



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“Efectos genotóxicos de los compuestos de
cromo (III) y (VI) en el ratón CD-1 *in vivo*”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
PEREYRA MEJÍA PEDRO SALVADOR**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

Septiembre 2010.



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.



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Proyecto PAPIIT-IN209309.

Arriégate...

Hace mucho tiempo que no pasa nada
Nadie se preocupa de que el sol un día muera
Hay una actitud de calma mientras mi cuerpo arde
La indiferencia puede costarte la vida

Un día nos dormimos y pasaron siglos
No esperes que las pirámides te salven
Eres esa persona en la que yo, yo sí creo
Que va a cambiar la ruta de los huracanes

Ahora es tu tiempo y no es momento de calma
Enfrenta la injusticia, la mentira, al asesino
Eres esa persona en la que yo, yo sí creo
Que va a cambiar la ruta de los huracanes

Arriégate y vuelve a nacer
Y cambia esta forma de pensar
Y de amar...

Agradecimientos

Todo en la vida significa un sacrificio, por lo que para afrontar cada batalla debes ser constante y no darle la espalda a la responsabilidad, ya que de ella depende el resultado de la prueba, y ha sido en esta larga batalla donde tropecé obstáculos difíciles, más sin embargo también encontré con quien superarlos más fácil, personas que me permitieron su amor, amistad, confianza y apoyo... (Familia y amigos) A todos ustedes GRACIAS!!!

Dedico este trabajo a:

A mi madre Araceli Mejía Contreras

Porque sé que siempre estás ahí cuando te necesito, cuando rio, cuando lloro, por darme los mejores consejos, el mejor abrazo, el mejor consuelo, por ser la mejor guía en este camino de la vida, porque no hay nadie más fuerte que tú!!
En pocas palabras por ser la mejor madre de este mundo... Te Amo!!!

A mi padre José Salvador Pereyra Ortiz

Porque has sido mi mayor maestro, porque me has enseñado como debo enfrentar a la vida, porque me has mostrado que nada me puede vencer y no existen imposibles!!!

A mi hermana Erika Itzel

Porque a pesar de que muestras ser irrompible, en el fondo eres tan solo una dulce niña, por lo que para mí siempre vas a ser mi hermanita...

A mi hermano Emmanuel

Porque eres el que impulsa a ser mejor persona para darte un buen ejemplo, y porque con tus silencios y filosofías me has enseñado que un cascarón puede ser tan fuerte como el acero...

A mis pequeños Claudia, Lisandra, Jesús y Fernando
Porque han sido los mejores amigos! Por los
buenos momentos compartidos, las risas y el llanto
y porque a pesar del tiempo y la distancia siempre
han estado en las buenas y en las malas! Los
quiero!

A mi maestra la Dra. María del Carmen García
Rodríguez

Porque después de tanto tiempo aún me soporta!
(Jaja), porque este trabajo no hubiera sido
posible sin su ayuda y asesoría, y más importante
por enseñarme que siempre se puede ser mejor y se
puede dar más, porque ha llegado a ser más que mi
maestra, mi amiga!!

Índice de contenido

	Páginas
Resumen	i
Índice de abreviaturas	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Metales pesados	2
1.2. Cromo	2
1.2.1. Distribución	3
1.2.2. Usos y exposición al cromo	5
1.2.3. Carcinogénesis.....	8
1.2.4. Citotoxicidad y genotoxicidad de los compuestos del cromo.....	9
1.2.5. Mecanismos de inducción de daño	12
1.3. Evaluación de la genotoxicidad	14
1.3.1. Micronúcleos	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
3. HIPÓTESIS.....	19
4. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo General	20

4.2. Objetivos Particulares	20
5. MATERIAL Y MÉTODO	22
5.1. Animales.....	22
5.2. Reactivos.....	22
5.3. Tratamientos	23
5.4. Establecimiento de las dosis de los compuestos de Cr (III) y (VI)	23
5.5. Tiempos de evaluación.....	23
5.5.1. Genotoxicidad y citotoxicidad	23
5.6. Evaluaciones.....	25
a) Preparación de láminillas.....	25
b) Toma de muestras.....	25
c) Evaluación de láminillas.....	25
5.7. Análisis estadístico.....	26
6. RESULTADOS	27
6.1. Evaluación de las frecuencias de MN inducidas por los compuestos de Cr (III) en machos y hembras	27
6.2. Evaluación de las frecuencias de MN inducidas por los compuestos de Cr (VI) en machos y hembras	33
6.3. Comparación de la genotoxicidad de los compuestos de Cr (III) en hembras vs machos	39
6.4. Comparación de la genotoxicidad de los compuestos de Cr (VI) en hembras vs machos.....	40
6.5. Evaluación del efecto citotóxico de los compuestos de Cr (III) en machos y hembras.....	42

6.6. Evaluación del efecto citotóxico de los compuestos de Cr (VI) en machos y hembras.....	43
7. DISCUSIÓN.....	46
8. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES	52
9. REFERENCIAS	54
10. ANEXOS	63

Resumen

Los efectos genotóxicos y citotóxicos de los compuestos del cromo (Cr) han sido estudiados ampliamente en tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* empleando células de mamíferos. Se ha observado que algunos de sus compuestos principalmente de Cr (III) son capaces de modificar el crecimiento celular, la síntesis de proteínas y dañar los ácidos nucleicos. Sin embargo, se propone que aunque los compuestos de Cr (III) inducen daño directo al ADN, los compuestos de Cr (VI) presentan mayor potencial genotóxico, debido a su capacidad de atravesar la membrana celular donde pueden ser reducidos hasta Cr (III) generando especies reactivas de oxígeno (ERO's), las cuales directa o indirectamente pueden generar daño al ADN. En este trabajo se estudiaron los efectos genotóxicos y citotóxicos de diferentes compuestos de Cr (III) y Cr (VI), mediante la evaluación de las frecuencias de micronúcleos (MN) en sangre periférica de ratones macho y hembra de la cepa CD-1. Los ratones fueron tratados por vía intraperitoneal con 25, 28, 38 y 40 mg/kg de peso corporal con compuestos de Cr (III) [sulfato crómico potásico ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$) y cloruro de cromo (CrCl_3)] y Cr (VI) [cromato de potasio (KCrO_4), dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), dicromato de sodio ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y trióxido de cromo (CrO_3)]. Las muestras de sangre fueron obtenidas cada 24 horas durante y después de la administración de los tratamientos durante 72 horas. En los resultados obtenidos se observó que los grupos tratados con los compuestos de Cr (VI) se incrementa el número de MN en las horas 24 y 48, teniendo un efecto genotóxico, a diferencia de los grupos tratados con los compuestos de Cr (III) los cuales no mostraron tener efecto sobre la frecuencia de MN, por lo que nuestros datos corroboran la hipótesis de que los compuestos de Cr (VI) inducen mayor daño genotóxico *in vivo* que los compuestos de Cr (III) a pesar de que estos últimos son más tóxicos. El mecanismo por el cual el Cr (VI) induce el daño genotóxico puede estar relacionado con la generación de ERO's. Por otra parte, el hecho de que el Cr (III) no incrementara la frecuencia de MN, a pesar de que *in vitro* ha mostrado que es capaz de interactuar con el ADN e inducir daño, puede estar relacionado con su poca capacidad de atravesar la membrana celular *in vivo*, por lo que no interaccionó directamente con el ADN.

1. Introducción

El crecimiento demográfico, la industria y las nuevas tecnologías han provocado un aumento en la contaminación del agua, el aire y el suelo, debido a la alta producción y emisión de agentes tóxicos en el ambiente (Brooks *et al.*, 1984). Algunas estimaciones de la United Nations Environment Programme (UNEP) han identificado aproximadamente unos 100 mil productos químicos producidos comercialmente y utilizados como parte integral de nuestra vida cotidiana, a pesar de esto el estudio de las interacciones de estas sustancias con los organismos no supera las 8000. (Vega y Reynaga, 1990; IARC, 1990; UNEP, 2010). Debido a estas razones organizaciones internacionales como la World Health Organization (WHO), la Agencia de Environmental Protection Agency (EPA) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), entre otras, han tratado de controlar la entrada de nuevas sustancias al ambiente, así como de estudiar las ya presentes; por medio de diversas pruebas como son las de toxicidad, citotoxicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad (Houge, 1984; Graedel *et al.*, 1986; Albert, 1988).

Los agentes químicos a los que estamos expuestos se pueden asimilar o bien eliminar de nuestro organismo, pero debido al incremento en la exposición de dichas sustancias, en muchos casos se rebasan estas capacidades, por lo que se rompe el equilibrio y aumenta el riesgo en las alteraciones de la salud como lo son algunos tipos de cáncer, así como enfermedades congénitas y reproductivas. En el ambiente además de los agentes químicos, también se encuentran agentes físicos como el ruido, el calor, las radiaciones α , β , γ y X, y agentes biológicos como los virus, bacterias y hongos, por lo que estamos hablando de una exposición compleja y constante a estos agentes. (Albert, 1988; Clarkson *et al.*, 1988).

1.1. Metales pesados

Dentro de los contaminantes químicos considerados como peligrosos se encuentran los metales pesados. Los metales son considerados como micronutrientes y se encuentran en casi todos los seres vivos; tal es el caso del hierro (Fe), cadmio (Cd), zinc (Zn), arsénico (As), vanadio (V), cobre (Cu) y el cromo (Cr) entre otros. También son componentes del sistema enzimático y redox (Mertz, 1969; Ortiz-Monasterio *et al.*, 1987; Friberg y Nordberg, 1990; Guillespie *et al.*, 1990). Sin embargo, además compuestos de metales pesados pueden inducir daño genotóxico y teratógeno, el cual es dependiente de sus propiedades químicas, su estado de oxidación y su solubilidad (Newman e Intosh, 1991).

Uno de los metales que ha llamado más la atención para su estudio es el Cr, debido a que es empleado ampliamente en la industria y se le ha asociado con diferentes alteraciones en la salud. Algunos compuestos de sus han mostrado ser genotóxicos y teratógenos en diferentes sistemas biológicos de prueba (Hartwin 1995; Nishio y Uyeki, 1985; Mirsalis *et al.*, 1996), aunque los que se han estudiado principalmente son sus compuestos de (III) y (VI), siendo los últimos considerados los más tóxicos (ATSDR, 2000).

1.2. Cromo

El Cr fue aislado de la Crocoíta (PbCrO_4) por Louis Nicholas Vauquelin en 1798, al mezclar este mineral con ácido clorhídrico y calentarlo en un horno de carbón obtuvo trióxido de cromo (CrO_3). Hoy en día el Cr metálico se obtiene calentando la Cromita (FeCr_2O_4) en presencia de Aluminio o Sílice (Depault *et al.*, 2004). El número atómico del Cr es 24 y su peso molecular es de 52 g/mol, su densidad es de 7.19 g/cm³, su punto de fusión es de $1857 \pm 20^\circ\text{C}$, y su punto de ebullición de 2672°C , pertenece a las primeras series de los elementos de transición. Sus estados de oxidación van de 2- a 6+, siendo las formas más comunes 3+ y 6+. Los compuestos

crómicos trivalentes son más estables y tienen una fuerte tendencia a formar complejos y quelatos, las formas hexavalentes están siempre ligadas a oxígeno, por lo que son fuertes oxidantes (Norseth, 1981).

1.2.1. Distribución

El Cr es un elemento natural que se encuentra ampliamente distribuido, ya que se estima que en la corteza terrestre hay en promedio en una concentración de 1.02×10^2 mg/kg. Las formas más comunes en las que se presenta en el ambiente son:

- a) Cr metálico (0), el cual es generado principalmente por procesos industriales y generalmente se encuentra formando aleaciones con metales como níquel (Ni), hierro (Fe) y cobalto (Co).
- b) Cr es en su estado trivalente (III), puede encontrarse de manera natural en el ambiente, o como derivado de procesos industriales, en esta forma es esencial que el cuerpo requiere para promover la acción de la insulina de manera que los azúcares, las proteínas y las grasas puedan ser utilizados por el organismo (Anderson, 1981; CDPC, 1992).
- c) Cr hexavalente (VI) que al igual que el cromo metálico (0) es generado y utilizado por diversas actividades humanas y rara vez se le encuentra de manera natural (ATSDR, 2000; Depault *et al.*, 2004).

El nivel de Cr en el aire es generalmente bajo con una concentración aproximada de 0.01 y 0.03 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, sin embargo las emisiones producidas al quemar carbón y petróleo, así como la producción de acero también pueden aumentar los niveles de Cr (III) en el aire, por lo que en las industrias estas concentraciones pueden llegar a cientos de microgramos por metro cubico (O'Brien *et al.*, 2003). En el agua los niveles de Cr también son bajos, en los ríos las concentraciones naturales varían de 0.001 a 0.005 ppm, en los océanos son inferiores a 0.005 ppm y en el agua potable

(contiene principalmente Cr (III)) las concentraciones son generalmente muy bajas, menos de 2ppb. Sin embargo el agua de pozo contaminada puede contener Cr (III) y (VI) en altas concentraciones de hasta 0.025 ppm (figura 1) (ATSDR, 2000).

De manera general, las poblaciones nos encontramos expuestas al Cr (III) y (VI) mediante la ingestión de alimentos, de agua o por la inhalación de aire. Se ha estimado que el consumo diario promedio del Cr (III) contenido en el aire, agua y alimentos sólidos es de alrededor de 0.2 a 0.4 μg , 2.0 μg , y 60 μg respectivamente, aunque para adultos se recomienda una ingesta diaria de 50-200 μg de Cr (III). (ATSDR, 2000).

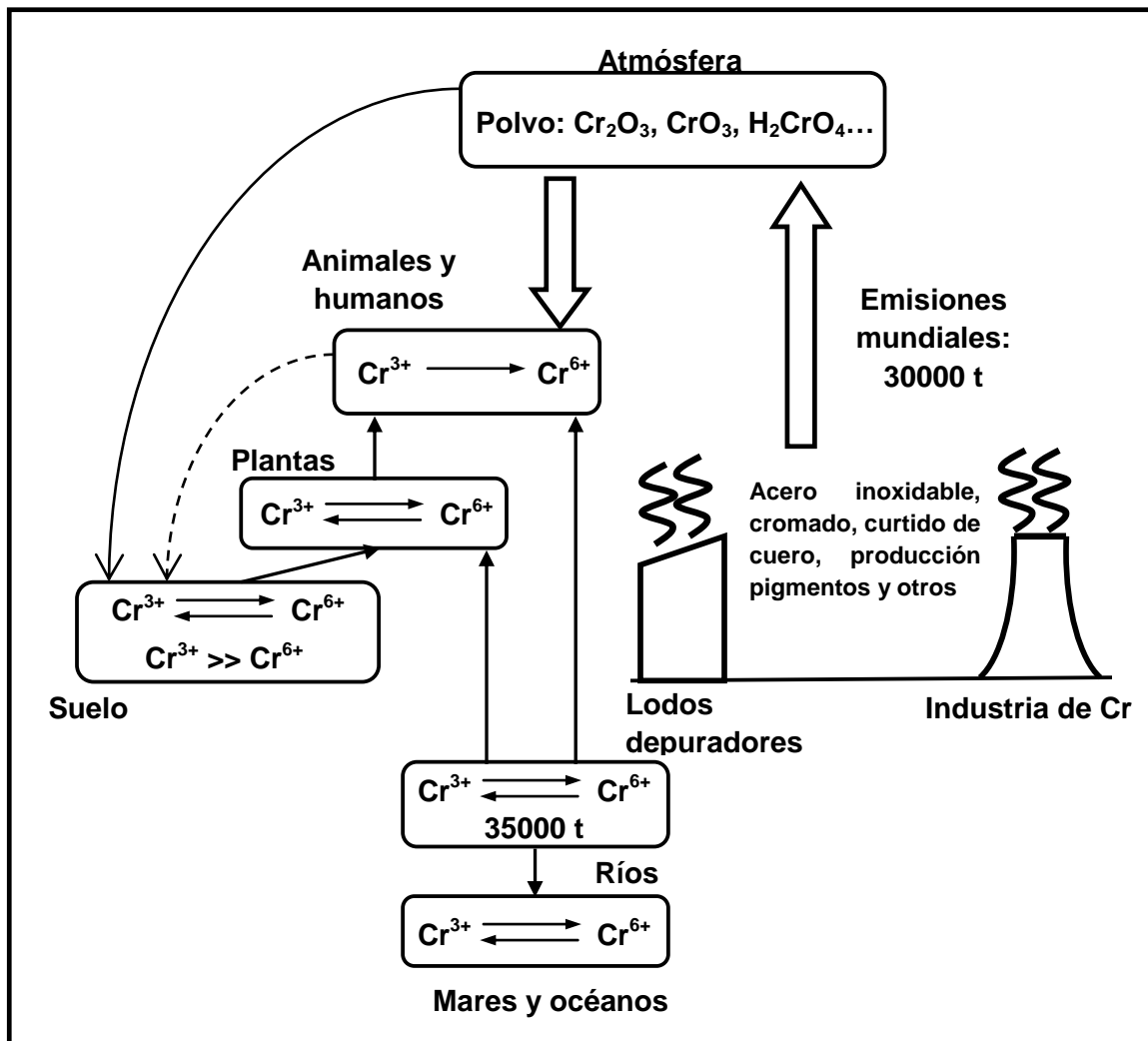


Figura 1. Circulación del Cr (III) y (VI) en el medio ambiente contaminado (Ciéslak-Golonka, 1995 modificada)

1.2.2. Usos y exposición del cromo

Los principales usos del Cr se presentan en diversas actividades como lo son (ECO, 1987; ATSDR, 2000):

- Curtido de cuero (III)
- Industria de ferrocromo (III y VI)
- Pigmentos de cromo (III y VI)
- Soldadura de acero inoxidable (VI)
- Manufactura de cromato (VI)
- Cromado de metales (VI)
- Fabricantes de colorantes (III)
- Fabricantes de caucho (III y VI)
- Trabajadores en la industria del cemento (III y VI)
- Fabricantes de velas (III y VI)
- Impresores (III y VI)
- Pintores (III y VI)
- Trabajadores que mantienen o reparan copiadoras y que desechan polvos de tóner de copiadoras (VI)
- Fabricantes de baterías (VI)

Por lo que, las personas que trabajan en estas actividades se encuentran ocupacionalmente expuestas a los compuestos de Cr (III) y (VI). Sin embargo, las personas que viven cerca de vertederos industriales de Cr, plantas industriales que manufacturan o usan compuestos de Cr, plantas productoras de cemento, torres de refrigeración, corrientes de agua que reciben descargas de industrias de

galvanoplastía, curtido de cuero y textiles entre otras también pueden estar expuestos a los compuestos del Cr (ATSDR, 2000).

También, se ha descrito que las poblaciones humanas estamos expuestas a los compuestos de Cr por las emisiones de los automóviles y el humo de los cigarrillos. La IARC ha estimado que los cigarrillos producidos en Estados Unidos contienen Cr en cantidades de 0.24 a 6.3 mg/kg (IARC, 1990). Se ha reportado que los compuestos de Cr (VI) son lo más tóxicos, debido a que al entrar en los organismos son capaces de ingresar en las células donde son reducidos hasta Cr (III), proceso en el cual se originan especies reactivas de oxígeno (ERO's).

En la figura 2 se muestran las diferentes vías por donde los compuestos de Cr (VI) pueden ingresar al organismo humano: a) Por inhalación del aire; el Cr (VI) se deposita en el pulmón y posteriormente se elimina por medio de la orina, b) Por contacto; el Cr (VI) al absorberse por piel puede llegar a la sangre y c) Por ingestión puede llegar al tracto gastrointestinal y eliminarse por medio de las heces fecales (Miranda, 1992). Una vez que los compuestos de Cr (VI) ingresan al organismo pueden distribuirse en los tejidos u órganos en donde pueden inducir toxicidad o bien ser eliminados ya sea por orina y/o por heces fecales. Debido a que es difícil la determinación de la concentración de Cr acumulada en los tejidos humanos, en las técnicas empleadas como monitoreo biológicos se utilizan muestras de sangre y orina (Clarkson *et al.*, 1988).

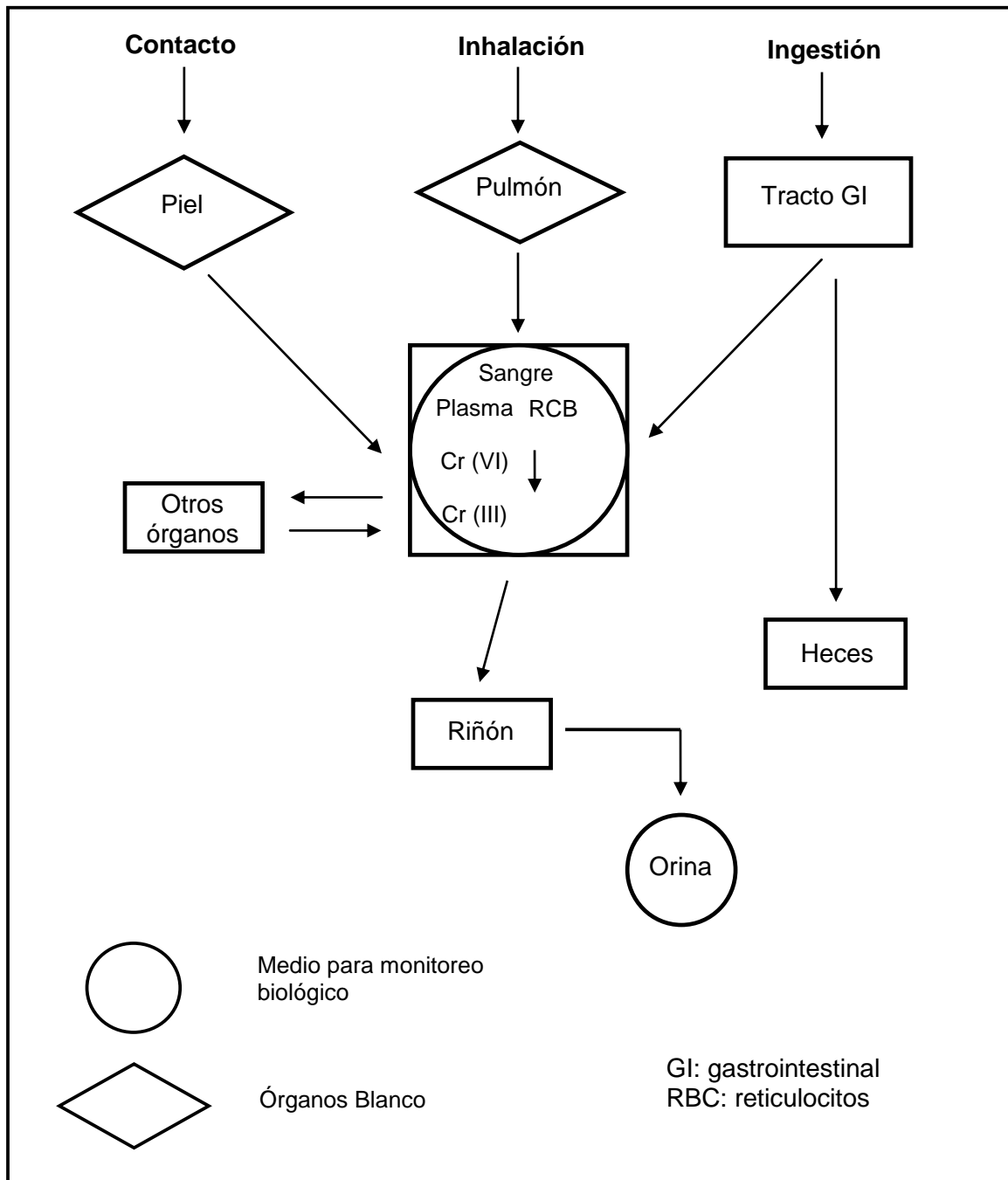


Figura 2. Vías de exposición al Cr (VI) (tomado de Clarkson *et al.*, 1988).

1.2.3. Carcinogénesis

En estudios epidemiológicos se ha correlacionado una alta incidencia del cáncer en trabajadores que están directamente expuestos a algunos de los compuestos de Cr, encontrándose una mortalidad por cáncer que va desde 5 a 40 veces más de lo esperado, siendo los adenocarcinomas en la nariz el más observado (Friberg y Nordberg, 1990). En nuestro país está documentado un caso de toxicidad por exposición a compuestos de Cr, que es el caso de “Cromatos de México”. En 1958 se estableció en San Francisco Chilpan, municipio de Tultitlán, Estado de México, una empresa procesadora de cromita para obtener Na_2CrO_4 y K_2CrO_4 , los procesos se llevaban a cabo a cielo abierto, no se tenía control de las emisiones de polvos ni de las aguas residuales, por lo que los desechos sólidos se acumulaban en los patios de la empresa. Estos desechos se emplearon durante varios años por las autoridades municipales para el relleno de las calles de dicha zona. En 1977 se reportaron casos de obreros con; septum nasal perforado, hipertrofia de cornetes, mucosa nasal hiperémica, irritación conjuntival, dermatosis y cáncer. En cuanto a los recién nacidos hubo un incremento en las alteraciones. Al hacerles el análisis de sangre y pelo a quienes presentaban estos efectos, se encontraron concentraciones de Cr por arriba de los niveles establecidos (Ortíz-Monasterio *et al.*, 1987; García-Rodríguez, 2006)

En estudios *in vivo* con animales de experimentación como son los ratones, los hámsters y las ratas, expuestos por diferentes vías a los compuestos del Cr, se ha observado un incremento en la incidencia de cáncer en el pulmón y en la cavidad nasal (Rojas *et al.*, 1999). En un estudio realizado con ratas tratadas con diferentes compuestos de Cr, se observó que el CrO_3 provoca cáncer en el musculo esquelético, sin embargo la administración de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y el $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ no presentan estos efectos (Foulkes, 1990). También, se ha descrito que las formas insolubles de Cr (III) y (VI) son más cancerígenas que las solubles, esto probablemente se debe a que las formas solubles no perduran en los tejidos expuestos y rápidamente son eliminados por los fluidos del cuerpo (De Flora *et al.*, 1990).

1.2.4. Citotoxicidad y genotoxicidad de los compuestos de cromo

En diversos estudios epidemiológicos con trabajadores ocupacionalmente expuestos a los compuestos del Cr, se ha observado efectos tóxicos tanto agudos como crónicos, relacionados con neurotoxicidad, toxicidad reproductiva, cardiotoxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad (Bagchi *et al.*, 1997). Además de los efectos visibles como la irritación de la membrana de la mucosa y de la piel (dermatitis alérgica), reacciones asmáticas, manchas y úlceras en las manos y en las uñas, perforación del septum nasal, necrosis en el hígado y riñón e incluso la muerte (Mertz, 1969; Friberg y Nordberg, 1990).

Los efectos citotóxicos y genotóxicos del Cr se han estudiado principalmente en ensayos *in vitro* empleando células de mamíferos, en donde se ha encontrado que algunos de sus compuestos afectan el crecimiento celular, en la síntesis de proteínas, en los ácidos nucleicos y alteran el ciclo mitótico; ya que influyen directamente en la forma en que los organismos pueden obtener y acumular el Cr. De hecho, se ha visto que compuestos de Cr (VI) son citotóxicos y genotóxicos para células bronquiales humanas (Fornace *et al.*, 1981; Singh *et al.*, 1999; Wise *et al.*, 2002), incluso se ha propuesto que dichos compuestos tienden a acumularse y a causar tumores bronquiales en los sitios de bifurcación donde las partículas tienden a acumularse (Ishikawa *et al.*, 1994). Por otra parte, el tratamiento de células de hámster chino con diferentes compuestos del Cr (VI) (poco solubles) inhibe la síntesis de ácidos nucleicos después de dos horas de preincubación. De igual manera, en otro estudio se observó que al administrar diferentes concentraciones de $K_2Cr_2O_7$ en células de hámster chino, se inhibía la síntesis macromolecular que bloqueaba de la replicación del ADN, y se reducía la síntesis del ARN (Levis y Majone, 1981). También, se ha mostrado que *in vitro* los compuestos de Cr (VI) pueden inducir la sustitución de pares de bases en guanina-citosina y adenina-timina, así como aberraciones cromosómicas (AC) (como formación de gap cromatídicos y rompimientos cromosómicos), intercambio de cromátidas hermanas (ICH), enlaces cruzados, fragmentación y daño en la

replicación del ADN e inhibición de la formación de huso del huso mitótico (Bianchi *et al.*, 1980; De Flora *et al.*, 1990; Foulkes, 1990).

La citotoxicidad y genotoxicidad de los compuestos del Cr se ha relacionado con dos de sus propiedades:

- La solubilidad, que afecta tanto de manera extracelular como intracelular.
- El estado de oxidación del Cr, en donde la forma hexavalente al parecer es la que causa el mayor daño citotóxico.

En el cuadro 1 se muestra la comparación de los diferentes efectos genotóxicos tanto del Cr (III) como del Cr (VI) en diferentes estudios empleando sistemas de prueba *in vitro*, en donde se observa que la forma hexavalente induce daño en todos los sistemas estudiados en comparación con los del Cr (III) (Bianchi *et al.*, 1980).

Cuadro 1. Efectos genéticos del Cr (III) y Cr (VI) *in vitro* (Bianchi *et al.*, 1980)

Sistema experimental	Cr (VI)	Cr (III)
Alteraciones físico-químicas del ADN	+	+
Alteración en la replicación del ADN	+	+
Mutación génica en <i>Escherichia coli</i>	+	-
Mutación génica en <i>Salmonella typhimurium</i>	+	-
Recombinación mitótica en <i>Saccharomyces cereviseae</i>	+	NP
Mutación génica en células de mamíferos	+	-
AC en células de mamíferos	+	±
ICH en células de mamíferos	+	-
Reparación del ADN en células de mamíferos	+	-

NP no probados

En el cuadro 2 se muestran ejemplos de los efectos citotóxicos y genotóxicos que presentan algunos compuestos Cr (VI) estudiados en diferentes sistemas de prueba tanto *in vivo* como *in vitro*, donde se observa que en células de mamíferos estos son capaces de inducir alteraciones cromosómicas, inhibición de síntesis del ADN, ICH,

formación de MN, además estos compuestos también presentan efectos en las plantas como; inhibición de la fotosíntesis, formación de MN y retardo en el crecimiento entre otros.

Cuadro 2. Estudios citotóxicos y genotóxicos con compuestos de Cr (VI) (tomado de García 2006).

Compuesto estudiado	Sistema de prueba	Dosis	Resultados	Referencia
K₂CrO₄	Medula ósea de ratón <i>in vivo</i>	30, 40, 50 mg/kg	clastogenicidad	Trivedi <i>et al.</i> , 1989
K₂Cr₂O₇	Células de roedores <i>in vitro</i>	10 ⁻³ mM	Incrementa ICH	Bianchi <i>et al.</i> , 1980
K₂Cr₂O₇	Células de ratón <i>in vitro</i>	10 µM	Inhibe la síntesis de ADN	Nishio y Uyeki, 1985
K₂Cr₂O₇ CrO₃ CaCrO₄	Células <i>in vitro</i>	1,10, 100 µg/ml	Inhibe la síntesis del ADN, induce ICH	Bianchi <i>et al.</i> , 1980; Gómez-Arroyo <i>et al.</i> , 1981
K₂Cr₂O₇	Ratas <i>in vivo</i>	2.5 mg/kg	Estrés oxidativo y daño en los tejidos	Bagchi <i>et al.</i> , 1997
K₂Cr₂O₇ Na₂Cr₂O₇	Algas y plantas	20-10 000 µg/l	Inhibición de la fotosíntesis y retardo en el crecimiento, desbalance en la concentración de K, P, Fe, Mg, Ca.	Cervantes y Moreno, 1999
CrO₃	<i>Vicia faba</i>	0.001, 0.01, 0.05, 1-3 %	Alteraciones cromosómicas, anomalías en el huso mitótico y MN	Villagómez, 1981 Gómez-Arroyo <i>et al.</i> , 1983
CrO₃	Sangre periférica de ratón <i>in vivo</i>	20 y 25 mg/kg	Inducción de MN	García-Rodríguez <i>et al.</i> , 1998; 2000; 2001

1.2.5. Mecanismos de inducción de daño

Se ha descrito que el mecanismo de daño del Cr (VI) está relacionada con la generación de ERO's. El Cr (VI) existe en el ambiente celular de diferentes formas aniónicas; como son: CrO_4^{2-} , HCrO_4^- o Cr_2O_7^- dependiendo del pH del medio (Gómez y Callao, 2006) y tiene la capacidad de ingresar a la célula utilizando la vía general de los canales de proteínas transportadores de aniones (Bridges y Zalups, 2005), ya dentro de la célula puede ser reducido intracelularmente por moléculas como el H_2O_2 , la glutatión reductasa, los carbohidratos, el ácido ascórbico, el citocromo P-450, y el aldehído oxidasa entre otros, aunque también se puede reducir en la piel ya que la metionina, la cisteína, la cistina, el ácido láctico, la hemoglobina y las globulinas han sido consideradas como reductores. El Cr (VI) al ser reducido produce reactivos intermedios como el Cr (V), Cr (IV) y finalmente Cr (III), este último es transportado principalmente por el plasma, predominantemente ligado a la transferrina. (O'Brien *et al*, 2003; Mertz, 1969). Dentro de la célula la reducción se puede llevar a cabo en el retículo endoplasmático, la mitocondria, la membrana plasmática o el núcleo celular (Norseth, 1981; De Flora *et al.*, 1985).

Se ha planteado que el daño que causa el Cr (VI), se debe a la reducción intracelular, ya que las ERO's pueden desencadenar reacciones con el radical Hidroxil (OH^\cdot) provocando la peroxidación lipídica que daña a los ácidos nucleicos mediante el rompimiento de cadena del ADN y la formación de sitios apurínicos/apirimídicos, así como, la inducción de enlaces cruzados (Mertz, 1969; Bianchi *et al.*, 1980; Tamino *et al.*, 1981; Foulkes, 1990; Liu y Dixon, 1996; Bagchi *et al.*, 1997; Vega y Reynaga, 1990; Shi y Dalal, 1992). En la figura 3 se muestran las principales rutas involucradas en las lesiones genéticas causadas por el Cr (VI).

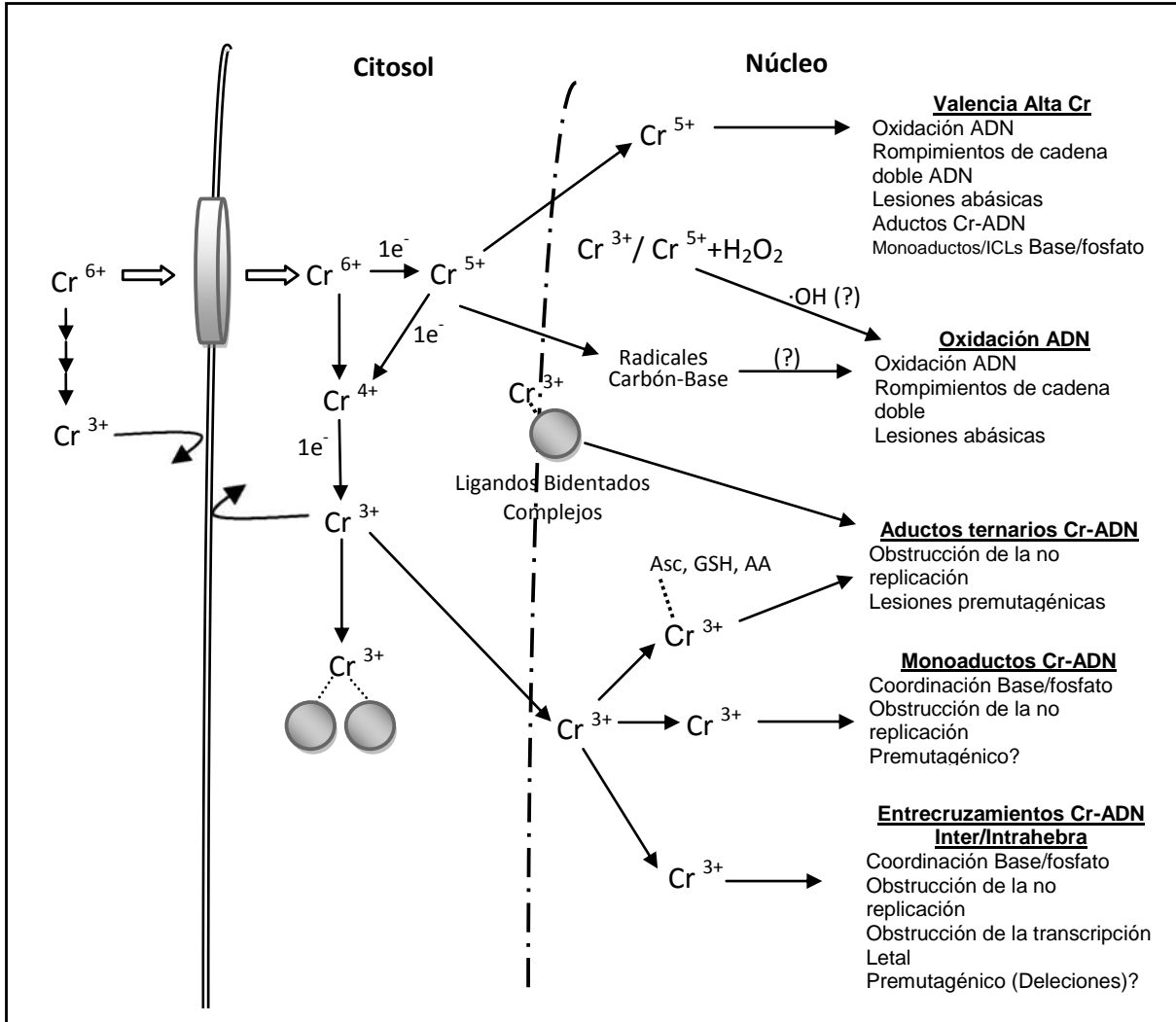


Figura 3. Principales rutas involucradas en las lesiones genéticas causadas por el Cr (O'Brien et al., 2003 modificada)

El mecanismo más importante de activación de oxígeno por metales de transición, involucra el ciclo de Haber-Weiss donde se lleva a cabo la reacción Fenton generando el radical hidroxil (HO·), que daña el ADN. En el ciclo Haber-Weiss (figura 4), se observa que el Cr (VI) puede catalizar la formación de radicales OH a partir de radicales superóxido (O₂⁻), esto es, el radical (O₂⁻) puede reducir al Cr (VI) para generar Cr (V), el cual puede reaccionar con el H₂O₂ para producir el radical HO· y generar nuevamente Cr (VI) (Shi y Dalal, 1992).

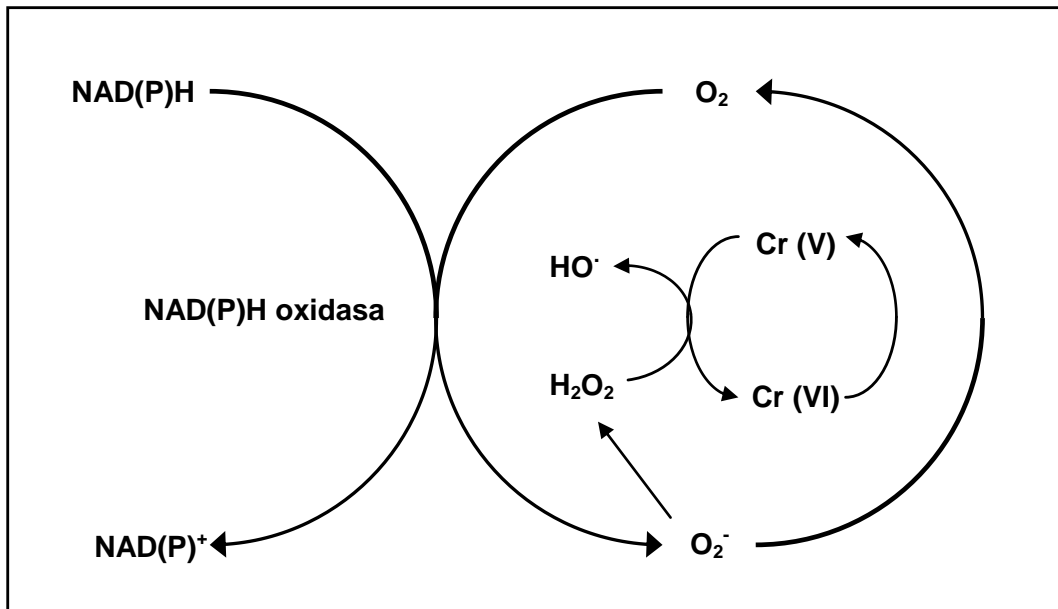


Figura 4. Ciclo de Haber-Weiss y la reacción de Fenton (Shi y Dalal, 1992)

La formación del radical OH[·] es particularmente importante, debido a que durante la fagocitosis los macrófagos por ejemplo generan gran cantidad del radical superóxido (O₂⁻) en el llamado estallido respiratorio. Cabe aclarar que el radical O₂⁻ es relativamente inerte, pero si algún ion metálico (como el Cr [VI]) está presente en el sitio de formación pierde su inactividad (Shi y Dalal, 1992).

1.3. Evaluación de la genotoxicidad

El término referente a la genotoxicidad fue usado por primera vez para establecer la relación entre la inducción de cáncer y daño genético. Posteriormente, la “Comisión Internacional para la Protección contra los Mutágenos y Carcinógenos Ambientales”, redefinió este término y estableció que sólo sea considerado para aquellos agentes que son capaces de interactuar con el ADN. La inducción de daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varias etapas. El agente xenobiótico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las

membranas celulares. Una vez dentro de la célula puede ser reactivo por sí mismo (de acción directa) o bien puede ser activado por enzimas metabólicas (de acción indirecta). Se da entonces la interacción con el ADN produciéndose un daño que puede ser reparado eficiente o ineficientemente (Ames, 1989). En términos generales, los ensayos de prueba para la detección de daño genotóxico se agrupan dependiendo del tipo de alteración que detectan y pueden ser:

a) Mutaciones génicas; entendidas como sustituciones de pares de bases, adiciones o supresiones. Estas modificaciones pueden llegar a inactivar un gen, aunque normalmente permiten al individuo sobrevivir y reproducirse, con lo cual las mutaciones génicas se pueden establecer y heredar a las siguientes generaciones. Se detectan mediante procesos de secuenciación de muestras de ADN (Cole y Skopek, 1994).

b) Alteraciones en la integridad del ADN; son lesiones premutagénicas, como la formación de aductos, ligamientos cruzados intra e interbanda y rompimientos de una o dos hebras. Estas alteraciones pueden ser reparadas enzimáticamente, por lo que si esto ocurre no constituyen mutaciones heredables. Algunas de las pruebas que las detectan son la determinación de aductos en el ADN y la electroforesis unicelular alcalina (Hemmink *et al.*, 1994).

c) Aberraciones cromosómicas; que se subdividen a su vez en estructurales y numéricas. Aberraciones estructurales; consisten en deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. Estas modificaciones en los cromosomas son deletéreas y provocan desde el desarrollo de enfermedades genéticas hasta letalidad. Aberraciones numéricas incluyen aneuploidías y poliploidías; estos cambios numéricos comúnmente ocasionan una falta de equilibrio genético drástico, y letalidad en las etapas tempranas del desarrollo, aunque también hay alteraciones numéricas viables. En ambos casos, un análisis del cariotipo permite detectar este tipo de daños (Bender, 1980).

Dentro de las principales pruebas recomendadas para evaluar daño genotóxico se encuentran; a) ensayos para evaluar mutaciones (bacterias; prueba de AMES), b) ensayos *in vitro*, para evaluar daño cromosómico (células de mamífero; frecuencia de AC) y 3) ensayos *in vivo* (medula ósea o sangre periférica; frecuencia de MN) (Mavournin, 1990; Krishna y Hayashi, 2000; Müller, *et al.*, 1999). Las pruebas para evaluar genotoxicidad no sólo son indispensables para evaluar el daño que puede producir un agente al material genético, sino también, es una herramienta necesaria para determinar el mecanismo de acción.

1.3.1. Micronúcleos

El ensayo de MN ha sido recomendado como batería de prueba para la evaluación genotóxica en la “International Conference on Harmonization (ICH4) of Genotoxicity Guidelines”, así como otras agencias reguladoras tales como la “Environmental Protection Agency” (EPA), la “Food and Drug Administration” (FDA) y la “International Agency for Research on Cancer” (IARC). El propósito del ensayo es identificar sustancias que causan daño citogenético, originado por clastogénesis o aneuploidogénesis (Mavournin, 1990; Krishna y Hayashi, 2000; Müller, *et al.*, 1999).

La técnica de MN fue desarrollada por Schmid y Boller en 1970, y es utilizada como ensayo de corto plazo. Detecta daño citogenético asociado con la frecuencia de AC, evalúa el daño en cromosomas enteros o en fragmentos y también puede identificar daño citotóxico (Schmid y Von Ledebur, 1973; Krishna y Hayashi, 2000). Los MN son pequeños cuerpos de cromatina que se originan de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que no son incorporados dentro del núcleo después de la mitosis, por lo que se identifican en el citoplasma como pequeños núcleos adicionales (Schmid y Von Ledebur, 1973).

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

- a) Aberraciones cromosómicas que conllevan a la formación de fragmentos acéntricos (daño clastógeno).
- b) Daño a nivel de las proteínas involucradas, directa o indirectamente, en la segregación de cromosomas, esto incluye inhibición en el ensamble o desensamble de microtúbulos, remoción de cinetocoros, daños al centriolo, centrómero inactivado etc. (daño aneuploidógeno).
- c) Recientemente, se ha sugerido que también pueden provenir de procesos de amplificación génica (Fenech y Crott, 2002; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

Los MN pueden ser evaluados en diferentes tipos celulares como por ejemplo; los mieloblastos, mielocitos, medula ósea de ratón (eritrocitos) o en eritrocitos de sangre periférica, células binucleadas (linfocitos) inducidas mediante citocalacina B, así como también células uroteliales y exfoliadas de la mucosa bucal y nasal. De igual manera, se han iniciado estudios en eritrocitos de hígado y de sangre periférica fetal (Schmid y Von Ledebur, 1973; Heddle *et al.*, 1983). Los MN pueden ser fácilmente detectados, ya que son de forma redonda con un diámetro de alrededor de 1/20 a 1/5 de un eritrocito (Mavournin, 1990). Un incremento en la frecuencia de MN en animales tratados con agentes químicos, indica que estos agentes son inductores de daño cromosómico (Krishna y Hayashi, 2000). En las células eritroides se distinguen claramente a los eritrocitos jóvenes y a los maduros. Los eritrocitos policromáticos (EPC, eritrocito joven), todavía contiene ARN, son basófilos y el núcleo principal es expulsado, si un MN se ha formado permanece en el citoplasma anucleado. Los EPC, con el tiempo, pierden el ARN y se convierten en eritrocitos normocromáticos (ENC, eritrocitos maduros), más pequeños que los EPC y son acidófilos. Partiendo de esto, los eritrocitos se pueden diferenciar entre ENC y EPC utilizando diferentes colorantes como May-Gruenwald, Giemsa y Naranja de Acridina (NA) (Schmid y Von Ledebur, 1973; Hayashi, 1990).

2. Planteamiento del problema

El Cr está de manera ubicua en el ambiente y es muy común encontrarlo en las rocas, en el suelo y en los organismos vivos. Si bien, se le encuentra principalmente en las formas trivalente [Cr (III)] y hexavalente [Cr (VI)], esta última que es generada principalmente por fuentes antropogénicas y es altamente tóxica y cancerígena. De ahí que, las personas que se encuentran ocupacionalmente expuestas o que viven en los lugares aledaños a estos son las más vulnerables a sufrir los efectos del Cr. Los efectos del Cr (III) y Cr (VI) han sido estudiados tanto en trabajos *in vivo* como *in vitro*, siendo estos últimos los mayormente realizados para establecer los mecanismos empleando principalmente compuestos de Cr (III). Sin embargo, se ha descrito que los compuestos de Cr (VI) tienen un mayor poder oxidativo ya que al atravesar la membrana citoplasmática pueden ser reducidos hasta Cr (III). En estudios previos realizados en la Unidad de Investigación en Genética de la FES “Zaragoza” se observó que la administración de los compuestos de Cr (VI) [CrO₃ y K₂Cr₂O₇] en hembras adultas y gestantes inducían MN pero de manera diferenciada ya que se necesitaban altas dosis de K₂Cr₂O₇ en comparación del CrO₃, así como la condición de preñez reducía el efecto de ambos compuestos. Por lo que, en el presente trabajo se evaluaron los efectos citotóxicos y genotóxicos de diferentes compuestos de Cr (III) y Cr (VI) administrados a machos y hembras adultas de ratón de la cepa CD-1.

3. Hipótesis

Se ha mostrado que los compuestos de Cr (VI) son capaces de atravesar la membrana celular e inducir daño al ADN mediante la generación de ERO's y RL durante la reducción a Cr (III). Por otra parte, se ha descrito que los compuestos de Cr(III) si bien inducen daño directo al ADN *in vitro*, no tienen la misma capacidad que los de Cr(VI) de atravesar la membrana, por lo que se espera que al administrar a ratones de la cepa CD-1 compuestos de cromo (VI) (dicromato de sodio, cromato de potasio, dicromato de potasio y trióxido de cromo) así como compuesto de Cr (III) (sulfato crómico potásico y cloruro de cromo) se incrementen las frecuencias de MN (daño genotóxico) y se alteren las frecuencias de EPC con respecto a las de ENC (daño citotóxico) en sangre periférica y que el efecto sea mayor en los compuestos de Cr(VI).

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

- Estudiar los efectos genotóxicos y citotóxicos de diferentes compuestos de Cr (VI) y Cr (III) mediante su administración por vía intraperitoneal en ratones machos y hembras de la cepa CD-1.

4.2. Objetivos Particulares

- Establecer las dosis a emplear de los compuestos de Cr (III) [sulfato crómico potásico ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$) y cloruro de cromo (Cr_3Cl)] y Cr (VI) [cromato de potasio (KCrO_4), dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), dicromato de sodio ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y trióxido de cromo (CrO_3)] a partir de las dosis reportadas como genotóxicas.
- Establecer la cinética de inducción de MN de los compuestos de Cr (III) mediante la toma de muestras cada 24 horas, a partir de la hora 0 (aplicación de los tratamientos) hasta la hora 72 en ratones hembras y machos de la cepa CD-1.
- Establecer la cinética de inducción de MN de los compuestos de Cr (VI) mediante la toma de muestras cada 24 horas, a partir de la hora 0 (aplicación de los tratamientos) hasta la hora 72 en ratones hembras y machos de la cepa CD-1.
- Evaluar el efecto citotóxico de diferentes compuestos de Cr (III) mediante la evaluación de la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) respecto a los eritrocitos normocromáticos (ENC) en sangre periférica de ratones hembras y machos.

- Evaluar el efecto citotóxico de diferentes compuestos de Cr (VI) mediante la evaluación de la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) respecto a los eritrocitos normocromáticos (ENC) en sangre periférica de ratones hembras y machos.
- Comparar los efectos genotóxicos y citotóxicos de los compuestos de Cr (III) con respecto a los de Cr (VI), así como los efectos en ratones hembras y machos de la cepa CD-1.

5. Material y Método

5.1. Animales

Se emplearon ratones sexualmente maduros de la cepa CD-1 de entre 45 y 60 días de edad con un peso de 25 a 45g. Se desarrolló el pie de cría en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, con animales provenientes del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Los ratones se alimentaron con nutricubos (Purina), con libre acceso al agua. Y se mantuvieron bajo condiciones ambientales de temperatura y circulación de aire controladas, así como periodos de 12 horas luz – 12 horas oscuridad.

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo se establecieron con base a los lineamientos de los programas GENOTOX, la EPA, la ECETOC y la FDA (Heddle *et al.*, 1983; Mavournin *et al.*, 1990; Hayashi *et al.*, 1994; EPA, 1984; FDA, 2000).

5.2. Reactivos

Al menos que este indicado, todos los reactivos empleados en el estudio fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, EUA).

- Colorante NA [CAS No. 10127-02-3]; cromato de potasio [CAS No. 7789-00-6]; dicromato de potasio [CAS No. 7778-50-9]; dicromato de sodio [CAS No. 7789-12-0]; trióxido de cromo [CAS No. 1333-82-0]; sulfato crómico potásico [CAS NO. 7788-99-0] y cloruro de cromo [CAS No. 10025-73-7].

5.3. Tratamientos

Todos los tratamientos de los compuestos tanto de Cr (III) y Cr (VI) se aplicaron vía i.p, (indicado en el protocolo), los grupos testigos no fueron tratados. Cada grupo estuvo conformado por 5 ratones hembras o machos. Los compuestos se prepararon en una solución de agua inyectable, una vez preparados los reactivos se administraron inmediatamente en volúmenes de 0.25 ml por ratón.

5.4. Establecimiento de las dosis de los compuestos de Cr (III) y (VI)

Se realizaron estudios preliminares en los que se probaron diferentes dosis de los compuestos de Cr (III) y Cr (VI). La dosis que se administraron (25, 28, 38 y 40 mg/kg de peso corporal) se basaron en los resultados de estudios previos del laboratorio, donde se observó que la administración de CrO₃ en dosis de 25 mg/kg de peso corporal administrado por vía i.p. a ratones de la cepa CD-1, incrementaba de manera estadísticamente significativa la frecuencia de MN (García-Rodríguez, 2007).

5.5. Tiempos de evaluación

5.5.1 Genotoxicidad y citotoxicidad

Una vez que se establecieron la dosis de los diferentes compuestos de Cr, así como las condiciones de trabajo, se evaluó el daño genotóxico mediante la frecuencia de MN y la citotoxicidad mediante la frecuencia de EPC con respecto a la de ENC.

A los ratones se les administró aproximadamente 0.25 ml de compuesto ya sea de Cr (III) o (VI) vía i.p. en un tiempo considerado como hora 0 y a partir de ese momento se tomaron muestras cada 24 horas hasta la hora 72, como se muestra en la figura 5.

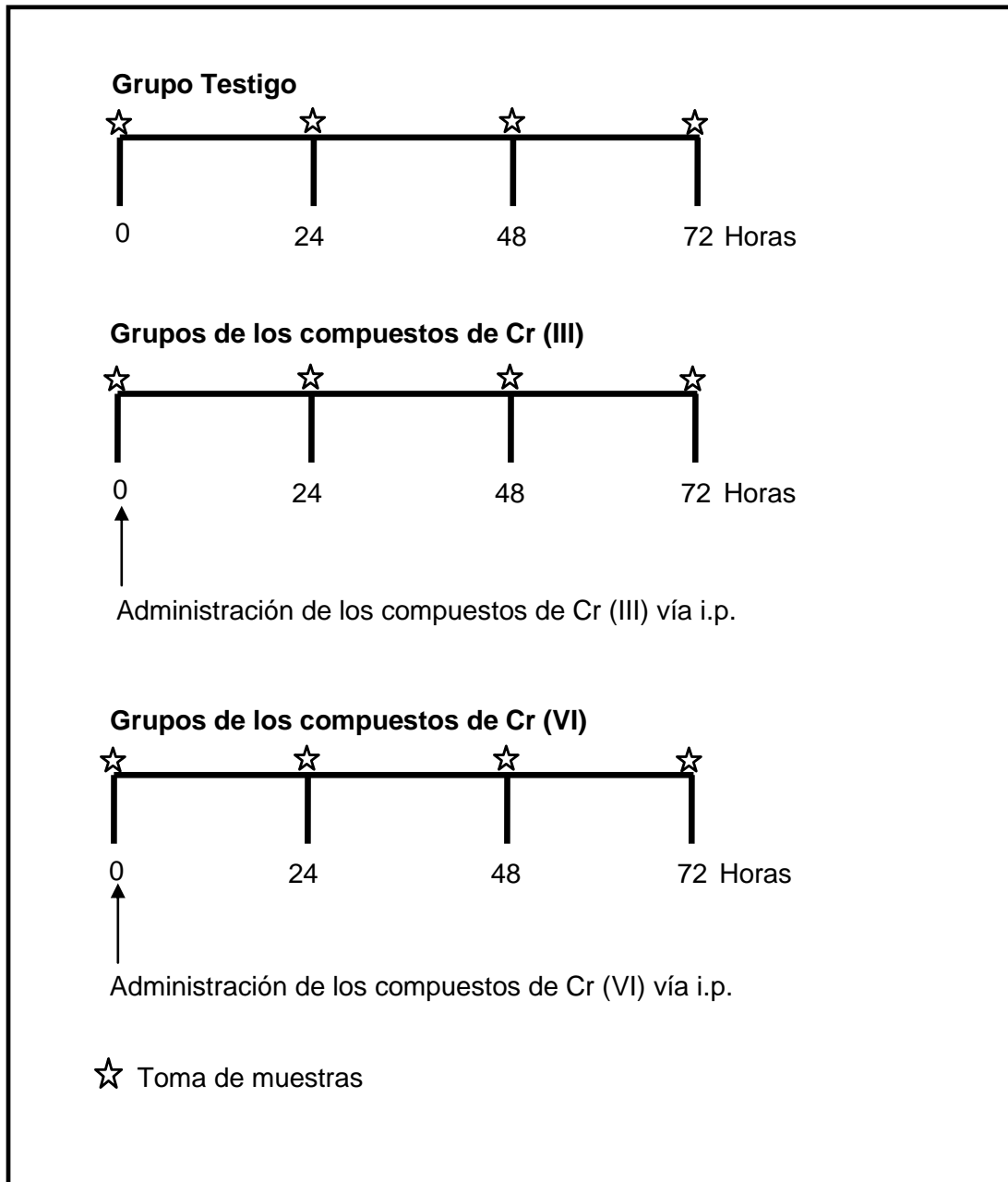


Figura 5. Protocolo para la administración y toma de muestras de los diferentes compuestos de Cr (III) y (VI) en ratones de la cepa CD-1

5.6. Evaluaciones

a) Preparación de laminillas con naranja de acridina

Se disolvió NA en agua destilada a una concentración de 1 mg/ml. Se tomaron 10 µl de esta solución y se colocaron sobre laminillas precalentadas (aproximadamente a 70°C), con ayuda de otro portaobjetos se extendió el colorante. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en la oscuridad hasta su uso como recomienda Hayashi *et al.*, 1990.

b) Toma de muestras

Para la evaluación del daño genotóxico y citotóxico se obtuvieron muestras de sangre de los ratones machos y hembras, a estos se les cortó la punta de la cola, para obtener sangre periférica, la cual se colocó directamente en las laminillas preparadas con NA. Inmediatamente se les colocó un cubreobjetos y se sellaron. Las preparaciones se guardaron en cajas de plástico en la oscuridad a 4°C y después de 12h se analizaron. Se prepararon 2 laminillas por cada organismo. La toma de muestras en todos los tratamientos se realizó cada 24 horas a partir de la hora 0 hasta llegar a la hora 72 después de la aplicación de cada uno de los tratamientos.

c) Evaluación de laminillas

Con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2) y un objetivo de 100X, se realizó la cuantificación de 1000 eritrocitos, distinguiendo los ENC de los EPC, con la intención de darnos una idea de la citotoxicidad. El daño genotóxico se estableció mediante la evaluación de 2000 EPC, de los cuales se identificó la presencia o ausencia de MN, en las muestras se pueden observar células de color oscuro que son ENC, células de color rojo que son los EPC y puntos de color verde fluorescente que son un MN.

5.7. Análisis estadísticos

Los resultados de la inducción de MN y de la frecuencia de los EPC se presentan en media \pm desviación estándar, con el programa estadístico SPSS/PC V16 se compararon mediante un análisis de varianzas, seguida de una prueba de Tukey. Para los casos de NIF y DIF, se les analizó con una chi-cuadrada, con el programa STATISTICA/PC V7, para todos los casos el nivel de significancia fue de $p < 0.05$ (Adler *et al.*, 1998).

Para la inducción de MN se calculó la Frecuencia de Inducción Neta de MN (NIF por sus siglas en inglés) para descartar la inducción espontánea que obtengan los grupos a la hora 0 ya que no se le había aplicado ningún tratamiento y la Frecuencia de Inducción Diferencial de MN (DIF por sus siglas en inglés) lo que permitió descartar la posibilidad de que el efecto a observar fuera producto de la manipulación, restando la inducción que hay en el grupo testigo. El NIF y DIF se analizaron con una Chi-cuadrada. En todos los casos se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$ (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001).

6. Resultados

6.1. Evaluación de las frecuencias de MN inducidas por los compuestos de Cr (III) en machos y hembras

En el cuadro 3 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluadas de las 0 a las 72 horas, en los grupos de ratones macho tratados con los compuestos de Cr (III). El $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ fue administrado en una dosis baja (25mg/kg) y una dosis alta (38mg/kg) ambos por vía i.p., mientras que, el CrCl_3 solo se administró en una dosis de 40 mg/kg por vía i.p. Como se muestra en el cuadro, ninguno de los tratamientos incrementó de manera estadísticamente significativa las frecuencias de MN, solo se observó un incremento de alrededor de un MN en el grupo tratado con $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ en la dosis baja a la hora 48 después del tratamiento.

Cuadro 3. Frecuencia de MN en machos tratados con los compuestos de Cr (III) ($x \pm de$)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	N	Hora	MN / 1000 células \pm d.e.
Testigo	0	5	0	0.50 \pm 0.71
			24	0.80 \pm 0.45
			48	1.20 \pm 0.84
			72	1.30 \pm 0.57
$\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$	25	5	0	0.80 \pm 0.57
			24	1.00 \pm 1.46
			48	2.00 \pm 1.77
			72	0.90 \pm 0.74
$\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$	38	5	0	1.40 \pm 0.89
			24	1.20 \pm 0.45
			48	1.10 \pm 0.55
			72	0.50 \pm 0.35
CrCl_3	40	5	0	1.50 \pm 0.79
			24	0.60 \pm 0.22
			48	0.60 \pm 0.65
			72	0.80 \pm 0.67

A los datos obtenidos se les calculó el valor absoluto de la frecuencia neta de la inducción de MN (NIF). Esta frecuencia parte de la premisa de que la inducción de los MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que, al restarle el número de MN evaluados en la hora 0 a las siguientes horas, se asume que se obtiene la inducción “neta” de MN (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

NIF = |valor observado en el grupo “A” a la hora x_i – valor observado en el grupo “A” a la hora 0|

Dónde:

A = grupo

x_i = tiempo de evaluación

En la figura 6 se muestran los cálculos realizados del NIF a las frecuencias de MN de los grupos tratados con los compuestos de Cr (III), se observa que se incrementa la frecuencia de MN de manera estadísticamente significativa en la hora 48 cuando se administró la dosis baja de $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ con respecto al grupo testigo y a los otros tratamientos de Cr(III).

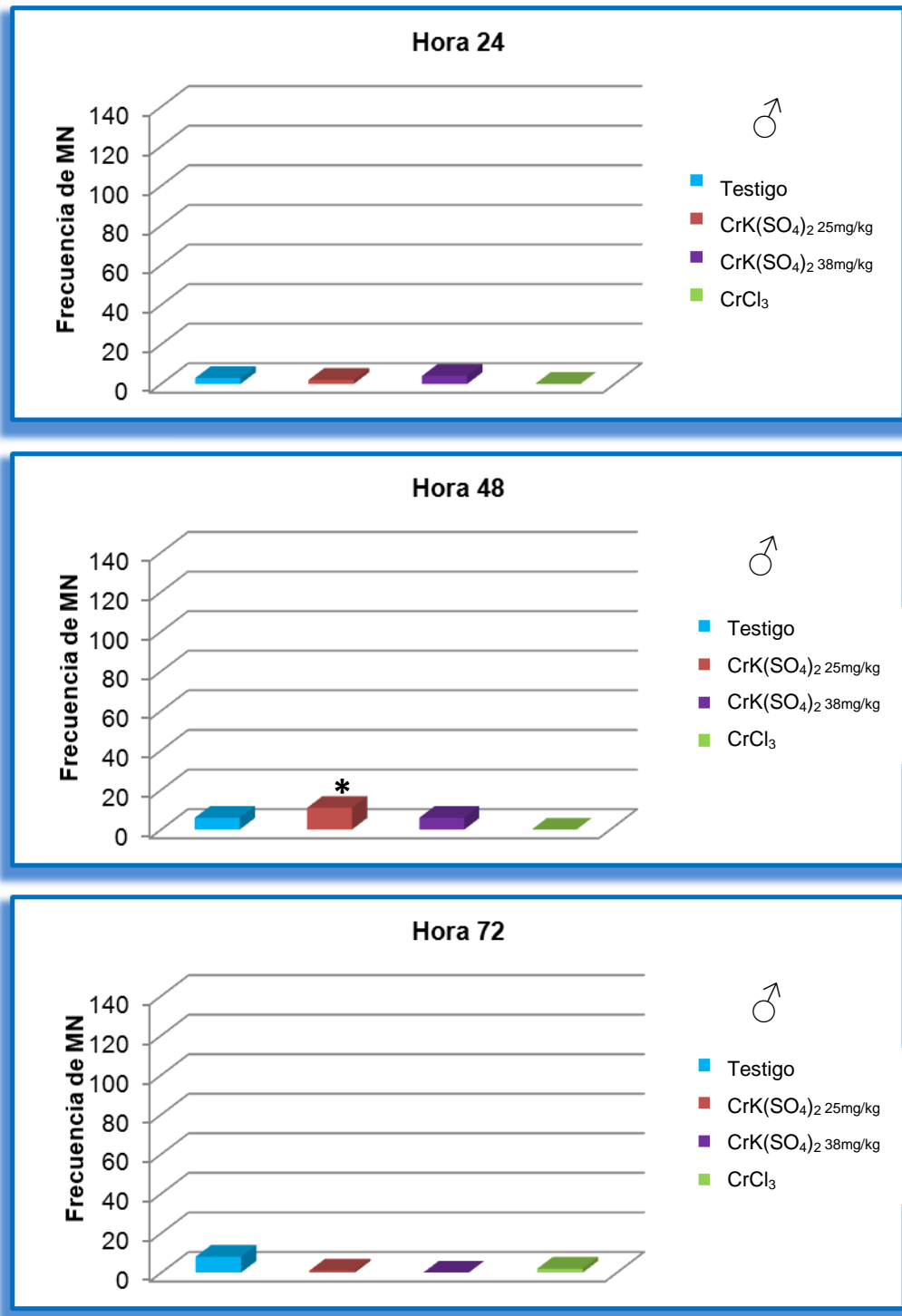


Figura 6. Análisis por tiempo y por grupo del NIF absoluto de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró el CrCl₃ y el CrK(SO₄)₂ a machos (*: estadísticamente significativo p<0.05).

A los datos obtenidos también se les calculó el DIF en cual consistió en restarles los valores respectivos de cada hora del grupo testigo a los tratados. La intención de analizar los datos de esta forma fue para “eliminar” la inducción de MN espontanea, asumiendo que los MN evaluados a las diferentes horas en el grupo testigo, es la inducción basal durante el experimento (García Rodríguez, 2006).

DIF = |valor observado en el grupo tratado a la hora x_i – valor obtenido en el grupo testigo a la hora x_i |

Dónde: x_i = tiempo de evaluación

En la figura 7 se muestran los cálculos realizados del DIF a las frecuencias de MN de los grupos tratados con los compuestos de Cr (III), se observa que persiste el efecto en el grupo tratado con $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ (dosis baja de 25mg/kg) a la hora 48, el cual también resultó estadísticamente significativo.

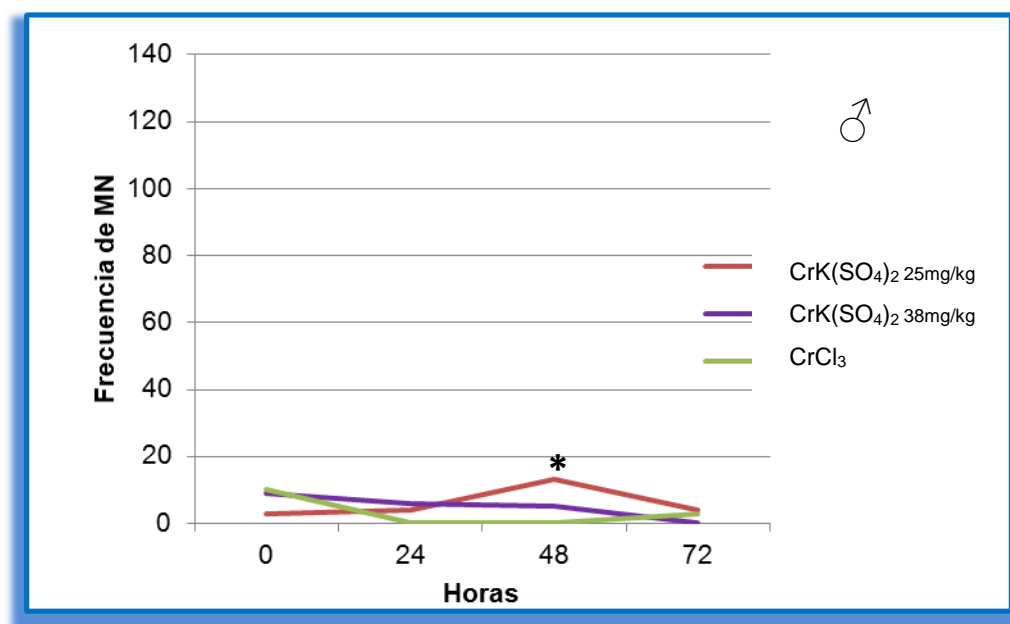


Figura 7. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró el $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ y el Cl_3Cr a machos (*: estadísticamente significativo).

En el cuadro 4 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluadas de las 0 a las 72 horas, en los grupos de ratones hembra tratadas con los compuestos de Cr (III). El $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ fue administrado en una dosis de 38mg/kg por vía i.p., y CrCl_3 se administró en una dosis de 40 mg/kg también por vía i.p. Como se muestra en el cuadro ninguno de los tratamientos indujo un incremento en el número de MN de manera estadísticamente significativa, a diferencia de los machos tratados con Cr(III) en las hembras el mayor incremento (alrededor de un MN) se observó en el grupo tratado con CrCl_3 a la hora 48 después del tratamiento.

Cuadro 4. Frecuencia de MN en hembras tratadas con los compuestos de Cr (III) ($x \pm de$)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	N	Hora	MN / 1000 células \pm d.e.
Testigo	0	5	0	0.60 \pm 0.82
			24	0.70 \pm 0.67
			48	0.70 \pm 0.57
			72	1.10 \pm 0.42
$\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$	38	5	0	0.70 \pm 0.67
			24	1.00 \pm 0.87
			48	0.70 \pm 0.57
			72	0.70 \pm 0.84
CrCl_3	40	5	0	0.70 \pm 0.57
			24	1.30 \pm 1.15
			48	1.90 \pm 2.01
			72	0.70 \pm 0.57

Al igual que en los machos, a los datos obtenidos se les calculó el NIF. En la figura 8 se muestran las frecuencias de MN de los grupos de hembras tratadas con los compuestos de Cr (III) con base a los cálculos realizados del NIF, al grupo al cual se le administró el Cl_3Cr muestra un incremento en la muestras obtenidas a la hora 48 después de los tratamientos el cual resultó estadísticamente significativa con relación a los otros grupos.

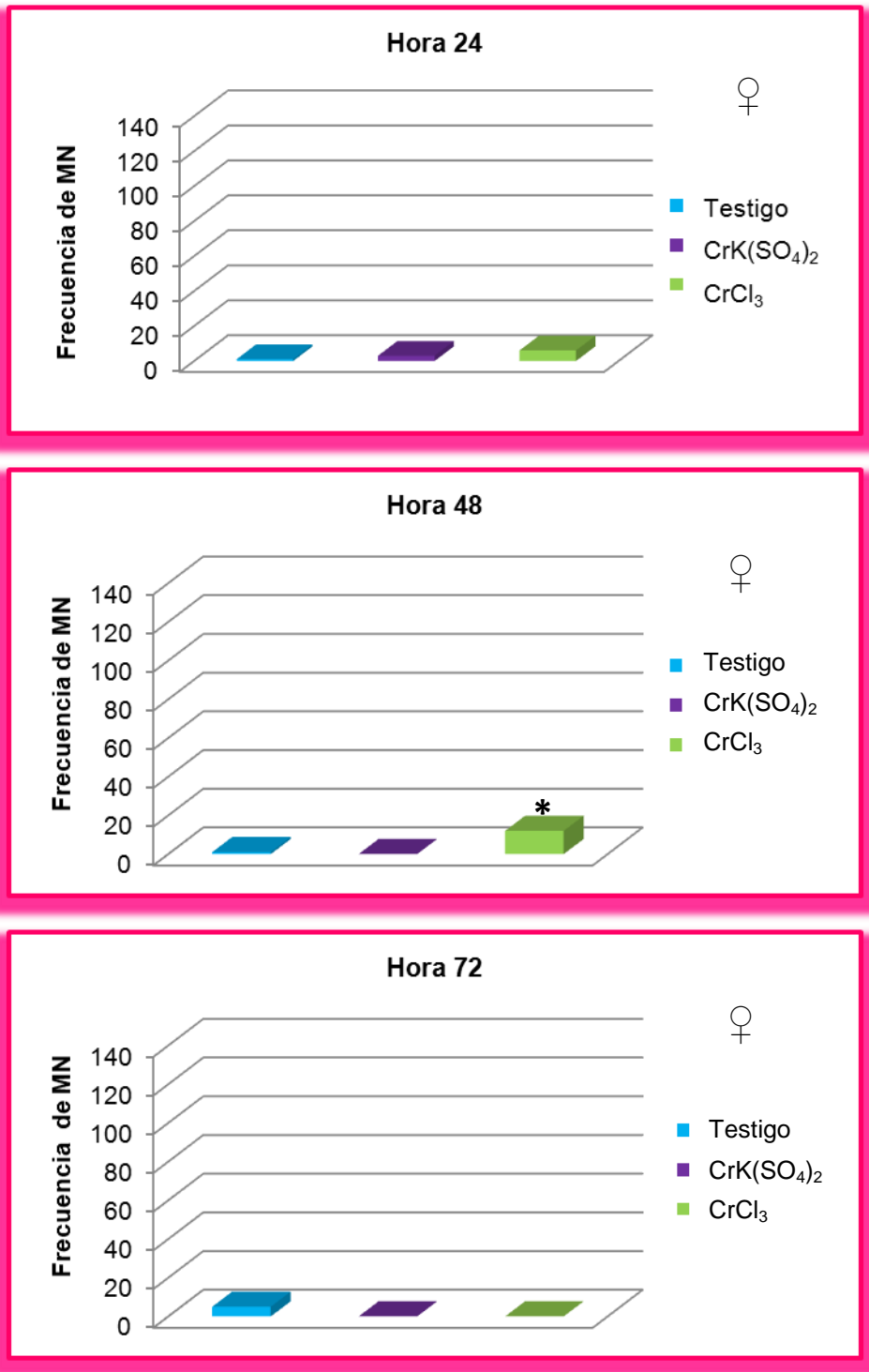


Figura 8. Análisis por tiempo y por grupo del NIF absoluto de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró CrK(SO₄)₂ y Cl₃Cr a hembras. (*: estadísticamente significativo p<0.05).

En la figura 9 se muestran los cálculos realizados del DIF a las frecuencias de MN de los grupos de hembras tratadas con los compuestos de Cr (III), se observa que el efecto persiste en el grupo tratado con CrCl_3 a la hora 48, el cual también resultó estadísticamente significativo.

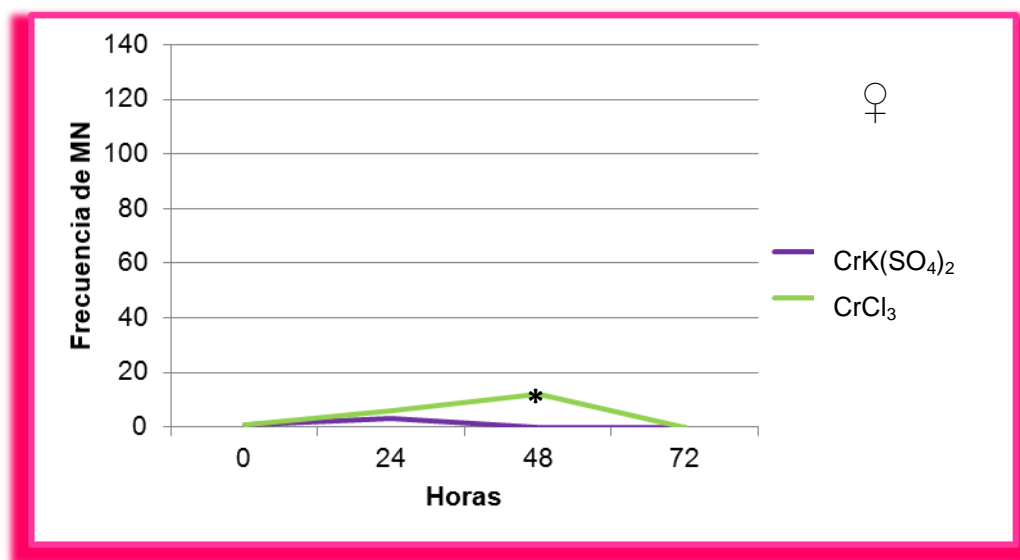


Figura 9. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ y CrCl_3 a hembras. (*: estadísticamente significativo $p < 0.05$).

6.2. Evaluación de las frecuencias de MN inducidas por los compuestos de Cr (III) en machos y hembras

En el cuadro 5 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluadas de las 0 a las 72 horas, en los grupos de ratones macho tratados con los compuestos de Cr (VI). El K_2CrO_4 fue administrado en una dosis baja (25 mg/kg) y una dosis alta (38 mg/kg) ambos por vía i.p., el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y el $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ solo se administraron en una dosis de 25 mg/kg por vía i.p., y el CrO_3 con una dosis de 20mg/kg. Como se observa en el cuadro en los grupos tratados con ambas dosis (baja y alta) de K_2CrO_4 se indujeron incrementos en el número de MN (de 3 a 5 MN) las 24 y 48 horas. Mientras que, en la administración del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se observa un incremento en la frecuencia de MN (alrededor de 7) solo la hora 48 al igual que el grupo tratado con $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Al grupo

que se le administró el CrO₃ fue el que presentó el mayor efecto ya que, se incrementaron las frecuencias de MN de manera estadísticamente significativa desde la hora 24 y el efecto persistió hasta la hora 72.

Cuadro 5. Frecuencia de MN en machos tratados con los compuestos de Cr (VI) ($\bar{x}\pm de$)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	N	Hora	MN / 1000 células
Testigo	0	5	0	1.40±0.82
			24	0.50±0.87
			48	0.30±0.45
			72	0.50±0.35
K ₂ CrO ₄	25	5	0	1.00±0.61
			24	4.10±1.85*
			48	4.70±2.33*
			72	1.90±1.08
K ₂ CrO ₄	38	5	0	1.40±1.08
			24	3.00±1.17*
			48	5.20±1.72*
			72	0.80±0.27
K ₂ Cr ₂ O ₇	25	5	0	1.00±0.61
			24	0.50±0.35
			48	7.50±2.34*
			72	0.90±0.65
Na ₂ Cr ₂ O ₇	25	5	0	1.30±1.15
			24	3.10±1.74*
			48	6.00±3.04*
			72	1.90±0.42
CrO ₃	20	5	0	0.90±0.42
			24	5.50±1.10*
			48	13.30±1.95*
			72	3.70±0.76*

*: estadísticamente significativo $p < 0.05$

En la figura 12 se muestran las frecuencias de MN de los ratones macho tratados con Cr (VI) al realizarles el análisis del NIF. En la muestras de las 24 horas se observa que a excepción del Na₂Cr₂O₇ todos los compuestos de Cr (VI) incrementaron estadísticamente significativa las frecuencias de MN y a las 48 horas se observa un incremento de la frecuencia de MN de todos los compuestos de Cr(VI). Mientras que, solo la administración del CrO₃ presenta efectos significativos a las 72 horas después del tratamiento.

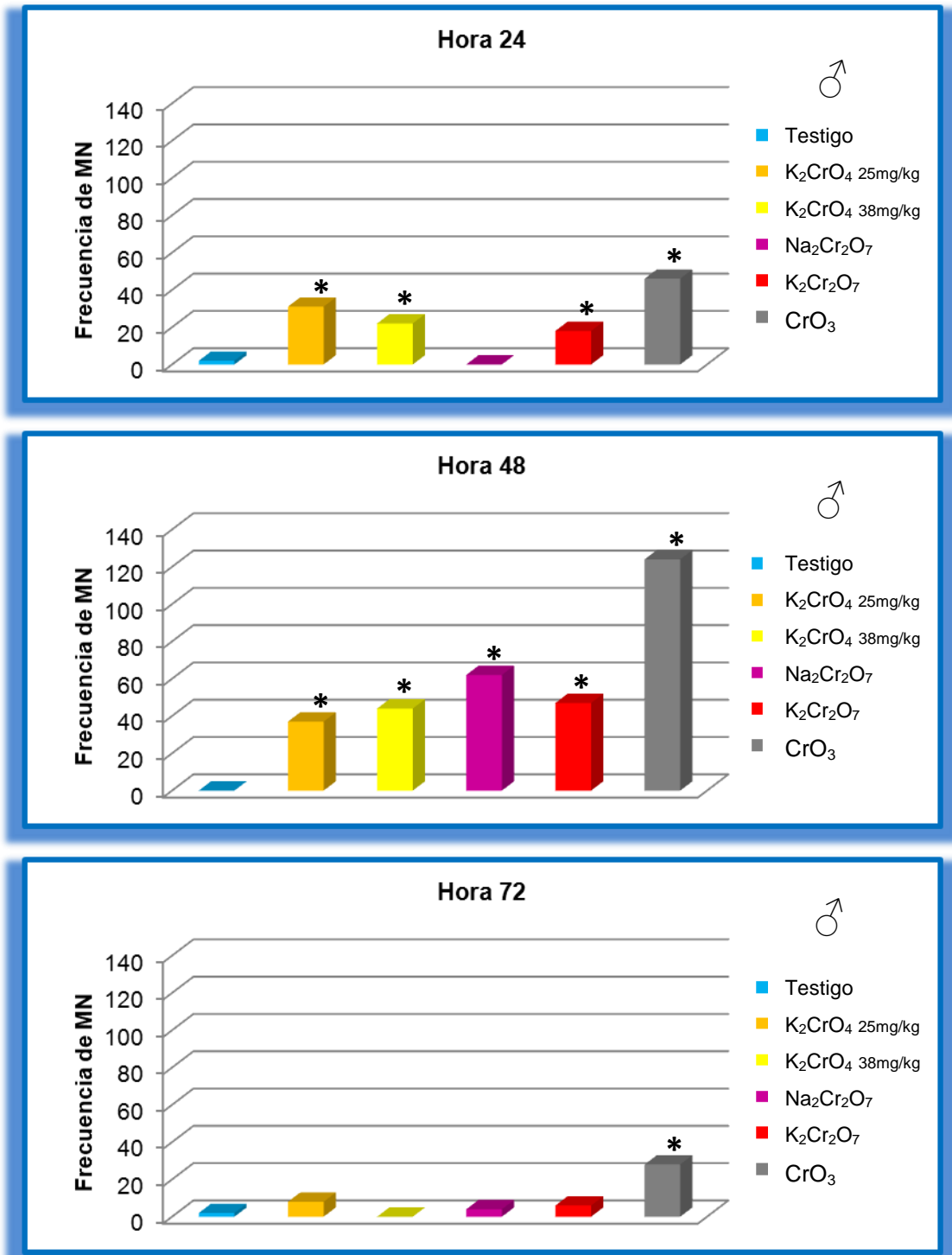


Figura 12. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró K₂CrO₄, K₂Cr₂O₇, Na₂Cr₂O₇ y CrO₃ a hembras. (*: estadísticamente significativo p<0.05).

En la figura 13 se muestra el DIF a las frecuencias de MN de los grupos de machos tratados con los compuestos de Cr (VI), al realizar este análisis se observa que persisten los efectos descritos para el NIF los cuales también fueron estadísticamente significativas con este análisis.

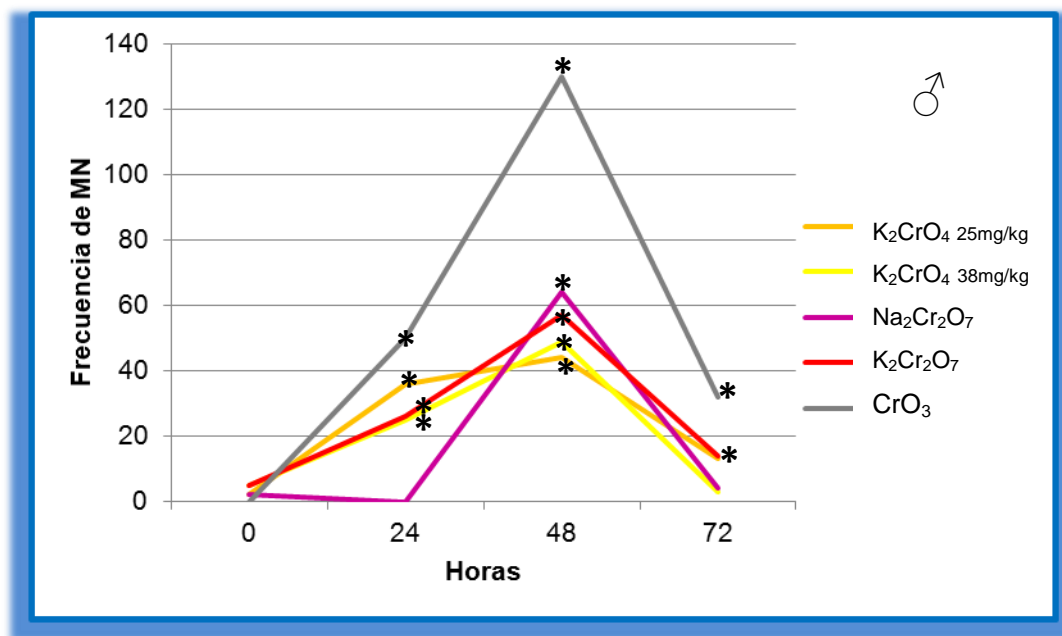


Figura 13. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró K₂CrO₄, K₂Cr₂O₇, Na₂Cr₂O₇ y CrO₃ a hembras. (*: estadísticamente significativo p<0.05).

En el cuadro 6 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluadas de las 0 a las 72 horas, en los grupos de ratones hembra tratadas con los compuestos de Cr (VI). El K₂CrO₄ fue administrado en una dosis de 38mg/kg por vía i.p., el K₂Cr₂O₇ con una dosis de 40mg/kg por vía i.p., el Na₂Cr₂O₇ se administró en una dosis de 25 mg/kg por vía i.p., y el CrO₃ con una dosis de 20mg/kg. Como se muestra en el cuadro en los grupos tratados con K₂CrO₄ y Na₂Cr₂O₇ se indujo un incremento en las frecuencias de MN (4 y 3 respectivamente) que resultó estadísticamente significativo solo para el K₂CrO₄. La administración de K₂Cr₂O₇ presento efectos estadísticamente significativos tanto en la hora 48 como en la 72 (10

y 6 MN respectivamente). Mientras que, el grupo tratado con CrO₃ tuvo un aumento de la frecuencia de MN desde la hora 24 hasta la hora 72, todos sus valores resultaron estadísticamente significativos.

Cuadro 6. Frecuencia de MN en hembras tratadas con los compuestos de Cr (VI) ($\bar{x}\pm de$)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	N	Hora	MN / 1000 células \pm de
Testigo	0	5	0	0.60 \pm 0.82
			24	0.70 \pm 0.67
			48	0.70 \pm 0.57
			72	1.10 \pm 0.42
K ₂ CrO ₄	38	5	0	1.10 \pm 0.82
			24	1.20 \pm 0.91
			48	4.10 \pm 1.85*
			72	1.40 \pm 0.55
K ₂ Cr ₂ O ₇	40	5	0	1.70 \pm 1.20
			24	2.80 \pm 1.95
			48	10.60 \pm 3.38*
			72	6.00 \pm 3.50*
Na ₂ Cr ₂ O ₇	25	5	0	1.20 \pm 0.57
			24	1.10 \pm 0.65
			48	3.40 \pm 1.88
			72	0.90 \pm 1.24
CrO ₃	20	5	0	1.00 \pm 1.00
			24	6.20 \pm 1.35*
			48	8.40 \pm 1.14*
			72	5.80 \pm 0.84*

*: estadísticamente significativo p<0.05

En la figura 14 se muestran las frecuencias de MN de los ratones hembra tratadas con Cr (VI) cuando se les calculó el NIF, en donde se puede observar que persisten los incrementos significativos observados en el cuadro cuando se les aplicó la ANOVA, a excepción del grupo Na₂Cr₂O₇, en el cual el aumento de MN a la hora 48 resulta estadísticamente significativo con este análisis.

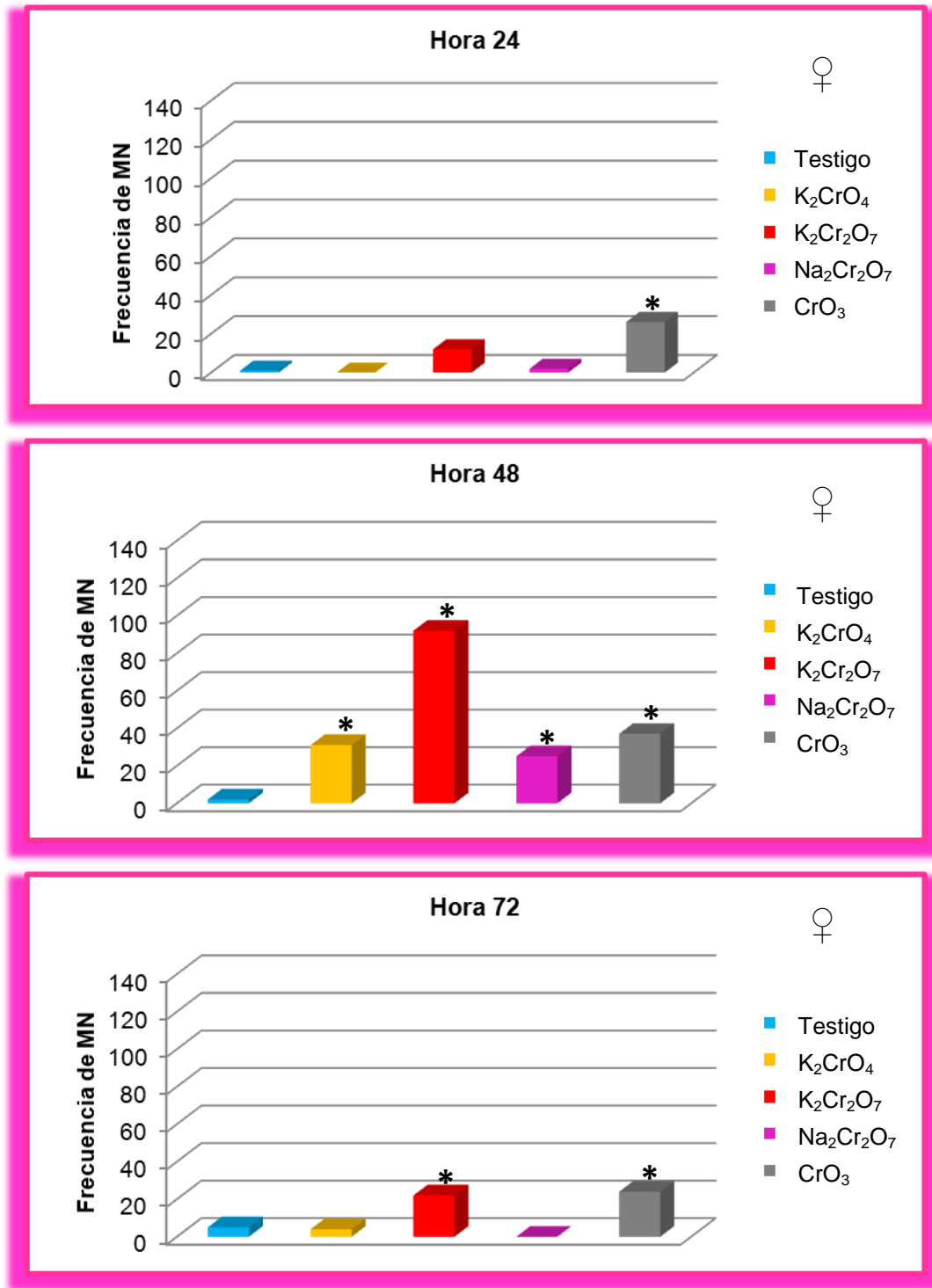


Figura 14. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró K₂CrO₄, K₂Cr₂O₇, Na₂Cr₂O₇ y CrO₃ a hembras. (*: estadísticamente significativo p<0.05).

En la figura 15 se muestran los cálculos realizados del DIF a las frecuencias de MN de los grupos de hembras tratadas con los compuestos de Cr (VI), se observa que la administración del $K_2Cr_2O_7$ incrementa la frecuencia de MN de forma estadísticamente significativa en desde la hora 24 y hasta las 72 horas, en comparación con los anteriores análisis. De igual manera, el efecto observado del CrO_3 a las 72 horas ya no resulta estadísticamente significativo en comparación con el análisis anterior.

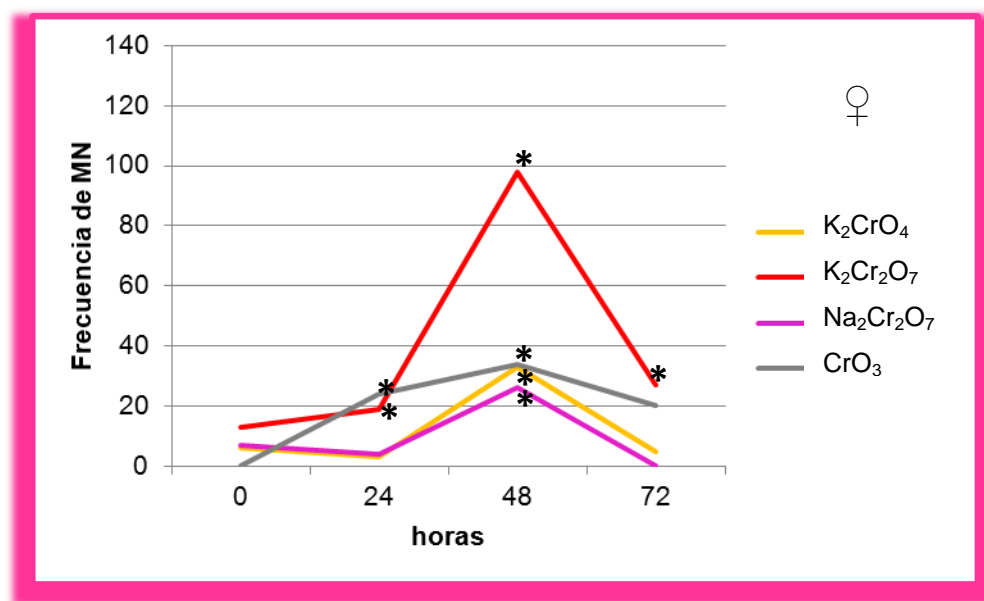


Figura 15. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró K_2CrO_4 , $K_2Cr_2O_7$, $Na_2Cr_2O_7$ y CrO_3 a hembras. (*: Estadísticamente significativo $p < 0.05$).

6.3. Comparación de la genotoxicidad de los compuestos de Cr (III) en hembras vs machos

En el cuadro 7 se muestra un cuadro comparativo entre en los grupos de ratones hembra y macho de los promedios de las frecuencias de MN evaluadas de las 0 a las 72 horas, cuando se administraron los compuestos de Cr (III). Al administrar el $CrK(SO_4)_2$ y el $CrCl_3$ no se observan diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de MN pues estas son de alrededor de 1 MN para todas las horas de evaluación.

Cuadro 7. Frecuencia de MN en hembras vs machos tratados con los compuestos de Cr (III) ($x \pm de$)

Tratamiento	Sexo	Dosis(mg/kg)	N	Hora	MN / 1000 células \pm d.e.
CrK(SO₄)₂	♀	38	5	0	0.70 \pm 0.67
				24	1.00 \pm 0.87
				48	0.70 \pm 0.57
				72	0.70 \pm 0.84
CrK(SO₄)₂	♂	38	5	0	1.40 \pm 0.89
				24	1.20 \pm 0.45
				48	1.10 \pm 0.55
				72	0.50 \pm 0.35
CrCl₃	♀	40	5	0	0.70 \pm 0.57
				24	1.30 \pm 1.15
				48	1.90 \pm 2.01
				72	0.70 \pm 0.57
CrCl₃	♂	40	5	0	1.50 \pm 0.79
				24	0.60 \pm 0.22
				48	0.60 \pm 0.65
				72	0.80 \pm 0.67

6.4. Comparación de la genotoxicidad de los compuestos de Cr (VI) en hembras vs machos

En el cuadro 8 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluadas de las 0 a las 72 horas, comparando entre en los grupos de ratones hembra y macho tratados con los compuestos de Cr (VI). A diferencia del cuadro anterior de Cr (III) hembras vs machos, en este si se pueden observar diferencias en las frecuencias de MN evaluadas tanto en hembras como en machos. Cuando se administró el K₂CrO₄ se observa que en los machos la frecuencia de MN se incrementa desde la hora 24 y el efecto persiste hasta la hora 48 a diferencia de los hembras la elevación de la frecuencia de MN sólo puede observarse en la hora 48, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas. Al administrar el Na₂Cr₂O₇ tanto en hembras como en machos la frecuencia de MN se elevó a las 48 horas después del tratamiento, pero fue en los machos donde el efecto fue mayor con una frecuencia de

6 MN y este valor fue estadísticamente significativo. Y finalmente cuando se administró CrO₃ se pudo observar que la frecuencia de MN se incrementa desde la hora 24 y el efecto persiste a la hora 72, pero este fue mayor en los machos cuando se evaluó la hora 48 resultando estadísticamente significativo.

Cuadro 8. Frecuencia de MN en hembras vs machos tratados con los compuestos de Cr (VI) ($\bar{x} \pm de$)

Tratamiento	Sexo	Dosis(mg/kg)	N	Hora	MN / 1000 células \pm d.e.
K₂CrO₄	♀	38	5	0	1.10±0.82
				24	1.20±0.91
				48	4.10±1.85
				72	1.40±0.55
K₂CrO₄	♂	38	5	0	1.40±1.08
				24	3.00±1.17
				48	5.20±1.72
				72	0.80±0.27
Na₂Cr₂O₇	♀	25	5	0	1.20±0.57
				24	1.10±0.65
				48	3.40±1.88
				72	0.90±1.24
Na₂Cr₂O₇	♂	25	5	0	1.30±1.15
				24	3.10±1.74
				48	6.00±3.04*
				72	1.90±0.42
CrO₃	♀	20	5	0	1.00±1.00
				24	6.20±1.35
				48	8.40±1.14
				72	5.80±0.84
CrO₃	♂	20	5	0	0.90±0.42
				24	5.50±1.10
				48	13.30±1.95*
				72	3.70±0.76

* estadísticamente significativo. p<0.05

6.5. Evaluación del efecto citotóxico de los compuestos de Cr (III) en machos y hembras

En el cuadro 9 se muestra la frecuencia de EPC con respecto a los ENC para evaluar la citotoxicidad de los compuestos de Cr (III) administrados en grupos de ratones macho. Cuando se administró el CrCl₃ la frecuencia de de EPC a la hora 0 y 24 del tratamiento resultaron estadísticamente significativas.

Cuadro 9. Frecuencia de EPC en machos tratados con compuestos de Cr (III) ($\bar{x} \pm de$)

Tratamiento	Dosis(mg/kg)	N	Hora	EPC / 1000 células
Testigo	0	5	0	52.60±5.86
			24	60.20±9.42
			48	64.20±15.05
			72	65.40±5.86
CrK(SO ₄) ₂	25	5	0	51.40±8.20
			24	52.80±8.84
			48	62.00±3.60
			72	55.20±7.95
CrK(SO ₄) ₂	38	5	0	67.40±7.40
			24	53.80±14.27
			48	73.00±15.87
			72	75.80±18.04
CrCl ₃	40	5	0	82.00±10.37*
			24	93.40±5.59*
			48	82.20±6.38
			72	84.80±4.60

*: estadísticamente significativo p<0.05

En el cuadro 10 se muestran las frecuencia de EPC respecto a los ENC de los tratamientos de los compuestos de Cr (III) administrados vía i. p. a los ratones hembra. En la administración de los dos compuestos de Cr (III) ninguna de las frecuencias de EPC resultaron estadísticamente significativas.

Cuadro 10. Frecuencia de EPC en hembras tratadas con compuestos de Cr (III) ($\bar{x} \pm de$)

Tratamiento	Dosis(mg/kg)	N	Hora	EPC / 1000 células
Testigo	0	5	0	55.80±17.02
			24	68.80±10.83
			48	81.40±12.14
			72	92.20±32.17
CrK(SO₄)₂	38	5	0	65.00±6.80
			24	61.80±11.82
			48	68.60±8.90
			72	70.80±10.18
CrCl₃	40	5	0	82.00±10.37
			24	93.40±5.59
			48	82.20±6.38
			72	84.80±4.60

6.6. Evaluación del efecto citotóxico de los compuestos de Cr (VI) en machos y hembras

En el cuadro 11 se muestra la frecuencia de EPC con respecto a la ENC en los grupos de ratones macho tratados con los compuestos de Cr (VI). Se pueden observar modificaciones en la frecuencia de EPC en el grupo tratado con K_2CrO_4 en su dosis de 25mg/kg en la evaluación de sus cuatro horas, en el grupo $K_2Cr_2O_7$ se observa un efecto estadísticamente significativo en la hora 48 y 72, en el $Na_2Cr_2O_7$ se modificó la frecuencia de EPC en sus hora 24, 48 y 72 de evaluación, y por último el CrO_3 tuvo efectos estadísticamente significativos en la frecuencia de EPC a la hora 24, 48 y 72 de evaluación.

Cuadro 11. Frecuencia de EPC en machos tratados con compuestos de Cr (VI) (x±de)

Tratamiento	Dosis(mg/kg)	N	Hora	EPC / 1000 células
Testigo	0	5	0	78.00±8.15
			24	84.80±6.06
			48	88.80±9.44
			72	83.20±6.18
K ₂ CrO ₄	25	5	0	40.00±7.07*
			24	46.60±6.50*
			48	55.00±7.52*
			72	66.40±14.69*
K ₂ CrO ₄	38	5	0	75.00±14.01
			24	62.00±6.20
			48	69.80±13.53
			72	68.60±12.50
K ₂ Cr ₂ O ₇	25	5	0	100.60±19.29
			24	106.20±14.53
			48	73.40±6.66*
			72	71.40±10.14*
Na ₂ Cr ₂ O ₇	25	5	0	47.40±9.76*
			24	55.80±7.33*
			48	61.60±15.72*
			72	56.00±14.26*
CrO ₃	20	5	0	62.60±5.41
			24	57.60±8.60*
			48	59.20±8.61*
			72	54.60±6.35*

*: estadísticamente significativo p<0.05

En el cuadro 12 se muestra la frecuencia de EPC con respecto a la ENC en los grupos de ratones hembra tratados con los compuestos de Cr (VI). Se pueden observar modificaciones estadísticamente significativas en la frecuencia de EPC en el grupo tratado con K₂CrO₄ en la evaluación de su hora 72, igualmente en el grupo K₂Cr₂O₇ y Na₂Cr₂O₇ se modificó significativamente la frecuencia de EPC en su hora 72 de evaluación.

Cuadro 12. Frecuencia de EPC en hembras tratadas con compuestos de Cr (VI) ($\bar{x}\pm de$)

Tratamiento	Dosis(mg/kg)	N	Hora	EPC / 1000 células
Testigo	0	4	0	69.00±9.70
			24	61.75±6.50
			48	67.75±4.50
			72	85.00±23.11
K ₂ CrO ₄	38	5	0	53.80±5.60
			24	55.60±4.83
			48	52.80±6.68
			72	54.80±8.40*
K ₂ Cr ₂ O ₇	40	5	0	76.00±11.62
			24	68.40±6.80
			48	59.00±7.35
			72	57.67±7.57*
Na ₂ Cr ₂ O ₇	25	5	0	56.20±6.76
			24	62.00±6.70
			48	66.80±3.96
			72	62.39±11.42*
CrO ₃	20	5	0	77.60±6.73
			24	81.00±5.34
			48	73.20±9.98
			72	76.60±12.52

*: estadísticamente significativo p<0.05

7. Discusión

Los compuestos de Cr (III) y (VI) han sido ampliamente estudiados debido a que son cancerígenos e inductores de daño genotóxico (Newman e Intosh, 1991; O'Brien *et al.*, 2003). En trabajos realizados previamente en el laboratorio de Antimutagénesis de la UNIGEN, se observó que compuestos del Cr (VI) como el CrO_3 y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ inducían la formación de MN en hembras adultas gestantes y no gestantes (García-Rodríguez *et al.*, 2001; García-Rodríguez, 2006; García-Rodríguez *et al.*, 2007). La técnica de MN es utilizada para evaluar daño genotóxico, debido a que un incremento en la frecuencia de MN en animales tratados con agentes químicos, indica que estos agentes inducen daño cromosómico (Hayashi *et al.*, 2000). En los resultados de este estudio se observó que los compuestos de Cr (III) administrados a hembras y machos de ratón de la cepa CD-1 no indujeron daño genotóxico, ya que no se incrementaron de manera estadísticamente significativas las frecuencias de MN, sin embargo la administración de los compuestos de Cr (VI) sí presentó efectos genotóxicos, ya que se observó un aumento en las frecuencias de MN, el cual resultó mayor para los machos en comparación con las hembras.

El hecho de que la administración a machos y hembras de los compuestos de Cr (III) [CrCl_3 y $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ para ambas dosis (baja y alta) incrementara de 10 a 14 MN por 10000 EPC implica que bajo nuestras condiciones de trabajo los compuestos de Cr(III) no indujeron daño genotóxico, ya que organizaciones como la FDA (2000) y la OECD (1997) han propuesto que se considere como un agente genotóxico sólo aquellos compuestos que incrementan los MN a más de 40/10000 EPC. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Tsapakos *et al.*, (1983) quienes administraron por vía i.p. dosis de hasta 80 mg/kg de CrCl_3 a ratas Sprague-Dawley y no observaron daño al ADN evaluado mediante la fragmentación empleando la técnica de elución alcalina. Sin embargo, Levis y Majone (1979) observaron que la administración de $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ induce daño genotóxico en cultivos *in vitro* de células de hámster chino, ya que incrementa la formación de AC, aunque no modifica los ICH,

lo que puede estar relacionado con el estado de oxidación y la solubilidad del compuesto, ya que se ha descrito que las formas insolubles de Cr (III) y (VI) son más tóxicas que las solubles, debido a que las formas solubles no perduran en los tejidos expuestos y rápidamente se eliminan del cuerpo (De Flora *et al.*, 1990; Newman e Intosh, 1991; O'Brien *et al.*, 2003).

Por otra parte, el hecho de que no se haya observado daño genotóxico inducido por los compuestos de Cr (III) puede estar relacionado con la poca capacidad de estos para atravesar la membrana celular (Smith, 1970; Ashby *et al.*, 1995), aunque se ha descrito que cuando se administran a altas concentraciones (mM) los compuestos de Cr (III) pueden atravesar de forma pasiva la membrana celular y nuclear induciendo daño directamente ya que se ha observado en estudios *in vitro* que el Cr (III) muestra una alta afinidad por los ácidos nucleicos e induce daño (Tamino *et al.*, 1981; Tsapakos y Wetterhahn, 1983; Buttner y Beyersmann, 1985; Wise *et al.*, 1993; Stearns *et al.*, 1995; Arakawa *et al.*, 2000). Esto puede indicar que las dosis empleadas en nuestro estudio tal vez no fueron las suficientes para atravesar la membrana pasivamente e inducir MN. Cabe mencionar que cuando se administraron las dosis de $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$, no hubo un incremento estadísticamente significativo de MN con la dosis alta, aunque la dosis baja indujo un incremento en la frecuencia de MN. El hecho de que el mayor efecto se haya observado con la dosis baja de $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ y no con la dosis alta, puede deberse al fenómeno de hormesis, que describe que la dosis-respuesta de un agente genotóxico se caracteriza por una mayor estimulación del efecto de la dosis baja, a diferencia de la dosis alta (que muestra menor efecto) (Calabrese, 2002).

Cuando se administraron los compuestos de Cr (VI) en hembras y machos se observó que se incrementaban las frecuencias de MN de forma estadísticamente significativa a las 24 y las 48 horas. Se ha descrito, que en general que entre las 24 y 48 horas es cuando se presenta la mayor distribución y biotransformación de los agentes químicos (Scialli, 1992), de ahí que se plantee que las evaluaciones de MN se realicen a las 48 horas después de administrados los tratamientos, aunque no se

debe descartar que en algunos casos pueden persistir los efectos hasta 72 horas (Salamone y Heddle, 1983; MacGregor *et al.*, 1987).

Por otra parte, el efecto observado cuando se le administró el K_2CrO_4 concuerda con lo reportado previamente por Wild, (1978) y Kathis, (1981) quienes también observaron un incremento en las frecuencias de MN en médula ósea, al administrar dosis mayores que la de nuestro estudio (40-48 mg/kg) a ratones de la cepa NMR1 y hámsters chinos respectivamente. Se ha descrito que la administración del $K_2Cr_2O_7$ (20 a 75mg/kg) induce daño al material genético mediante la formación de MN y AC, en ratones de la cepa BALB/c (Fabry, 1980; Léonard y Deknudt, 1981), al igual que en nuestro estudio donde se administraron dosis de 25 y 38 mg/kg. Los resultados obtenidos cuando se administró el $Na_2Cr_2O_7$ en una dosis de 25 mg/kg mostraron daño genotóxico al incrementarse estadísticamente significativas las frecuencias de MN, lo que apoya con lo reportado por Tsapakos, (1981, 1983) quien también realizó estudios *in vivo* administrando dosis de 20 a 50mg/kg a ratas Sprage-Dawley, en las que evaluó la fragmentación de ADN células de riñón e hígado. Finalmente, al igual que para los otros compuestos de Cr (VI) empleados en nuestro estudio el efecto observado para el CrO_3 para hembras, concuerda con lo descrito previamente por García-Rodríguez *et al.*, (2001) quienes ya habían reportado daño genotóxico mediante el incremento de MN con dosis similares a las que se emplearon en este estudio tanto en hembras adultas y como gestantes (García-Rodríguez y Altamirano Lozano 2007). Particularmente, en estudios realizados *in vitro* con CrO_3 , se ha descrito que este compuesto puede generar daño genotóxico como la inhibición de la síntesis de ADN, incrementos en el ICH y la formación de AC (Sirover y Loeb, 1976; Tsuda y Kato, 1977; Levis and Majone, 1979; Gómez-Arroyo *et al.*, 1981).

A pesar de que el Cr (VI) muestra muy poca actividad biológica (es decir la interacción con macromoléculas celulares), sin embargo se encuentra bajo condiciones fisiológicas en forma de oxianión cromato y atraviesa la membrana celular a través de transportadores de aniones no específicos de fosfatos/sulfatos (Buttner *et al.*, 1985; Arslan *et al.*, 1987). Dentro de la célula es sometido a una

reducción metabólica por el ácido ascórbico (Asc), el glutatión (GSH), el peróxido de hidrógeno (Kawanishi *et al.*, 1986), y la cisteína (Cys) principalmente, sin embargo hay otros reductores intracelulares del Cr (VI) como lo son el citocromo P450 reductasa (Mikalsen *et al.*, 1989; 1991), la glutatión reductasa (Shi y Dalal, 1989), el aldehído oxidasa (Banks y Cooke, 1986), las catecolaminas (Pattison *et al.*, 2001), la DT-diaforasa (De Flora *et al.*, 1985), la sangre y secreciones gástricas (De Flora *et al.*, 1997). De estas sustancias se cree que el Asc y los tioles (Cys>GSH) son lo más importantes reductores de Cr (VI), siendo el primero favorecido cinéticamente (Quievryn *et al.*, 2003). En general hay dos vías para la reducción del Cr (VI), en primer lugar una serie de reducción de un solo electrón, puede ocurrir en niveles bajos de reductores produciendo las especies intermedias Cr (V), Cr (IV) y en última instancia el Cr (III). La otra posibilidad se da cuando los niveles intracelulares de los agentes reductores están en exceso total sobre el Cr (VI), el paso inicial consiste en la reducción de dos electrones dando como resultado al Cr (IV), y seguido de la reducción de un electrón generando Cr (III) (Stearns *et al.*, 1995). Durante el metabolismo reductivo del Cr (VI) se puede conducir a la generación de especies reactivas de radicales carbón-base (es decir Asc \cdot) y producir efectos tóxicos secundarios (aductos y rupturas en la cadena de ADN) (Stearns *et al.*, 1994, 1995). Sin embargo, se pueden formar otras especies reactivas como el radical OH \cdot , de hecho se ha sugerido que las especies reactivas intermedias generadas en la reducción del Cr (VI) pueden participar en una reacción de Fenton interactuando con el H₂O₂ provocando la producción de radicales OH \cdot , esto ha sido apoyado en experimentos donde se ha aislado ADN para tratarlo con Cr (III) y H₂O₂ lo cual condujo a la formación de ERO's, sitios abásicos y rompimiento de la cadena de ADN (Shi y Dalal, 1989). Por otra parte en el ciclo de Haber-Weiss, estos autores proponen que el radical O₂ \cdot^- puede causar la reducción del Cr (VI) y como consecuencia generar Cr (V), y este a su vez puede reaccionar con H₂O₂ para formar el radical HO \cdot .

En este estudio se evaluó el efecto genotóxico de los compuestos de Cr (III) y Cr (VI) tanto en ratones hembras como en machos de la cepa CD-1, ya que la mayor parte de la información actual es en estudios con machos, y se ha recomendado evaluar daño genotóxico en ambos sexos (con un mínimo de 5 animales de cada sexo) (FDA, 2000). Si un resultado positivo es obtenido en uno de los sexos, un agente de prueba puede ser clasificado como genotóxico, pero ambos sexos deben ser probados para verificar un resultado negativo en uno de los sexos (MacGregor *et al.*, 1987), dado que al probar los compuestos de Cr (III) obtuvimos resultados negativos en nuestro estudio se probaron todos los compuestos en ambos sexos, con la finalidad de poder comparar los resultados de los tratamientos de Cr (III) y (VI) tanto en hembras como en machos. Las diferencias de la inducción de daño genotóxico observadas en el presente trabajo pueden ser debidas a factores de: a) conducta; ya que se ha descrito que los ratones machos tienden a pelear por el control del grupo por lo que se encuentran sometidos a estrés permanentemente (cabe mencionar que los grupos de machos de este estudio generalmente se encontraban peleando) y b) la otra causa probable puede estar involucrada con el metabolismo asociado con factores hormonales (Scialli, 1992; Denmark *et al.*, 2010).

Al evaluar la citotoxicidad de los compuestos de Cr (III) en las hembras y machos ninguno de los resultados de las diferentes horas de evaluación resultó estadísticamente significativo por lo que no podemos hablar de citotoxicidad por parte de estos compuestos, aunque sabemos que la evaluación de la frecuencia de EPC en sangre periférica nos puede indicar daño citotóxico (Venitt y Parry, 1984), en diferentes estudios ha sido imposible concluir respecto a este parámetro debido a la variabilidad natural que presenta; ya que un compuesto puede inducir muerte celular, por lo que si disminuye la frecuencia de EPC; a su vez esta señal puede desencadenar proliferación acelerada de eritrocitos para compensar dicha muerte (Venitt y Parry, 1984; Krishna *et al.*, 2000). Por otra parte, los compuestos de Cr (VI) en hembras y machos disminuyeron las frecuencias de EPC con respecto a la de ENC, por lo que podemos hablar de un efecto citotóxico por parte de dichos compuestos, pero la

interpretación de estos resultados se debe tomar con reserva debido al efecto anteriormente mencionado. El posible efecto citotóxico observado con los compuestos de Cr (III) coincide con lo descrito por otros autores que indican que los compuestos de Cr (VI) son citotóxicos debido a la capacidad que tiene de generar estrés oxidativo, daño en el ADN y muerte celular por apoptosis (Bagchi *et al.*, 2002). Al comparar los resultados de los compuestos de Cr (III) y (VI) estos últimos tienen un mayor efecto en la frecuencia de EPC, esto concuerda con ensayos de prueba donde se ha demostrado que el Cr (VI) es capaz de exhibir una citotoxicidad más pronunciada que los compuestos de Cr (III) por su mayor producción de ERO's (Bagchi *et al.*, 2002). Finalmente, la citotoxicidad observada puede depender de la capacidad de respuesta celular a los compuestos de Cr y la captación de iones de este elemento por parte de las diferentes líneas celulares (Britton *et al.*, 2008).

8. Conclusiones y comentarios finales

- i. La administración por vía i.p. de los compuestos de Cr (III) [CrCl_3 y $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$] a ratones macho y hembra de la cepa CD-1 no incrementó de significativa las frecuencias de MN por lo que no tienen efecto genotóxico.
- ii. La administración por vía i.p. de los compuestos de Cr (VI) [K_2CrO_4 , $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y CrO_3] a ratones hembra y macho de la cepa CD-1 incrementan las frecuencias de MN por lo que tienen efecto genotóxico.
- iii. La formación de MN observados cuando se administraron los compuestos de Cr (VI), puede deberse al efecto de las ERO's y RL que se generan durante la reducción de Cr (VI) a Cr (III) una vez que estos compuestos atraviesan la membrana celular.
- iv. El daño genotóxico inducido en los machos por la administración de los compuestos de Cr (III) y (VI) se observó en el siguiente orden de mayor a menor $\text{CrO}_3 > \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 > \text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 > \text{K}_2\text{CrO}_4 > \text{CrK}(\text{SO}_4)_2 > \text{CrCl}_3$, y en las hembras $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 > \text{CrO}_3 > \text{K}_2\text{CrO}_4 > \text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 > \text{CrCl}_3 > \text{CrK}(\text{SO}_4)_2$.
- v. La administración de los compuestos de Cr (VI) indujeron mayor daño genotóxico en los machos que en las hembras, lo cual puede estar relacionado con diferencias conductuales y del metabolismo asociado con factores hormonales.

- vi. La administración por vía i.p. de CrCl_3 y del $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ a ratones macho y hembra de la cepa CD-1 no modifican las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, por lo que no tienen efectos citotóxico evaluado con este parámetro.

- vii. La administración por vía i.p. del K_2CrO_4 , el $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y el CrO_3 a ratones macho y hembra de la cepa CD-1 tuvo efecto citotóxico debido a que disminuyeron las frecuencias de EPC con respecto a las de ENC de manera estadísticamente significativa.

9. Referencias Bibliográficas

- Adler, I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. y Hayashi, M. Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutation Res.* 417, 19-30 (1998).
- Albert, L. A., *Curso básico de toxicología ambiental*; 2ª ed., Ed. Limusa, México D.F. 311 (1988).
- Ames, B. Mutagens and carcinogens: endogenous and exogenous factors. *Environ. Mol. Mutag.* 14, 66-77 (1989).
- Anderson, R. A. Nutritional role of chromium. *Sci. Total Environ.* 17, 13-29 (1981).
- Arakawa, H., Ahmad, R., Naoui, M. y Tajmir-Riahi, H. A. A comparative study of calf thymus DNA binding to Cr(III) and Cr(VI) ions. Evidence for the guanine N-7-chromium-phosphate chelate formation, *J. Biol. Chem.* 275, 10150–10153 (2000).
- Arslan P., Beltrame, M. y Tomasi, A. Intracellular chromium reduction. *Biochem Biophys Acta*;931, 10-5 (1987).
- Ashby, J. A., Tinwell, H., Lefevre, P. A., y Browne, M. A. The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage _comet assay.: measurement of tail length and moment, *Mutagenesis* 10, 85-90 (1995).
- ATDRS Agency for Toxic Substances and Disease Registry Toxicological Profile for Chromium September. P.H.S. US Department of Health and Human Services (2000).
- Bagchi, D., Vuchetich, P. J. Bagchi, M., Hassaoun E., Tran M. N., Tangs, L. y Stosh. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate (Chromium VI) and Cadmium Chloride (Cadmium II) to rats; *Free Radical Biology & Medicine*; 22 (3) 471-478 (1997).
- Bianchi, V., Dal T. R., Debetto, P., Gino, L. A., Luciani, S., Majone F. y Tamino G. Mechanism of Chromium Toxicity in mammalian cell cultures; *Toxicology* 17, 219-224 (1980).
- Banks, R. B. y Cooke Jr., R. T. Chromate reduction by rabbit liver aldehyde oxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 8-14 (1986).

- Bender, M. Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production, en; Generoso, W., Shelby, F., De Serres, F. DNA repair and mutagenesis in eukaryotes. Plenum, New York, 245-265 (1980).
- Bridges, C. C. y Zalups, R. K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 204(3), 274-308 (2005).
- Britton C. G., Walter, R., Stephen R. P., Thompson, W. D., Wise, S. S., Winn, R. N., Mitani, H. y Wise, J. P. The cytotoxicity and genotoxicity of hexavalent chromium in medaka (*Oryzias latipes*) cells. *Aquatic Toxicology* 87, 60–67 (2008).
- Brooks, A. L., Schmitz, R. W., Bemson, y Dautcher, J. S. The inducer of sister chromatid exchanges by Environmental Pollutants: Relationship of SCE to other Measures of genetic damage, in: Sister Chromatid Exchange. (eds) Tice R. y Hollaender A., Plenum Publishing Corporation, 150 (1984).
- Buttner, B., Beyersmann, D. Modification of the erythrocyte anion carrier by chromate, *Xenobiotica* 15, 735–741 (1985).
- Calabrese, E. J. Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. *Reflections in Mutation Research* 511, 181-189 (2002).
- CDPC Chromium Draft for Public Comment. U S. Department of Health and Human Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry Comments Period Ends: February 18 (1992).
- Cervantes, C. y Moreno, S. R., Contaminación Ambiental por metales pesados; ed. AGT Editor; México; 368 (1999).
- Cieślak-Golonka, M. Toxic and Mutagenic effects of Chromium (VI) A Review. *Coord. Chem. Rec.*, 109, 223 and refs therein (1995).
- Chernomorsky, S., Segelman A. y Poretz, R.D. Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratogen Carcinogen Mutagen.* 19: 313-322 (1999).
- Clarkson, W. T., Friberg, L., Norberg, F. G. y Sager R. P. Biological Monitoring of Toxic Metals. Ed. Plenum Press., New York. p.p. 369-382 (1988).
- Cole, J. y Skopek, T. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogenesis, working paper 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutation Res.* 304, 33-106 (1994).

- De Flora, S., Bennicelli, C., Camoirano, A., Serra, D., Romano, M., Rossi, G. A., Morelli, A. y De Flora, A. In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds, *Carcinogenesis*, 6, 1735-1745 (1985).
- De Flora, S., Bagnaso M., Serra, D. y Znacchi, P. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutation Res.* 238, 99-172 (1990).
- De Flora, S., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., Corbett, G. E. y Kerger, B. D. Estimates of the chromium(VI) reducing capacity in human body compartments as a mechanism for attenuating its potential toxicity and carcinogenicity, *Carcinogenesis* 18, 531-537 (1997).
- Denmark, A., Tien, D., Wong, K., Chung, A., Cachat, J., Goodspeed, J., Grimes, Ch., Elegante, M. y Suci, C. The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behavioural Brain Research* 208, 553-559 (2010).
- Depault, F., Cojocar, M., Fortin, F., Chakrabart, S. y Lemieux, M. Genotoxic effects of chromium (VI) and cadmium (II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy in situ end-labeling (EM-ISEL) assay. *Toxicol In Vitro.* Epub Nov. 5 (2004).
- ECO. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Cromo Serie vigilancia 5. Organización Mundial de la Salud (1987).
- FDA. Food and Drug Administration: Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. USA. (2000).
- Fernandes, M., Mota, M. I., Silva, L. M., Oliveira, R. C., Geraldes, G. C. y Alpoim, C. M. Human Erythrocytes are Protected against Chromate-Induced Peroxidation; *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43, 38-46 (1999).
- Fornace, A. J., Seres, D. S., Lechner, J. F. y Harris, C. C. DNA-protein cross-linking by chromium salts. *Chem Biol Interact.* Sep;36(3):345-54 (1981).
- Foulkes, E. C. Biological effects of heavy metals. CRC Press Vol. II, 36-44 (1990).
- Friberg, L. y Nordberg, G. F. Handbook on the toxicology of metals, 2a. ed, Elsevier Science Publishers B. V. Vol. II, 185-205 (1990).
- García-Rodríguez M. C. y Altamirano-Lozano M. Sales de sodio y cobre de la clorofila; usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y

- anticancerígena. TIP Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas, 4(2); 77-86 (2001).
- García-Rodríguez M. C. Estudio de los efectos de la clorofilina sobre la acción genotóxica y teratogena del cromo VI. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, FES Zaragoza, UNAM (2006).
- García-Rodríguez, M. C. y Altamirano- Lozano, M. La Clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón in vivo. Rev.Bioquímica. Volumen 32 (1):15-24 (2007).
- Gillespie, J. R., Humphreys, A. D. y Baird C. A. y Robinson A. E. Química; ed. Reverté; p.p. 1139 (1990).
- Gómez-Arroyo, S., Altamirano, M. y Villalobos, R. Sister-chromatid exchanges induced by some chromium compounds in human lymphocytes in vitro Mutation Res. 90, 425-431 (1981).
- Gómez V. y Callao, M. P. Chromium determination and speciation since 2000. Trends Analyt Chem. 25 (10), 1006-15 (2006).
- Graedel, T. E., Hawkins, D. T. y Claxton L. D. Atmospheric Chemicals Compounds, Sources, Occurrence and Bioassays; Academic Press, New York, 732 (1986).
- Fabry, L. Relation entre l'induction de micronoyaux dans les cellules de la moelle par les sels de chrome et leur pouvoir cancérogène, C. R. Soc. Biol., 174, 889-892 (1980).
- Fenech, M. y Crott, J. 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. Mutation Res. 504: 131-136 (2002).
- Foulkes, E. C. Biological effects of heavy metals. CRC Press vol. II, 36-44 (1990).
- Fornace A. J Jr., Seres D.S., Lechner J. F. y Harris, C. DNA-protein cross-linking by chromium salts. Chem Biol Interact. Sep;36(3):345-54. (1981)
- Hartwin, A. Current aspects in metal genotoxicity; Biometals 8, 3-11 (1995).
- Hayashi, M., Morita, T. Kodama. Y., Sofuni, T. y Ishidate, M Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutation Res., 245; 245-249 (1990).

- Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Ruso, A. y Sutuo, S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Env. Mol. Mutagen.* 35, 234-252 (2000).
- Heddle, A. J., Hite, M., Kirkhart, M. K. y Salamone, F. M. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, Ed. Elsevier Science Publisher 83, 165-1110 (1983).
- Hemmink, K., Dipple, A., Shuker, D., Fadlubar, F., Segerback, D. y Bartsch, H. Adducts identification and biological significance. International Agency for Research on Cancer Lyons. IARC Scientific Publications 125: 478 (1994).
- Hougue, C. J., The effect of common exposures on reproductive outcomes; Teratogen. *Carcinogen. Mutagen.* 4, 45-57 (1984).
- IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenesis Risk to Humans, Chromium, Nickel and Welding, Lyon, France (1990).
- Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Satoh, Y., Kitagawa, T., Sugano, H., Hirano, T., y Tsuchiya, E. Characteristics of chromate workers' cancers, chromium lung deposition and precancerous bronchial lesions: an autopsy study. *Br J. Cancer.* Jul; 70(1):160-6 (1994).
- Kaths, D.S. In vivo cytogenetic effect of some salts of the heavy metals cadmium, chromium, mercury, and platinum in assays of micronuclei and sister chromatid exchange, Thesis, Freiburg University (F.R.G.), in German 80, (1981).
- Kawanishi, S., Inoue, S. y Sano, S. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.* 261, 5952-5958 (1986).
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A. y Wakata, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Res.* 540: 153-163 (2003).
- Krishna, G. y Hayashi, M. in vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation; *Mutation Res.* 455, 155-166 (2000).
- Léonard, A. y Deknudt, G. Mutagenicity test with chromium salts in mouse (Abstract), *Mutation Res.*, 80, 287 (1981).

- Levis, A.G., y Majone, F. Cytotoxic and clastogenic effects of soluble chromium compounds on mammalian cells cultures, *Br. J. Cancer*, 40, 523-533 (1979).
- Levis, A. G. y Majone, F. Cytotoxic and calstogenic effects of soluble and insoluble compounds containing hexavalent and trivalent chromium; *Br. J. Cancer* 44, 219-235 (1981).
- Liu, S., Dixon, K. Induction of mutagenic DNA by chromium (VI) and Glutathione. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28, 71-79 (1969).
- MacGregor, J.T., Tucker, J. D., Ziderman, I.I., Wehr, C. M., Wilson, R. E. y Friedman, M. Non-clastogenicity in mouse bone marrow of fructose/lysine and other sugar/ amino acid browning products with in vitro genotoxicity, *Food Chem. Toxicol.*, 27, 715-721 (1989).
- Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C. Salamone, M. F. y Heddle, J. A. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 239, 29-80 (1990).
- Mertz, W. Chromium Ocurrance and Fuction in Biological Systems. *Physiological Reviews* vol. 49, No. 42 (1969).
- Mikalsen, A., Alexander, J. y Ryberg, D. Microsomal metabolism of hexavalent chromium. Inhibitory effect of oxygen and involvement of cytochrome P-450, *Chem. Biol. Interact.* 69, 175–192 (1989).
- Mikalsen, A., Alexander, J., Wallin, H., Ingelman Sundberg, M. y Andersen, R. A. Reductive metabolism and protein binding of chromium(VI) by P450 protein enzymes, *Carcinogenesis* 12, 825–831 (1991).
- Miller III, C. A., Cohen, M. D. y Costa, M. Complexing of actin and other nuclear proteins to Dna by cis.diammine-dichloroplatinum (II) and chromium compounds. *Carcinogenesis* 12, 269-276 (1991).
- Miranda, H. J. Estudio del comportamiento fisico y quimico del cromo en aguas profundas del municipio de Tultitlan, Estado de México; Tesis FES Zaragoza, UNAM, 85 (1992).
- Mirsalis, C., Hamilton, M. C., y Patierno, S. Chromium (VI) in plausible Drinking water concentrations in not genotoxic in vivo bone marrow micronucleus or liver unscheduled DNA synthesis assay; *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2, 60-63 (1996).

- Müller, L., Kikuchi, Y., Probst, G. Schechtman, L. Shimada, H. Sofuni, T, y Tweats, D. ICHharmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Res.* 436, 195-225 (1999).
- Newman, M. C., e Intosh, A. W. *Metal Ecotoxicology*; Ed. Lewis Publishers 395 (1991).
- Newmark, H. Plant phenolics as inhibitors of mutational and precarcinogenic events. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 461-466 (1987).
- Norseth, T. The Carcinogenicity of Chromium; *Environmental Health Perspectives*; Vol. 40, 121-130 (1981).
- Nishio, A. y Uyeki E. Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds; *Journal of Toxicology and Environmental Health* 15, 237-244 (1985).
- O'Brien T. J., Fornsgaglio, J. L., Ceryak, S. y Patierno, S. R. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Res.* 533; 3-36 (2003).
- Ortiz-Monasterio, P. F., Cortinas de Nava C. y Maffey, G. L. Manejo de los desechos industriales peligrosos en México, *Universo veintiuno, México* (1987).
- Quievryn, G., Peterson, E., Messer, J. y Zhitkovich, A. Genotoxicity and mutagenicity of chromium(VI)/ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. *Biochemistry* 42, 1062-1070 (2003).
- Pattison, D. I., Davies, M. J., Levina, A., Dixon, N. E. y Lay, P. A. Chromium(VI) reduction by catechol(amine)s results in DNA cleavage in vitro: relevance to chromium genotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 14, 500-510 (2001).
- Phillips R. L. Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among seventh-day Adventists. *Cancer Res.* 35, 3513-3522 (1975).
- Rojas, E., Herrera, L. Poirier, L. y Ostrosky-Wegman, P. Are metals dietary carcinogens?. *Mut. Res.* 443, 157-181 (1999).
- Salamone, M.F. y Heddle, J. A. The bone marrow micronucleus assay: Rationale for a revised protocol, in: F.J. de Serres (Ed.), *Chemical Mutagens*, Vol. 8, Plenum, New York, pp. 111-149 (1983).
- Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder, G. Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotóxico effects. *Mutation Res.* 318, 239-247 (1994).

- Schmid, W. y Ledebur, M. V. The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Res.* 19, 109-117 (1973).
- Shi, X. y Dalal, N. S. The role of superoxide radical in the chromium (VI)- generated hydroxyl radical: The Cr (VI) Haber-Weiss cycle. *Biochemistry and biophysics* vol 292, 323-327 (1992).
- Singh, J., Pritchard, D. E., Carlisle, D. L., Mclean, J. A., Montaser, A., Orenstein, J. M., y Patierno, S. R. Internalization of carcinogenic lead chromate particles by cultured normal human lung epithelial cells: formation of intracellular lead-inclusion bodies and induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* Dec 15;161(3):240-8 (1999).
- Sirover, M. A. y Loeb, L. A. Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens, *Science*, 194, 1434-1436 (1976).
- Smith, B. S. W. A comparison of I and Cr for measurement of total blood volume and residual blood content of tissues in the rat: evidence for accumulation of ⁵¹Cr by tissues, *Clin. Chim. Acta* 27, 105-108 (1970).
- Stearns, D. M. y Wetterhahn, K. E. Reaction of chromium (VI) with ascorbate produces chromium (V), chromium (IV) and carbon-based radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 21-25 (1994).
- Stearns, D. M., Kennedy, L. J., Courtney, K. D., Gianngrande, P. H., Phieffer, L. S. y Wetterhahn, K. E. Reduction of chromium (VI) by ascorbate leads to chromium-DNA binding and DNA strands breaks in vitro. *Biochemistry* 34, 910-919 (1995).
- Steinmetz, K. and Potter, J. D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 96:1027-1039 (1996).
- Tamino, G., Peretta, L., y Levis, A. G. Effects of trivalent and hexavalent chromium on the physicochemicals properties of mamalian cell nucleic acids and synthetic polynucleotides; *Chem. Biol. Interactions* 37, 309-319 (1981).
- Trivedi, B., Saxena, K. D., Murthy, C. R. y Chandra, V. S. Embryotoxicity and fetotoxicity of orally administered hexavalent Chromium In Mice; *Reproductive Toxicology* Vol. 3, 275-278 (1989).
- Tsapakos, M. J., Hampton, T. H. y Jennette, K. W. The carcinogen chromate induces DNA cross-links in rat liver and kidney, *J. Biol. Chem.*, 256, 3623-3626 (1981).
- Tsapakos, M. J. y Wetterhahn, K. E. The interaction of chromium with nucleic acids. *Chem. Biol. Interact.* 46, 265-277 (1983).

- Tsuda, H. y Kato, K. Chromosomal aberrations and morphological transformation in hamster embryonic cells treated with potassium dichromate in vitro, *Mutation Res.*, 46, 87-94 (1977).
- UNEP United Nations Environment Programme. Harmful substances and hazardous waste, (2010)
- Vega G. S. y Reynaga, O. Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales; Ed. Limusa; México D. F.; 727 (1990).
- Venitt, S. y Parry, J. M. Mutagenicity testing a practical approach; ed. Press Limited 337 (1984).
- Villagómez, M. M. Efectos producidos por el trióxido de cromo sobre los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de Vicia faba, Tesis Facultad de Ciencias, Depto. De Biología, UNAM., 50 (1981).
- Voitkun, V., Zhitkovich, A. y Costa, M. Complexing of amino acids to DNA by chromate in intact cells. *Environ. Health Perspect.* 102, (Suppl. 3) 251-255 (1994).
- Voitkun, V., Zhitkovich, A. y Costa, M. Cr (III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. *Nucl. Acids Res.* 26, 2024-2030 (1998).
- Vouk, V. General chemistry of metals. En: Handbook on the toxicology of metals. (Eds) L. Fribrs, G. F. Elsevier. Cap. 1 (1986).
- Wild, D. Cytogenetic effects in the mouse of 17 chemical mutagens and carcinogens evaluated by the micronucleus test, *Mutation Res.*, 56, 319-327 (1978).
- Wise, J. P. Sr., Stearns, D. M., Wetterhahn, K. E., y Patierno, S. R. Cell-enhanced dissolution of carcinogenic lead chromate particles: the role of individual dissolution products in clastogenesis. *Carcinogenesis.* Oct;15(10):2249-54 (2002).
- Zhitkovich, A., Voitkun, V. y Costa, M. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium in vitro: importance of trivalent chromium and the phosphate group. *Biochemistry* 35, 7275-7282 (1996).
- Zhitkovich, A., Song, Y., Quievryn, G. y Voitnuk, V. Non-oxidative mechanism are responsible for the induction of mutagenesis by reduction of Cr (VI) with cysteine: role of ternary DNA adducts in Cr(III)-dependent mutagenesis. *Biochemistry* 40, 549-560 (2001).

10. ANEXOS

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

- i) **Evento:** XIV Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, D.F. Celebrado del 23 al 25 de septiembre de 2009.

Título de la ponencia: “Efectos Genotóxicos de los Compuestos de Cromo (VI) y (III) en el Ratón CD-1 *in vivo*”

Autores: Pereyra Mejía Pedro Salvador, Altamirano Lozano Mario y García Rodríguez Ma. del Carmen.

- ii) **Evento:** Congreso Nacional de Genética 2009, de la Sociedad Mexicana de Genética, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México. Celebrado del 6 al 10 de octubre de 2009.

Título de la ponencia: “Efectos Genotóxicos de los Compuestos de Cromo (III y VI) y de la acción de la Clorofilina sobre la Frecuencia de Micronúcleos en Ratones de la Cepa CD-1 tratados con CrO_3 ”

Autores:, García-Rodríguez M. C., Pereyra-Mejía P., Macedo-Evaristo C. y Altamirano-Lozano M.

- iii) **Evento:** V Congreso de Investigación, FES Zaragoza, UNAM. Iztapalapa, México D.F., Celebrado del 3 al 6 de noviembre de 2009.

Título de la ponencia: “Efectos Genotóxicos de los Compuestos de Cromo (III y VI) y de la acción de la Clorofilina sobre la Frecuencia de Micronúcleos en Ratones de la Cepa CD-1 tratados con CrO_3 ”

Autores: María del Carmen García Rodríguez, Pedro Salvador Pereyra Mejía, Claudia Macedo Evaristo y Mario Altamirano Lozano.



V Congreso de Investigación en la FES Zaragoza

Programa General



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

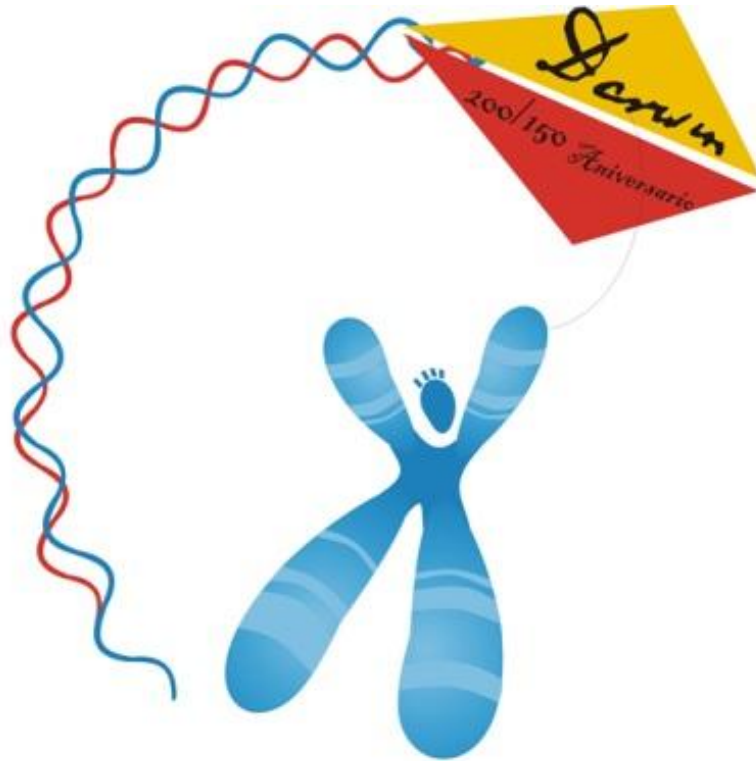
3 – 6 Noviembre, 2009

EFFECTOS GENOTÓXICOS DE LOS COMPUESTOS DE CROMO (III Y VI) Y DE LA ACCIÓN DE LA CLOROFILINA SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN RATONES DE LA CEPA CD-1 TRATADOS CON CrO₃

García Rodríguez Ma. del Carmen, Pereyra Mejía Pedro Salvador., Macedo Evaristo Claudia y Altamirano Lozano Mario. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), FES-Zaragoza, UNAM, D.F.
maricar_67@yahoo.com

Aunque los compuestos de Cr (III) son capaces de dañar directamente al ADN, los compuestos de Cr (VI) presentan mayor potencial genotóxico por ser capaces de atravesar la membrana celular y reducirse hasta Cr (III) generando especies reactivas de oxígeno (ERO's) que dañan al ADN. El estudio de sustancias con propiedades antimutágenas y anticancerígenas ha surgido como una opción para contrarrestar los efectos de los agentes genotóxicos. La clorofilina (CFL), sal de sodio y cobre de la clorofila, ha mostrado en diversos ensayos de prueba actividad antimutágena y anticancerígena. En este trabajo se estudiaron los efectos genotóxicos de diferentes compuestos de Cr (VI) y Cr (III) y la acción de la CFL sobre el daño al ADN. Se evaluó la frecuencia de micronúcleos (MN) en sangre de ratón empleando la técnica de naranja de acridina. Ratones de la cepa CD-1, fueron tratados por vía i.p. con 25 mg/kg de peso corporal de los compuestos de Cr (III) [CrK(SO₄)₂], Cr (VI) [(CrO₃), (Na₂Cr₂O₇) y (K₂CrO₄)] y 20 mg/kg de CFL. Los resultados muestran un incremento en la frecuencia de MN estadísticamente significativos en los grupos tratados con Cr (VI). Estos datos corroboran la hipótesis de que los compuestos de Cr (VI) inducen mayor daño genotóxico *in vivo* que los compuestos de Cr (III). Cuando se combinaron los tratamientos de la CFL con CrO₃, la frecuencia de MN disminuye significativamente, lo cual indica protección de la CFL del daño al ADN inducido por el CrO₃. Sin embargo, al administrar una solución de CFL+CrO₃ no se redujo la frecuencia de MN, lo que sugiere que la CFL no interactúa directamente con el CrO₃ (formación de complejo), sino que podría estar más relacionado con la captura de radicales libres generados por la reducción de Cr (VI) a Cr (III).

Efectos genotóxicos de los compuestos de Cr (III) y (VI) en el ratón D-1 in vivo



Universidad Veracruzana



Sociedad Mexicana
de Genética



Facultad de Biología
Xalapa

Congreso Nacional Genética 2009

XALAPA, VERACRUZ

06 al 10 octubre USBI

Conferencias Magistrales, Presentaciones orales y carteles
Informes http://smgac.org/congreso_anual.htm
socouv@yahoo.com y bpalmeros@uv.mx

EFFECTOS GENOTÓXICOS DE LOS COMPUESTOS DE CROMO (III Y VI) Y DE LA ACCIÓN DE LA CLOROFILINA SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN RATONES DE LA CEPA CD-1 TRATADOS CON CrO₃

García-Rodríguez M. C., Pereyra-Mejía P., Macedo-Evaristo C. y Altamirano-Lozano M.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN),
FESZaragoza, UNAM, D.F. maricar_67@yahoo.com

Aunque los compuestos de Cr (III) son capaces de dañar directamente al ADN, los compuestos de Cr (VI) presentan mayor potencial genotóxico ya que estos últimos son capaces de atravesar la membrana celular y reducirse hasta Cr (III) generando especies reactivas de oxígeno (ERO's) que a su vez inducen daño al ADN. El estudio de sustancias con propiedades antimutágenas y anticancerígenas ha surgido como una opción para contrarrestar los efectos genotóxicos de los agentes a los cuales nos encontramos expuestas las poblaciones humanas. La clorofilina (CFL), sal de sodio y cobre de la clorofila, ha mostrado en diversos ensayos de prueba actividad antimutágena y anticancerígena. En este trabajo se estudiaron los efectos genotóxicos de diferentes compuestos de Cr (VI) y Cr (III) y la acción de la CFL sobre el daño al ADN. Se evaluó la frecuencia de micronúcleos (MN) en sangre periférica de ratón empleando la técnica con naranja de acridina. Ratones de la cepa CD-1, fueron tratados por vía i.p. con 25 mg/kg de peso corporal de los compuestos de Cr (III) [CrK(SO₄)₂], Cr (VI) [(CrO₃), (Na₂Cr₂O₇) y (K₂CrO₄)] y 20 mg/kg de CFL. Los resultados muestran un incremento en la frecuencia de MN estadísticamente significativa solo en los grupos tratados con Cr (VI). Estos datos corroboran la hipótesis de que los compuestos de Cr (VI) inducen mayor daño genotóxico *in vivo* que los compuestos de Cr (III). Cuando se combinaron los tratamientos de la CFL con CrO₃, la frecuencia de MN disminuyó significativamente, lo cual indica protección de la CFL del daño al ADN inducido por el CrO₃. Sin embargo, al administrar una solución de CFL+CrO₃ (preparados 4 horas antes de su aplicación) no se redujo la frecuencia de MN, lo que sugiere que el mecanismo de protección de la CFL no es interactuando directamente con el CrO₃ (formación de complejo) como lo hace con otros mutágenos, sino que podría estar más relacionado con la captura de radicales libres generados por la reducción de Cr (VI) a Cr (III). Proyecto financiado por PAPIIT IN209309.

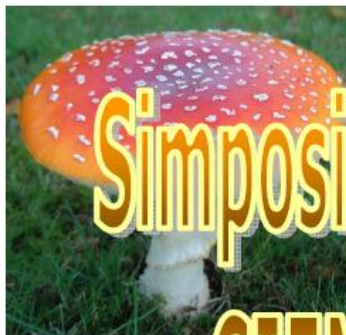
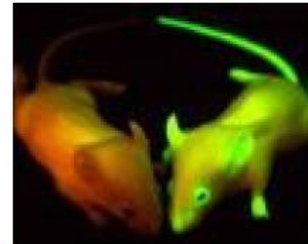
Efectos genotóxicos de los compuestos de Cr (III) y (VI) en el ratón (D-1 in vivo



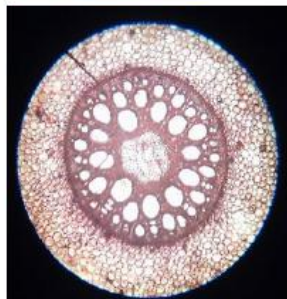
**35 Aniversario
1974-2009**



XIV



**Simposio del Departamento de
CIENCIAS DE LA SALUD**



SALA CUICACALLI 23-25 de septiembre de 2009

**EFFECTOS GENOTÓXICOS DE LOS COMPUESTOS DE CROMO (VI) Y (III)
EN EL RATÓN CD-1 *in vivo***

Pereyra Mejía Pedro Salvador, Altamirano Lozano Mario y García Rodríguez Ma. del Carmen.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, D.F. maricar_67@yahoo.com

Los efectos genotóxicos y citotóxicos de los compuestos del cromo (Cr) han sido estudiados ampliamente en ensayos *in vitro* empleando células de mamíferos. Se ha observado que algunos de sus compuestos principalmente de Cr (III) son capaces de modificar el crecimiento celular, la síntesis de proteínas, dañar los ácidos nucleicos y alterar el ciclo mitótico. Sin embargo, se ha propuesto que a pesar de que los compuestos de Cr (III) inducen daño directo al ADN, los compuestos de Cr (VI) presentan mayor potencial genotóxico, esto debido a que son capaces de atravesar la membrana celular donde se reducen hasta Cr (III) generando especies reactivas de oxígeno (ERO's) las cuales directa o indirectamente pueden generar daño al ADN. En este trabajo se estudiaron los efectos genotóxicos de diferentes compuestos de Cr (VI) y Cr (III), mediante la evaluación de las frecuencias de micronúcleos (MN) en sangre periférica de ratón. Se empleó la técnica de naranja de acridina[1]. Ratones de la cepa CD-1, fueron tratados por vía intraperitoneal con 25 mg/kg de peso corporal de los compuestos de Cr (III) $[\text{CrK}(\text{SO}_4)_2]$ y Cr (VI) $[(\text{CrO}_3)$, $(\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)$ y $(\text{K}_2\text{CrO}_4)]$. Muestras de sangre periférica de la vena caudal fueron obtenidas cada 24 horas durante y después de la administración de los tratamientos. En los resultados obtenidos se observó que en los grupos tratados con los compuestos de Cr (VI) se incrementa el número de MN en las horas 24 y 48, no así en el grupo tratado con Cr (III), sin embargo, los incrementos en los MN solo resultan estadísticamente significativos en el grupo tratado con CrO_3 , por lo que se incrementaron las dosis en los demás grupos para incrementar el efecto, pero solo resultaron estadísticamente significativos los incrementos de MN en los grupos tratados con Cr (VI). Estos datos corroboran la hipótesis de que los compuestos de Cr (VI) inducen mayor daño genotóxico *in vivo* que los compuestos de Cr (III) a pesar de ser más tóxicos estos últimos *in vitro*[2,3]. El mecanismo por el cual el Cr (VI) indujo daño puede estar relacionado con el estrés oxidativo, sin embargo, es necesario realizar nuevos experimentos para establecer los mecanismos por los cuales los compuestos de Cr (VI) inducen MN. Por otra parte, el hecho de que el Cr (III) no incrementara la frecuencia de MN, a pesar de que *in vitro* ha mostrado que es capaz de interaccionar con el ADN[4] e inducir daño, puede estar relacionado con su incapacidad de no atravesar la membrana celular *in vivo*, por lo que no interaccionó directamente con el ADN. Financiamiento por PAPIIT IN-209309.

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

[2] De Flora, S., Bagnaso M., Serra, D. y Zanicchi, P. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutation Res.* 238, 99-172 (1990).

[3] O'Brien T. J., Fornsgaglio, J. L., Ceryak, S. y Patierno, S. R. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Res.* 533; 3-36 (2003).

[4] M. J. y Wetterhahn, K. E. The interaction of chromium with nucleic acids. *Chem. Biol. Interact.* 46, 265-277 (1983).