz azul (480nm) y un filtro de luz amarilla (515-530nm). Se evaluaron 300 células por ratón, y se cuantificaron las células viables, apoptóticas y necróticas.



## 5.6. Determinación del 8-OHdG

Para la determinación del 8-OHdG en plasma y orina se utilizó un ensayo inmuno-enzimático ELISA basado en el método propuesto por Asami *et al.* (1998). Se empleó una placa revestida con anti-ratón IgG de cabra, un anticuerpo monoclonal de ADN/ARN de daño oxidante, un marcador que consiste en un conjugado de 8-OHdG-acetilcolinesterasa (8-OHdG-AChE) y el reactivo Ellman. La placa se lavó para eliminar cualquier reactivo no unido y luego se añadió el reactivo de Ellman. La absorbancia se midió a 412 nm. La formación de producto es inversamente proporcional a la cantidad de 8-OHdG presente en la muestra.

## 5.7. Determinación de la capacidad antioxidante total

La determinación de la capacidad antioxidante total se realizó en plasma sanguíneo obtenido a las 48 horas de administrados los tratamientos mediante un kit comercial, basado en el método ABTS propuesto por Miller *et al.* (1993). En este ensayo, el 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) se incubó con mioglobina y  $H_2O_2$  para producir  $ABTS^{*+}$ , la cual es de color azul-verde y se midió en espectrofotómetro a 450 nm. Los antioxidantes presentes en la muestra disminuyen la concentración de  $ABTS^{*+}$ , lo que implica una reducción en la absorción proporcional a su concentración. El valor de la capacidad antioxidante total de las muestras analizadas se expresa como un equivalente de la concentración milimolar de solución trolox.

## 5.8. Determinación de la concentración intracelular de glutatión total

Los niveles de glutatión total se determinaron en eritrocitos de sangre periférica utilizando un kit comercial mediante el método de reciclaje enzimático de Griffith (1980), en el cual el GSH es oxidado por 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, reactivo de Ellman) y reducido por NADPH en presencia de GR. La formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) se monitorea a 412 nm. El contenido de glutatión total de la muestra se determinó



por comparación del valor observado con una curva estándar generada a partir de concentraciones conocidas de glutatión total.

### 5.9. Análisis estadístico

Los resultados de la inducción de MN, de la relación de los EPC, de apoptosis y necrosis, de viabilidad celular y los niveles de antioxidantes totales, glutatión total y de 8-OHdG se presentó como media  $\pm$  desviación estándar ( $\bar{x} \pm d.e.$ ) y se analizó mediante un análisis de varianzas (ANDEVA), seguido de una prueba de Tukey o Dunnet. A las frecuencias de inducción diferencial de MN, consumos de agua y de alimento, se les realizó una prueba de chi-cuadrada. Se empleó el programa estadístico SPSS Statistic v21 y GraphPad Prism 5 (Adler *et al.* 1998; García-Rodríguez *et al.* 2001). Para todos los análisis se consideró una  $p < 0.05$  como significativa.

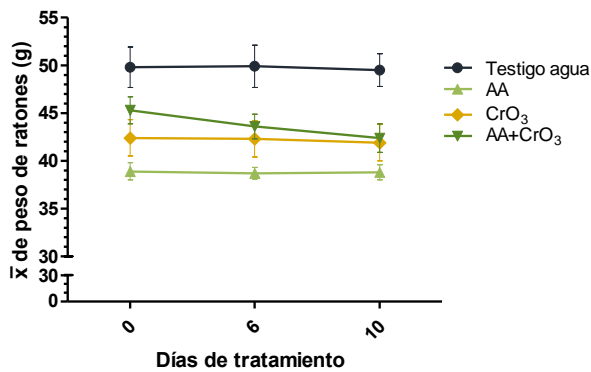


## 6. Resultados

### 6.1. Peso de los ratones tratados con AA, $\alpha$ -TOH y $\text{CrO}_3$

En los grupos tratados con AA,  $\text{CrO}_3$  y AA+ $\text{CrO}_3$  tanto en el tratamiento a corto plazo (Figura 7a) como a mediano plazo (Figura 7b) no hubo cambios significativos en los pesos de los ratones en los diferentes días de evaluación.

#### a) Corto plazo



#### b) Mediano plazo

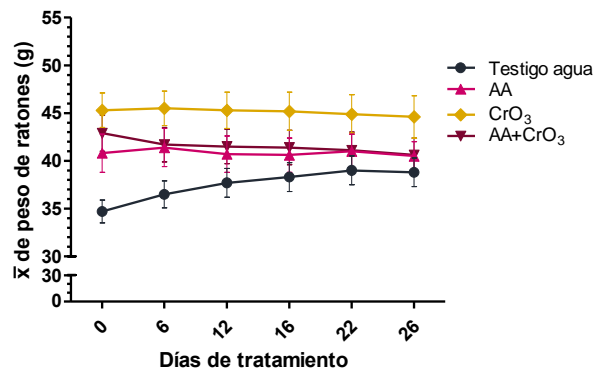
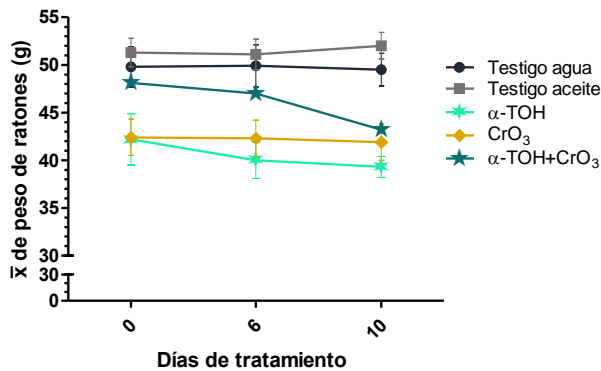


Figura 7. Promedio de peso de los ratones *Hsd:ICR* tratados con AA,  $\text{CrO}_3$  y AA+ $\text{CrO}_3$ . a) tratamiento a corto plazo; b) tratamiento a mediano plazo.

En los grupos tratados con  $\alpha$ -TOH,  $\text{CrO}_3$  y  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$  a corto plazo (Figura 8a) y mediano plazo (Figura 8b) tampoco se observaron cambios significativos.

#### a) Corto plazo



#### b) Mediano plazo

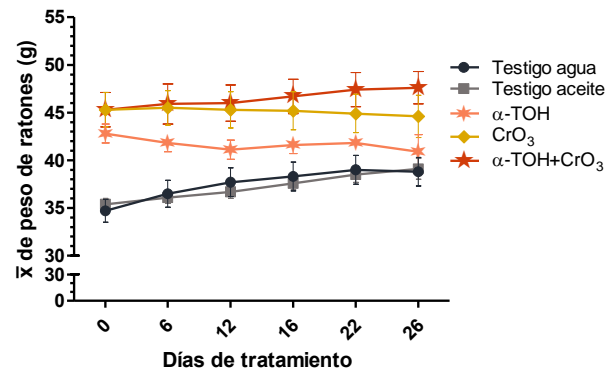


Figura 8. Promedio de peso de los ratones *Hsd:ICR* tratados con  $\alpha$ -TOH,  $\text{CrO}_3$  y  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$ . a) tratamiento a corto plazo; b) tratamiento a mediano plazo.



## 6.2. Consumo de líquidos de los ratones tratados con AA, $\alpha$ -TOH y $\text{CrO}_3$

El consumo acumulado de líquidos en los diferentes grupos a corto plazo fue entre 47 y 64 mL (Figura 9a). En los grupos de AA y AA+ $\text{CrO}_3$  el consumo diario fue de 6.5 y 5.9 mL y la dosis total consumida de AA fue de 458.0 y 420.7 mg/kg respectivamente (Cuadro 1). En la Figura 9b se muestra que a mediano plazo hubo un consumo de líquidos entre 122 y 174 mL y en los grupos de AA,  $\text{CrO}_3$  y AA+  $\text{CrO}_3$  disminuyeron significativamente su consumo con respecto al grupo testigo, mientras que en los grupos de AA y AA+ $\text{CrO}_3$  el consumo diario fue de 5.1 y 5.0 mL y las dosis totales consumidas de AA fueron de 1065.0 y 1194.0 mg/kg, respectivamente (Cuadro 1). El consumo diario de líquidos con AA por ratón fue mayor en el tratamiento a corto plazo.

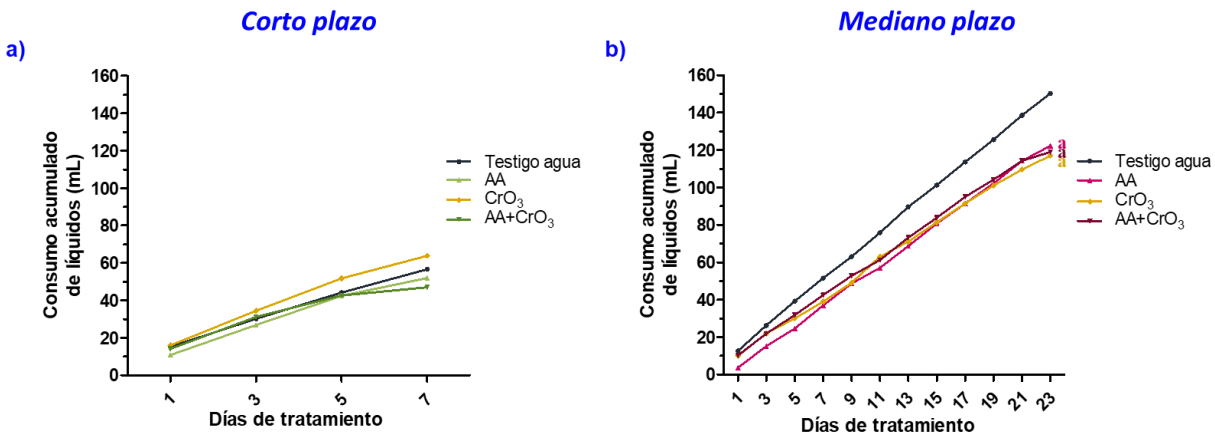


Figura 9. Consumo acumulado de líquidos en los grupos tratados a corto y mediano plazo.

Cuadro 1. Consumo y dosis por día y total de líquidos con AA por ratón en los grupos tratados con AA a corto y mediano plazo.

Tratamiento	Consumo diario (mL) / dosis diaria de AA (mg/kg) por ratón		Consumo total (mL) / dosis total de AA (mg/kg) por ratón	
Corto plazo	AA	6.5 / 57.3	52.0 /	458.0
	AA+ $\text{CrO}_3$	5.9 / 52.6	47.0 /	420.7
Mediano plazo	AA	5.1 / 44.4	122.0 /	1065.0
	AA+ $\text{CrO}_3$	5.0 / 43.6	143.0 /	1194.0

### 6.3. Consumo de alimento de los ratones tratados con AA, $\alpha$ -TOH y $\text{CrO}_3$

El consumo acumulado de alimento en los diferentes grupos tratados a corto plazo fue entre 29.8 y 26.0 (Figura 10a). El consumo diario en los grupos de  $\alpha$ -TOH y  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$  a corto plazo fue de 3.7 y 3.9 y la dosis total consumida de  $\alpha$ -TOH fue de 39.4 y 35.9 mg/kg, respectivamente (Cuadro 2). Mientras que, en el tratamiento a mediano plazo, el consumo acumulado de alimento fue entre 94 y 132 g (Figura 10b), observando una disminución significativa, en los grupos de  $\alpha$ -TOH y  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$ . Las dosis totales consumidas de  $\alpha$ -TOH fue de 156.5 y 168.9 mg/kg (Cuadro 2).

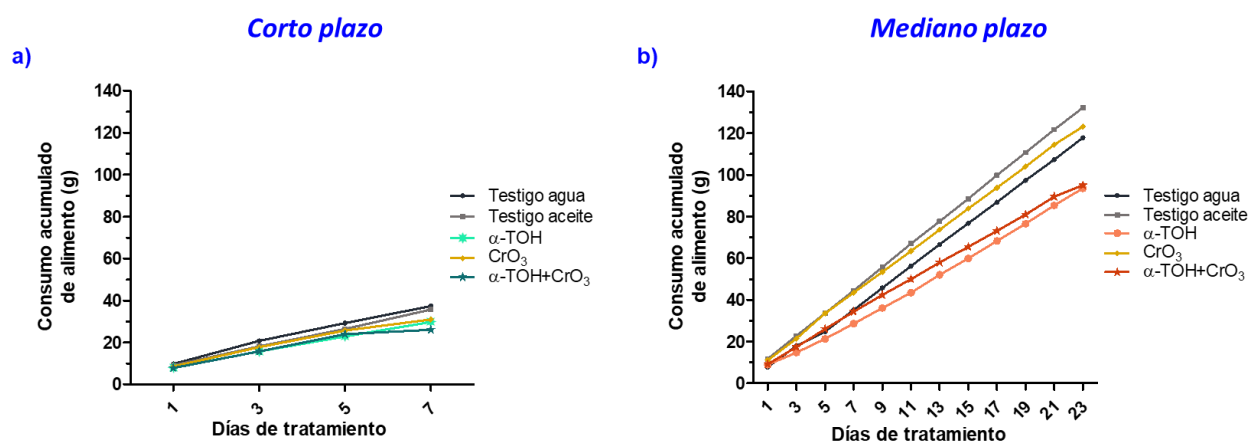


Figura 10. Consumo acumulado de alimento por ratón en los grupos tratados a corto y mediano plazo.

Cuadro 2. Consumo y dosis por día y total de alimento con  $\alpha$ -TOH por ratón en los grupos tratados con AA a corto y mediano plazo.

Tratamiento		Consumo diario (g) / dosis diaria de $\alpha$ -TOH (mg/kg) por ratón	Consumo total (g) / dosis total de $\alpha$ -TOH (mg/kg) por ratón
Corto plazo	$\alpha$ -TOH	3.7 / 9.9	29.8 / 39.4
	$\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$	3.9 / 13.0	26.0 / 35.9
Mediano plazo	$\alpha$ -TOH	4.0 / 13.0	93.5 / 156.5
	$\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$	3.9 / 13.0	95.0 / 168.9



#### 6.4. Evaluación de MN

La tinción de eritrocitos obtenida con NA para la técnica de MN se presenta en la Figura 11. Se identificó a los ENC que no se tiñen porque ya han degradado el ARN (Figura 11A), mientras que los EPC teñidos de color naranja fluorescente ya que aún contienen ARN (Figura 11B). Los MN se distinguen como cuerpos redondos amarillo fluorescente, por la presencia de ADN (Figura 11C).

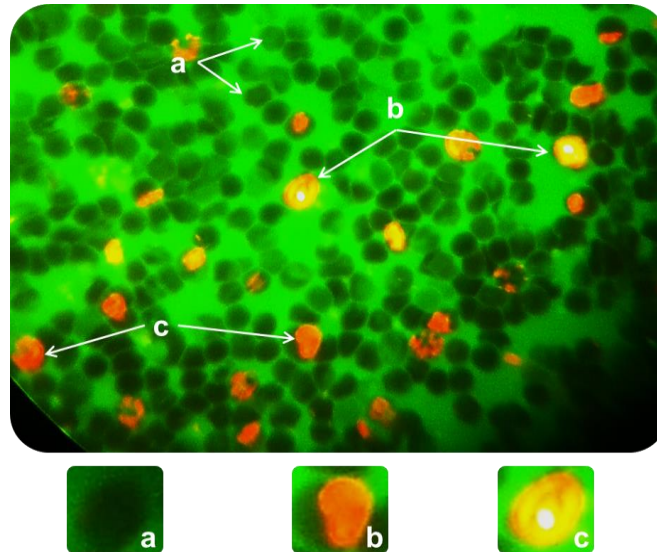


Figura 11. Eritrocitos de sangre periférica de ratón teñidos con NA.  
(a) ENC, (b) EPC y (c) MN (1000x).

Al evaluar los MN, se observó variabilidad en el día 0, por lo que se calculó el promedio de inducción neta de MN con la finalidad de contabilizar solamente los MN que se indujeron después de la administración de los tratamientos. Este cálculo consiste en restar el número de MN observados el día 0, a los siguientes días de evaluación de cada tratamiento, como lo indica la siguiente fórmula:

$$\text{Promedio de inducción neta} = MN_a X_i - MN_a X_0$$

Donde:

a = grupo

$X_i$  = tiempo de evaluación

$X_0$  = tiempo 0

El análisis por tiempo y por grupo del promedio de inducción neta de MN para 1000 EPC en los grupos de testigo agua, AA, CrO<sub>3</sub> y AA+CrO<sub>3</sub> a corto y mediano plazo se presenta en la Figura 12. Al realizar este análisis se observa que en los días 4 y 6 del corto plazo (Figura 12a y 12b) y los días 12 y 22 del tratamiento a mediano plazo (Figura 12e y 12f) no hubo cambios significativos en los promedios de MN. En el grupo de CrO<sub>3</sub> se observó un incremento significativo en los días 8 y 10 del tratamiento a corto plazo y los días 24 y 26 del tratamiento a mediano plazo con respecto a su grupo testigo (Figura 12c y 12d), incluso en el tratamiento a mediano plazo la inducción de MN es mayor que lo observado en el tratamiento a corto plazo. En los días 8 y 10 del tratamiento a corto plazo (Figura 12c y 12d) se observó que en el grupo de AA+CrO<sub>3</sub> los promedios de MN disminuyeron significativamente en un 78% y 83% contra el grupo CrO<sub>3</sub>. Por otra parte, en los días 24 y 26 del tratamiento a mediano plazo (Figura 12g y 12h), en el grupo de AA+CrO<sub>3</sub> hay una disminución significativa del 76% y 64%. La disminución de los promedios de MN fue mayor en el tratamiento a corto plazo.



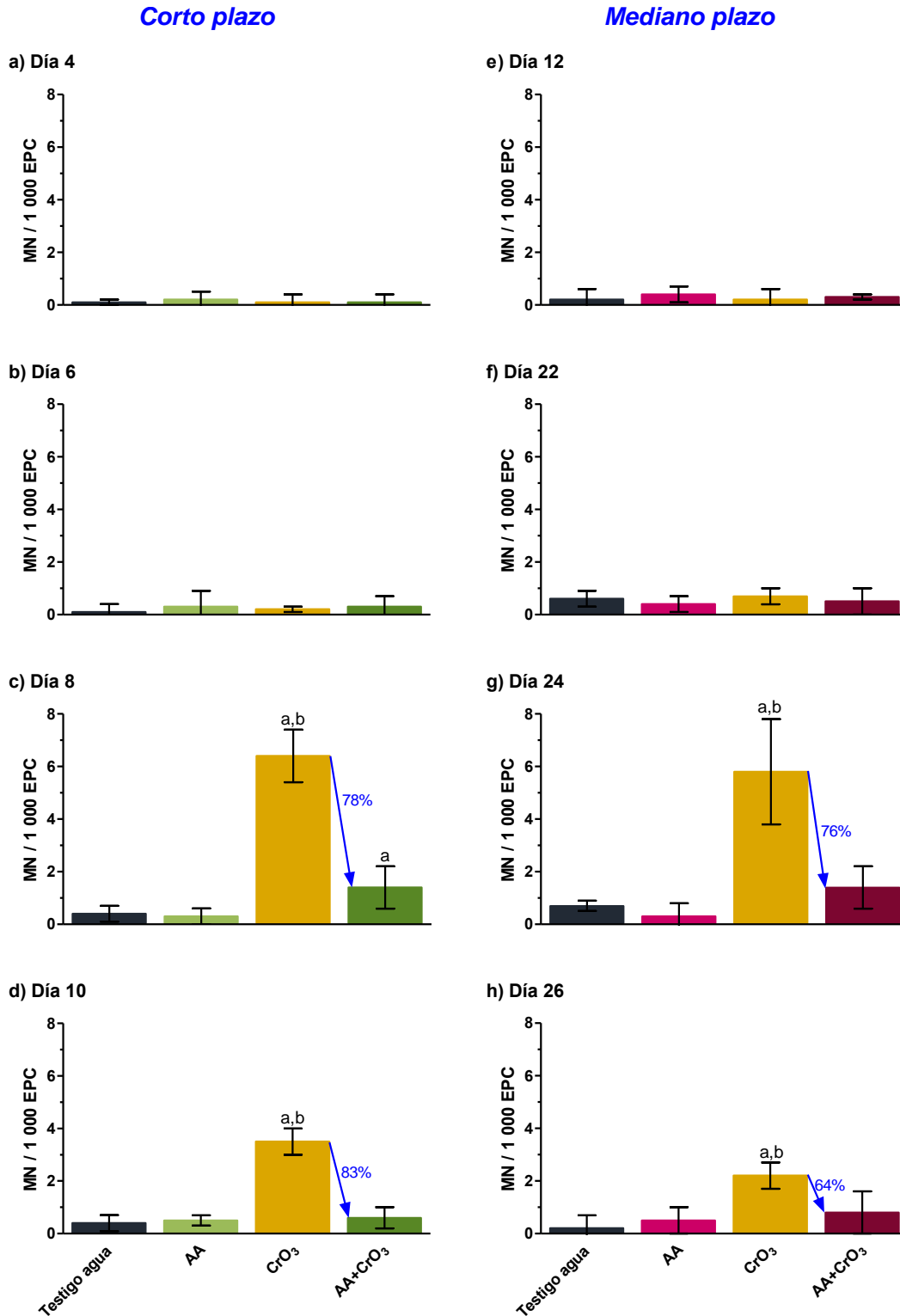


Figura 12. Análisis de los promedios de inducción neta de MN calculado por grupo para 1000 EPC en los diferentes tiempos evaluados, días 4, 6, 8 y 10 (corto plazo) y días 12, 22, 24 y 26 (mediano plazo).  $p < 0.05$ : a: vs. Testigo agua; b: vs. AA+CrO<sub>3</sub>.



El análisis por tiempo y por grupo del promedio de inducción neta de MN para 1000 EPC en los grupos de testigo agua, testigo aceite,  $\alpha$ -TOH,  $\text{CrO}_3$  y  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$  en los tratamientos a corto y mediano plazo se presenta en la Figura 13. En este análisis se observa que en los días 4 y 6 del corto plazo (Figura 13a y 13b) y los días 12 y 22 del tratamiento a mediano plazo (Figura 13e y 13f) no hubo cambios significativos en los promedios de MN. En el grupo de  $\text{CrO}_3$  se observó un incremento significativo en los días 8 y 10 del tratamiento a corto plazo y los días 24 y 26 del tratamiento a mediano plazo con respecto al grupo testigo (Figura 13g y 13h), incluso en el tratamiento a mediano plazo la inducción de MN es mayor que lo observado en el tratamiento a corto plazo. En el día 8 y 10 del tratamiento a corto plazo (Figura 13c y 13d) se observó un incremento del promedio de inducción neta en el grupo de  $\alpha$ -TOH- $\text{CrO}_3$  con respecto al grupo testigo, sin embargo, hubo una reducción de 34 y 51%, la cual resultó estadísticamente significativa, con respecto al grupo de  $\text{CrO}_3$  (Figura 13c y 13d). Mientras que en el grupo de  $\alpha$ -TOH- $\text{CrO}_3$  del tratamiento a mediano plazo se observó que en los días 24 (Figura 13g) una disminución significativa del 57% al comparar con el grupo  $\text{CrO}_3$ .



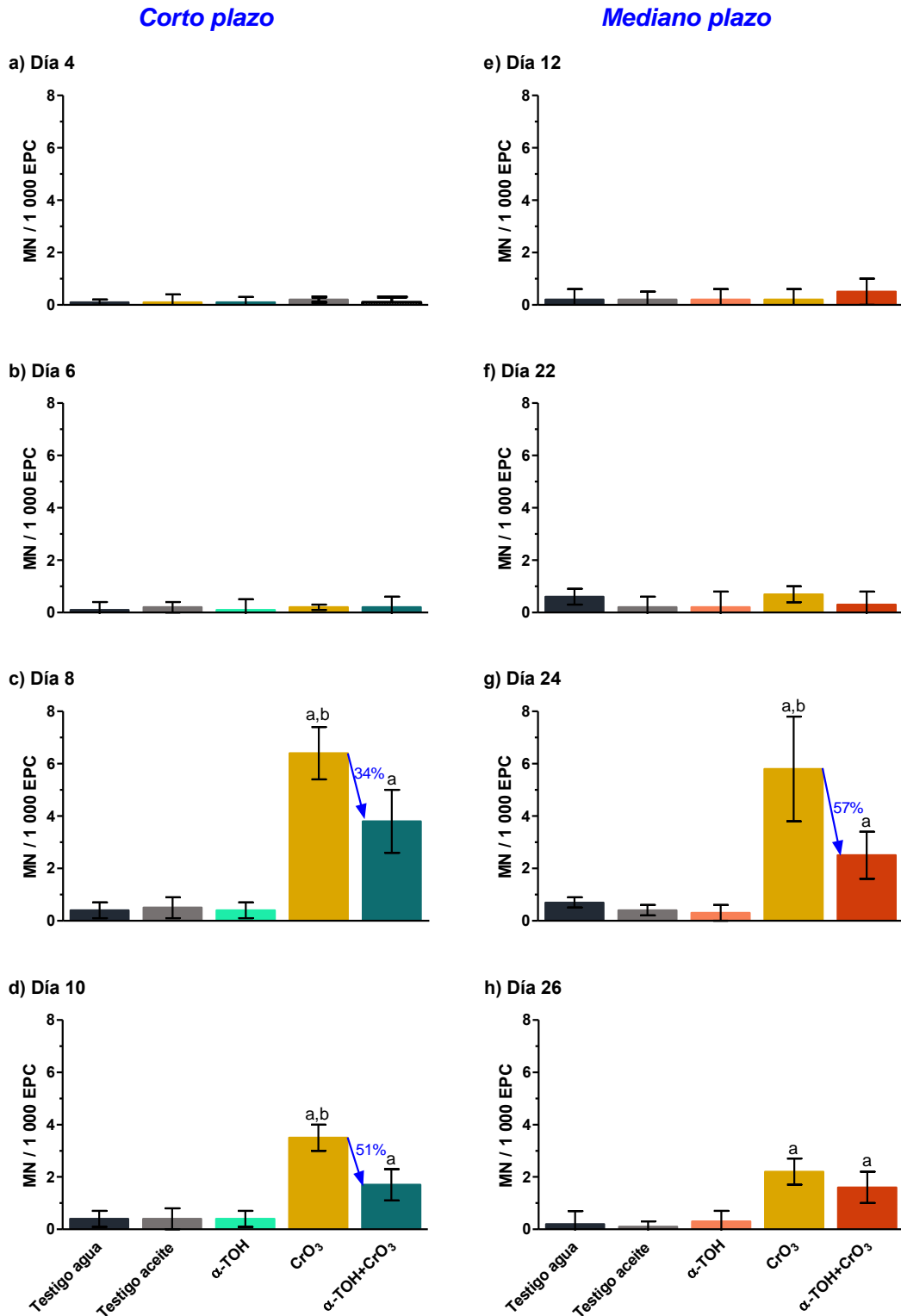


Figura 13. Análisis de los promedios de inducción neta de MN calculado por grupo para 1000 EPC en los diferentes tiempos evaluados, días 4, 6, 8 y 10 (corto plazo) y días 12, 22, 24 y 26 (mediano plazo).  $p < 0.05$ : a: vs. Testigo agua; b: vs.  $\alpha$ -TOH+CrO<sub>3</sub>.



Con la finalidad de descartar los MN inducidos por el manejo de los ratones, se calculó el promedio de inducción diferencial, que consiste en restar los MN observados en todos los días de evaluación del grupo testigo a sus correspondientes días de evaluación de los grupos tratados, es decir:

$$\text{Promedio de inducción diferencial} = MN_a X_i - MN_t X_i$$

Donde:

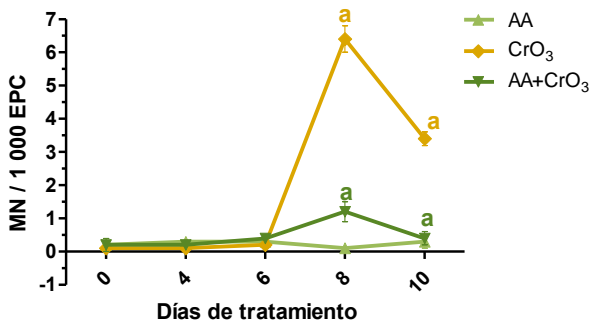
a = grupo tratado

t = grupo testigo

$X_i$  = tiempo de evaluación

El análisis del promedio de inducción diferencial, a corto y mediano plazo se presenta en la Figura 14 y 15. Se observa que el manejo de los animales no tuvo efecto sobre los MN evaluados, ya que se muestra un comportamiento similar al del análisis de los promedios de inducción neta.

a) Corto plazo



b) Mediano plazo

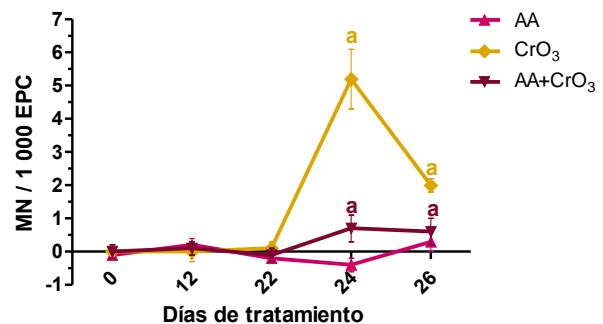
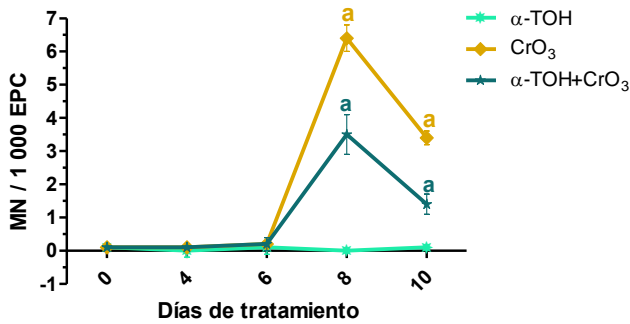


Figura 14. Análisis del promedio de inducción diferencial de MN por tiempo y grupo, calculado para 1000 EPC. a) tratamiento a corto plazo; b) tratamiento a mediano plazo.  $p < 0.05$ : a: vs. CrO<sub>3</sub>.

a) Corto plazo



b) Mediano plazo

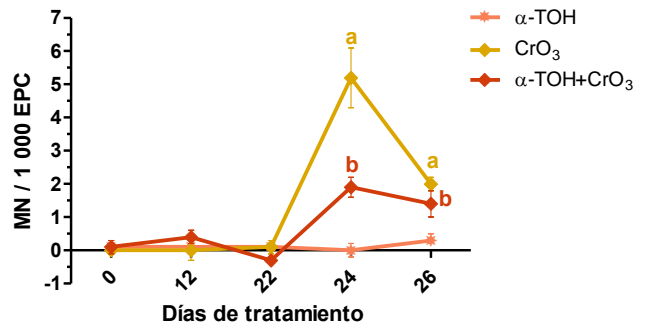


Figura 15. Análisis del promedio de inducción diferencial de MN por tiempo y grupo, calculado para 1000 EPC. a) tratamiento a corto plazo; b) tratamiento a mediano plazo.  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs.  $\text{CrO}_3$ ; <sup>b</sup>: vs.  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$  día 0.

## 6.5. Evaluación de apoptosis y necrosis

La tinción diferencia con NA/BrEt permite determinar si las células están o no en apoptosis y en qué estado, temprano o tardío, además de diferenciar a las células necróticas. Las células sanas son aquellas con una membrana y cromatina intacta, lo cual sólo permite la entrada de NA, que al intercalarse con el ADN, se tiñen de color verde (Figura 16A). Las células apoptóticas tempranas, presentan la cromatina condensada o fragmentada y se tiñen de verde fluorescente ya que la membrana aún está intacta y el BrEt no puede atravesarla (Figura 16B). Las células apoptóticas tardías tienen la cromatina fragmentada y se forman vesículas en la membrana, permitiendo la entrada del BrEt que al intercalarse con el ADN se tiñen de color rojo fluorescente (Figura 16C). Y las células necróticas presentan una tinción roja fluorescente uniforme debido a la entrada de BrEt en estas células. (Figura 16D).



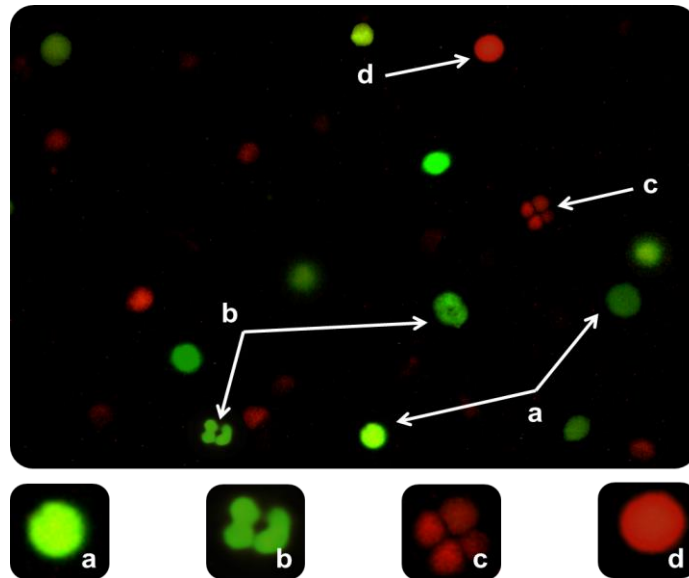


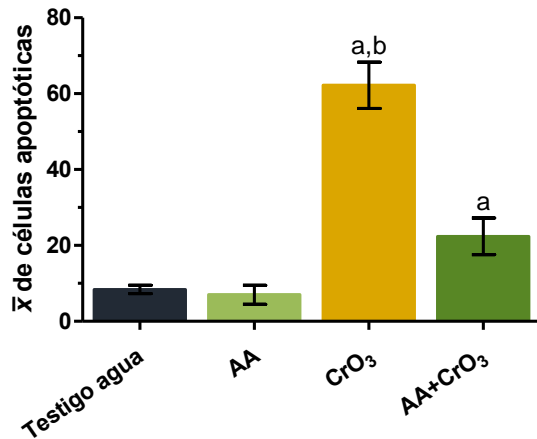
Figura 16. Células nucleadas de sangre periférica de ratón teñidas con NA/BrEt. (a) Células sanas, (b) apoptóticas tempranas, (c) apoptóticas tardías y (d) necróticas (400x).

En la Figura 17 se presentan las evaluaciones de la apoptosis en los grupos tratados con AA y  $\text{CrO}_3$  evaluados el día 8 del tratamiento a corto plazo (Figura 17a) y el día 24 del mediano plazo (Figura 17b) equivalente a las 48 horas después de la administración de  $\text{CrO}_3$ . En el grupo de  $\text{CrO}_3$  y de AA+ $\text{CrO}_3$  a corto y mediano plazo se incrementaron significativamente las células apoptóticas con respecto al grupo testigo. Mientras que en los grupos combinados de ambos tratamientos se disminuyen significativamente los promedios de células apoptóticas al comparar con el grupo de  $\text{CrO}_3$ .





## a) Corto plazo (D8)



## b) Mediano plazo (D24)

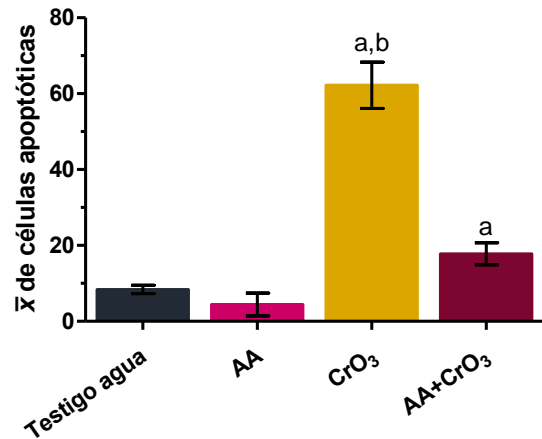
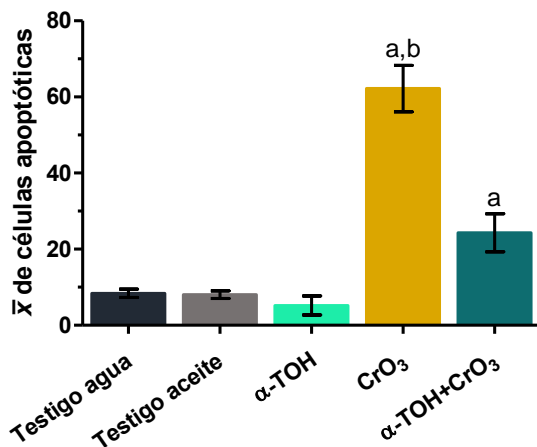


Figura 17. Promedios de células apoptóticas evaluados el día 8 (corto plazo) y el día 24 (mediano plazo).  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs. AA+CrO<sub>3</sub>.

En la Figura 18 se presenta el análisis de la apoptosis en los grupos tratados con  $\alpha$ -TOH, y CrO<sub>3</sub> evaluados el día 8 del tratamiento a corto plazo (Figura 18a) y el día 24 del mediano plazo (Figura 18b) es decir 48 horas después de la administración de CrO<sub>3</sub>. En los grupos de CrO<sub>3</sub> y los grupos combinados hubo un incremento significativo de las células apoptóticas con respecto al grupo testigo. Sin embargo, al comparar con el grupo de CrO<sub>3</sub> hubo una disminución significativa.

## a) Corto plazo (D8)



## b) Mediano plazo (D24)

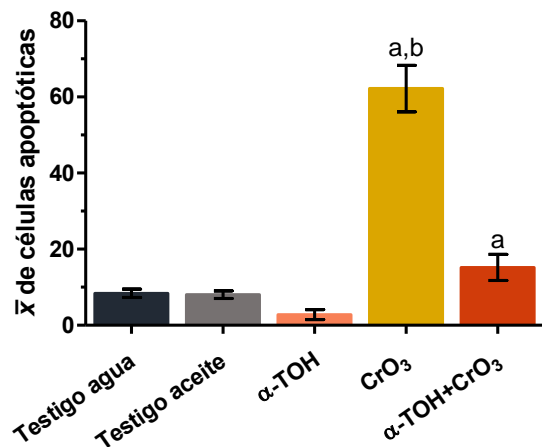
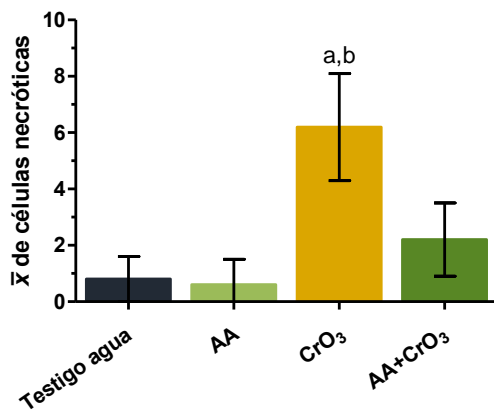


Figura 18. Promedios de células apoptóticas evaluados el día 8 (corto plazo) y el día 24 (mediano plazo).  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs.  $\alpha$ -TOH+CrO<sub>3</sub>.

En la Figura 19 y 20 se presentan las evaluaciones de necrosis en los grupos tratados con AA, CrO<sub>3</sub> y AA+CrO<sub>3</sub> (Figura 19) o α-TOH, CrO<sub>3</sub> y α-TOH+CrO<sub>3</sub> (Figura 20) evaluados el día 8 del tratamiento a corto plazo (Figura 19a y 20a) y el día 24 del mediano plazo (Figura 19b y 20b). Se observa que en ambos grupos de CrO<sub>3</sub> hubo un incremento significativo de las células necróticas con respecto al grupo testigo. Y en los grupos combinados de los tratamientos a corto y mediano plazo hay una disminución significativa de células necróticas al comparar con el grupo de CrO<sub>3</sub>.

a) Corto plazo (D8)



b) Mediano plazo (D24)

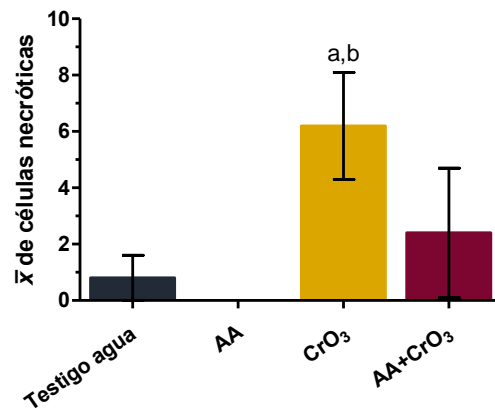
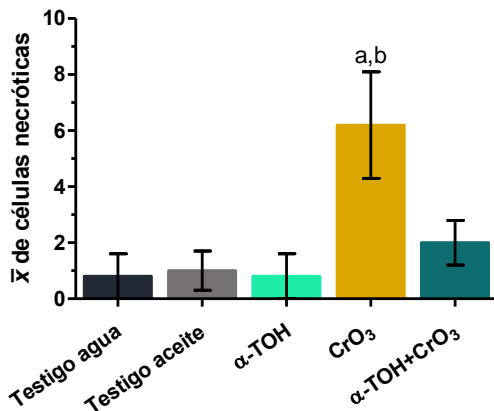


Figura 19. Promedios de células necróticas evaluados el día 8 (corto plazo) y el día 24 (mediano plazo).  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs. AA+CrO<sub>3</sub>.

a) Corto plazo (D8)



b) Mediano plazo (D24)

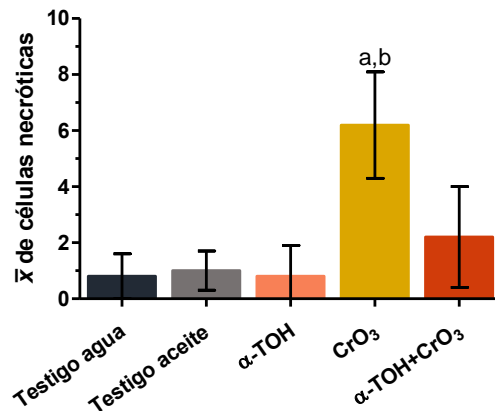


Figura 20. Análisis de los promedios de células necróticas evaluados el día 8 (corto plazo) y el día 24 (mediano plazo).  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs. α-TOH+CrO<sub>3</sub>.



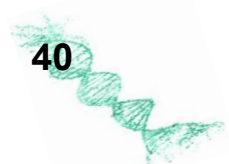
## 6.6. Evaluación de la relación EPC/ENC y de la viabilidad celular

Los promedios de EPC/ENC evaluados en el tratamiento a corto plazo, en el grupo de CrO<sub>3</sub> del día 8 es mayor que el grupo testigo y su propio día 0. En los grupos combinados los promedios fueron menores que el grupo CrO<sub>3</sub> (Cuadro 3).

Cuadro 3. Promedios de la relación EPC/ENC en 1000 células totales de sangre periférica de ratones tratados a corto plazo con AA,  $\alpha$ -TOH y CrO<sub>3</sub>.

Tratamiento	Día	N	EPC/1000ENC ( $\bar{x} \pm d. e.$ )
Testigo agua	0	5	74.3 $\pm$ 3.8
	4		68.6 $\pm$ 3.4
	6		71.6 $\pm$ 3.2
	8		73.4 $\pm$ 7.2
	10		72.4 $\pm$ 4.3
Testigo aceite	0	5	66.9 $\pm$ 0.3
	4		73.4 $\pm$ 0.5
	6		73.9 $\pm$ 0.6
	8		68.7 $\pm$ 0.6
	10		78.0 $\pm$ 0.5
AA	0	5	72.4 $\pm$ 0.4
	4		70.9 $\pm$ 0.2
	6		68.5 $\pm$ 0.7
	8		78.9 $\pm$ 0.3
	10		71.2 $\pm$ 0.4
$\alpha$ -TOH	0	5	72.7 $\pm$ 2.9
	4		69.6 $\pm$ 4.1
	6		70.9 $\pm$ 3.5
	8		71.9 $\pm$ 4.8
	10		73.8 $\pm$ 4.7
CrO <sub>3</sub>	0	5	74.9 $\pm$ 3.2
	4		71.1 $\pm$ 3.0
	6		76.1 $\pm$ 3.9
	8		105.5 $\pm$ 27.7 <sup>a,b,c,d</sup>
	10		73.7 $\pm$ 4.4
AA+CrO <sub>3</sub>	0	5	72.1 $\pm$ 5.5
	4		76.6 $\pm$ 6.7
	6		74.2 $\pm$ 4.9
	8		73.1 $\pm$ 10.8
	10		71.9 $\pm$ 7.4
$\alpha$ TOH+CrO <sub>3</sub>	0	5	70.3 $\pm$ 3.2
	4		73.6 $\pm$ 2.8
	6		70.2 $\pm$ 4.5
	8		73.0 $\pm$ 8.9
	10		77.1 $\pm$ 2.5

$p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs. CrO<sub>3</sub>; <sup>c</sup>: vs. AA+CrO<sub>3</sub>; <sup>d</sup>: vs.  $\alpha$ -TOH+CrO<sub>3</sub>.



Los promedios de EPC/ENC evaluados en el tratamiento a mediano plazo, en el grupo de CrO<sub>3</sub> son mayores que en el grupo testigo y su propio día 0. En los grupos combinados, los promedios de EPC/ENC fueron menores que el grupo tratado con CrO<sub>3</sub> (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedios de la relación EPC/ENC en 1000 células totales en sangre periférica de ratones tratados a mediano plazo con AA,  $\alpha$ -TOH y CrO<sub>3</sub>.

Tratamiento	Día	N	EPC/1000 ENC ( $\bar{x} \pm d. e.$ )
Testigo agua	0	5	76.3 $\pm$ 8.0
	12		77.9 $\pm$ 4.8
	22		68.8 $\pm$ 9.8
	24		75.0 $\pm$ 13.2
	26		72.1 $\pm$ 6.3
Testigo aceite	0	5	75.2 $\pm$ 0.7
	12		70.8 $\pm$ 0.4
	22		77.2 $\pm$ 0.4
	24		69.8 $\pm$ 0.6
	26		80.0 $\pm$ 0.8
AA	0	5	74.6 $\pm$ 0.4
	12		69.0 $\pm$ 0.4
	22		74.1 $\pm$ 0.4
	24		68.1 $\pm$ 0.8
	26		73.0 $\pm$ 0.6
$\alpha$ -TOH	0	5	69.2 $\pm$ 4.8
	12		74.7 $\pm$ 4.2
	22		75.4 $\pm$ 5.2
	24		76.6 $\pm$ 6.0
	26		75.0 $\pm$ 7.2
CrO <sub>3</sub>	0	5	70.4 $\pm$ 3.2
	12		70.3 $\pm$ 4.4
	22		106.9 $\pm$ 15.1 <sup>a,b,c,d</sup>
	24		153.1 $\pm$ 30.4 <sup>a,b,c,d</sup>
	26		103.9 $\pm$ 13.5 <sup>a,b,c,d</sup>
AA+CrO <sub>3</sub>	0	5	70.8 $\pm$ 5.1
	12		71.5 $\pm$ 2.5
	22		74.4 $\pm$ 5.7
	24		75.9 $\pm$ 13.0
	26		73.1 $\pm$ 7.7
$\alpha$ TOH+ CrO <sub>3</sub>	0	5	73.2 $\pm$ 4.5
	12		76.3 $\pm$ 4.2
	22		68.1 $\pm$ 3.1
	24		68.9 $\pm$ 8.8
	26		78.0 $\pm$ 6.6

$p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs. CrO<sub>3</sub>; <sup>c</sup>: vs. AA+CrO<sub>3</sub>; <sup>d</sup>: vs.  $\alpha$ -TOH+CrO<sub>3</sub>.



Debido a que en los grupos estudiados se observa variabilidad en la relación de los EPC con respecto a los ENC, se realizó el análisis de viabilidad celular en leucocitos de sangre periférica con la tinción diferencial de NA/BrEt (García-Rodríguez *et al.* 2014), ya 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). Con el análisis de viabilidad celular por tinción diferencial con NA/BrEt se pueden diferenciar a las células viables y no viables en función de la integridad de la membrana.

En la Figura 21 se presenta el promedio de células viables y no viables en los grupos de AA, CrO<sub>3</sub> y AA+CrO<sub>3</sub> de los tratamientos a corto (Figura 21a) y mediano plazo (Figura 21b). En los grupos tratados con CrO<sub>3</sub> y AA+CrO<sub>3</sub> (corto plazo) se observa un incremento significativo de los promedios de células no viables con respecto al grupo testigo agua, mientras que en los grupos de AA+CrO<sub>3</sub>, a corto y mediano plazo, los promedios de células no viables son significativamente menores que en el grupo tratado con CrO<sub>3</sub>.

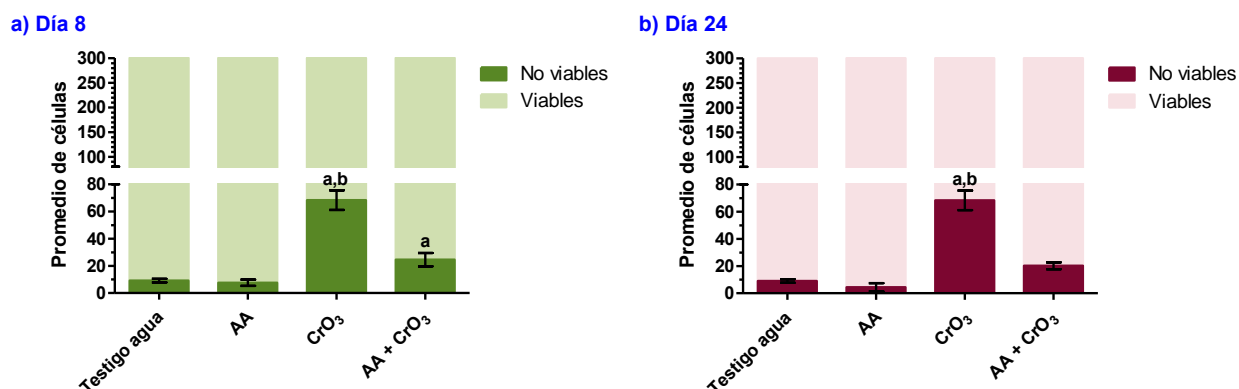


Figura 21. Promedios de células viables y no viables de los diferentes grupos tratados evaluadas el día 8 del tratamiento a corto plazo (a) y el día 24 del tratamiento a mediano plazo (b).  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs. AA+CrO<sub>3</sub>.

En la Figura 22 se observó un incremento significativo de las células no viables en los grupos de CrO<sub>3</sub> y  $\alpha$ -TOH+CrO<sub>3</sub> (corto plazo), mientras que los promedios de células no viables en los grupos de  $\alpha$ -TOH+CrO<sub>3</sub> a corto y mediano plazo disminuye significativamente con respecto al grupo CrO<sub>3</sub>.



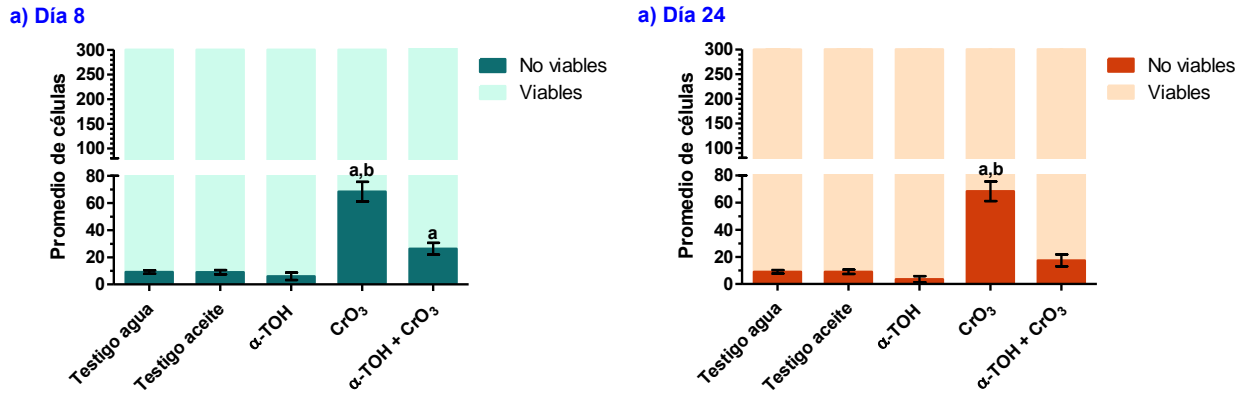


Figura 22. Promedios de células viables y no viables de los diferentes grupos tratados evaluadas el día 8 del tratamiento a corto plazo (a) y el día 24 del tratamiento a mediano plazo (b).  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs. α-TOH+CrO<sub>3</sub>.

### 6.7. Capacidad antioxidante total

En la Figura 23 se presenta la capacidad antioxidante total de los grupos de AA, CrO<sub>3</sub> y AA+CrO<sub>3</sub>, evaluados a las 48 horas después de la administración del CrO<sub>3</sub>, es decir, el día 8 del tratamiento a corto plazo y el día 24 del tratamiento a mediano plazo en los grupos. Se observa que en los grupos combinados la capacidad antioxidante total se incrementó significativamente con respecto al grupo testigo agua y CrO<sub>3</sub>.

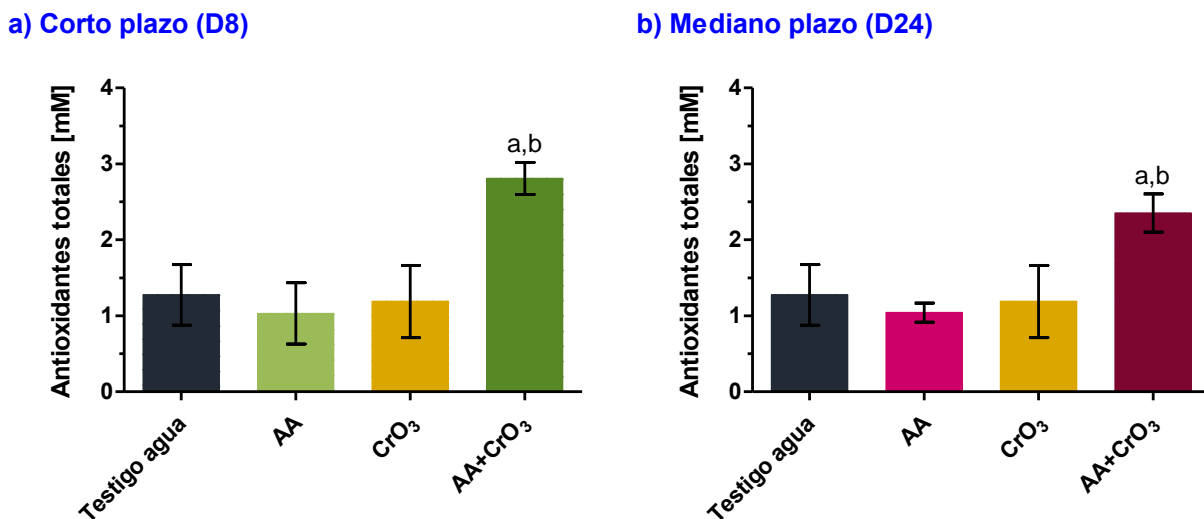
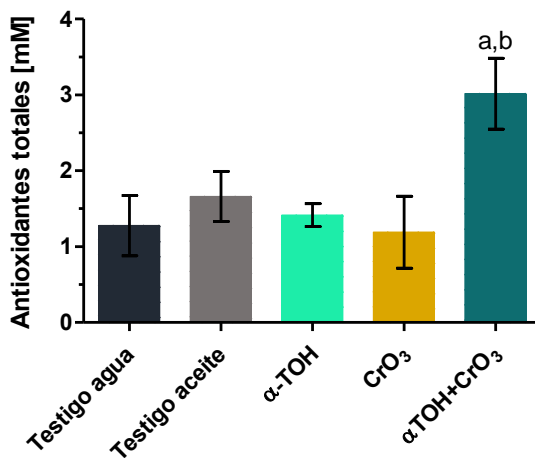


Figura 23. Capacidad de antioxidantes totales en plasma de ratones. a) tratamiento a corto plazo (día 8); b) tratamiento a mediano plazo (día 24) con AA, CrO<sub>3</sub>, AA+CrO<sub>3</sub>.  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs. CrO<sub>3</sub>.



En la Figura 24 se presenta la capacidad antioxidante total de los grupos de  $\alpha$ -TOH,  $\text{CrO}_3$  y  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$  evaluadas a las 48 horas después de la administración del  $\text{CrO}_3$ , es decir, el día 8 para el corto plazo y el día 24 para el mediano plazo. Se observa que en el grupo combinado de corto plazo hay un aumento significativo de la capacidad antioxidante total al comparar con el grupo testigo y  $\text{CrO}_3$ . Mientras que en el tratamiento a mediano plazo no hubo efecto sobre la capacidad antioxidantes totales.

a) Corto plazo (D8)



b) Mediano plazo (D24)

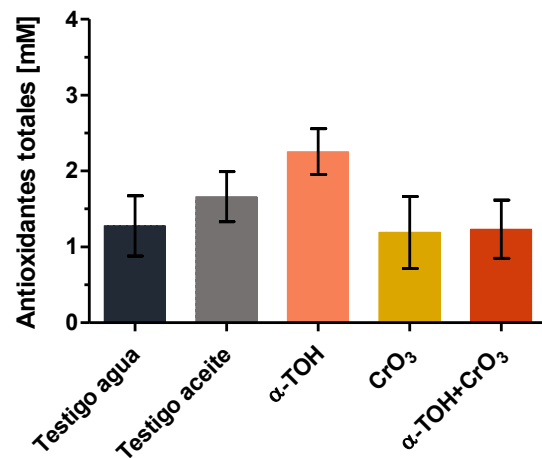


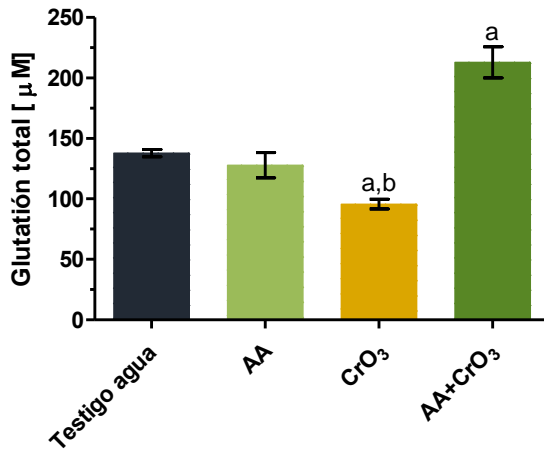
Figura 24. Capacidad de antioxidantes totales en plasma de ratones. a) tratamiento a corto plazo (día 8); b) tratamiento a mediano plazo (día 24) con  $\alpha$ -TOH,  $\text{CrO}_3$ ,  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$ .  
 $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs.  $\text{CrO}_3$ .

## 6.8. Niveles de glutatión total

En la Figura 25 se presentan los niveles de glutatión total en el tratamiento a corto (Figura 25a) y mediano plazo (Figura 25b), en el grupo de AA a mediano plazo se disminuye significativamente el nivel de glutatión total contra el grupo testigo. En los grupos de  $\text{CrO}_3$  los niveles de glutatión total disminuyen en comparación con el grupo testigo, mientras que en los grupos de AA+ $\text{CrO}_3$  a corto y mediano plazo el nivel de glutatión total aumenta significativamente contra los grupos  $\text{CrO}_3$ , y en el caso de corto plazo también resulta significativo contra el grupo testigo.



a) Corto plazo (D8)



b) Mediano plazo (D24)

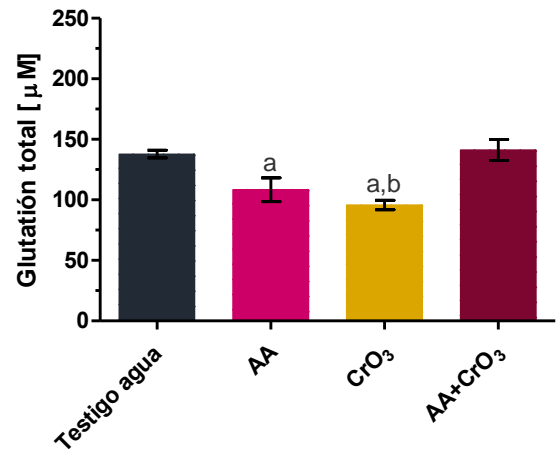
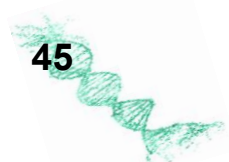


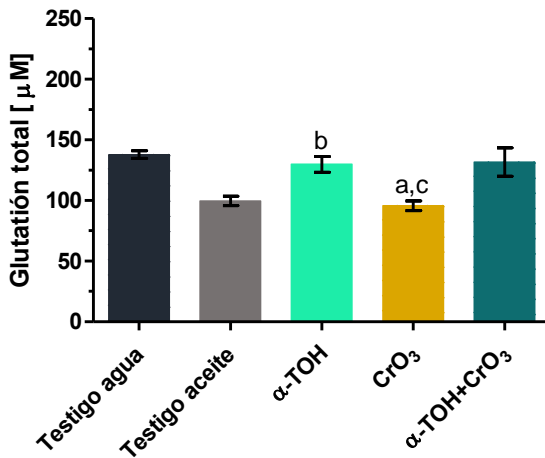
Figura 25. Promedio de las concentraciones de glutatión total en plasma de ratones. a) tratamiento a corto plazo (día 8); b) tratamiento a mediano plazo (día 24) con AA,  $\text{CrO}_3$  y AA+ $\text{CrO}_3$  evaluados los días 8 y 24.  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs. AA+ $\text{CrO}_3$ .

En la Figura 26 se observan los niveles de glutatión total en el tratamiento a corto (Figura 26a) y mediano plazo (Figura 26b) en los grupos tratados con  $\alpha$ -TOH,  $\text{CrO}_3$  y  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$ . En el grupo de  $\alpha$ -TOH se observa un ligero aumento que resulta significativo al comparar con el testigo aceite, mientras que en el grupo de  $\text{CrO}_3$  el nivel de glutatión total disminuye en comparación con el grupo testigo agua, en los grupos de  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$  a corto y mediano plazo el nivel de glutatión total incrementa significativamente al comparar con el grupo de  $\text{CrO}_3$  y en el caso del grupo combinado de mediano plazo el aumento también resulta significativo contra el testigo agua.





a) Corto plazo (D8)



b) Mediano plazo (D24)

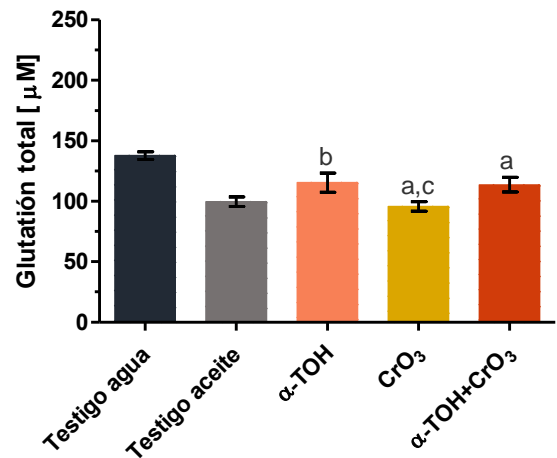
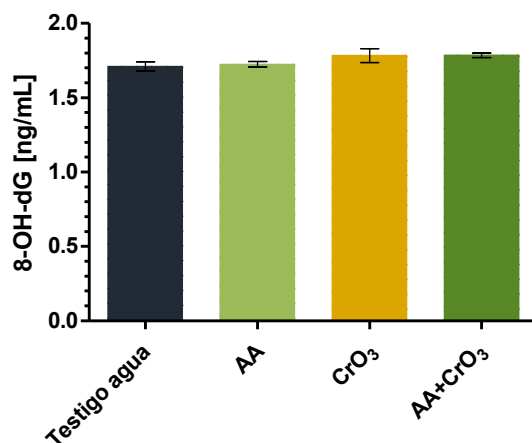


Figura 26. Promedio de las concentraciones de glutatión total en plasma de ratones. a) tratamiento a corto plazo (día 8); b) tratamiento a mediano plazo (día 24) con  $\alpha\text{-TOH}$ ,  $\text{CrO}_3$  y  $\alpha\text{-TOH+CrO}_3$ .  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs. aceite, <sup>c</sup>: vs.  $\alpha\text{-TOH+CrO}_3$ .

## 6.9. Niveles de 8-OHdG

En la Figura 27 se observan los niveles de 8-OHdG en plasma con el tratamiento a corto (Figura 27a) y mediano plazo (Figura 27b) en los grupos tratados con AA,  $\text{CrO}_3$  y  $\text{AA+CrO}_3$ . Se observa que en el grupo de  $\text{AA+CrO}_3$  a mediano plazo disminuyen significativamente los niveles de 8-OHdG con respecto al grupo testigo y  $\text{CrO}_3$ .

a) Corto plazo (D8)



b) Mediano plazo (D24)

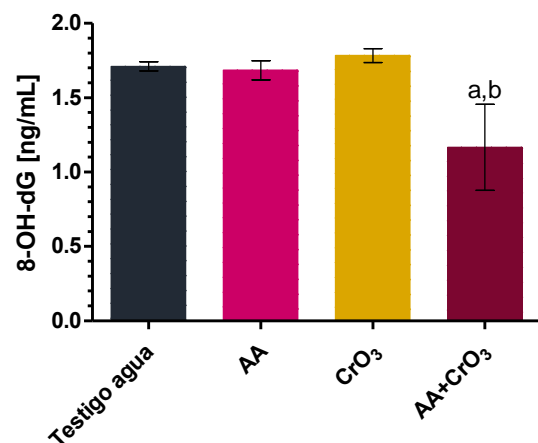
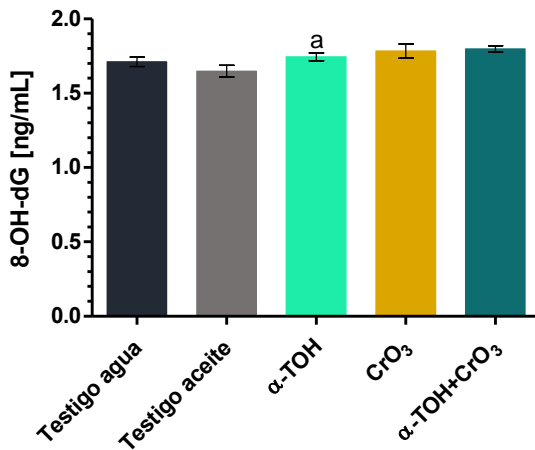


Figura 27. Promedio de las concentraciones 8-OHdG en plasma de ratones. a) tratamiento a corto plazo (día 8); b) tratamiento a mediano plazo (día 24) con AA,  $\text{CrO}_3$  y  $\text{AA+CrO}_3$ .  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs.  $\text{CrO}_3$ .

En la Figura 28 se observan los niveles de 8-OHdG en plasma con el tratamiento a corto (Figura 28a) y mediano plazo (Figura 28b) en los grupos tratados con  $\alpha$ -TOH,  $\text{CrO}_3$  y  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$ . En el grupo de  $\alpha$ -TOH del tratamiento a corto plazo hubo un aumento significativo de los niveles de 8-OHdG con respecto al grupo testigo aceite. Se observa que en el grupo de  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$  a mediano plazo disminuyen significativamente los niveles de 8-OHdG al comparar con el grupo  $\text{CrO}_3$ .

a) Corto plazo (D8)



b) Mediano plazo (D24)

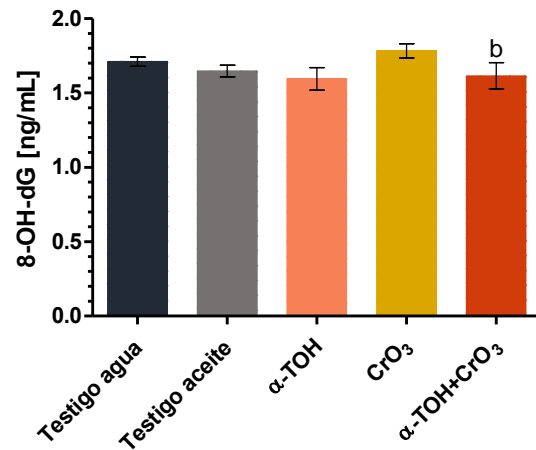


Figura 28. Promedio de las concentraciones 8-OHdG en plasma de ratones. a) tratamiento a corto plazo (día 8) b) tratamiento a mediano plazo (día 24) con  $\alpha$ -TOH,  $\text{CrO}_3$  y  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$ .  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo aceite; <sup>b</sup>: vs.  $\text{CrO}_3$ .

En la Figura 29 se observan los niveles de 8-OHdG en orina con el tratamiento agudo de AA,  $\alpha$ -TOH,  $\text{CrO}_3$ , AA+ $\text{CrO}_3$  y  $\alpha$ -TOH + $\text{CrO}_3$ . En el grupo tratado con  $\text{CrO}_3$  se incrementan significativamente los niveles de 8-OHdG, por el contrario, en ambos grupos combinados se observa una disminución significativa con respecto al grupo de  $\text{CrO}_3$ .



## Hora 48

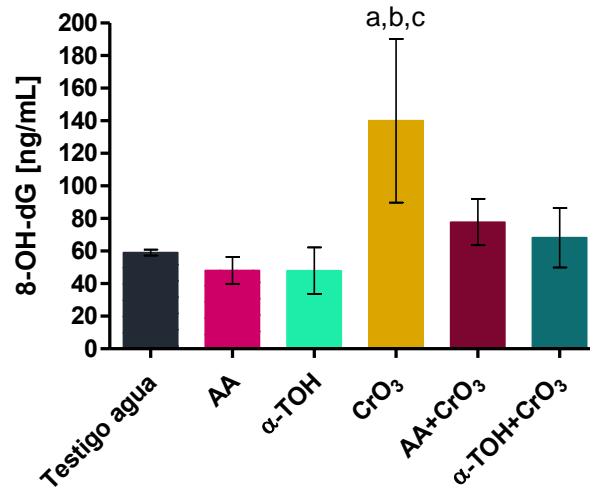
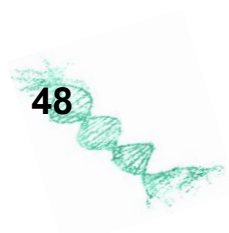


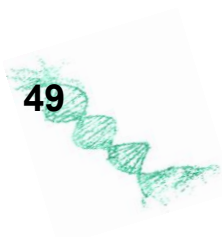
Figura 29. Promedio de las concentraciones 8-OHdG en orina de ratones con el tratamiento agudo de AA,  $\alpha$ -TOH, y  $\text{CrO}_3$  evaluados a las 48 horas.  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>: vs. Testigo agua; <sup>b</sup>: vs. AA+ $\text{CrO}_3$ ; <sup>c</sup>: vs.  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$ .



Cuadro 5. Resumen de los resultados obtenidos en los tratamientos a corto plazo en los diferentes parámetros de evaluación.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Vía de administración	Evaluación							
			MN	Apoptosis	Necrosis	EPC/ENC	Viabilidad celular	[Antioxidantes totales]	[Glutación total]	[8-OHdG] plasma
AA	100	Oral <i>ad libitum</i> (agua)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
$\alpha$ -TOH	20	Oral <i>ad libitum</i> (alimento)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++	+
CrO <sub>3</sub>	20	i.p.	++	++	++	+	--	+/-	--	+/-
AA+CrO <sub>3</sub>	100+20	Oral <i>ad libitum</i> (agua)+i.p.	--	--	--	--	++	++	++	+/-
$\alpha$ -TOH+CrO <sub>3</sub>	20+20	Oral <i>ad libitum</i> (alimento)+i.p.	--	--	--	--	++	++	+	+/-

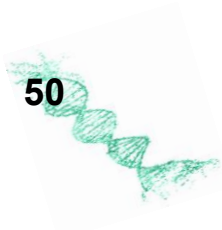
--: decremento leve; --: decremento moderado; +: incremento leve; ++: incremento moderado; +/-: sin efecto. Los grupos de AA,  $\alpha$ -TOH y CrO<sub>3</sub> se compararon contra su propio testigo y los grupos de AA+CrO<sub>3</sub> y de  $\alpha$ -TOH+CrO<sub>3</sub> se compararon con el grupo de CrO<sub>3</sub>.



Cuadro 6. Resumen de los resultados obtenidos en los tratamientos a mediano plazo en los diferentes parámetros de evaluación.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Vía de administración	Evaluación							
			MN	Apoptosis	Necrosis	EPC/ENC	Viabilidad celular	[Antioxidantes totales]	[Glutación]	[8-OHdG] plasma
AA	100	Oral <i>ad libitum</i> (agua)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	--	+/-
$\alpha$ -TOH	20	Oral <i>ad libitum</i> (alimento)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-
CrO <sub>3</sub>	20	i.p.	++	++	++	++	--	+/-	--	+/-
AA+ CrO <sub>3</sub>	100+20	Oral <i>ad libitum</i> (agua)+i.p.	--	--	--	--	++	++	+	--
$\alpha$ -TOH+ CrO <sub>3</sub>	20+20	Oral <i>ad libitum</i> (alimento)+i.p.	-	--	--	--	++	+/-	+	--

-: decremento leve; --: decremento moderado; +: incremento leve; ++: incremento moderado; +/-: sin efecto. Los grupos de AA,  $\alpha$ -TOH y CrO<sub>3</sub> se compararon contra su propio testigo y los grupos de AA+CrO<sub>3</sub> y de  $\alpha$ -TOH+CrO<sub>3</sub> se compararon con el grupo de CrO<sub>3</sub>.



## 7. Discusión

El consumo de antioxidantes tales como el AA y el  $\alpha$ -TOH, se ha relacionado con la mejora en el daño oxidante, ya que pueden prevenir la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con el daño al ADN como es el cáncer. Ya que los antioxidantes pueden inactivar moléculas altamente reactivas, como los RL, que se generan de manera normal durante varios procesos bioquímicos en las células o por la exposición a xenobióticos como el Cr(VI) (Singh *et al.* 2008; Chung *et al.* 2011). De ahí que en el presente estudio se evaluó el efecto de los tratamientos a corto y mediano plazo del AA y del  $\alpha$ -TOH sobre el daño oxidante del ADN en ratones Hsd:ICR expuestos a  $\text{CrO}_3$  y su relación con la apoptosis, viabilidad celular y los niveles de antioxidantes y 8-OHdG.

Los animales utilizados durante este estudio se evaluaron periódicamente, para detectar cambios en el peso corporal y la ingesta de agua y alimento. En los grupos tratados con  $\text{CrO}_3$ , solo o en combinación, se observó una tendencia a disminuir el peso corporal, que resultó estadísticamente significativo en el grupo de  $\alpha$ -TOH+ $\text{CrO}_3$  a corto plazo. La disminución en el peso corporal en ratones tratados con Cr(V) fue descrita por Rao *et al.* (2009), quienes observaron que, además, hubo una disminución significativa de los niveles de proteínas, lo cual se relaciona con la producción excesiva de EROs durante su reducción a Cr(III) que a su vez produce EOX, lo que conduce al deterioro o daño de las proteínas de los tejidos (Bagchi *et al.* 2002).

Las dosis planteadas fueron de 100 mg/kg para el caso del ácido ascórbico o 20 mg/kg de  $\alpha$ -TOH por 6 días (corto plazo) y 22 días (mediano plazo), sin embargo, debido a que los antioxidantes se adicionaron al agua o alimento, y por lo tanto el consumo fue *ad libitum*, la dosis promedio consumida diariamente de AA fue de 55 mg/kg en el tratamiento a corto plazo y de 44 mg/kg a mediano plazo; y para el caso del  $\alpha$ -TOH la dosis promedio fue de 11.45 mg/kg a corto plazo y 13 mg/kg a mediano plazo. Las dosis de AA y  $\alpha$ -TOH que se emplearon en este estudio fueron menores a la  $\text{LD}_{50}$  (Dosis Letal 50) para ratones (USP DI, 1999). Cabe mencionar que los grupos de  $\text{CrO}_3$  solo y combinados, tuvieron una tendencia a disminuir el consumo de agua y alimento siendo significativas las



diferencias en el tratamiento a mediano plazo, debido posiblemente a los efectos tóxicos del  $\text{CrO}_3$ .

Los animales tratados a corto o mediano plazo con AA o  $\alpha$ -TOH a no presentaron efectos tóxicos. Incluso se ha informado en diversos estudios que dosis de 10-400 mg/kg de AA vía i.g. por períodos de 11-90 días en roedores y de 500-5000 mg/día en humanos durante 2 semanas no inducen efectos tóxicos (Vojdani *et al.* 2000; Zanardo *et al.* 2003; ElShafai *et al.* 2011; Shivavedi *et al.* 2018). Por otra parte, el tratamiento oral con  $\alpha$ -TOH en roedores en dosis de 50-100 mg/kg vía i.g. durante 20-90 días y de hasta 500 mg/día durante 8 semanas en humanos tampoco produjo efectos tóxicos (Ota *et al.* 2004; Li *et al.* 2015; Mandil *et al.* 2016; Elayapillai *et al.* 2017).

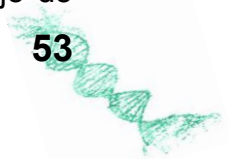
Los tratamientos con los antioxidantes solos, AA o  $\alpha$ -TOH, a corto y mediano plazo no tuvieron efectos genotóxicos, ya que durante los 10 o 26 días de tratamiento no incrementaron las frecuencias de MN. En estudios previos en nuestro laboratorio se ha demostrado que la administración de 100 mg/kg de AA i.p. o 20 mg/kg i.g. de  $\alpha$ -TOH en tratamientos agudos no incrementa los MN en EPC (García-Rodríguez *et al.* 2012a, 2016). Por otra parte, se ha observado que el tratamiento en ratones durante 10 días con dosis superiores a las de este estudio (1000 mg/kg de AA o 1200 UI (unidades internacionales) de vitamina E (804 mg/kg de  $\alpha$ -TOH) vía oral) no tiene efecto genotóxico, ya que no se incrementan los promedios de MN ni el porcentaje de daño al ADN, cuantificado mediante ensayo cometa (Miranda-Vilela *et al.* 2014). Cabe destacar que, en los estudios mencionados, y en la mayoría de los estudios en los que la administración de los antioxidantes es vía oral, se usó la sonda intragástrica. En humanos, el tratamiento a largo plazo con AA con 100 mg/kg vía oral durante 30 días tampoco tiene efectos genotóxicos, al no incrementar la frecuencia de MN, por el contrario, disminuye los MN basales en el epitelio bucal (Abasova *et al.* 2013). De igual forma, se ha descrito que dosis de 50 mg/kg de  $\alpha$ -TOH (proporcionado por cereales) en humanos durante 8 semanas no incrementa la frecuencia de MN (Fenech *et al.* 1997).

La administración de  $\text{CrO}_3$  indujo un incremento significativo de los promedios de MN, con lo que se corrobora su efecto genotóxico, ampliamente descrito para los compuestos de Cr(VI) (O'Brien *et al.* 2003; Henkler *et al.* 2010) y particularmente para el  $\text{CrO}_3$



(García-Rodríguez *et al.* 2012b, 2013). La mayor inducción de MN fue al día 8 (corto plazo) y 24 (mediano plazo), lo que corresponde a las 48 horas después de la administración, debido a que la mayor distribución y biotransformación de los agentes químicos se presenta a esta hora (Heddle *et al.* 1983; Hayashi *et al.* 1990). Se ha planteado que el daño genotóxico inducido por los compuestos de Cr(VI), es a través de la generación de EROs durante su reducción intracelular a Cr(III), ya que Cr(VI) tiene la capacidad de atravesar la membrana celular mediante canales transportadores de aniones y dentro de la célula se reduce rápidamente por reductores celulares (GSH, ascorbato y NADPH) a Cr(V), Cr(IV) y Cr(III), estos intermediarios son altamente reactivos y tienen afinidad con las bases y fosfatos de ADN, por lo que pueden causar daños al ADN por la producción de EROs que, a su vez, pueden inducir rupturas, aductos en la cadena del ADN, entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas, y por lo tanto, inducir daño mutagénico y carcinógeno (O'Brien *et al.* 2003; Arita y Costa, 2009; Jomova y Valko, 2011).

El consumo de AA a corto y mediano plazo previo a la administración de CrO<sub>3</sub> redujo entre un 64 y 83% los promedios de MN al comparar con el grupo CrO<sub>3</sub>, lo cual confirma el efecto protector que tiene el AA sobre el daño genotóxico inducido por CrO<sub>3</sub> (García-Rodríguez *et al.* 2012a, 2016), por lo que el AA también protege con tratamientos prolongados y vía oral *ad libitum*. El tratamiento a corto plazo presentó una mayor reducción de MN que el tratamiento a mediano plazo, particularmente en el día 10 en el que se observó una disminución del 80%. Se ha observado en otros estudios a corto plazo que el daño genotóxico inducido por diferentes xenobióticos como la radiación UV, metronidazol y radiación de cobalto-60, reduce entre un 60 y 70 % por el consumo de AA i.g. o en agua potable hasta por 10 días, en dosis de (23.3 mg/kg o 500 mg/kg) (Das *et al.* 2013; Zúñiga-González *et al.* 2015). Mientras que, en estudios donde el consumo de AA ha sido por 28-30 días, en dosis de 15 mg/kg o 1000 mg/kg, la protección del daño inducido por miltefosina o anfepramona, fue de 30-35%, y se observó reducción de la inducción de MN y del daño al ADN evaluado por ensayo cometa (Silva-Nunes, 2013; Castelo-Branco *et al.* 2019). La mayor protección observada en el tratamiento a corto plazo nos sugiere que el AA actúa de manera inmediata. Y debido a que el mecanismo de absorción es saturable, al ingerir grandes cantidades, el porcentaje de





absorción disminuye, por lo que la biodisponibilidad también disminuye, mientras la excreción de orina aumenta (Graumlich *et al.* 1997; Chehue *et al.* 2013; Du *et al.* 2012).

El efecto protector del AA sobre el daño genotóxico inducido por CrO<sub>3</sub>, observado en presente estudio, puede deberse a que el AA es capaz de eliminar las EROs, disminuyendo así el daño al ADN. Se ha encontrado que la presencia de Cr(VI) en la célula es reaccionar principalmente por los antioxidantes GSH y AA, ya que estas moléculas se unen a Cr(VI) y lo reducen a Cr(III). Se ha demostrado en estudios *in vivo* que el AA es el eliminador predominante (80-95%) en la reducción de Cr(VI). La reducción mediada por AA es más rápida y genera rendimientos del 25-80% menos de moléculas oxidantes en comparación con la reducción de Cr(VI) mediada por GSH (Macafie *et al.* 2010; Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2019). Además de que el pretratamiento de los animales con ascorbato disminuye la formación de Cr(V), evitando así, que Cr(V) pueda reaccionar a través de la reacción de Fenton con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y formar el •OH. La actividad antioxidante del AA se debe a que dona fácilmente sus electrones a los RL para neutralizarlos, y de esta manera genera DHA y AA•, el cual es un radical poco reactivo. Además, es capaz de regenerarse nuevamente a AA o DHA e incluso participar en la regeneración de α-TOH (Padayatty *et al.* 2002; Yeum *et al.* 2004; Valko *et al.* 2006; Du *et al.* 2012).

Con respecto al consumo de α-TOH previo al tratamiento con CrO<sub>3</sub>, la reducción de los promedios de MN fue de 34-57%, por lo que se demuestra que el α-TOH protege del daño genotóxico inducido por CrO<sub>3</sub>, lo cual concuerda con estudios anteriores en nuestro laboratorio, en los que el α-TOH fue administrado en una sola dosis de 20 mg/kg previo a la administración de CrO<sub>3</sub> y V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (García-Rodríguez *et al.* 2012a, 2016). La mayor protección por parte del α-TOH fue del 57% en el día 24 del tratamiento a mediano plazo. Sin embargo, se ha encontrado en estudios con ratas que el consumo de 50, 100 o 400 mg/kg de α-TOH por 5 o 7 días protege del daño genotóxico inducido por arsenito de sodio o fipronil entre un 50-90% en la reducción de MN, así como un 63% y 74% en la reducción de aberraciones cromosómicas y en el porcentaje de daño al ADN (cometas) (Oyagbemi *et al.* 2018; Badgujar *et al.* 2017). Mientras que en estudios en ratas con daño genotóxico inducido por arsenito de sodio o bisfenol A, con tratamientos de 30 o 90 días



con  $\alpha$ -TOH vía oral en dosis de 40 o 400 mg/kg, se observó una disminución de MN del 46 o 50% (Balakumar *et al.* 2010; Srivastava y Gupta, 2016) lo cual corrobora los resultados obtenidos en este estudio, por lo que se sugiere que el  $\alpha$ -TOH actúa de manera progresiva. Sin embargo, es importante recalcar que, en los estudios mencionados, el  $\alpha$ -TOH fue administrado vía i.g. El mecanismo de acción antioxidante del  $\alpha$ -TOH consiste en interrumpir el proceso de lipoperoxidación, mediante la donación de un hidrógeno al  $LOO^{\bullet}$ , lo cual genera al  $\alpha$ - $TO^{\bullet}$ , poco reactivo, incapaz de continuar la reacción en cadena de la lipoperoxidación lipídica. El  $\alpha$ -TOH también puede reaccionar con los radicales triclorometil,  $^{\bullet}OH$ ,  $O_2^{\bullet}$  y oxígeno sigulete ( $^1O_2$ ) (Sagayo *et al.* 2007; Fukusawa, 2008; Engin, 2009). Por lo que, con base en los resultados obtenidos en este estudio, el efecto antígenotóxico que se observó con el consumo de  $\alpha$ -TOH inducido por  $CrO_3$ , puede estar relacionado con la captura de EROs incluyendo los RL que se generan durante la reducción de Cr(VI) a Cr(III).

El aducto 8-OHdG es uno de los marcadores oxidantes en el ADN que se miden con más frecuencia, además de que es altamente mutagénico. Sin embargo, la mayoría de estos aductos son eliminados mediante mecanismos de reparación como BER (reparación por escisión de bases), para después ser transportados por plasma, saliva u orina para su excreción, donde puede ser detectado y cuantificado como un producto de reparación, tal como se realizó en este estudio (Wu *et al.* 2004; Singh *et al.* 2013; Nakabeppu, 2014).

Al evaluar los niveles de 8-OHdG en plasma se observó que el grupo de AA+ $CrO_3$  a mediano plazo presentó una reducción alrededor del 31.8% con respecto al grupo testigo y al  $CrO_3$  mientras que en el grupo de  $\alpha$ -TOH a corto plazo los niveles incrementan 5.5% con respecto al testigo aceite. Sin embargo, la cuantificación de los niveles fue muy baja, ya que se ha descrito que la concentración de 8-OHdG en trabajadores ocupacionalmente expuestos a Cr(VI) es alrededor de 2.5 a 2.8 ng/mL en plasma lo cual es significativamente mayor que lo obtenido en este estudio (Li *et al.* 2014). Debido a esto, se realizó la determinación de 8-OHdG en orina en los tratamientos agudos con AA,  $\alpha$ -TOH,  $CrO_3$  y grupos combinados, con lo cual, se observó que los niveles de 8-OHdG tienen un incremento significativo del 136.9% en el grupo tratado con  $CrO_3$ , lo que sugiere que no se están activando los sistemas de reparación, ya que se ha descrito que algunos



iones metálicos pueden inactivar los sistemas de reparación y con ello inducir genotoxicidad mediante la generación de EOX (Foksinski *et al.* 2007; Wawrzyniak *et al.* 2013; Wu *et al.* 2015). Por lo que se sugiere que el incremento de los niveles de 8-OHdG en orina en el grupo de CrO<sub>3</sub> fue producido por el EOX generado durante la reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) (Hodges y Chipman, 2002; Maeng *et al.* 2003). El incremento de los niveles de 8-OHdG en orina se ha observado en trabajadores expuestos a Cr(VI), en los que los niveles de 8-OHdG fueron de 23.8 ng/mL en promedio (con un rango de 1.1-975.0 ng/mL) (Setyaningsih *et al.* 2015), sin embargo, en nuestro estudio, los niveles fueron de 140 ng/mL, es decir casi 6 veces más que el promedio de los trabajadores expuestos, lo que podría deberse a que la exposición al Cr(VI) puede dañar el riñón y por ello, causar cambios en la concentración de 8-OHdG en la orina (Wang T *et al.*, 2011).

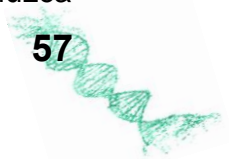
En contraparte, en los grupos combinados, de los tratamientos a corto y mediano plazo y del tratamiento agudo, se observó una disminución significativa de los niveles de 8-OH-dG del 44.4% en el grupo de AA+CrO<sub>3</sub> y del 51.3% en el grupo de α-TOH+CrO<sub>3</sub>. La reducción muy probablemente se debe al potencial antioxidante del AA y α-TOH, ya que estos antioxidantes son capaces de neutralizar las EROs, como lo es •OH producido por la reducción de Cr(VI) a Cr(III) (Foksinski *et al.* 2007 y Wawrzyniak *et al.* 2013). En diversos estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que los niveles plasmáticos altos y el consumo de AA o α-TOH por 1 hasta 28 días, en diferentes modelos biológicos expuestos a EOX producido por xenobióticos (nicotina, arsénico, etanol o ciclofosfamida) o condiciones patológicas (periodontitis o distrofia) disminuyen significativamente los niveles de aductos en el ADN, particularmente del 8-OHdG, detectado en fluidos (plasma y orina) y tejidos (hígado, aorta, riñón) desde el 18 hasta el 95% (Cheng *et al.* 2003; Ekuni *et al.* 2009; Yang *et al.* 2012; Ma *et al.* 2013; Passarieux *et al.* 2015). De ahí que al relacionar estos resultados con los de MN y apoptosis, se corrobore que los antioxidantes a corto y mediano plazo podrían actuar antes de que el CrO<sub>3</sub> genere daño genotóxico.

Al realizar el análisis de apoptosis en los grupos tratados sólo con AA o α-TOH, a corto y mediano plazo, no se incrementaron los promedios de células apoptóticas, por lo que, al relacionar estos resultados con los promedios de MN, se sugiere que al no haber células



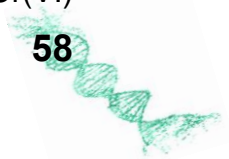
genéticamente dañadas no hay células que mandan a apoptosis, corroborando que el consumo de AA o  $\alpha$ -TOH no induce daño genotóxico. La apoptosis, es un tipo de muerte celular que ocurre de manera normal en los organismos que puede ser activada por una variedad de xenobióticos, incluidos metales, como un mecanismo para eliminar las células genéticamente dañadas. Por lo que la apoptosis ocurre esencialmente cuando el daño celular, incluido el daño al material genético, ha excedido la capacidad de reparación. Por lo cual al ser una de las respuestas celulares frente al daño al ADN, la apoptosis puede ser considerada como un marcador de daño genotóxico (Hayashi *et al.* 1990; Wu *et al.* 2012; García-Rodríguez *et al.* 2013). En el grupo de  $\text{CrO}_3$  se observó un incremento significativo de las células apoptóticas, lo que confirma los resultados obtenidos en estudios previos en nuestro laboratorio, cuando se administraron dosis iguales a las empleadas en este estudio (García-Rodríguez *et al.* 2015, 2017). Se ha documentado que las EROs producidas durante la reducción de  $\text{Cr(VI)}$  a  $\text{Cr(III)}$  genera  $\text{EOx}$  y que, a su vez, puede dañar el ADN y alterar la homeostasis celular, lo que desencadena la apoptosis (Banu *et al.* 2011). Por lo tanto, las EROs generadas a partir de la reducción del  $\text{Cr(VI)}$  juegan un papel importante en la vía de señalización de apoptosis (Hayashi *et al.* 2004; García-Rodríguez *et al.* 2013). Particularmente, se ha considerado que las vías principales implicadas en la apoptosis inducida por  $\text{Cr(VI)}$ , son por medio de las rutas dependientes e independientes de la proteína p53, además de una disminución de la proteína Bcl-2 (anti-apoptótica) (Singh, 2008; Banu *et al.* 2011). Si bien la apoptosis es un mecanismo relevante para el mantenimiento de una población de células funcionales y sanas, hay un margen de actividad apoptótica que si se rebasa puede conducir a errores que permiten a las células dañadas escapar de la muerte celular y proliferar, lo cual podría ser un factor importante en la carcinogénesis que se ha observado en personas expuestas a cromo (Das *et al.* 2015).

Cuando el AA o el  $\alpha$ -TOH se consumieron previo a la administración  $\text{CrO}_3$  hubo un comportamiento similar tanto a corto como a mediano plazo, al disminuir significativamente las células apoptóticas al comparar con el grupo administrado sólo con  $\text{CrO}_3$ . Esto podría estar relacionado con la disminución de MN observada en los grupos combinados, sugiriendo que, al haber menos células con daño al ADN, menos células son enviadas a apoptosis, por lo que los antioxidantes actúan antes de que se produzca



un daño. Esto concuerda con otros estudios, pues se ha mostrado que las vitaminas antioxidantes como la vitamina C (AA) o E ( $\alpha$ -TOH) inducen la apoptosis en células dañadas, pero no en células normales (Borek, 2004; Miranda-Vilela *et al.*, 2014). Se ha observado que la administración con AA vía oral o i.p. e incluso en estudios *in vitro*, las células apoptóticas inducidas por diferentes xenobióticos (anfepirama, plomo) disminuyen significativamente (Banu *et al.* 2011; Khordad *et al.* 2013; Silva-Nunes *et al.* 2013) y se ha mostrado que el AA tiene un efecto anti-apoptótico al disminuir la proteína Bax y mejorar la proteína Bcl-2 (ElBakry y Tawfik, 2014; Afifi y Embaby, 2016). Por otra parte, en estudios donde se ha inducido la apoptosis por xenobióticos como el arsenito de sodio o fipronil, o bien en condiciones de hipoxia o hiperglucemia proponen que el consumo de  $\alpha$ -TOH tiene efectos anti-apoptóticos, al disminuir significativamente las células apoptóticas, mediada por la disminución en la expresión de caspasa-3 y promoviendo la Bcl-2 y Akt, sugiriendo que su efecto anti-apoptótico se debe a sus propiedades antioxidantes (Oyagbemi *et al.* 2018; Abdel-Daim y Abdeen, 2018; Wu *et al.* 2018). De acuerdo con De Carvalho *et al.* (2019) los antioxidantes pueden disminuir los niveles de EROs, por lo tanto, inhibir la apoptosis inducida por EROs.

Al evaluar la citotoxicidad mediante la relación de EPC con respecto a los ENC, se observa un incremento significativo de los EPC/ENC en el grupo tratado con  $\text{CrO}_3$  en los días 8 del tratamiento a corto plazo y 22, 24 y 26 del tratamiento a mediano plazo con respecto al testigo. Por lo que al comparar con los grupos combinados de AA o  $\alpha$ -TOH de ambos tratamientos, los promedios de EPC/ENC se normalizan, lo cual da un indicio del efecto citotóxico del  $\text{CrO}_3$  y de la protección de los antioxidantes. Si bien la OECD (2016) 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 realizara la evaluación de viabilidad celular empleando la técnica de NA/BrEt de acuerdo con la técnica modificada por García-Rodríguez *et al.* (2013). Se observó que la administración de  $\text{CrO}_3$  incrementó significativamente las células necróticas y, por ende, hubo una disminución significativa en las células viables. Lo anterior coincide con otros estudios *in vivo* e *in vitro* donde se ha observado que los compuestos de Cr(VI)



aumentan la pérdida de la viabilidad celular al incrementar la tasa de células necróticas y los niveles de TNF- $\alpha$  y disminuir las células viables (Bagchi *et al.* 2002; Karaulov *et al.* 2019; Shil y Pal, 2019). Se ha informado que los compuestos de Cr(VI) son altamente tóxicos para las células, y su citotoxicidad parece estar mediada por el EOX y el daño en el ADN (ElBakry y Tawfik, 2014).

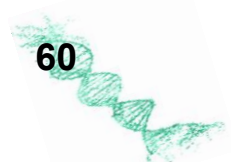
En contraparte, los tratamientos a corto y mediano plazo con AA o  $\alpha$ -TOH, no tuvieron efectos sobre las células necróticas y no viables, por lo que su consumo durante 6 hasta 22 días no tiene efecto citotóxico. Por el contrario, se ha observado que el consumo o administración de estos antioxidantes protegen del daño citotóxico inducido por metales (Hasaneini y Emamjomeh, 2019). Particularmente la ingesta de AA en dosis de 60 y 120 mg/kg o 2 y 10 mg/kg de  $\alpha$ -TOH durante 5 hasta 30 días protegen del efecto citotóxico inducido por compuestos metálicos, como el dicromato de potasio o el cloruro de níquel e incluso de mezclas de metales (cadmio, cobre, plomo y zinc) (Rao *et al.* 2009; ElBakry y Tawfik, 2014; Harabawy y Mosleh, 2014). Se ha propuesto que la vía oral, al tener una absorción intestinal limitada o excreción renal rápida, no produce concentraciones de ascorbato plasmático prooxidantes (Chen *et al.* 2008). De ahí que, se sugiere que el AA y el  $\alpha$ -TOH son capaces de proteger o modular no sólo el daño genotóxico, sino también del daño citotóxico inducido por compuestos de Cr(VI) *in vivo*.

Por otra parte, la alteración de la homeostasis redox es crucial en la toxicidad inducida por los compuestos de Cr(VI) (Valko *et al.* 2006). Por ellos es importante medir la capacidad antioxidante total, un biomarcador que permite determinar el potencial antioxidante en fluidos corporales por la acción antioxidante de los compuestos consumidos que se absorben y están presentes en el plasma (Fraga *et al.* 2014). Se determinaron los niveles de antioxidantes totales y glutatión total. Con la evaluación de la capacidad de antioxidantes totales presentes en plasma, se observó que los grupos de antioxidantes solos y en el grupo de CrO<sub>3</sub>, a corto y mediano plazo, no presentan cambios significativos. Esto pudo deberse a que la homeostasis redox se mantiene por un sistema complejo donde el cambio en la concentración de un antioxidante puede ser compensado por otro (Benzie y Strain, 1999; Marim *et al.* 2015). Mientras que en los grupos de combinados de AA+CrO<sub>3</sub> de ambos tratamientos (siendo más evidente en el tratamiento



a corto plazo) y el grupo de  $\alpha$ -TOH+CrO<sub>3</sub> a corto plazo se incrementaron significativamente los niveles de antioxidantes totales con respecto al grupo de CrO<sub>3</sub> lo que podría indicar que la vía de protección del daño al ADN es mediante la estimulación del sistema antioxidante. Nuestros resultados coinciden con lo observado en otros estudios, donde se ha visto que la ingesta diaria de 50 hasta 1000 mg/kg de AA o 150 mg/kg de  $\alpha$ -TOH o 400 UI de vitamina E (268 mg/kg de  $\alpha$ -TOH) durante 1, 3 o hasta 12 meses en ratas o trabajadores expuestos a plomo incrementan significativamente los niveles de antioxidantes totales (Rendón-Ramírez *et al.* 2014; Karamian *et al.* 2015; Salehi *et al.* 2015). Sin embargo, no existen estudios donde se evalúe este parámetro en ratones tratados con los antioxidantes en el agua o alimento expuestos a Cr(VI). Se ha propuesto que un aumento en la capacidad antioxidante está relacionado con la disminución de EOX por la eliminación de RL (Boyacioglu *et al.* 2014). Por lo que estos resultados nos sugieren que el AA y el  $\alpha$ -TOH disminuye el EOX al aumentar la capacidad antioxidante total.

El glutatión es el principal tiol celular y participa en la protección de las células contra el daño producido por compuestos tóxicos, EROs y ERN debido a su capacidad de capacidad de reaccionar directamente con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\cdot$ O<sub>2</sub><sup>-</sup> y  $\cdot$ OH. Es capaz de quelar y desintoxicar metales poco después de que ingresen a la célula (Rao *et al.*, 2009). Cuando se evaluó la concentración de glutatión total, se observó que el tratamiento de AA a mediano plazo disminuyó los niveles de glutatión total, lo que concuerda con observaciones en eritrocitos humanos, el AA puede disminuir las concentraciones de GSH, NADPH y NADH, sin que cause EOX (May *et al.* 2001). El tratamiento con CrO<sub>3</sub> disminuye la concentración de glutatión total. Se sabe que la disminución significativa en GSH es un indicador de EOX, ya que se ha sugerido que el agotamiento en la actividad de GSH podría deberse a su participación en la formación de complejos de cromo, además de que puede reflejar su uso para contrarrestar el daño oxidante bajo la influencia de EROs generados por el EOX y, por lo tanto, el GSH proporciona una de las principales defensas contra el daño celular inducido por EROs (Rao *et al.* 2009; Harabawy y Mosleh, 2014; Mandil *et al.* 2016). Por lo que la disminución significativa en los niveles de glutatión total observada en este estudio puede deberse a su utilización al eliminar el  $\cdot$ OH generado por el EOX producido durante la reducción intracelular del Cr(VI)



Por otra parte, en los grupos de  $\alpha$ -TOH solo y los grupos combinados de AA+CrO<sub>3</sub> y  $\alpha$ -TOH+CrO<sub>3</sub> incrementaron significativamente los niveles de glutatión total al compararlos con el grupo de CrO<sub>3</sub>. Los resultados muestran que los niveles altos de antioxidantes totales podrían depender de las concentraciones elevadas de glutatión total. Dado que AA y  $\alpha$ -TOH tienen un gran potencial antioxidante, pueden neutralizar los prooxidantes y preservar los niveles de GSH (Kaur *et al.* 2009). Se ha mostrado que el consumo de 100 o 500 mg/kg de AA así como la suplementación con 100, 500 o 800 mg/kg de  $\alpha$ -TOH en ratones tratados con fipronil, ratas tratadas con picolinato de cromo, ratas con hiperhomocisteinemia crónica o trabajadores expuestos a la contaminación por la incineración de residuos hospitalarios, restablecen los valores normales de GSH e incluso los incrementan al compararlos con los valores reducidos de los xenobióticos (Mahmoud *et al.*, 2006, Wilhelm-Filho *et al.* 2010; Boyacioglu *et al.* 2014; Badgujar *et al.* 2015). Se ha sugerido que el aumento de los niveles de GSH por el tratamiento con vitamina E evita el daño al ADN debido a la eliminación de RL (Valko *et al.* 2006; Ma *et al.* 2013). El restablecimiento de los niveles de glutatión total fue más notorio en ambos grupos de AA+CrO<sub>3</sub>, particularmente en el tratamiento a corto plazo. Esto se debe que posiblemente el AA no sólo actúa como un antioxidante sino también como un co-antioxidante implicado en el reciclaje de algunos antioxidantes como el GSH y el  $\alpha$ -TOH. Además, se ha propuesto que el AA es capaz de eliminar directa y rápidamente los RL o inhibir su formación, ya que puede actuar regulando las defensas antioxidantes endógenas (ElGendy *et al.* 2010).





## 8. Resumen de resultados

- Se corroboró el daño genotóxico del  $\text{CrO}_3$  y se cuantificó el daño oxidante al ADN ya que incrementaron significativamente los promedios de MN y los niveles de 8-OHdG.
- El tratamiento a corto y mediano plazo con AA y  $\alpha$ -TOH no inducen daño genotóxico ya que no presentaron efectos significativos sobre los promedios de MN y los niveles de 8-OHdG.
- Los tratamientos con AA y  $\alpha$ -TOH (corto y mediano plazo) previo a la administración de  $\text{CrO}_3$ , protegen del daño genotóxico inducido por los compuestos de Cr(VI), ya que redujeron significativamente los promedios de MN y los niveles de 8-OHdG.
- La administración de  $\text{CrO}_3$  induce daño citotóxico al incrementar las células apoptóticas y necróticas y disminuir la viabilidad celular.
- Los tratamientos a corto y mediano plazo con AA o  $\alpha$ -TOH no inducen daño citotóxico ya que no presentaron efectos significativos sobre las células apoptóticas y necróticas y la viabilidad celular.
- Los tratamientos con AA o  $\alpha$ -TOH a corto y mediano plazo, previo a la administración de  $\text{CrO}_3$ , redujeron significativamente los promedios de las células apoptóticas y necróticas y aumentaron la viabilidad celular en comparación con el grupo tratado sólo con  $\text{CrO}_3$ .
- La administración de  $\text{CrO}_3$  presenta efectos significativos sobre los niveles de glutatión total ya que los reduce.
- Los tratamientos con AA o  $\alpha$ -TOH a corto y mediano plazo presentan efectos sobre los niveles de glutatión total; en el grupo de AA a mediano plazo disminuyeron significativamente y en los grupos de  $\alpha$ -TOH de corto y mediano plazo incrementaron.
- Los tratamientos con AA y  $\alpha$ -TOH a corto y mediano plazo, previo a la administración de  $\text{CrO}_3$ , incrementaron significativamente la capacidad antioxidante totales y los niveles de glutatión total, lo que podría estar relacionado con la regulación del GSH.



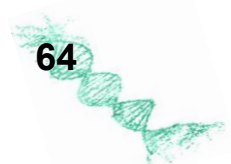
## 9. Conclusiones y comentarios finales

- Los tratamientos de AA y del  $\alpha$ -TOH, a corto y mediano plazo, protegen del daño genotóxico y citotóxico inducido por el  $\text{CrO}_3$ , ya que disminuyeron significativamente los promedios de MN y restablecieron la viabilidad celular.
- La vía de protección del daño genotóxico podría deberse a la neutralización directa del  $\bullet\text{OH}$  o indirecta mediante la modulación del sistema antioxidante endógeno que inhibió su formación, ya que no se incrementaron los niveles del aducto 8-OHdG y los promedios de células apoptóticas cuando se administraron los tratamientos de AA y del  $\alpha$ -TOH previó al tratamiento con el  $\text{CrO}_3$ .
- El tratamiento de AA a corto plazo tuvo una mayor eficacia en la protección del daño genotóxico y citotóxico inducido por el  $\text{CrO}_3$ . Además de que, los tratamientos a corto y mediano plazo mostraron una mayor protección que lo reportado para los tratamientos agudos.
- Con base en estos resultados, se sugiere que, aunque la exposición de las poblaciones humanas a metales con potencial cancerígeno como los compuestos de Cr(VI), puede representar un riesgo genotóxico y citotóxico, los antioxidantes presentes en la dieta, como el AA y el  $\alpha$ -TOH, pueden jugar un papel importante en la prevención o como coadyuvante en el tratamiento del daño oxidante inducido por la exposición a estos agentes. Además, este tipo de estudios generan expectativas en campos de la investigación como el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con el EOX y daño al ADN.

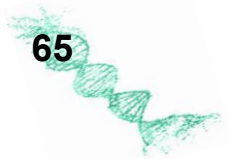


## 10. Referencias bibliográficas

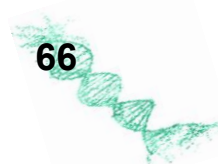
- Abasova Y, Reutova N, Sycheva L, Chernysheva E. 2013. Studies of antimutagenic effects of vitamins A and C in humans. *Bull Exp Biol Med* 154(5): 649-653.
- Abdel-Daim MM, Abdeen A. 2018. Protective effects of rosuvastatin and vitamin E against fipronil-mediated oxidative damage and apoptosis in rat liver and kidney. *Food Chem Toxicol* 114: 69-77.
- Abrevaya X. 2008. ¿Qué es la genotoxicidad? *Intra Med Artículos* (4711).
- Adler ID, Bootman J, Favor J, Hook G, Schriever G, Welzl G, Whorton E, Yoshimura I, Hayashi M. 1998. Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat Res* 417: 19-30.
- Afifi OK y Embaby AS. 2016. Histological study on the protective role of ascorbic acid on cadmium induced cerebral cortical neurotoxicity in adult male albino rats. *J Microsc Ultrastruct* 4(1): 36-45.
- Allen RT, Hunter WJ III, Agrawal DK. 1997. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol* 37: 215-228.
- Ames BN. 1989. Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. *Environ Mol Mutagen* 14(S16): 66-77.
- Arita A y Costa M. 2009. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics* 1: 222-228.
- Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tsurudome Y, Itoh H, Kasai H. 1998. Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem Biophys Res Commun* 243(3): 678-682.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2008. Toxicological profile for chromium. PHS. US Department of Health and Human Services.
- Avello M y Suwalsky M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* 494: 161-172.
- Badgujar PC, Pawar NN, Chandratre GA, Telang AG, Sharma AK. 2015. Fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice: protective effect of vitamin E and vitamin C. *Pestic Biochem Physiol* 118: 10-18.
- Badgujar PC, Selkar NA, Chandratre GA, Pawar NN, Dighe VD, Bhagat ST, Telang AG, Vanage GR. 2017 Fipronil-induced genotoxicity and DNA damage *in vivo*: Protective effect of vitamin E. *Hum Exp Toxicol* 36(5): 508-519.
- Bagchi D1, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG. 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 180(1):5-22.
- Balakumar BS, Suresh R and Venugopal R. 2010. Modulatory effects of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol on arsenic induced micronuclei formation. *Int J Pharmacol* 6(5): 676-680.



- Banu S, Stanley J, Lee J, Stephen S, Arosh J, Hoyer P, Burghardt RC. 2011. Hexavalent chromium-induced apoptosis of granulosa cells involves selective sub-cellular translocation of Bcl-2 members, ERK1/2 and p53. *Toxicol Appl Pharmacol* 251(3): 253-266.
- Baskic D, Popovic S, Ristic P, Arsenijevic NN. 2006. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int* 30: 924-932.
- Benzie I y Strain J. 1999. Effect of vitamin C supplementation on concentrations of vitamins C and E in fasting plasma. *Asia Pac J Clin Nutr* 8(3): 207-210.
- Berger TM, Polidori MC, Dabbagh A, Evans PJ, Halliwell B, Morrow JD Frei B. 1997. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. *J Biol Chem* 272(25): 15656-15660.
- Beyersmann D y Hartwing A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and celular mechanisms. *Arch Toxicol* 82: 493-512.
- Blé-Castillo, Díaz-Zagoyab JC, José D. Méndez. 2007. Suplementación con vitamina E, ¿benéfica o dañina? *Gac Méd Méx* 144(2): 147-154.
- Bolognesi C y Hayashi M. 2011. Micronucleus assay in aquatic animal. *Mutagenesis* 26(1): 205-213.
- Borek C. 2004. Dietary antioxidants and human cancer. *Integr Cancer Ther* 3: 333-341.
- Boyacioglu M, Sekkin S, Kum C, Korkmaz D, Kiral F, Yalinkilinc HS, Ak MO, Akar F. 2014. The protective effects of vitamin C on the DNA damage, antioxidant defenses and aorta histopathology in chronic hyperhomocysteinemia induced rats. *Exp Toxicol Pathol* 66(9-10): 407-413.
- Castelo-Branco PV, Alvesa HJ, Lacerda Pontes R, Maciel-Silva VL, Ferreira Pereira SR. 2019. Ascorbic acid reduces the genetic damage caused by miltefosine (hexadecylphosphocholine) in animals infected by Leishmania (Leishmania) infantum without decreasing its antileishmanial activity. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 9: 8-15.
- Castillo E, Granados M, Cortina JL. 2002. Chemically facilitated chromium(VI) transport throughout an anion-exchange membrane application to an optical sensor for chromium(VI) monitoring. *J Chromatogr A* 963: 205-211.
- Chazot C y Kopple JD. 2013. Vitamin metabolism and requirements in renal disease and renal failure. En: Nutritional management of renal disease. Tercera edición. USA. Ed. Academic Press, 351-382.
- Chehue Romero A, Olvera Hernández EG, Flores Cerón T, Álvarez Chávez A. 2013. The exogenous antioxidants, oxidative stress and chronic degenerative diseases - A role for antioxidants. En: Oxidative stress and chronic degenerative diseases- A role for antioxidants. Ed. IntechOpen, 33-57.
- Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, Khosh DB, Drisko J, Levine M. 2008. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(32): 11105-11109.
- Chen QY, DesMarais T, Costa M. 2019. Metals and mechanisms of



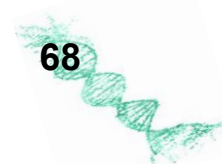
- carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 59: 537-554.
- Cheng Y, Li HL, Wang HF, Sun HF, Liu YF, Peng SX, Liu KX, Guo ZY. 2003. Inhibition of nicotine-DNA adduct formation in mice by six dietary constituents. *Food Chem Toxicol* 41(7): 1045-1050.
- Chung CJ, Pu YS, Chen YT, Su CT, Wu CC, Shiue HS, Huang CY, Hsueh YM. 2011. Protective effects of plasma alpha-tocopherols on the risk of inorganic arsenic-related urothelial carcinoma. *Sci Total Environ* 409(6): 1039-1045.
- Combs GF y McClung JP. 2017. The vitamins, fundamental aspects in nutrition and health. Quinta edición. Londres. Ed. Academic Press, 207-295.
- Das J, Kang M, Kim E, Kwon D, Choi Y, Kim J. 2015. Hexavalent chromium induces apoptosis in male somatic and spermatogonial stem cells via redox imbalance. *Sci Rep* 5(1): 1-14.
- Das Roy L, Giri S, Singh S, Giri A. 2013. Effects of radiation and vitamin C treatment on metronidazole genotoxicity in mice. *Mutat Res* 753(2): 65-71.
- De Carvalho Melo-Cavalcante AA, da Rocha Sousa L, Alencar MVOB, de Oliveira Santos JV, da Mata AMO, Paz MFCJ, de Carvalho RM, Nunes NMF, Islam MT, Mendes AN, Gonçalves JCR, da Silva FCC, Ferreira PMP, de Castro E Sousaa JM. 2019. Retinol palmitate and ascorbic acid: Role in oncological prevention and therapy. *Biomed Pharmacother* 109: 1394-1405.
- Degterev A, Yuan J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(5): 378-390.
- Ding M y Shi X. 2002. Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 234-235: 293-300.
- Du J, Cullen JJ, Buettner GR. 2012. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* 1826(2): 443-457.
- Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Koikeguchi S, Yamamoto T. 2009. Vitamin C intake attenuates the degree of experimental atherosclerosis induced by periodontitis in the rat by decreasing oxidative stress. *Arch Oral Biol* 54(5): 495-502.
- Elayapillai SP, Teekaraman D, Paulraj RS, Jagadeesan A. 2017. Ameliorative effect of  $\alpha$ -tocopherol on polychlorinated biphenyl (PCBs) induced testicular Sertoli cell dysfunction in F1 prepuberal rats. *Exp Toxicol Pathol* 69(8): 681-694.
- EIBakry RH y Tawfik SM. 2014. Histological study of the effect of potassium dichromate on the thyroid follicular cells of adult male albino rat and the possible protective role of ascorbic acid (vitamin C). *J Microsc Ultrastructure* 2: 137-150.
- Elena GA. 2002. Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Rev Arg Anest* 60(6): 391-401.
- El-Gendy KS, Aly NM, Mahmoud FH, Kenawy A, El-Sebae AK. 2010. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food Chem Toxicol* 48(1): 215-221.
- EIShafai A, Zohdy N, El Mulla K, Hassan M, Morad N. 2011. Light and electron microscopic study of the toxic effect of prolonged lead exposure on the seminiferous tubules of albino rats and the



- possible protective effect of ascorbic acid. *Food Chem Toxicol* 49: 734-743.
- Engin KN. 2009. Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Mol Vis* 15: 855-860.
- EPA, Environmental Protection Agency. 1998. Integrated Risk information System (IRIS) on chromium VI. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC. Disponible en: [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris\\_documents/documents/subst/0144\\_summary.pdf](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0144_summary.pdf)
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567: 1-6.
- FDA, Food and Drugs Administration. 2000. Redbook. IV. C.1.d. Mammalian erythrocyte micronucleus test, 1-6.
- Fenech M y Crott J. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 504: 131-136.
- Fenech M, Dreosti I, Aitken C. 1997. Vitamin-E supplements and their effect on vitamin-E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 18(2): 359-364.
- Foksinski M, Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, Guz J, Szpila A, Dziaman T. 2007. Effects of basal level of antioxidants on oxidative DNA damage in humans. *Eur J Nutr* 46: 174-180.
- Forman H, Zhang H, Rinna A. 2009. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30(1-2): 1-12.
- Fraga CG, Oteiza PI, Galleano M. 2014. *In vitro* measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochim Biophys Acta* 1840(2): 931-4.
- Friberg L, Nordberg GF, Vouk, VB. 1990. Handbook on the toxicology of metals. 2° ed. Amsterdam. Ed. Elsevier. Science Publishers BV. Vol. II. 185-205.
- Fukuzawa K. 2008. Dynamics of lipid peroxidation and antioxidant of alpha-tocopherol in membranes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokio)*. 54(4): 273-285.
- García GA, Cobos C, Rey CA, Mejía OR, Casariego CA, Clavijo D, García A, Hernández S, Báez SA. 2006. Biología, patobiología y bioclínica de la actividad de oxidorreducción de la vitamina C en la especie humana. *Universitas Médica* 47(4): 349-363.
- García-Rodríguez MC y Altamirano-Lozano MA. 2006. La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón *in vivo*. *Bioquímica* 32: 15-24.
- García-Rodríguez MC, Cervantes-Juárez MM, Altamirano-Lozano MA. 2013. Antigenotoxic and apoptotic activity of green tea polyphenol extracts on hexavalent chromium-induced DNA damage in peripheral blood of CD-1 mice: analysis with differential acridine orange/ethidium bromide staining. *Oxid Med Cell Longev* 13: 1-9.
- García-Rodríguez MC, Gordillo-García A, Altamirano-Lozano M. 2017. The role of vitamin C in the protection and modulation of genotoxic damage induced by metals associated with oxidative stress. En: Vitamin C. Ed. IntechOpen, 99-112.



- García-Rodríguez MC, Hernández-Cortés LM, Altamirano-Lozano MA. 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. *Oxid Med Cell Longev* 1-11.
- García-Rodríguez M, Serrano-Reyes G, Altamirano-Lozano M. 2012a. Comparative study *in vivo* of the genotoxic damage induced by CrO<sub>3</sub> and the effects of the antioxidants: ascorbic acid, alpha-tocopherol and beta-carotene. *Free Radic Biol Med* 53(1): 2-3.
- García-Rodríguez MC, Serrano-Reyes G, Retana-Ugalde R, Altamirano-Lozano M. 2015. Effect of ascorbic acid and (-)-epigallocatechin-3-gallate on oxidative damage induced by chromium (VI) in Hsd:ICR mice. *Free Radic Biol Med* 87(1): S95.
- García-Rodríguez MC, Vilches-Larrea RE, Nicolás-Méndez T, Altamirano-Lozano MA. 2012b. El té verde en la quimioprevención *in vivo* del daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (cromo [VI]). *Nutr Hosp* 27(4): 1204-1212.
- García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. 2001. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res* 496(1-2): 145-151.
- Giono LE y Nieto MN, Cambindo BAE, Dujardin G, Muñoz MJ, Kornblihtt AR. 2016. The RNA response to DNA damage. *J Mol Biol* 428 (12): 2636-2651.
- Godic A, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. 2014. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 1-6.
- Graumlich JF, Ludden TM, Conry-Cantilena C, Cantilena LRJ, Wang Y, Levine M. 1997. Pharmacokinetic model of ascorbic acid in healthy male volunteers during depletion and repletion. *Pharm Res* 14(9): 1133-1139.
- Griffith O. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106(1): 207-212.
- Halliwell B y Gutteridge JM. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 18: 125-126.
- Halliwell B y Gutteridge JMC. 1999. Free radicals in biology and medicine. Tercera ed. Oxford. Ed. Oxford University Press.
- Harabawy AS, Mosleh YY. 2014. The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 104: 28-35.
- Harper JW y Elledge SJ. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28(5): 739-745.
- Hasanein P y Emamjomeh A. 2019. Beneficial effects of natural compounds on heavy metal-induced hepatotoxicity. En: Dietary interventions in liver disease. USA. Ed. Academic Press, 345-355.
- Hayashi M, MacGregor J, Gatehouse D, Adler I, Blaker D, Dertinger S, Krishna G, Morita T, Ruso A, Suto S. 2000. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II: Some aspects of protocol design including repeated treatment, integration with toxicity testing and automated scoring. *Env Mol Mutagen* 35: 234-252



- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res* 245: 245-249.
- Hayashi Y, Kondo T, Zhao Q-Li, Ogawa R, Cui Zheng-Guo, Loreto B-FJr, Teranishi H, Kasuta M. 2004. Signal transduction of p53-independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells. *Toxicol and Applied Pharmacol* 197: 96-106.
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutat Res* 123(1): 61-118.
- La inducción de micronúcleos como medida de genotoxicidad. Un informe del Programa Gene-Tox de la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU.
- Henkler F, Brinkmann J, Luch A. 2010. The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics cancers. *Cancers (Basel)* 2: 376-396.
- Hernández-Rincón S. 2010. Citotoxicidad y genotoxicidad del compuesto de minerales trióxido (MTA): una revisión bibliográfica. *Endod Div RAOA* 98(4): 313-321.
- Hodges N y Chipman J. 2002. Down-regulation of the DNA-repair endonuclease 8-oxo-guanine NA glycosylase1 (hOGG1) by sodium dichromate in cultured human A549 lung carcinoma cells. *Carcinogenesis* 23(1): 55-60.
- Hollstein M, Shomer B, Greenblat M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC. 1996. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res* 24: 141-146.
- Holmes AL, Wise SS, Wise Sr JP. 2008. Carcinogenicity of hexavalent chromium. *Indian J Med Res* 128: 353-372.
- Hummel M, Standl E, Schnell O. 2007. Chromium in metabolic and cardiovascular disease. *Horm Metab Res* 39: 743-751.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. 1997. Chromium, nickel and welding: summary of data reported and evaluation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. WHO. Vol.49. pp. 257.
- Institute of Medicine (US) Food and Nutrition Board, Dietary Antioxidants and Related Compounds. 2000. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Ed. National Academies Press, Washington, DC. 186-283
- Johnston C. 2003. Vitamina C. En: Conocimientos actuales sobre nutrición. Washington: Organización Panamericana de la Salud. 191-199.
- Jomova K y Valko M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283: 65-87.
- Jones DP. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Sign* 8 (9-10):1865-1879.
- Kadry SM, Marzouk MS, Amer AM, Hanna MI, Azmy AH, Hamed HS. 2012. Vitamin E as antioxidant in female african catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to chronic toxicity of atrazine. *J Aquat Biol Fish* 16(2): 83-98.
- Kamal-Eldin A y Budilarto E. 2015. Tocopherols and tocotrienols as antioxidants for food preservation. En:





- Handbook of Antioxidants for Food Preservation. USA. Ed. Woodhead Publishing, 141-159.
- Karamian R, Komaki A, Salehi I, Tahmasebi L, Komaki H, Shahidi S, Sarihi A. 2015. Vitamin C reverses lead-induced deficits in hippocampal synaptic plasticity in rats. *Brain Res Bull* 116: 7-15.
- Karaulov AV, Renieri EA, Smolyagin AI, Mikhaylova IV, Stadnikov AA, Begun DN, Tsarouhas K, Buha Djordjevic A, Hartung T, Tsatsakis A. 2019. Long-term effects of chromium on morphological and immunological parameters of Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 133: 110748.
- Kaur G, Alam MS, Athar M. 2009. Cumene hydroperoxide debilitates macrophage physiology by inducing oxidative stress: Possible protection by  $\alpha$ -tocopherol. *Chem Biol Interact* 179(2-3): 94-102.
- Khordad E, Fazel A, Ebrahimzadeh Bideskan A. 2013. The effect of ascorbic acid and garlic administration on lead-induced apoptosis in rat offspring's eye retina. *Iran Biomed J* 17(4): 206-213.
- Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, Eichenlaub-Ritter U, Decordier I. 2003. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol Lett* 140(1): 63-74.
- Klauning J y Kamendulis L. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 239-267.
- Kojo S. 2004. Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 11: 1041-1064.
- Krishna G y Hayashi M. 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 455: 155-166.
- Krishna G, Nath J, Ong T. 1986. Sister chromatid exchanges in mice by vitamin C inhibition. *Cancer Res* 46: 2670-2674
- Lademann J, Patzelt A, Schanzer S, Richter H, Meinke MC, Sterry W. 2011. Uptake of antioxidants by natural nutrition and supplementation: pros and cons from the dermatological point of view. *Skin Pharmacol Physiol* 24(5): 269-273.
- Lee W-J. 2009. The prospects of vitamin C in cancer therapy. *Immune Netw* 9(5): 147-152.
- Li P, Gu Y, Yu S, Li Y, Yang J, Jia G. 2014. Assessing the suitability of 8-OHdG and micronuclei as genotoxic biomarkers in chromate-exposed workers: a cross-sectional study. *BMJ Open* 4(10): e005979.
- Li Y, Sen A, Ren J, Askew LM, Sidahmed E, Brenner DE, Ruffin 4th MT, Turgeon DK, Djuric Z. 2015. Effects of vitamin E from supplements and diet on colonic  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol concentrations in persons at increased colon cancer risk. *Nutr Cancer* 67(1): 73-81.
- Ma P, Wu Y, Zeng Q, Gan Y, Chen J, Ye X, Yang X. 2013. Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E. *Food Chem Toxicol* 58: 177-183.
- Macfie A, Hagan E, Zhitkovich A. 2010. Mechanism of DNA-protein cross-linking by chromium. *Chem Res Toxicol* 23(2): 341-347.
- Maeng S, Chung H, Yu I, Kim H, Lim C, Kim K, Kim S, Ootsuyama Y, Kasai H. 2003. Changes of 8-OHdG levels in DNA and its base excision repair activity in rat lungs after inhalation exposure to hexavalent chromium. *Mutat Res* 539(1-2): 109-116.



- Mahmoud AA1, Karam SH, Abdel-Wahhab MA. 2006. Chromium-picolinate induced ocular changes: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 226(2-3): 143-151.
- Mandil R, Rahal A, Prakash A, Garg SK, Gangwar NK, Swain DK. 2016. Ameliorative potential of  $\alpha$ -tocopherol against flubendiamide and copper-induced testicular-insult in Wistar rats. *Chem Biol Interact* 260: 91-101.
- Marim R, De Gusmão A, Castanho R, Deminice R, Therezo A, Jordão A, Assis M, Taipeiro E, Martins L. 2015. Effects of vitamin C supplementation on the chronic phase of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 57(3): 245-250.
- Marnett L. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21(3): 361-370.
- Martínez-Sámano J, Torres-Durán P, Juárez-Oropeza M. 2011. El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Rev Educ Bioquím* 30(2): 56-67.
- Martínez-Sarrasague M, Barrado D, Zubillaga M, Hager A, De Paoli T, Boccio J. 2006. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 40(1): 45-54.
- Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. 2010. Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. *Free Radic Biol Med* 49: 1328-1341.
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. 1990. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 239: 29-80.
- May J, Qu Z, Morrow J. 2001. Mechanisms of ascorbic acid recycling in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1528(2-3): 159-166.
- May JM. 2012. Vitamin C transport and its role in the central nervous system. *Subcell Biochem* 56: 85-103.
- McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. 1995. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. *Method Cell Biol* 46: 153-185.
- Mekkiwaw IAA, Mahmoud UM, Wassif ET, Naguib M. 2012. Protective roles of tomato paste and vitamin E on cadmium-induced histological and histochemical changes of liver of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *J Fisher Aqua Sci* 7: 240-265.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* 84(4): 407-412.
- Miranda-Vilela AL, Grisolia CK, Longo JPF, Peixoto RCA, de Almeida MC, Barbosa LCP, Roll MM, Portilho FA, Estevanato LLC, Bocca AL, Bão SN, Lacava ZGM. 2014. Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. *J Nutr Biochem* 25(11): 1161-1176.
- Müller W, Nüsse M, Miller B, Slavotinek A, Viaggi S, Streffer C. 1996. Micronuclei: a



- biological indicator of radiation damage. *Mutat Res* 366(2): 163-169.
- Myers C. 2012. The effects of chromium (VI) on the thioredoxin system: Implications for redox regulation. *Free Radic Biol Med* 52(10): 2091-2107.
- Nakabeppu Y. 2014. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. *Int J Mol Sci* 15(7): 12543-12557.
- Navarro-Aviñó J, Aguilar I, López-Moya J. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16(2): 10-25.
- Newman MC e Intosh AW 1991. Metal ecotoxicology: concepts & applications. Lewis Publishers. USA. Ed. Boca Raton. 395.
- Nickens KP, Patierno SR, Ceryak S. 2010. Chromium genotoxicity: a doubleedged sword. *Chem Biol Interact* 188: 276-288.
- Niki E, Noguchi N. 2004. Dynamics of antioxidant action vitamin E. *Acc Chem Res* 37: 45-51.
- Norbury CJ y Hickson ID. 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 367-401.
- O'Brien T, Ceryak S, Patierno S. 2003. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res* 533: 3-36.
- Ock C, Kim E, Choi D, Lee H, Hahm, K, Chung M. 2012. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 18(4): 302.
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. 2016. Mammalian erythrocyte micronucleus test. Guideline for testing of chemicals: 474.
- OSHA, Occupational Safety and Health Administration. 2006. Occupational exposure to hexavalent chromium: final rule. *Fed Regist* 71: 10099-100385.
- OSHA, Occupational Safety and Health Administration. 2013. OSHA Fact Sheet - Controlling exposure to hexavalent chromium in aerospace and air transport painting 3650. Disponible en: [https://www.osha.gov/Publications/OSHA\\_FS-3650\\_Aerospace\\_Paint.pdf](https://www.osha.gov/Publications/OSHA_FS-3650_Aerospace_Paint.pdf)
- Ota Y, Sasagawa T, Suzuki K, Tomioka K, Nagai A, Niiyama G, Kawanaka M, Yamada G, Okita M. 2004. Vitamin E supplementation increases polyunsaturated fatty acids of RBC membrane in HCV-infected patients. *Nutrition* 20(4): 358-363.
- Oyagbemi AA, Omobowale TO, Ola-Davies OE, Adejumobi OA, Asenuga ER, Adeniji FK, Adedapo AA, Yakubu MA. 2018. Protective effect of *Azadirachta indica* and vitamin e against arsenic acid-induced genotoxicity and apoptosis in rats. *J Diet Suppl* 15(3): 251-268.
- Padayatty JS, Daruwala R, Wanga Y, Eck KP, Song J, Koh SW, Levine M. 2002. Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. En: Handbook of antioxidants. Segunda ed. USA. Ed. New York: Marcel Dekker, 117-145
- Page M, Robb EL, Salway KD, Stuart JA. 2010. Mitochondrial redox metabolism:



- Aging, longevity and dietary effects. *Mech Ageing Dev* 131: 242-252.
- Passerieux E, Hayot M, Jaussent A, Carnac G, Gouzi F, Pillard F, Picot MC, Böcker K, Hugon G, Pincemail J, Defraigne JO, Verrips T, Mercier J, Laoudj-Chenivresse D. 2015. Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate, and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Free Radic Biol Med* 81: 158-169.
- Pisoschi AM, Pop A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 97: 55-74.
- Quintanar-Escorza MA y Calderón-Salinas JV. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *REB* 28(3): 89-101.
- Ramírez AME y Rojas LM. 2010. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Latreia* 23(2): 166-177.
- Ramos M, Batista C, Gómez B, Zamora A. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Inv Salud* 8(1): 7-15.
- Rana SVS. 2008. Metals and apoptosis. Recent developments. *J Troce Elem Med Bio* 22: 262-284.
- Rao MV, Chawla SL, Sharma SR. 2009. Protective role of vitamin E on nickel and/or chromium induced oxidative stress in the mouse ovary. *Food Chem Toxicol* 47(6): 1368-1371.
- Rendón-Ramírez AL, Maldonado-Vega M, Quintanar-Escorza MA, Hernández G, Arévalo-Rivas BI, Zentella-Dehesa A, Calderón-Salinas JV. 2014. Effect of vitamin E and C supplementation on oxidative damage and total antioxidant capacity in lead-exposed workers. *Environ Toxicol Pharmacol* 37(1): 45-54.
- Rizzo A, Berselli P, Zava S, Montorfano G, Negroni M, Corsetto P, Berra B. 2010. Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Adv Exp Med Biol* 698: 52-67.
- Robbins D y Zhao Y. 2011. The role of manganese superoxide dismutase in skin cancer. *Enzyme Res* 2011: 409295.
- Robertson JD y Orrenius S. 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 30: 609-627.
- Rocha CAM, Da Cunha LA, Pinheiro RHS, Bahia MO, Burbano RMR. 2011. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of colossoma macropomum exposed to methylmercury. *Genet Mol Biol* 34(4): 694-697.
- Salehi I, Karamian R, Komaki A, Tahmasebi L, Taheri M, Nazari M, Shahidi S, Sarihi A. 2015. Effects of vitamin E on lead-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity. *Brain Res* 1629: 270-281.
- Sayago A, Marín M, Aparicio I, Morales R. 2007. Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceite* 58(1): 74-86.
- Setyaningsih Y, Husodo AH, Astuti I. 2015. Detection of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels as a biomarker of oxidative DNA damage among home industry workers exposed to chromium. *Procedia Environ Sci* 23: 290-296.
- Shi X, Chiu A, Chen CT, Halliwell B, Castranova V, Vallyathan V. 1999. Reduction of chromium(VI) and its



- relationship to carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2:87-104.
- Shi XL, Dalal NS. 1990. Evidence for a Fenton-type mechanism for the generation of OH radicals in the reduction of Cr(VI) in cellular media. *Arch Biochem Biophys* 281: 90-95.
- Shil K y Pal S. 2019. Metabolic and morphological disorientations in the liver and skeletal muscle of mice exposed to hexavalent chromium. *Comp Clin Pathol* 1-13.
- Shivavedi N, Charan Tej GNV, Neogi K, Nayak PK. 2018. Ascorbic acid therapy: A potential strategy against comorbid depression-like behavior in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 109: 351-359.
- Sierra-Vargas MP, Guzmán-Grenfell AM, Olivares-Corichi IM, Torres-Ramos YD, Hicks-Gómez JJ. 2004. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Rev Inst Natl Enf Resp Mex* 17(2): 135-148.
- Sies H y Jones DP. 2007. Oxidative stress. En: Fink G, editor. *Encyclopedia of stress*. Amsterdam. Ed. Elsevier, 45-48.
- Silva Nunes MF, da Silva Nunes R, Silva Kahl VF, Moyses Reyes J, da Silva J. 2013. Use of buccal micronucleus assay to determine mutagenicity induced by amfepramone in humans and the protective effects of vitamin C. *J Toxicol Environ Health A* 76(19): 1121-1128.
- Singh M, Kaur P, Sandhir R, Kiran R. 2008. Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. *Mutat Res* 654: 145-149.
- Singh S, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Kumar D, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N. 2013. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol Biochem* 70: 204-212.
- Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. 2015. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol* 71:40-56.
- Son YO, Hitron JA, Cheng S, Budhraj A, Zhang Z, Lan Guo N, Lee JC, Shi X. 2011. The dual roles of c-Jun NH2-terminal kinase signaling in Cr(VI)-induced apoptosis in JB6 cells. *Toxicol Sci* 119: 335-345.
- Srivastava S, Gupta P. 2016. Genotoxic and infertility effects of bisphenol a on wistar albino rats. *Int J Pharm Sci Rev Res* 41(1): 126-131.
- Sullivan JB, Krieger GR. 2001. *Clinical environmental health and toxic exposures*. Philadelphia. Ed. Lippincott William and Wilkins, 16-23.
- USP DI. 1999. *Drug information for the health care professional*. Vol. I. Massachusetts. Micromedex, Inc, 612-614.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44- 84.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12: 1161-1208.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40.



- Vojdani A, Bazargan M, Vojdani E, Wright J. 2000. New evidence for antioxidant properties of vitamin C. *Cancer Detect Prev* 24(6): 508-523.
- Wang J, Schipper HM, Velly AM, Mohit S, Gornitsky M. 2015. Salivary biomarkers of oxidative stress: A critical review. *Toxicol Sci* 85: 95-104.
- Wang T, Jia G, Zhang J, Ma Y, Feng W, Liu L, Zhang N, Yan L, Wang X, Zhang X, Liu Z, Du X, Zhen. 2011. Renal impairment caused by chronic occupational chromate exposure. *Int Arch Occ Env Hea* 84(2): 393-401.
- Wang X, Son YO, Chang Q, Sun L, Hitron JA, Budhraj A, Zhang Z, Ke Z, Chen F, Luo J, Shi X. 2011. NADPH oxidase activation is required in reactive oxygen species generation and cell transformation induced by hexavalent chromium. *Toxicol Sci* 123: 399-410.
- Wawrzyniak A, Górnicka M, Hamułka J, Gajewska M, Drywień M, Pierzynowska J, Gronowska-Senger A. 2013.  $\alpha$ -Tocopherol, ascorbic acid, and  $\beta$ -carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress. *Nutr Res* 33(10): 868-75.
- Wilhelm-Filho D, Avila S Jr, Possamai FP, Parisotto EB, Moratelli AM, Garlet TR, Inácio DB, Torres MA, Colepicolo P, Dal-Pizzol F. 2010. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in the blood of subjects exposed to occupational airborne contamination from coal mining extraction and incineration of hospital residues. *Ecotoxicology* 19(7): 1193-1200.
- Wong V, Armknecht S, Zhitkovich A. 2012. Metabolism of Cr(VI) by ascorbate but not glutathione is a low oxidant-generating process. *J Trace Elem Med Biol* 26(2-3): 192-196.
- Wu F, Sun H, Kluz T, Hailey AC, Kiok K, Costa M. 2012. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 258: 166-175.
- Wu LL, Chiou C, Chang P, Wu JT. 2004. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 339: 1-9.
- Wu Y, Yang X, Zhang B, Guo L. An electrochemiluminescence biosensor for 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine quantification and DNA repair enzyme activity analysis using a novel bifunctional probe. *Biosens Bioelectron* 69: 235-240.
- Wu Z, Zheng X, Meng L, Fang X, He Y, Li D, Zheng C, Zhang H. 2018.  $\alpha$ -Tocopherol, especially  $\alpha$ -tocopherol phosphate, exerts antiapoptotic and angiogenic effects on rat bone marrow-derived endothelial progenitor cells under high-glucose and hypoxia conditions. *J Vasc Surg* 67(4): 1263-1273.
- Yang CS, Suh N y Kong AN. 2012. Does vitamin E prevent or promote cancer? *Cancer Prev Res* 5(5): 701-705.
- Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. 2004. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys* 430: 97-103.
- Zanardo RC, Costa Cruz JW, Oliveira MA, Fortes ZB. 2003. Ascorbic acid supplementation restores defective leukocyte-endothelial interaction in alloxan-diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev* 19(1): 60-68.

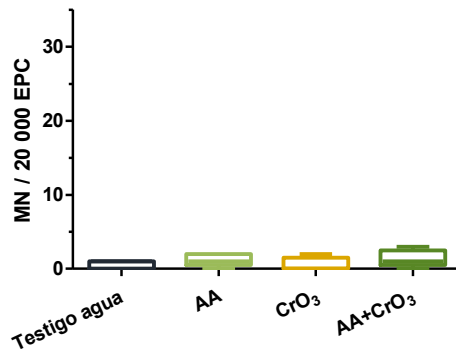


- Zarei I, Pourkhabbaz, A, Alipour H, Khazaei SH, 2013. Acute toxicity and the effects of copper sulphate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) on the behavior of the black fish (*Capoeta fusca*). *Iran J Toxicol* 6(19): 771-778.
- Zhou B, Wu LM, Yang L, Liu ZL. 2005. Evidence for  $\alpha$ -tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. *Free Radic Bio Med* 38: 78-88.
- Zúñiga-González GM, Gómez-Meda BC, Zamora-Perez AL, Martínez-González MA, Muñoz de Haro IA, Pérez-Navarro AE, Armendáriz-Borunda J, Gallegos-Arreola MP. 2015. Micronucleated erythrocytes in newborns of rat dams exposed to ultraviolet-A light during pregnancy; protection by ascorbic acid supplementation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 782: 36-41.

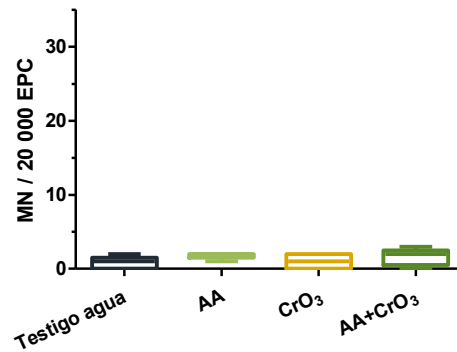
## 11. Anexos

### Anexo 1

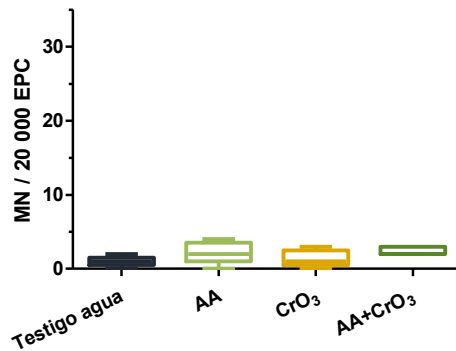
a) Día 0



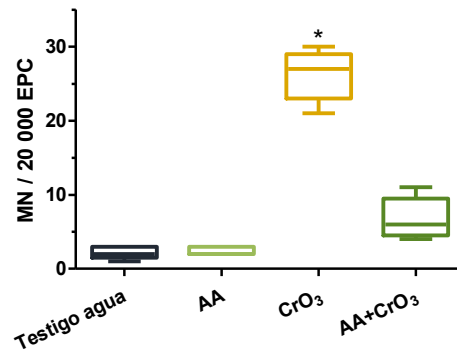
b) Día 4



c) Día 6



d) Día 8



e) Día 10

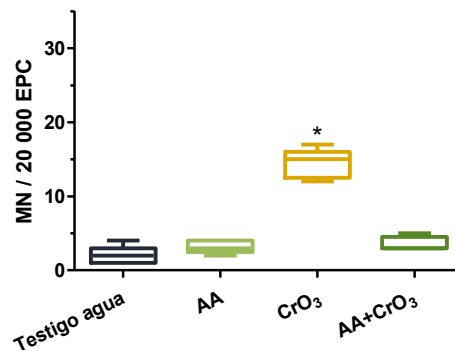


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de MN evaluados en 20,000 EPC en el tratamiento a corto plazo de AA, CrO<sub>3</sub> y AA+CrO<sub>3</sub> en los diferentes días de evaluación.  $p < 0.05$ : \* vs. Testigo agua.

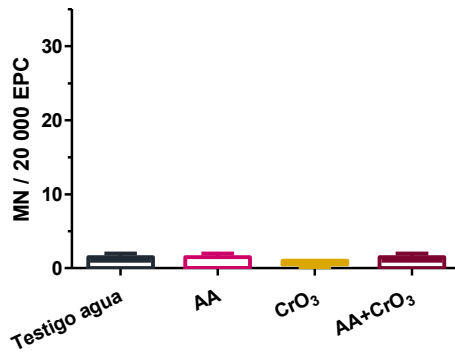




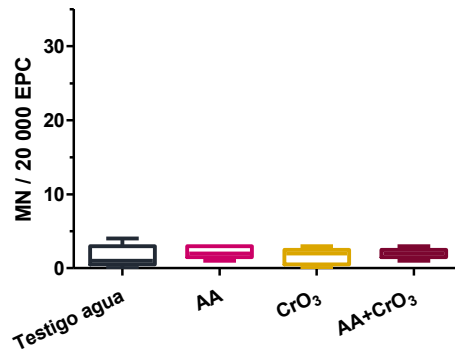
## Anexo 2

## Mediano plazo

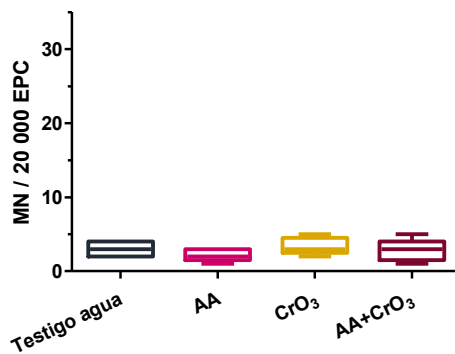
a) Día 0



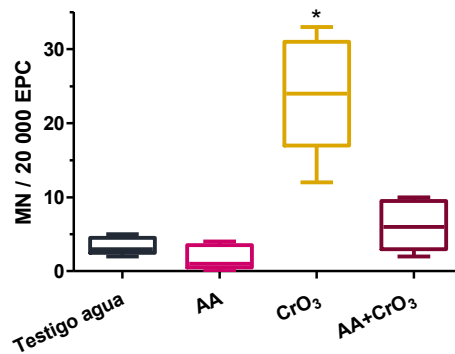
b) Día 12



c) Día 22



d) Día 24



e) Día 26

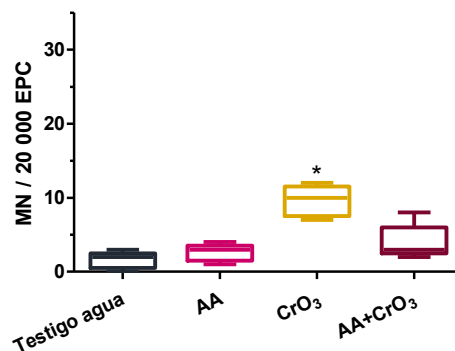


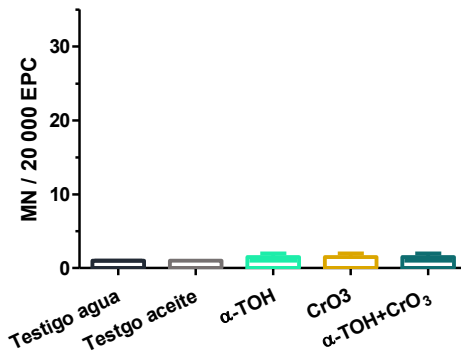
Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de MN evaluados en 20,000 EPC en el tratamiento a mediano plazo de AA, CrO<sub>3</sub> y AA+CrO<sub>3</sub> en los diferentes días de evaluación.  $p < 0.05$ : \*: vs. Testigo agua.



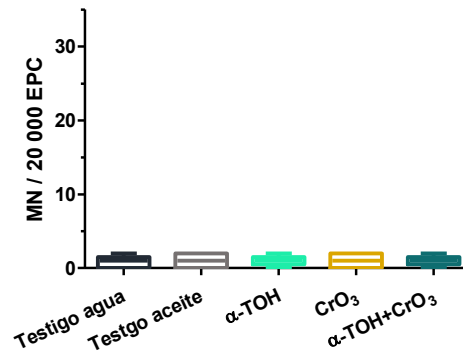
## Anexo 3

## Corto plazo

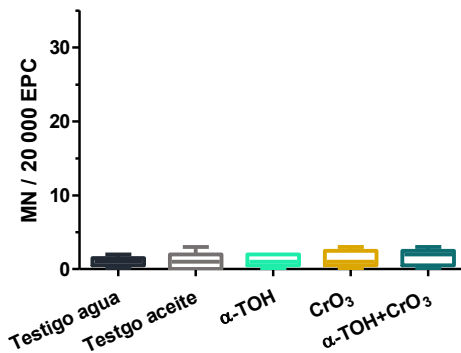
a) Día 0



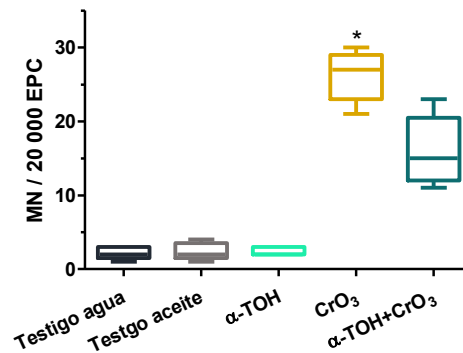
b) Día 4



c) Día 6



d) Día 8



e) Día 10

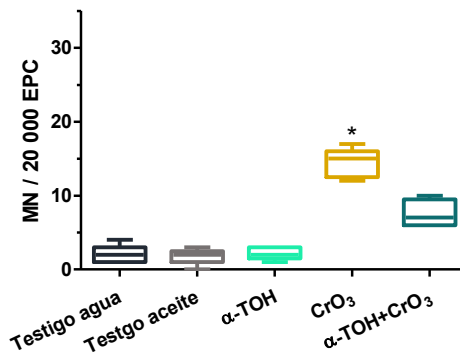


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de MN evaluados en 20,000 EPC en el tratamiento a corto plazo de α-TOH, CrO<sub>3</sub> y α-TOH+CrO<sub>3</sub> en los diferentes días de evaluación.  $p < 0.05$ : \*: vs. Testigo agua.

Anexo 4

Mediano plazo

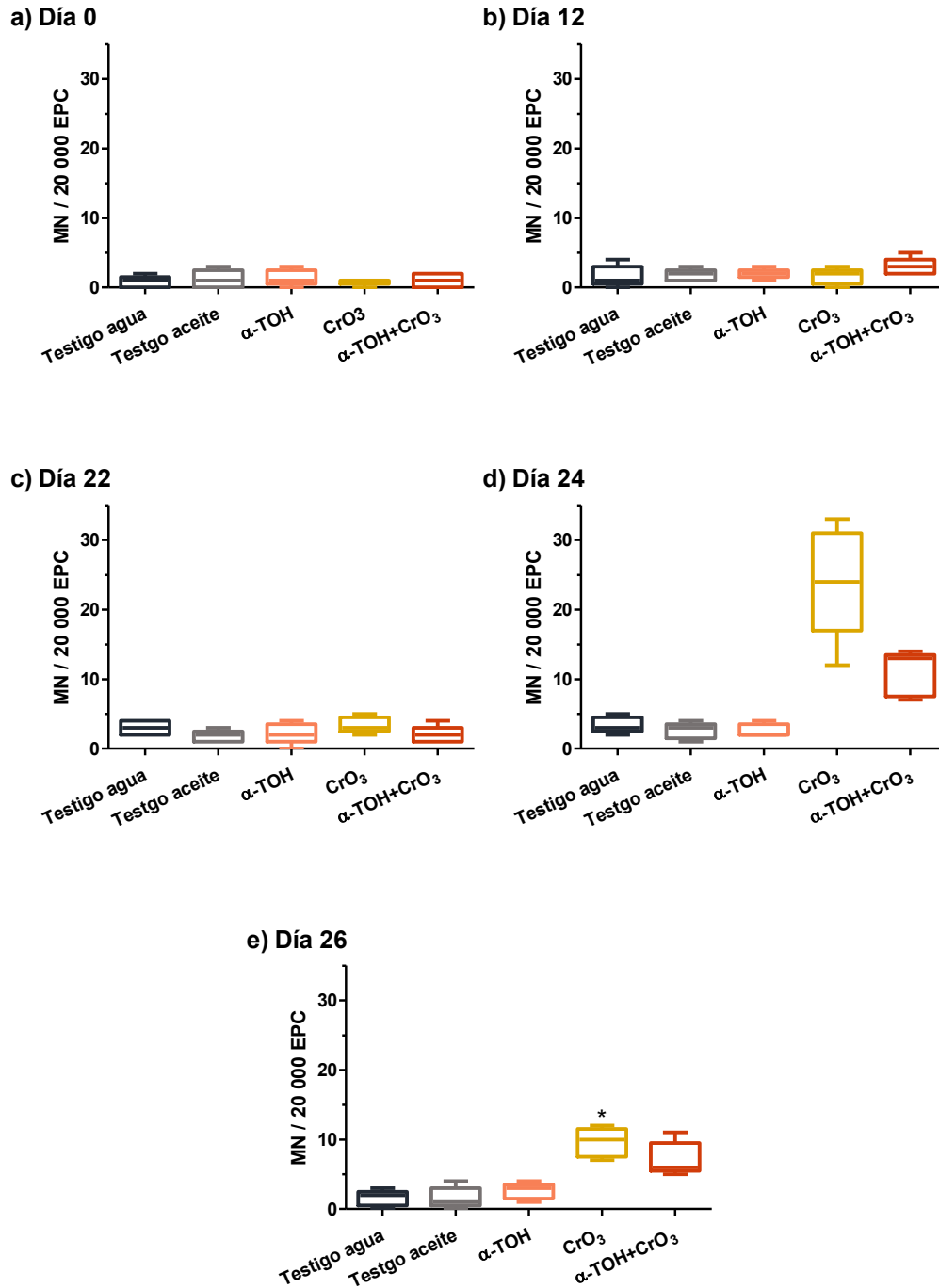


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de MN evaluados en 20,000 EPC en el tratamiento a mediano plazo de α-TOH, CrO<sub>3</sub> y α-TOH+CrO<sub>3</sub> en los diferentes días de evaluación.  $p < 0.05$ : \* vs. Testigo agua.



## Anexo 5

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

**i. XIX Reunión Internacional de Ciencias Médicas**

León, Guanajuato. Celebrado del 10 al 12 de marzo del 2019

Título del trabajo: "Efecto del tratamiento a mediano plazo del alfa-tocoferol sobre el daño cito/genotóxico inducido por Cr(VI)"

Autores: Hernández-Cortés LM y García-Rodríguez MC

**ii. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS)**

San Antonio, Texas, USA. Celebrado del 22 al 26 de septiembre del 2018

Título del trabajo: "Effects of ascorbic acid on genotoxic damage induced by hexavalent chromium and pentavalent vanadium compounds in peripheral blood of Hsd:ICR mice"

Autores: Hernández-Cortés LM y García-Rodríguez MC

**iii. XVIII Reunión Internacional de Ciencias Médicas**

León, Guanajuato. Celebrado del 18 al 20 de abril del 2017

Título del trabajo: "Administración a corto plazo del ácido ascórbico en ratones Hsd:ICR expuestos a cromo hexavalente"

Autores: Hernández-Cortés LM y García-Rodríguez MC

UNIVERSIDAD DE  
GUANAJUATO



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

# XIX Reunión Internacional de Ciencias Médicas

10-12 abril 2019

Fecha límite de entrega de Trabajos de  
investigación y Casos Clínicos  
**17 de Febrero 2019**

## Inscripción

Costo de Pre-inscripción hasta el 29 de Marzo:  
Profesionistas \$950.00 M.N.  
Estudiantes con credencial \$400.00  
Costo de inscripción a partir 14 de abril :  
Profesionistas \$1250.00 M.N.  
Estudiantes con credencial \$600.00

## Informes:

Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato  
20 de Enero #929, Col. Obregón, León, Guanajuato, México  
e-mail: ricmugto@gmail.com  
+52 (477) 2674900 Ext. 4661

## Sede:

Auditorio Jorge Ibargüengoitia del Departamento de  
Estudios Culturales de la Universidad de Guanajuato, Campus León  
Prolongación Calzada de los Héroes  
esq. Vasco de Quiroga  
Col. La Martnica,  
León, Guanajuato, México

[www.reunioncienciasmedicasugto.org.mx](http://www.reunioncienciasmedicasugto.org.mx)



@reunionciencias



## 99. Efecto del tratamiento a mediano plazo del alfa-tocoferol sobre el daño cito/genotóxico inducido por Cr(VI)

Lourdes Montserrat Hernández-Cortés, María del Carmen García-Rodríguez. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental. Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM. CDMX. E-mail: lumont.hc@gmail.com

**Introducción.** El cromo hexavalente (Cr(VI)) genera estrés oxidante durante su reducción intracelular a cromo trivalente, lo que a su vez puede inducir daño genotóxico. Mientras que, se ha observado que el alfa-tocoferol ( $\alpha$ -TOH) administrado de forma aguda por vía intragástrica (i.g.) disminuye el daño genotóxico inducido por el Cr(VI). Y considerando que los tratamientos a mediano plazo pueden tener una mayor eficacia, es de interés investigar otras estrategias para mejorar el efecto protector del  $\alpha$ -TOH.

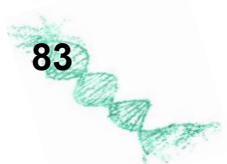
**Objetivo.** Evaluar el efecto del  $\alpha$ -TOH administrado a mediano plazo por vía oral *ad libitum* sobre el daño cito/genotóxico inducido por Cr(VI) en ratones Hsd:ICR.

**Materiales y Métodos.** Grupos de cinco ratones fueron tratados con: a) vehículo (agua potable estéril o aceite de maíz); b) 20 mg/kg de  $\alpha$ -TOH vía oral *ad libitum* durante 26 días; c) 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub> vía intraperitoneal y d) 20 mg/kg de  $\alpha$ -TOH previo al tratamiento de 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub>. Las muestras de sangre periférica fueron tomadas de la vena caudal los días 0, 12, 22, 24 y 26 después de la aplicación de los tratamientos. El daño cito/genotóxico se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos (MN)<sup>1</sup>, la apoptosis y la viabilidad celular<sup>2</sup>.

**Resultados.** Se observó que el tratamiento con  $\alpha$ -TOH a mediano plazo no modificó los promedios de MN, apoptosis y viabilidad celular. Por el contrario, la administración de CrO<sub>3</sub> incrementó significativamente los promedios de MN, apoptosis y viabilidad celular. Al combinar los tratamientos ( $\alpha$ -TOH-CrO<sub>3</sub>), se disminuyeron significativamente las frecuencias de MN, apoptosis y viabilidad celular. La reducción de los promedios de MN observada en nuestro estudio fue del 57%, mientras que la reducción reportada en el tratamiento agudo de  $\alpha$ -TOH por vía i.g. fue del 48%<sup>3</sup>.

**Conclusiones.** Los resultados sugieren que el tratamiento a mediano plazo por vía oral *ad libitum* con  $\alpha$ -TOH tiene una mayor eficacia en la protección del daño cito/genotóxico inducido por el Cr(VI) que lo reportado en los tratamientos agudos de  $\alpha$ -TOH por vía i.g.

[1]Hayashi *et al.*, 1990. *Mutat Res* 245:245-249. [2]García-Rodríguez *et al.*, 2013. *Oxid Med Cell Longev* 2013:1-9. [3]García-Rodríguez *et al.*, 2012. *Free Rad Biol Med* 53(1): S216. **Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT IN219216; IN224719.**



An International Journal Specializing  
in Environmental Mutagenesis

Volume 59  
Number S1  
September 2018

# EMGS Abstracts

Supplement to Environmental and Molecular Mutagenesis

APPLIED GENETIC TOXICOLOGY  
DNA REPAIR AND MUTAGENIC MECHANISMS  
ENVIRONMENTAL GENETIC TOXICOLOGY  
EPIGENETICS  
HERITABLE MUTATION AND DISEASE

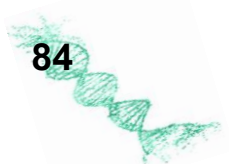
MOLECULAR EPIDEMIOLOGY  
NEW TECHNOLOGIES  
RISK ASSESSMENT  
TRANSGENICS AND IN VIVO MUTAGENESIS



**In this issue:**

Abstracts from the Environmental Mutagenesis and Genomics Society  
49th Annual Meeting, September 22-26, 2018, San Antonio, Texas

Program Chair: Miriam C. Poirier • New Investigator Co-Chair: Malathi Banda



## P5

**Effects of Ascorbic Acid on Genotoxic Damage Induced by Hexavalent Chromium and Pentavalent Vanadium Compounds in Peripheral Blood of Hsd:ICR Mice.** Hernández-Cortés LM, Garcia-Rodríguez MC. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, Mexico City, Mexico.

This study was conducted to investigate the effects of ascorbic acid (AA) against genotoxic damage of heavy metals associated with cancer induction such as hexavalent chromium Cr(VI) and pentavalent vanadium V(V). Groups of five Hsd:ICR mice were divided and treated as follows: (i) vehicle only; (ii) 100 mg/kg of AA *ad libitum*; (iii) 20 mg/kg of CrO<sub>3</sub> intraperitoneally (ip); (iv) 40 mg/kg of V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (ip); (v) 100-20 mg/kg of AA-CrO<sub>3</sub> and (vi) 100-40 mg/kg of AA-V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Genotoxic damage was evaluated by examining micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCE) obtained from the caudal vein at 0, 48, and 72 h after treatments. Induction of apoptosis was assessed at 48 h after treatment in nucleated cells of peripheral blood. Treatment with AA alone reduced basal MN-PCE and apoptotic cells, while CrO<sub>3</sub> and V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> treatment increased MN-PCE and apoptotic cells. The effect was more significant with the treatment of CrO<sub>3</sub> than V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. When the treatments of AA and metal compounds were combined, the frequencies of MN were reduced compared to the CrO<sub>3</sub> and V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> groups. However, in the AA-V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> group the apoptotic cells increased suggesting that this process may contribute to the elimination of the cells with metal-induced DNA damage (MN-PCE). Based on these results, it is suggested that although exposure to heavy metals such as CrO<sub>3</sub> and V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> may represent a genotoxic and cytotoxic risk, substances with antioxidant potential such as AA can prevent or modulate these effects. *Financial support was obtained from UNAM through the DGAPA, PAPIIT-IN219216 and PAEP-2018; CONACYT 853736.*

## P6

**Evaluation of estrogen adducts induced DNA damage and repair.** Mani C, Palle K. Mitchell Cancer Institute, AL, United States.

Estrogen belongs to a group of steroid hormones that regulates reproduction primarily in females. In spite of its role in development, elevated levels of estrogen can lead to carcinogenesis and has been identified as a risk factor for development of multiple cancers. 2-OHE products typically forming stable, bulky DNA adducts and the 4-OHE-mediated lesions generally being transient, depurinating adducts that create abasic sites within the genome that are primarily responsible for estrogen-induced mutations and carcinogenesis. Our results showed that estrogen metabolites induced more stalled forks and reduced the fork velocity. Similarly, increased comet tail and chromosomal aberration was also observed in the immortalized MCF10A cells and breast cancer cells. In addition, we saw activation of homologous recombination (HR) and translesion synthesis (TLS) pathway in response to estrogen treatment. The overall results of this study defines the influence of DNA repair pathway and metabolizing enzymes towards the molecular mechanisms that contribute to the DNA damage induced by estrogen. Further, the results about replication and transcriptional regulation of the estrogen will allow studying the overall genomic modification induced by estrogen, which will serve to design effective chemopreventive and therapeutic strategies.





# MEMORIAS

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

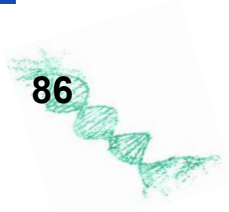
Auditorio Jorge Ibarquengoitia del Departamento de  
Estudios Culturales de la Universidad de Guanajuato, Campus León.



[www.reunioncienciasmedicasugto.org.mx](http://www.reunioncienciasmedicasugto.org.mx)



UNIVERSIDAD DE  
GUANAJUATO



## 75. Administración a corto plazo del ácido ascórbico en ratones Hsd:ICR expuestos a cromo hexavalente

Lourdes Montserrat Hernández-Cortés, María del Carmen García-Rodríguez.  
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental. Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM. CDMX.  
E-mail: lumont.hc@gmail.com

**Introducción.** El cromo hexavalente (Cr(VI)) genera estrés oxidante durante su reducción intracelular a cromo trivalente, lo que a su vez puede inducir daño genotóxico. En estudios en los que se ha administrado ácido ascórbico (AA) de forma aguda por vía intraperitoneal (i.p.) se ha observado una protección del daño genotóxico inducido por el Cr(VI). Sin embargo, la vía oral es por la cual las poblaciones humanas tenemos acceso al AA, y considerando que los tratamientos a corto plazo pueden tener una mayor eficacia, es de interés investigar si el efecto protector del AA es mayor al ser administrado por vía oral y por mayor tiempo.

**Objetivo.** Evaluar el efecto del AA administrado a corto plazo por vía oral en ratones Hsd:ICR expuestos a Cr(VI).

**Materiales y Métodos.** Grupos de cinco ratones fueron tratados con: a) vehículo (agua destilada); b) 100 mg/kg de AA vía oral *ad libitum* durante diez días; c) 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub> vía i.p. y d) 100 mg/kg de AA previo al tratamiento de 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub>. Las muestras de sangre periférica fueron tomadas de la vena caudal los días 0, 4, 6, 8 y 10 después de la aplicación de los tratamientos. Los MN se evaluaron de acuerdo a la técnica propuesta por Hayashi *et al.* (1990)[1], mientras que la apoptosis mediante la técnica modificada por García-Rodríguez *et al.* (2013)[2].

**Resultados.** Se observó que el tratamiento con AA a corto plazo no modificó las frecuencias de MN ni de apoptosis. La administración de CrO<sub>3</sub> incrementó de manera significativa las frecuencias de MN y apoptosis. Al combinar los tratamientos (AA-CrO<sub>3</sub>), se disminuyeron significativamente las frecuencias de MN y apoptosis. La reducción tanto de MN como de células apoptóticas observada en nuestro estudio fue mayor que lo reportado con los tratamientos agudos por vía i.p. de AA.

**Conclusiones.** Los resultados sugieren que el tratamiento por vía oral y a corto plazo del AA en ratones Hsd:ICR expuestos a Cr(VI) tiene una mayor eficacia que lo reportado en los tratamientos agudos por vía i.p. de AA.

*Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216.*

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

[2]García-Rodríguez *et al.*, 2013. *Oxid Med Cell Longev* 2013:1-9.

