



Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

“ESTUDIO *in vivo* DEL EFECTO ANTIGENOTÓXICO DEL TÉ VERDE
Y SUS FLAVONOIDES EN RATONES TRATADOS CON CROMO (VI)”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O

PRESENTA:

NICOLAS MENDEZ TONANCY

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María del Carmen García Rodríguez

MÉXICO, D.F. MARZO 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

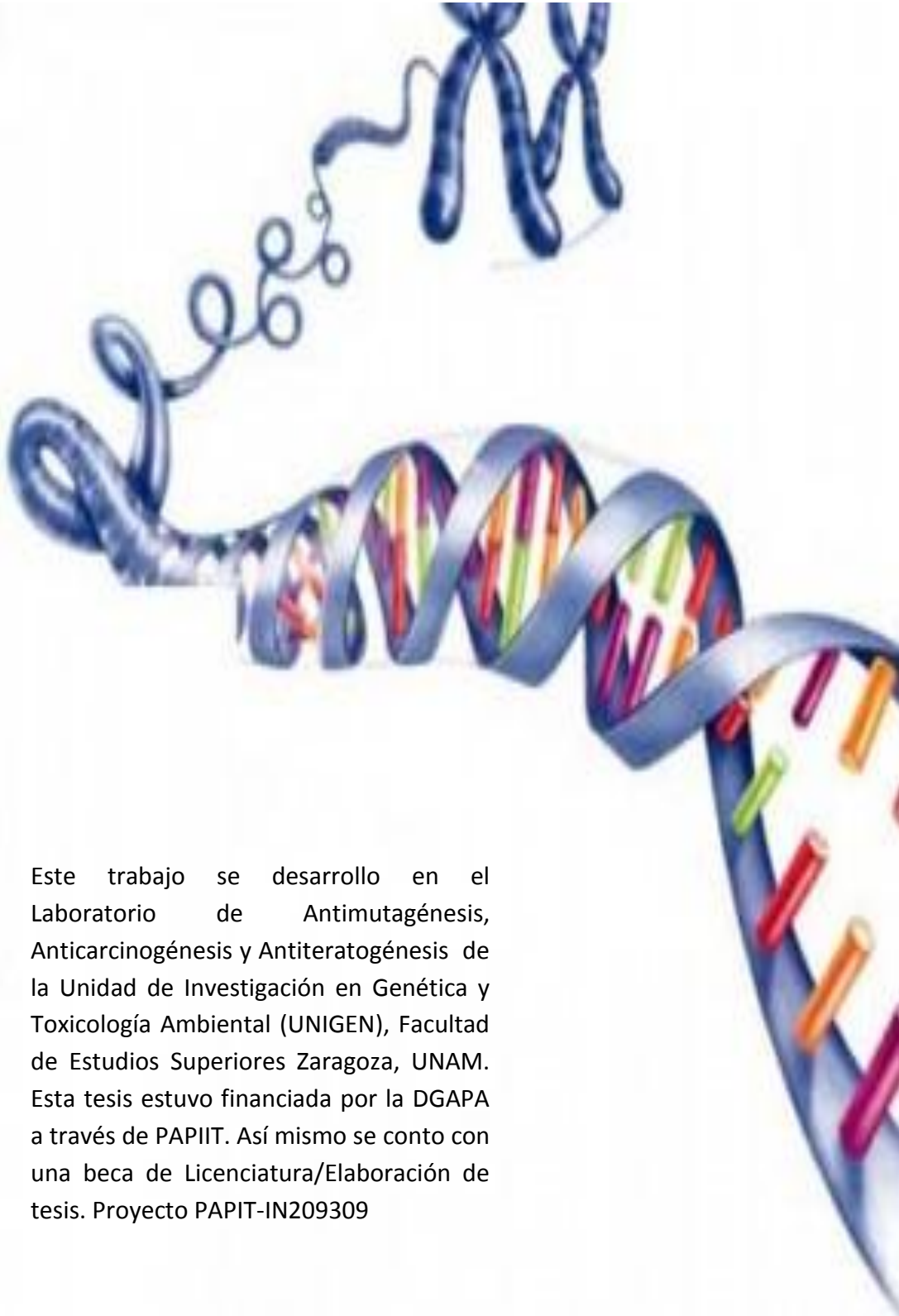


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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 desarrollo 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. Esta tesis estuvo financiada por la DGAPA a través de PAPIIT. Así mismo se conto con una beca de Licenciatura/Elaboración de tesis. Proyecto PAPIIT-IN209309

*"Que tu alimento sea tu medicina, y que tu
medicina sea tu alimento"...*

Hípócrates

Dedicado A....

Dante Yáotl... Por iluminar mi vida con tu sonrisa, por darme la fuerza que necesito para vivir día a día. Porque por ti todas las metas pueden ser alcanzadas. TE AMO HIJO.

Ayrton... Porque siempre has estado ahí para escucharme y apoyarme, por esperar siempre lo mejor de mí. TE AMO HERMANO.

Carlos... Por ser mi complemento, por tu apoyo incondicional. Por llegar en el momento indicado a mi vida. Simplemente porque TE AMO.

Cinthya... Por ser mi ejemplo a seguir, por tu apoyo incondicional. Por esos momentos que sólo se pueden vivir contigo. TE AMO HERMANA.

Minerva... Porque aunque has pasado por malos momentos siempre he contado contigo. Por estar en las buenas y en las malas a mi lado, por enseñarme a luchar en la vida. Por ser una gran persona y por tener la fortuna de ser tu hija. TE AMO MAMÁ.

Modesto... Porque sabías que lo lograría. Por tu apoyo y consejos. TE AMO PAPÁ.

Dra. María del Carmen... Por su confianza y gran apoyo, por brindarme la oportunidad de trabajar con usted. Pero sobre todo por su gran amistad.

Eduardo y Rafael... Porque sin su gran amistad, apoyo, confianza, consejos y regaños no habría podido llegar hasta aquí. Amigos, gracias por haber recorrido éste camino juntos. LOS QUIERO.

Nancy y Gaby... Porque más que compañeras de laboratorio son mis chicas de confianza. Gracias por su amistad y apoyo. Por todos esos momentos juntas. LAS QUIERO.

¡¡GRACIAS A TODOS AQUELLOS QUE SIEMPRE SUPIERON QUE LO LOGRARÍA!!

Índice de Contenido

Resumen.....	i
Índice de abreviaturas.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Té verde y sus componentes antioxidantes.....	1
1.1 Polifenoles.....	2
1.1.1 Biodisponibilidad y metabolismo.....	6
1.1.2 Acción antioxidante.....	7
1.1.3 Quercetina.....	10
1.1.4 Rutina.....	11
1.2 Mecanismo de protección.....	13
1.3 Toxicidad.....	14
2. Estrés Oxidante (EO).....	15
2.1 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's).....	15
2.2 Estrés Oxidante inducido por metales.....	16
2.3 Metales.....	16
2.3.1 Cromo.....	17
2.3.2 Mecanismo de inducción de daño al ADN	17
3. Evaluación de daño genotóxico.....	20
3.1 Micronúcleos (MN).....	20

II. JUSTIFICACIÓN.....	24
III. HIPÓTESIS.....	24
IV. OBJETIVOS.....	25
1.1 Objetivo general.....	25
1.2 Objetivos particulares.....	25
V. MATERIAL Y MÉTODO.....	26
1. Animales.....	26
2. Reactivos.....	26
3. Tratamientos.....	26
4. Establecimiento de las dosis de té verde, rutina, quercetina y CrO ₃	27
5. Tiempos de evaluación.....	27
VI. Evaluaciones	32
1. Preparación de laminillas.....	32
2. Toma de muestras.....	32
3. Evaluación de muestras.....	32
4. Análisis estadísticos.....	34

VII. RESULTADOS.....	35
VIII. DISCUSIÓN.....	52
IX. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES.....	60
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
XI ANEXOS.....	77

RESUMEN

En la búsqueda de sustancias con propiedades protectoras de daño al ADN se han preferido a los productos derivados de plantas. El estudio de estas sustancias protectoras es de importancia debido al incremento de la exposición de las poblaciones humanas a agentes inductores de daño genético. El té verde (*Camellia sinensis*) es una bebida rica en antioxidantes (flavonoides) y se le han atribuido efectos benéficos para la salud. Por otra parte, se ha descrito que los compuestos de cromo (VI) generan estrés oxidante y se les ha relacionado con daño genotóxico y con la inducción de algunos tipos de cáncer. En este estudio se evaluaron los efectos del té verde al ser administrado durante diez días por vía oral y los efectos de dos de los principales flavonoides (quercetina y rutina) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducidos por el trióxido de cromo (CrO_3). Se empleó la técnica de micronúcleos (MN) para evaluar el daño genotóxico. Grupos de 5 ratones hembra de la cepa CD-1 fueron tratados de la siguiente manera: a) Grupo testigo, al cual se le administro agua potable *ad libitum*; b) Grupo té verde, al cual se le administró durante 10 días infusiones de té verde (3 g en 100 ml de agua) *ad libitum*; c) Grupo rutina, al que se les administro 625mg/kg (dos dosis) por vía i.p.; d) Grupo quercetina, al que se les administro 100mg/kg por vía i.p.; e) Grupo rutina-quercetina, el cual fue tratado simultáneamente con una sola dosis de quercetina (100mg/kg) vía i.p. y dos dosis de rutina (625mg/kg) vía i.p.; f) Grupo CrO_3 , el cual fue tratado con una dosis de CrO_3 (20 mg/kg) por vía i.p.; g) Grupo té verde- CrO_3 , en el cual se combinaron los tratamientos del grupo té verde y en el día diez de tratamiento se les aplicó el CrO_3 ; h) Grupo rutina- CrO_3 , se combinaron los tratamientos de rutina y CrO_3 ; i) Grupo quercetina- CrO_3 , se combinaron los tratamientos de quercetina y CrO_3 ; j) Grupo rutina-quercetina- CrO_3 , se combinaron los tratamientos rutina-quercetina y CrO_3 . Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal cada 24 h después desde la administración de los tratamientos. Las muestras se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia para identificar la presencia de MN en eritrocitos policromáticos (EPC). Los resultados obtenidos muestran que la administración de té verde durante diez días como única fuente de líquidos, así como la administración de rutina, quercetina de manera independiente y simultánea no incrementan las frecuencias de MN. La administración del CrO_3 incrementó la frecuencia de MN de manera estadísticamente significativa lo cual corroboró el daño genotóxico de los compuestos de Cr (VI). Cuando se combinaron los tratamientos de té verde y flavonoides con CrO_3 se disminuyó el daño genotóxico inducido por el tratamiento de CrO_3 , ya que se redujeron las frecuencias de MN (hora 48) en el siguiente orden: rutina (82%) > quercetina (53%) > té verde (47%). Esto puede estar relacionado con el potencial de los tratamientos para neutralizar las ERO's y RL generados por la reducción del Cr (VI) a Cr (III). Cuando se combinaron los tratamientos de quercetina y CrO_3 se presentó un efecto dual, ya que a las 24 y 72 horas se disminuyeron las frecuencias de MN, pero a las 48 horas se incrementaron, lo que sugiere un efecto anti y prooxidante.

La co-administración de rutina y quercetina previo a la administración del CrO_3 no incremento la protección observada con la administración independiente de cada uno de los tratamientos.

Finalmente, la administración de los tratamientos no modificaron las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, por lo que no presentan efectos citotóxicos evaluados con este parámetro.

Índice de abreviaturas

AC	Aberraciones cromosómicas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Cr(VI)	Cromo hexavalente
Cr(III)	Cromo trivalente
CrO ₃	Trióxido de cromo
DIF	Frecuencia Diferencial de Inducción de MN
ENC	Eritrocitos Normocromaticos
EPA	Environmental Protection Agency
EPC	Eritrocitos Policromaticos
MN-EPC	Eritrocitos Policromaticos con micronúcleo
EO	Estrés Oxidante
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
ERO's	Especies Reactivas de Oxígeno
FDA	Food and Drug Administration
i.p.	Intraperitoneal
IARC	International Agency for Research on Cancer
MN	Micronúcleos
NA	Naranja de acridina
NIF	Frecuencia de la Inducción Neta de MN
RL	Radicales Libres
EGCG	(-)-epigallocatequina-3-galato
ECG	(-)-epicatequina-3-galato
EC	(-)-epicatequina
GC	(+)-galocatequina
EGC	(-)-epigallocatequina
UNEP	United Nations Environment Programme

I. INTRODUCCIÓN

La exposición de las poblaciones humanas a diferentes agentes xenobióticos ha generado un interés en el uso de suplementos dietéticos, particularmente productos derivados de plantas, debido a que se ha mostrado que existe una relación inversamente proporcional entre el consumo de vegetales y la incidencia de cáncer (Surh y Ferguson, 2003). El estudio de sustancias con propiedades protectoras ó moduladoras del daño al ADN, surge como una opción complementaria a los estudios de genotoxicidad, ya que al conocer los mecanismos de protección se pueden generar alternativas para contrarrestar los efectos de los agentes inductores de daño genotóxico (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007). De ahí que se proponga el uso de antimutágenos y anticancerígenos que se encuentran en la dieta como un procedimiento para prevenir el cáncer y algunas enfermedades genéticas en los humanos (Surh y Ferguson, 2003; Ferguson, 2004; Díaz, 2008).

Se ha encontrado que las frutas, los vegetales y algunos tipos de cereales tienen un alto contenido de componentes con propiedades antioxidantes, por lo que se ha propuesto que su consumo puede contribuir a neutralizar la acción de los Radicales Libres (RL) generados por el Estrés Oxidante (EO) (Pineda *et al.*, 1999; Molina, 2009). Particularmente, al té (*Camellia Sinensis*) se le han atribuido propiedades antioxidantes, las cuales son derivadas principalmente de los componentes polifenólicos que posee (Arencibia *et al.*, 2003).

1. Té verde y sus componentes antioxidantes

El té, es una bebida hecha a partir de las hojas secas de *Camellia sinensis*, esta planta a sido cultivada por muchos años y sus hojas que primeramente fueron usadas con fines medicinales se ha convertido en una de las bebidas más populares consumidas mundialmente (Stavric *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2007). El té es un componente polifenólico natural y dependiendo de los procesos de producción, se le puede encontrar en tres tipos: verde (no fermentado, mediante la inactivación de la enzima polifenol oxidasa), oolong o blanco (semi-fermentado) y negro (fermentado); de los cuales el té verde es el que posee la mayor cantidad de polifenoles (30%), seguido del té negro (5%) y el té oolong (4.5%). (Rijken *et al.*, 2002; Chandra, 2010).

La composición del té verde se ha estudio por muchos años y se ha reportado que las catequinas son los polifenoles que se encuentran en mayor proporción, incluyendo las (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), (-)-epicatequina-3-galato (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina (EC), (+)-galocatequina (GC), (+) catequina, que en conjunto pueden constituir el 30% del peso seco de las hojas. El té verde también contiene ácido gálico y otros ácidos fenólicos como ácido clorogénico, cafeína y otros flavonoles como son el kaemferol, miricetina, quercetina, rutina; ácidos quínicos, carotenoides, lignina, proteínas, clorofilinas, minerales y cantidades muy pequeñas de otras metilxantinas como teofilina, teobromina y teanina (Dufresne y Farnworth, 2001; Srinivasan *et al.*, 2008; Chandra, 2010).

En diversos estudios epidemiológicos y experimentales se ha observado que el consumo de té tiene efectos beneficios en la salud, debido a su gran cantidad de polifenoles que le atribuyen su gran actividad antioxidante; se ha observado que contribuye en la disminución del desarrollo de algunos tipos de cáncer, aterosclerosis, cardiopatías y enfermedades neurodegenerativas entre otras (Stavric *et al.*, 1996; Chandra *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2010). Se le ha asociado también con actividad antimutagénica y anticarcinogénica; así como con propiedades de neuroprotección (Guo *et al.*, 2005). Se ha observado que la actividad antioxidante que presenta el té verde se debe principalmente a las catequinas (EGCG, ECG, EGC, EC, GC). Sin embargo la quercetina, el kaemferol, la miricetina y sus glucósidos, los flavonoles más importantes, se les ha asociado también con actividad antimutágena en estudios *in vitro* e *in vivo* (Dufresne y Farnworth, 2001; Rijken *et al.*, 2002). Recientemente, se ha encontrado en estudios epidemiológicos que el consumo de esta bebida puede inhibir o reducir la iniciación, promoción y progresión de cáncer de estómago, así como de la cavidad oral, de pulmón y de esófago (Srinivasan *et al.*, 2008).

Numerosos estudios *in vivo* han indicado que los polifenoles del té verde inhiben la tumorigénesis inducida por químicos. El té y sus constituyentes han mostrado también inhibir la carcinogénesis en la piel, pulmón, esófago, estómago, hígado, intestino delgado, páncreas, colon y glándulas mamarias; así como inhibir los estados de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis (Lambert y Yang, 2003).

1.1 Polifenoles

Muchos de los beneficios que se le han atribuido al té verde, incluyendo la protección para enfermedades cardiovasculares y cáncer, son atribuidas principalmente a la presencia de polifenoles (Chandra *et al.*, 2005).

El té es un componente polifenólico natural, consumido por cerca de las dos terceras partes de la población mundial. De los varios tipos de té existentes, el té verde contiene relativamente la mayor cantidad de polifenoles, los cuales consisten en monómeros de flavanoles, mejor conocidos como catequinas; sin embargo el té verde también contiene ácidos fenólicos y flavonoles como el kaemferol, miricetina, quercetina y rutina (Chandra, 2010).

Los polifenoles son compuestos fenólicos que presentan un numeroso grupo ampliamente distribuido en la naturaleza. Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante, son captadores de RL neutralizando Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's), presentan degeneración de átomos de hidrogeno y quelación de iones metálicos; son multifuncionales y agentes reductores (Gracia, 2006).

Se han descrito más de 8000 polifenoles distintos que pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y el tipo de sustituyente unido a estos anillos. Las principales clases de polifenoles por ser los más ampliamente distribuidos en los alimentos son: flavonoides, ácidos y alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos (Rijken *et al.*, 2002; Díaz, 2008).

Los flavonoides, uno de los dos grandes grupos de compuestos fenólicos, son un grupo extenso de compuestos derivados del benzo-a-pireno; son pigmentos naturales ampliamente distribuidos en plantas (principalmente en las hojas), frutas, verduras y en diversas bebidas como el té y el vino; protegen al organismo vegetal del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, etc., los flavonoides responden a la luz controlando los niveles de las auxinas (hormonas vegetales) reguladoras del crecimiento, intervienen en la diferenciación y potencian la polinización al conferir coloración; representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana. Están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (heterocíclico) (C) (Figura 1) (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Escamilla *et al.*, 2009).

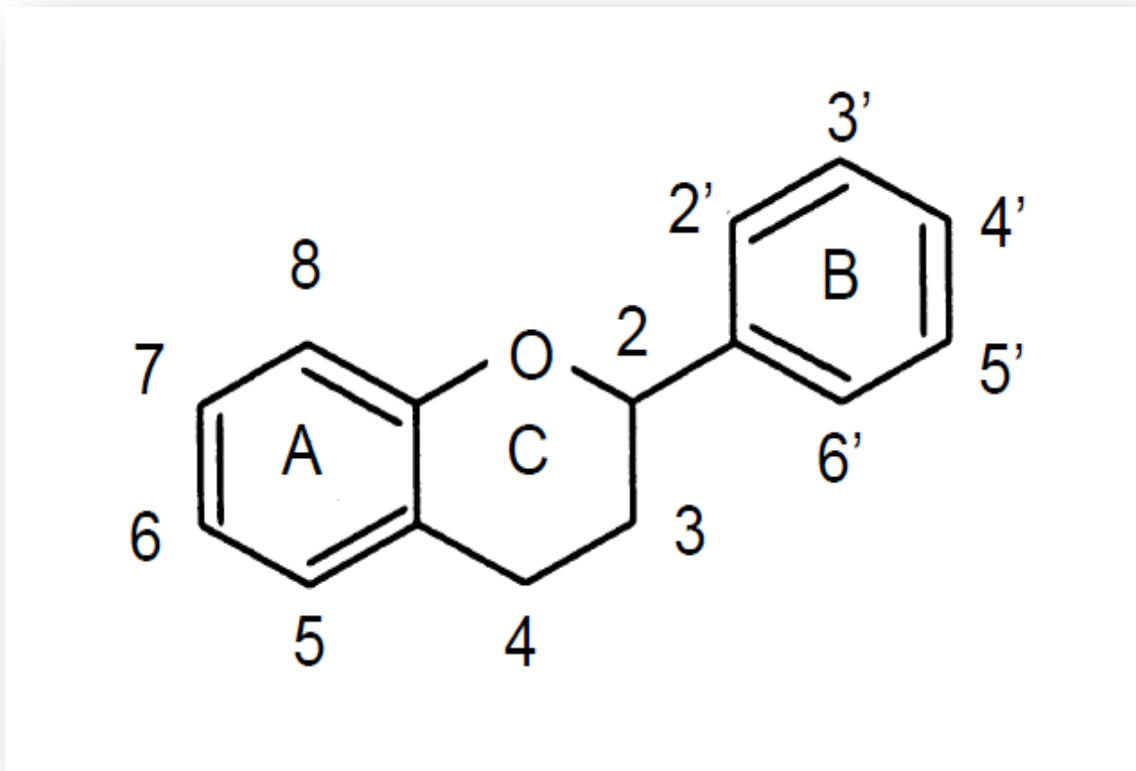


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides (Tomado de Flórez *et al.*, 2002)

Tres características estructurales, de los flavonoides, son importantes para su función: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). En función del estado de oxidación de la cadena de átomos de carbono y a las variaciones del pirano (C), los flavonoides pueden dividirse a su vez en diferentes subclases, siendo las más representativas: los flavonoles representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo hidroxido (-OH) en posición 3 del anillo C; flavonas como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo -OH en posición C3; antocianidinas que tienen unido el grupo -OH en posición 3 que además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C; flavanoles (catequinas y proantocianidinas) con un grupo -OH en posición 3 del anillo C; así como las flavanonas e isoflavonas. Generalmente, los flavonoides pueden encontrarse asociados a distintos carbohidratos o ácidos orgánicos, aunque ocasionalmente se pueden encontrar en forma de aglicona en las plantas (Figura 2) (Flórez *et al.*, 2002; Escamilla *et al.*, 2009; Granado, 2010).

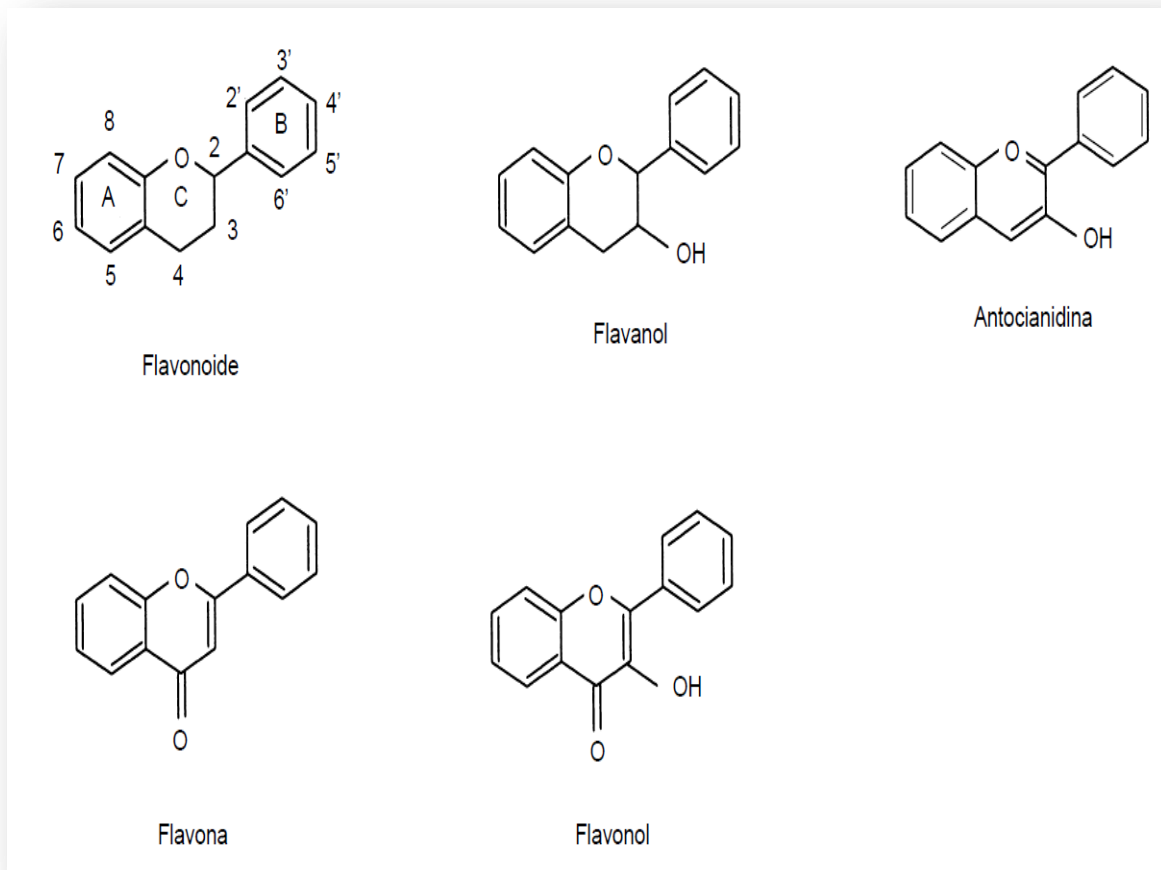


Figura 2. Principales flavonoides (Tomado de Flórez *et al.*, 2002)

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C, por lo que se ha propuesto que estos compuestos pueden proteger contra el EO de hecho, se ha observado que las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides presentan menores afecciones cardiovasculares (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Rijken *et al.*, 2002). Por otra parte se ha propuesto como mecanismo antioxidante de los flavonoides la captura del oxígeno reactivo (en forma de aniones superóxidos [$O_2^{\bullet-}$], radicales hidroxilos [OH^{\bullet}], peróxidos lipídicos o hidroperóxidos [$ROO\cdot$]) (Díaz, 2008).

Los flavanoles están presentes en la naturaleza en forma de monómeros (catequinas) (Figura 2) y de polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). A diferencia del resto de los flavonoides, los flavanoles son los únicos que no aparecen en forma glucosilada en los alimentos y se distinguen dos clases:

- i) Las catequinas se encuentran en frutas como los albaricoques y cerezas (hasta 250 mg/kg) y en bebidas como en el vino tinto (hasta 300 mg/l), si bien las principales fuentes de catequinas son el té verde (hasta 800 mg/l) y el chocolate (hasta 600 mg/l). La catequina y EC son los flavanoles más comunes en las frutas, mientras que las galocatequinas, EGC y EGCG, se encuentran en algunas semillas de leguminosas, uvas y principalmente en el té (Arts *et al.*, 2000).
- ii) Las proantocianidinas son los flavanoles responsables del carácter astringente de algunas frutas (uvas, manzanas, bayas, etc.) y bebidas (vino, sidra, té, cerveza, etc.), así como del amargor del chocolate (Rasmussen *et al.*, 2005). Dada la dificultad para evaluar el contenido de proantocianidinas en los alimentos por su amplio rango de estructuras y pesos moleculares, los únicos datos disponibles en la literatura se refieren a los dímeros y trímeros de catequinas, que son tan abundantes como las propias catequinas (De Pascual *et al.*, 2000; Manach *et al.*, 2004).

En la actualidad, existen pocos datos disponibles sobre la ingesta diaria de los polifenoles. Esta estimación se ha llevado a cabo mediante cuestionarios sobre la dieta en los que se refleja que la ingesta de estos compuestos es muy variable y depende en gran medida de los hábitos y preferencias de la población. Además, se ha de mencionar que la mayoría de estos datos se han obtenido a partir del análisis de las agliconas de los principales polifenoles presentes en aquellos alimentos vegetales más ampliamente consumidos tras la hidrólisis de los glicósidos y los ésteres (Cliffor, 2004). En este sentido, la ingesta de los flavanoles y flavonas es la más estudiada, dado que son los flavonoides más fáciles de determinar; la ingesta promedio se sitúa entre los 20 y 26 mg/día. Excede por tanto a la de otros antioxidantes en la dieta, tales como el beta-caroteno (2-3 mg/día) y la vitamina E (7-10 mg/día) y es igual, aproximadamente, a un tercio de la vitamina C (70-100 mg/día) (Hertog *et al.*, 1992; Kimira *et al.*, 1998; Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo predominantes los flavanoles especialmente la quercetina

(Martínez-Flórez *et al.*, 2002). En los países asiáticos, que son los que más consumen té, se ha calculado que el consumo diario de polifenoles es de 25-40 mg/día. Por su parte, los Estados Unidos (EEUU), que presentan un bajo consumo de té por lo que el consumo de flavonoides lo aportan otros componentes de la dieta, ricos en estos compuestos y se ha calculado de alrededor de 1 mg/día (Kuhnau, 1976; Tieppo *et al.*, 2007). En México no hay estudios al respecto.

1.1.1 Biodisponibilidad y metabolismo

La biodisponibilidad puede describirse de distintos modos. Una definición muy aceptada expone que es la proporción de nutrientes que se digiere, absorbe y metaboliza a través de una ruta normal (Srinivasan, 2001).

El concepto de biodisponibilidad cobra una gran importancia, dado que los polifenoles más abundantes no siempre son los más activos en el organismo, ya sea porque tienen una menor actividad intrínseca, su absorción en el intestino es baja, son altamente metabolizados o se excretan rápidamente (Srinivasan, 2001; Manach *et al.*, 2004).

En general, el metabolismo de los polifenoles se produce a través de una secuencia de reacciones común para todos ellos (Manach *et al.*, 2004), que es similar a la detoxificación metabólica que sufren muchos xenobióticos para reducir su potencial efecto citotóxico, incrementar su hidrofiliidad y facilitar su eliminación urinaria o biliar. Los estudios llevados a cabo en animales de experimentación han demostrado que determinados polifenoles como la quercetina, daidzeína o genisteína, pero no sus glucósidos, pueden ser absorbidos directamente en el estómago (Piskula *et al.*, 1999; Crespy, 2002), al igual que algunas antocianidinas (Talavera, 2003) o ácidos fenólicos como el ácido clorogénico (Lafay, 2006). Sin embargo, el resto de los polifenoles, que en su mayoría resisten la hidrólisis ácida del estómago, llegan intactos al intestino delgado donde sólo las agliconas, algunos ácidos hidroxicinámicos conjugados y unos pocos glicósidos pueden ser absorbidos directamente (Lee, 1995; Olthof *et al.*, 2000; Nardini *et al.*, 2002; Olthof *et al.*, 2003).

El estado de glucosilación de los polifenoles influye sobre su absorción en el intestino, ya que previamente han de ser hidrolizados por las enzimas intestinales como la lactasa-floridcina hidrolasa (hidrólisis extracelular) o la β -glucosidasa (hidrólisis intracelular). Así, los polifenoles glucosilados se absorben más fácilmente que los que poseen otro tipo de glucosilación, como los conjugados con las moléculas de ramnosa, que alcanzan el colon antes de ser absorbidos y son hidrolizados por las enzimas de la microflora colónica (Manach *et al.*, 1995). Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren reacciones de conjugación en las células intestinales y, posteriormente, en las células hepáticas (metilación, sulfatación, glucuronidación y conjugación con glicina en el caso de algunos ácidos fenólicos) (Manach *et al.*, 2004). Así, en general, los polifenoles que llegan a la sangre y a los tejidos son diferentes a los que se localizan originalmente en los alimentos (Day y

Willianson, 2001; Natsume, 2003). Diversos estudios *in vivo* (humanos y animales) han sugerido que sólo el 5% del total de polifenoles ingeridos diariamente son absorbidos en el duodeno (Clifford, 2004), y de este porcentaje, sólo un 5%, principalmente flavanoles, alcanzan la circulación sanguínea sin cambios en su estructura (Lee, 1995). El resto del total de los polifenoles ingeridos (95%) va a llegar al colon, donde son fermentados por la microflora colónica y dan lugar a metabolitos microbianos que se absorben y aparecen como derivados conjugados en el plasma (Clifford, 2004). Una vez absorbidos y metabolizados, los polifenoles pueden volver al duodeno a través de la circulación enterohepática, prolongando su presencia en el organismo (Manach *et al.*, 2004). Finalmente, antes de ser eliminados por la orina, los polifenoles circulantes en plasma se unen ampliamente a la albúmina y son capaces de incorporarse a los tejidos, particularmente a aquellos donde son metabolizados (tejido hepático, estomacal, intestinal, colónico y nefrítico) (Clifford, 2004; Graf, 2006; Bieger, 2008), pero además pueden acumularse en tejidos diana específicos como el tejido pulmonar, pancreático, cerebral, cardiaco y esplénico (Kim, 2000; Hong *et al.*, 2002; Bieger, 2008).

1.1.2 Acción antioxidante

El creciente interés en los flavonoides se debe a la aparición de su amplia actividad farmacológica, se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, ulcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Entre los efectos biológicos que pueden tener los flavonoides se encuentra el de la protección del daño genotóxico. Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides son: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi, que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5, con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante. En función de estos criterios, el flavonoide quercetina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Un número creciente de sustancias naturales se han identificado como moduladoras del proceso de carcinogénesis; entre ellas se encuentran los polifenoles que han demostrado poseer efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Diversos estudios han evaluado la eficacia de los polifenoles en modelos animales de carcinogénesis. Los efectos anticarcinogénicos del té y sus polifenoles frente al desarrollo de distintos tipos de cáncer (cavidad oral, esófago, estómago, intestino, colon, piel, hígado, vesícula biliar, próstata y mama) han sido descritos en diversos modelos animales (Lambert *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007).

En estudios *in vitro* se ha observado la inhibición de la oxidación de la 6-hidroxidopamina por parte de los polifenoles del té verde, así como también el control de ERO's que derivan del proceso (Guo *et al.*, 2005). Otros estudios en diferentes modelos animales han demostrado la actividad inhibitoria de los polifenoles del té verde contra la tumorigenesis, incluyendo los estudios en los que el daño carcinogeno es inducido por el humo de tabaco que contiene quimicos como el 4-(metilnitrosamino-1-(3-piridil)-1-butano, el benzo[a]pireno y el N-nitrosodimetilamina que causan el desarrollo de tumores en pulmón, en estos estudios los polifenoles del té verde muestran un decremento significativo durante los estados de iniciación o promoción de la incidencia de tumores en pulmón; en otros estudios en donde la administración de té verde es oral, se ha observado una reducción del número de tumores de pulmón en ratones Lewis, estos resultados sugieren que el té verde previene la carcinogenesis de pulmón en todos los estados de desarrollo; otros estudios han demostrado que el té verde inhibe el desarrollo de cáncer de colon inducida por Azoximetano, evaluado en ratas (Yang *et al.*, 2007).

La mayoría de los compuestos polifenolicos que presenta el té verde son las catequinas: EGCG, ECG, EGC, EC, GC, (+) catequina (Figura 3). Las catequinas del té verde han mostrado efectos benéficos sobre diversas enfermedades degenerativas, protección contra el cáncer, propiedades antivirales, propiedades antioxidantes, inhibición de formación de placa, potencial antialérgico, ayuda en la reducción de triglicéridos y colesterol, y estimulación del catabolismo lipídico del hígado (Morita *et al.*, 2009; Chandra, 2010). También se ha observado que las catequinas presentan cardioprotección, así como también puede ayudar al control del peso debido a que es un diurético; se ha observado también que presenta una protección sobre la hipotensión (Uzun *et al.*, 2010).

Muchos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que las catequinas del té verde pueden llegar a suprimir la actividad genotóxica de varios tipos de carcinógenos (Ogura *et al.*, 2008). Estudios epidemiológicos e *in vitro* han sugerido que las catequinas presentan efectos benéficos sobre enfermedades humanas, como son: protección contra insuficiencia cardiaca congestiva y protección contra cáncer, debido a su actividad antioxidante. Se ha observado también el efecto protector de las catequinas sobre células de mamífero hepáticas, que conduce a su uso terapéutico en la hepatitis; y la prevención o reducción de alteraciones morfológicas y bioquímicos de hepatocitos, inducidas por xenobióticos. Se ha reportado también, que las catequinas tienen un rol importante en la protección tanto enzimática como no enzimática contra EO inducido por toxicidad (Parvez *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha reportado que la quercetina, la rutina, el kaemferol, la miricetina y sus glucósidos, también presentes en el té verde (Figura 4) son importantes para la acción antioxidante (Yang *et al.*, 2007), dentro de éstos últimos flavonoides, han llamado la atención compuestos como la quercetina y la rutina por su gran potencial antioxidante.

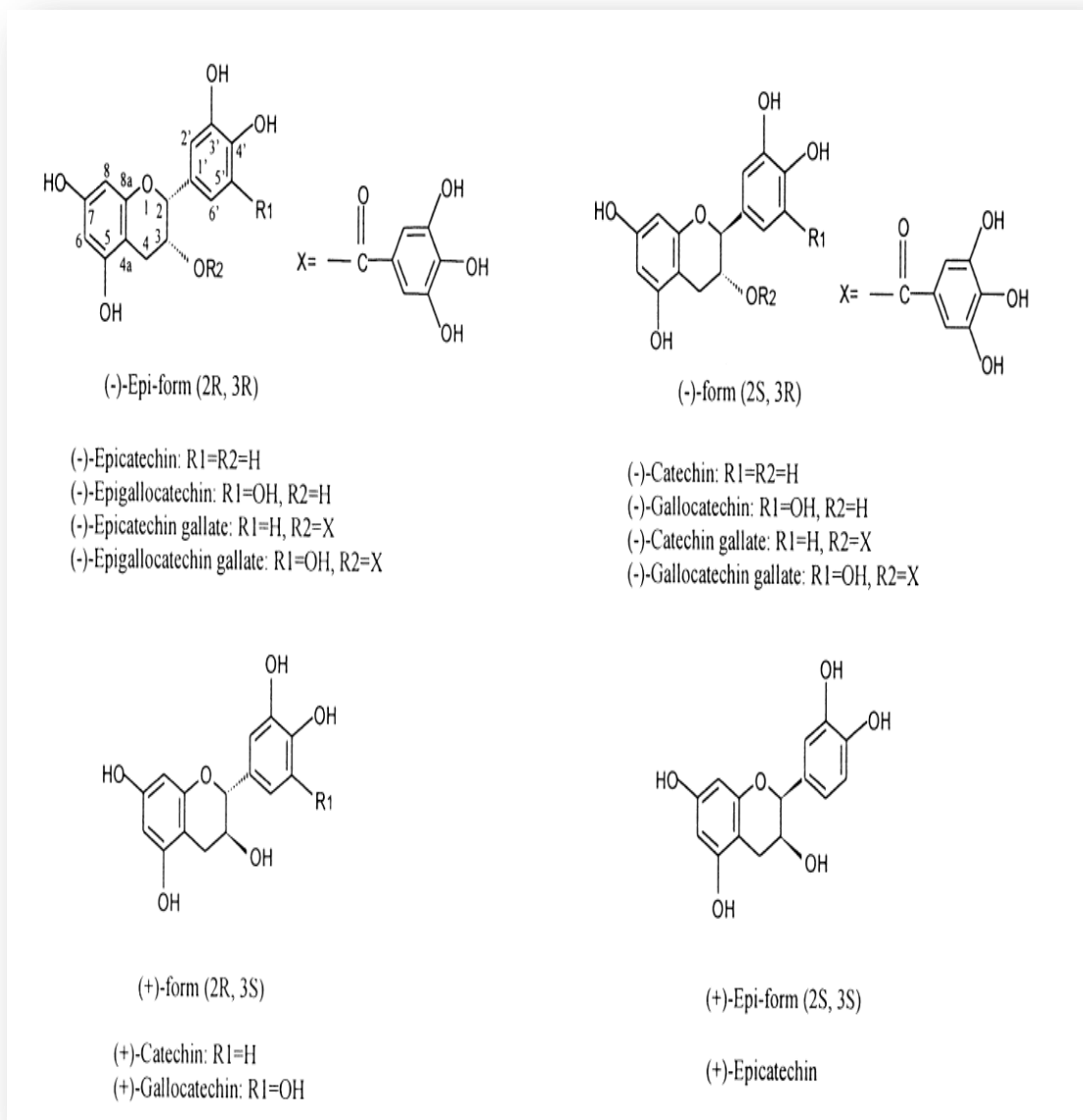


Figura 3. Estructura química de las catequinas presentes en el té verde (Tomado de Wang et al., 2000)

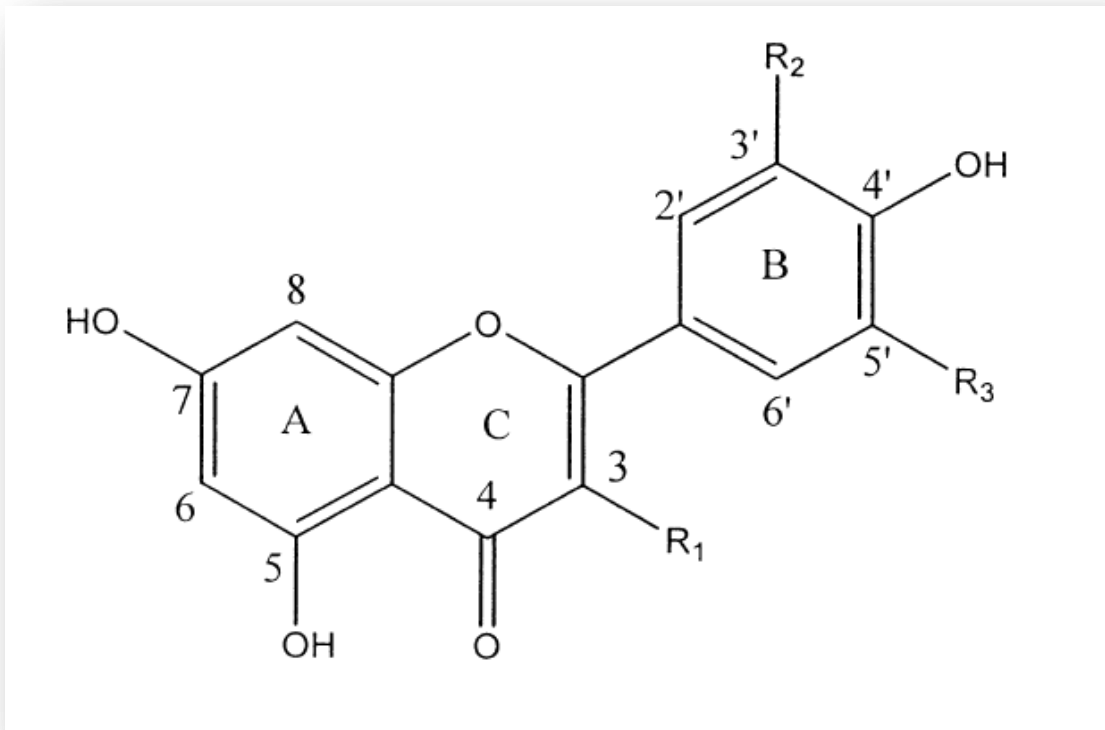


Figura 4. Estructura de los flavonoles presentes en el té verde. Miricetina: $R_1=R_2=R_3=OH$; Quercetina: $R_1=R_2=OH, R_3=H$; Kaemferol: $R_1=OH, R_2=R_3=H$ (Tomado de Wang et al., 2000)

1.1.3 Quercetina

La quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxilflavona) es un flavonoide presente en las plantas como un metabolito secundario (Figura 5), se encuentra ampliamente distribuida en el té, manzanas, fresas, cerazas, uvas (Murakami *et al.*, 2008), su ingesta en la dieta se estima entre los 50 y 500 mg/día (Inal y kahraman, 2000). Este flavonoide es encontrado en su forma aglicona (Papiez *et al.*, 2008). La quercetina protege contra enfermedades relacionadas con EO, como son: enfermedades coronarias, cáncer, diabetes y desordenes neurodegenerativos. Sus efectos anticancerigenos se han atribuido a varios mecanismos incluyendo su actividad antioxidante, la inhibición de enzimas que activan carcinógenos, la modificación de vías de señales de transducción y a su interacción con receptores y otras proteínas. Las propiedades antioxidantes de la quercetina se deben a los grupos OH en la posición 3 y 5 del anillo A, a una fracción de catecol del anillo B y al doble enlace en 2 y 3 en conjugación con un 4-oxo del grupo carbonil en el anillo C (Papiez *et al.*, 2008).

Se ha observado que la quercetina reduce el tamaño y la invasividad del carcinoma mamario inducido por 9,10-dimetil-benzoantraceno en ratas Wistar hembras albinas, previene el desarrollo de lesiones preneoplásicas durante la carcinogénesis hepática inducida por dietilnitrosamina y suprime la actividad tumorigénica de diferentes agentes carcinogénicos en ratas con cáncer de colon (Ramos *et al.*, 2008). Se ha reportado que la quercetina posee múltiples efectos beneficiosos sobre enfermedades humanas, tales como: protección sobre enfermedades cardiovasculares, actividad anticancerígena (pulmón, estómago, colon, riñón y cáncer de útero y ovario), efectos antiulcerosos, actividad antialérgica, prevención de cataratas, actividad antiviral y efectos anti-inflamatorios (Delgado *et al.*, 2009; Uzun *et al.*, 2010). En estudios *in vitro* se ha observado que el cultivo de timocitos de ratón junto con quercetina protege a las células del EO, mediante la inducción de apoptosis (Harwood *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha reportado también, que la quercetina posee efectos prooxidantes (Soares *et al.*, 2006). La generación de H₂O₂ en cultivos celulares es el resultado de la autooxidación de la quercetina, la cual se ha sugerido y demostrado, es la causante del efecto prooxidante (Canada *et al.*, 1990). La actividad antioxidante o prooxidante de la quercetina depende de su concentración, en donde bajas dosis resultan en el efecto antioxidante, mientras que dosis altas en el efecto prooxidante (Vargas y Burd, 2010).

1.1.4 Rutina

La rutina (3,3',4',5,7-pentahidroflavona-3-rhamnoglucosido) (Figura 5), es un flavonoide del tipo flavonol, glucosido derivado de la quercetina, otro componente polifenólico del té verde (Nassiri-Als *et al.*, 2008), del cual se ha reportado que es el flavonol en su forma glucosido, más encontrado en la dieta humana (Aherne y O'Brien, 2000). Se ha reportado la presencia de aproximadamente 14 glucosidos de quercetina presentes en las hojas frescas de té verde (Wang *et al.*, 2000). La rutina es ampliamente utilizada en alimentos para animales, cosméticos e industrias químicas, como un pigmento natural, estabilizador, conservador de alimentos y absorbente de rayos UV (Koda *et al.*, 2008). La rutina ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de enfermedades por las actividades farmacológicas que presenta, como: antialérgicas, antiinflamatorias, antitumorales, antibacteriales y antivirales, así como también de citoprotección, antipasmódicas y anticarcinogénicas (Yang *et al.*, 2008).

En varios estudios *in vitro* se ha observado el potencial antígenotóxico de la rutina (Ramos *et al.*, 2008). Se ha observado que la rutina posee gran importancia terapéutica debido a que alivia los síntomas de la insuficiencia venosa y linfática, asociados con algunas enfermedades hemorrágicas o de hipertensión, también ayuda a reducir los síntomas de la pérdida de la agudeza visual y alteraciones del campo visual. En otros estudios *in vivo* se ha observado que la rutina provoca un aumento de la lipasa pancreática con la consiguiente reducción en los niveles de triglicéridos en ratas y la actividad hepatoprotectora contra paracetamol y el tetracloruro de carbono en roedores (Marcarini *et al.*, 2011).

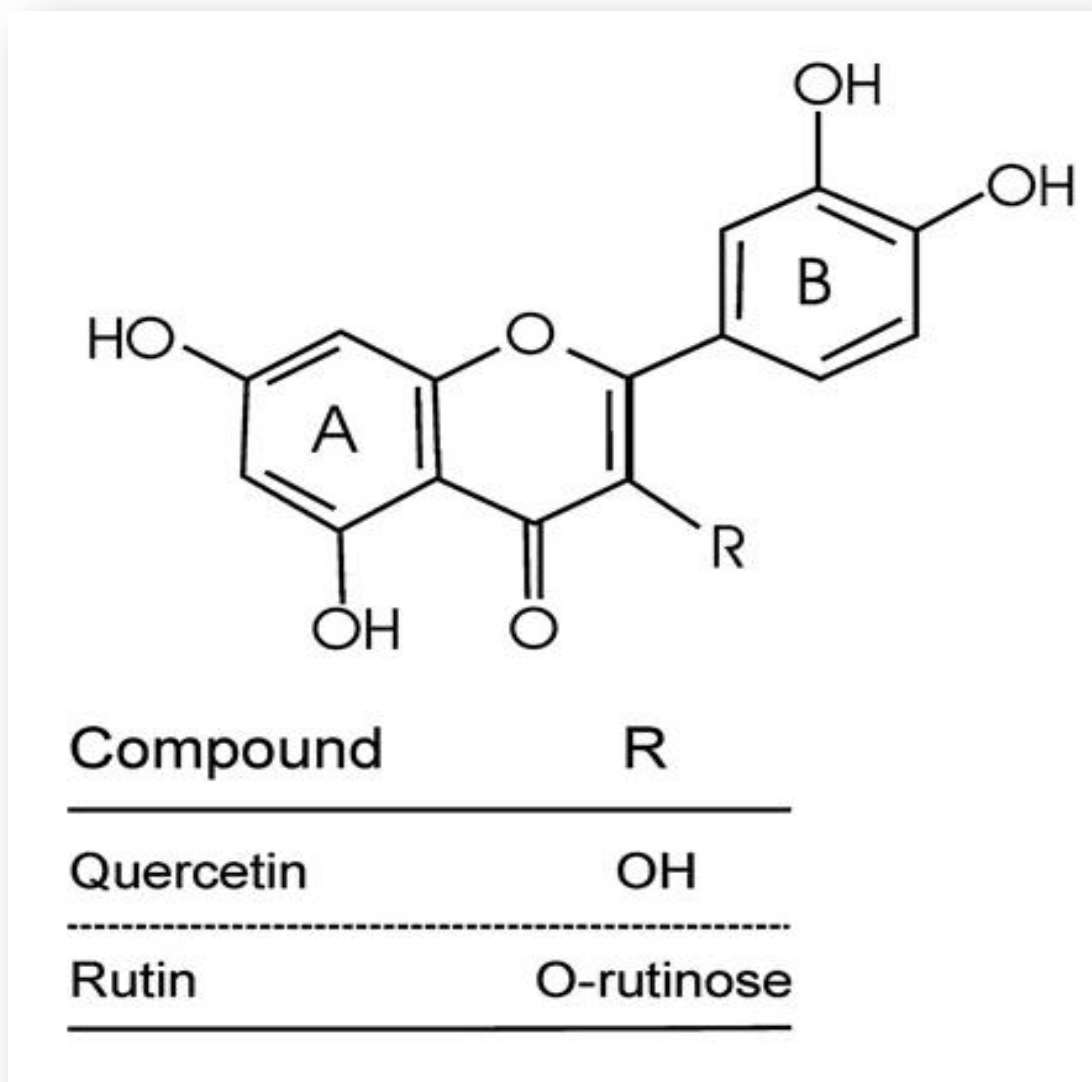


Figura 5. Estructura de la Quercetina y Rutina presentes en el té verde (Tomado de Ramos et al., 2008)

1.2 Mecanismos de protección

El mecanismo de protección del té verde se deriva principalmente de los flavonoides que lo constituyen. El mecanismo de protección de los flavonoides está relacionado con su potencial antioxidante, siendo los grupos funcionales de sus anillos los que juegan un papel importante en ésta actividad (Soobrattee *et al.*, 2005).

Los antioxidantes son sustancias que reducen significativamente los efectos adversos de las ERO's, especies reactivas de nitrógeno (ERN's) o ambas. Se ha demostrado que los flavonoides presentes en el té verde son fuertes antioxidantes, debido a la captura de RL, que puede prevenir del daño oxidante al ADN (Wang *et al.*, 2000). Dicho bloqueo puede tener lugar a través de diferentes mecanismos: 1) captación directa de los RL, 2) quelación de los cationes divalentes implicados en reacciones de Fenton y 3) modulación de las enzimas relacionadas con el EO (Surh, 2003; Ramos *et al.*, 2008).

También se ha observado que los antioxidantes interactúan mediante:

- Expulsión y captura de ERO's (radical superóxido, oxígeno singlete, OH^\bullet , óxido nítrico, dióxido de nitrógeno y peroxinitrito) previniendo así un EO.
- Penetración la bicapa lipídica de las células, como es el caso de la quercetina.
- Inducción de apoptosis en células tumorales (Roy *et al.*, 2003; Parvez *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 2008; Uzun *et al.*, 2010).
- Modulación de los niveles de hormonas, como la reducción del cáncer de mama a través de la modulación de los niveles de estrógeno (Yang *et al.*, 2007).

Se ha observado también que los polifenoles de la dieta también pueden actuar como pro-oxidantes dependiendo del tipo celular, dosis o duración del tratamiento, ya que pueden aumentar la producción de las ERO's e inducir apoptosis en las células cancerígenas, lo que puede prevenir o disminuir el desarrollo tumoral. Así, la quercetina y la EGC inducen apoptosis en las células de cáncer de mama MDA-MB-468147 y de adenocarcinoma pulmonar H661148 respectivamente, a través de un incremento de los niveles intracelulares de ERO's que provoca la formación de H_2O_2 . De manera similar, EGCG induce apoptosis en las células de mieloma mediante la modificación del sistema redox (incremento de la generación de las ERO's), ya que la adición de catalasa o SOD bloquea la apoptosis inducida por esta catequina (Nakazato *et al.*, 2005).

En animales así como en humanos, los efectos de la prevención de cáncer en diferentes órganos, es probable que sea determinada por la biodisponibilidad de los constituyentes del té. (Yang *et al.*, 2007).

Diferentes factores pueden influir sobre los mecanismos de protección de los polifenoles del té verde, como son: 1) la dieta usada, 2) el protocolo de iniciación de la tumorigenesis, y 3) el tipo de dosis de los polifenoles o extracto utilizado de té verde (Yang *et al.*, 2007).

1.3 Toxicidad

Se ha observado en estudios *in vivo* (roedores y perros) que la toxicidad por parte del té verde y sus polifenoles, se presenta cuando se utilizan en grandes dosis (Martinez *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2010). Como el hipotiroidismo en ratas que se presenta solo cuando se utilizan grandes dosis de extractos de té verde; sin embargo los efectos sobre la fisiología de la tiroides aun no es comprendida completamente (Chandra, 2010). Se ha observado también toxicidad en el hígado por parte de suplementos de té verde, sin embargo se ha reportado que la toxicidad en el hígado es debido a que los suplementos utilizados de té verde presentan un aumento significativo en la cantidad de catequinas en comparación con la cantidad de catequinas obtenidas con la ingesta de té verde como una bebida. Otros estudios han reportado que el té verde en particular las catequinas, no son responsables por la hepatotoxicidad y sugieren que esta toxicidad es debida a algun otro componente del extracto de té verde o por una posible contaminación durante el proceso de producción de los extractos (Jhonson *et al.*, 2010).

La relación entre el consumo de té verde y el riesgo de tener efectos toxicos como el desarrollo de cáncer, es incierto, ya que algunos estudios sugieren un efecto protector y otros no. Sin embargo, algunos estudios muestran un efecto protector contra el desarrollo de ciertos tipos cáncer solo en ciertas poblaciones (Yang *et al.*, 2007).

Algunos flavonoides han mostrado efectos mutagenos sólo en experimentos *in vitro*, sin embargo no muestra éstos efectos en experimentos *in vivo* (Tamura *et al.*, 2010).

Algunos estudios indican la mutagenicidad y genotóxicidad de los flavonoides, tanto en sistemas experimentales bacterianos como de mamíferos. Debido a sus características estructurales estos metabolitos poseen bajos $E_p/2$ que les permiten reducir el Fe^{3+} y el Cu^{2+} para sufrir una autooxidación o incluso involucrarse en un proceso de reciclaje redox, actuando de esta manera como agentes prooxidantes, lo que explica estos efectos mutagénicos y genotóxicos (Pérez, 2003). Lo que determina el carácter antioxidante o prooxidante es la estabilidad/labilidad redox del compuesto radical formado a partir del flavonoide original. Sin embargo, las acciones prooxidantes sólo parecen producirse cuando las dosis de los flavonoides son demasiado altas (da Silva *et al.*, 2002; Escamilla *et al.*, 2009).

2. Estrés Oxidante (EO)

Las células humanas están continuamente expuestas a EO ya sea por causas endógenas o exógenas. El EO es el desequilibrio bioquímico originado por la producción excesiva de ERO's y RL, que provocan daño oxidante a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa. El EO se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, este daño se relaciona con el envejecimiento y con más de 100 padecimientos. El daño que producen las ERO's y los RL, ocurre en los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, hidratos de carbono y ácidos nucleídos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena. Esto induce a que se presenten diversas enfermedades, como diabetes, aterosclerosis, procesos inflamatorios, el de isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cataratas, depresión, diversos tipos de cáncer, enfermedades neurológicas, cardiomiopatías, entre otros (Avello, 2006; Ramos *et al.*, 2006). Cuando hay cantidades excesivas de ERO's ocurre un desequilibrio en el sistema pro-oxidante-antioxidante a favor de los pro-oxidantes y cuando esto ocurre se produce un daño celular (Valko *et al.*, 2006). Dentro de los daños que inducen las ERO's y los RL se encuentra el daño al ADN, ya que si no es reparado pueden presentarse consecuencias biológicas serias como mutaciones, envejecimiento celular, y transformaciones carcinogénicas, e incluso puede llevar a la muerte celular (Olinski *et al.*, 2002; Klauning y Kamendulis, 2004). Se ha reportado que las ERO's y las ERN's están involucradas en los procesos de daño, no sólo por ser capaces de interactuar de manera directa sobre el ADN, sino también porque afectan la transducción de señales, la proliferación celular y la comunicación intercelular (Medeiros, 2008).

2.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO's)

Especies reactivas de oxígeno, es el término que se le da a los radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. Se considera ERO's al oxígeno atómico y al ozono que se genera con la unión del O al O₂, al oxígeno singlete que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del O₂ y al superóxido, al peróxido de hidrógeno y al OH[•] que son especies parcialmente reducidas. La toxicidad de las ERO's depende de su concentración y del contexto en el que se producen. Bajas concentraciones de ERO's estimulan el crecimiento de las células, son indispensables para la diferenciación celular y para la muerte celular programada (Hansberg, 2008). En condiciones normales las células metabolizan la mayor parte del oxígeno con la formación de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mientras que un pequeño porcentaje forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son RL (el anión superóxido y el hidroxilo). Otra fuente endógena de ERO's es el metabolismo de las células defensivas tales como los polimorfonúcleares, los monocitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos. Para que éstas puedan cumplir su función, están dotadas de diversas proteínas así como de vías metabólicas que generan varias especies químicamente agresivas como peróxido de

hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo. En condiciones normales estas especies reactivas son producidas y utilizadas en compartimentos celulares como los lisosomas que, aunque en el interior de los fagocitos, no tienen por qué dañar a las células siempre y cuando los mecanismos antioxidantes de éstas funcionen adecuadamente (Avello, 2006).

Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO's sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se induce un daño a las moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Avello, 2006).

2.2 Estrés oxidante inducido por metales

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). Cuando las poblaciones se exponen crónicamente a los contaminantes ambientales, con frecuencia se observa un aumento en la prevalencia de las enfermedades crónico-degenerativas (De Vizcaya, 2008). Algunas estimaciones de la United Nations Environment Programme (UNEP) han identificado aproximadamente unos 100 mil productos químicos generados comercialmente y utilizados como parte integral de nuestra vida cotidiana (Vega y Reynaga, 1990). Dentro de los contaminantes químicos considerados como peligrosos se encuentran los metales pesados, por lo que la exposición a estos causa daño a los organismos, como toxicidad en las células, tejidos u órganos, así como también genotóxicidad y carcinogenicidad (Conte *et al.*, 1998). Muchos estudios se han enfocado a la toxicidad y a la carcinogenicidad inducida por los metales, ya que éstos tienen un papel importante en la generación de ERO's y ERN's en los sistemas biológicos. La formación de RL mediada por metales, puede causar diversas modificaciones a las bases de ADN (Valko *et al.*, 2006).

2.3 Metales

Los metales son sustancias naturales que se han formado por meteorización de minerales y son emitidos al ambiente durante la actividad volcánica. Algunos metales son esenciales para la salud humana y amenudo son componentes importantes de varias enzimas con funciones fisiológicas (De Vizcaya, 2008).

Aunque los metales poseen variados efectos en la salud como ya se mencionó, son ampliamente utilizados en las actividades industriales (Seoane, 2001). La toxicidad que presentan los metales depende de sus propiedades químicas, así como también del grado de solubilidad y su estado de oxidación (Newman e Itosh, 1991).

2.3.1 Cromo

Dentro de los metales más estudiados por sus efectos cancerígenos se encuentran los compuestos del cromo (VI), los cuales son ampliamente utilizados en diversas industrias (recubrimiento de componentes automotrices, en el curtido de pieles y su tinción, en las procesadoras de cemento, como anticorrosivo en sistemas refrigerantes y calentadores de agua, en la fabricación del material fotográfico, en materiales refractarios, en la coloración y endurecimiento del mármol, en el pulido de metales, en la coloración de vidrios, en los cromados del acero inoxidable, en la fabricación de productos de lavandería como detergentes en polvo y líquidos, y como componente de fertilizantes). Los compuestos de cromo se pueden presentar en el ambiente en forma hexavalente (Cr VI) y trivalente (Cr III), siendo el Cr (VI) es el más utilizado en las industrias y también es el que ha mostrado mayor potencial carcinógeno dado su estado de oxidación (Depault *et al.*, 2006). Sin embargo, el Cr (III) es un micronutriente esencial, ya que es necesario para el metabolismo de los azúcares y para muchas reacciones enzimáticas; por lo que es administrado como suplemento en la dieta (Lushchak *et al.*, 2009).

2.3.2 Mecanismo de inducción de daño al ADN por parte del cromo

La reducción del cromo (VI) en las células genera ERO's, que contribuyen al daño al ADN y por lo tanto a la actividad carcinógena del cromo (VI) (Wu *et al.*, 2000). Se ha propuesto que las ERO's y las ERN's causan daño genotóxico, el cual puede ser originado por fuentes endógenas o por fuentes exógenas. Cuando el mecanismo de control antioxidante es rebasado por los RL, el potencial redox de la célula cambia a un estado de estrés oxidante lo que crea un incremento de daño hacia el ADN, los lípidos y las proteínas (Klaunig y Kamendulis, 2004).

Se ha reportado que los compuestos de Cr (VI) son los más tóxicos debido a la reducción del Cr (VI) en las células lo que genera ERO's, que contribuyen al daño al ADN y por lo tanto a la actividad carcinógena del cromo (VI) (Wu *et al.*, 2000). El Cr (VI) tiene la capacidad de ingresar a la célula utilizando la vía general de los canales de proteínas transportadoras de aniones (Bridges y Zalapus, 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 P450, 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 (Mertz, 1969; O'Brien *et al.*, 2003). Dentro de la célula la reducción se puede llevar a cabo en el retículo endoplasmático, la mitocondria, la membrana plasmática o el núcleo celular (Figura 6) (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 OH* 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 (Liu y Dixon, 1969; Mertz, 1969; Bianchi *et al.*, 1980; Tamino *et al.*, 1981; Foulkes, 1990; Vega y Reynaga, 1990; Shi y Dalal, 1992; Bagchi *et al.*, 1997.)

El mecanismo más importante de activación de oxígeno por metales de transición, involucra el ciclo Haber-Weiss donde se lleva a cabo la reacción de Fenton generando el OH*, que daña el ADN (Shi y Dalal, 1992).

Este daño en el DNA causado por ERO's conduce a la generación de bases oxidadas, ruptura de las cadenas de DNA, formación de complejos por uniones DNA-DNA o interacciones del DNA con proteínas (Hanahan y Weinber, 2000). Sin embargo, una de las estrategias más efectivas frente al daño genotóxico consiste en el bloqueo del EO mediante la participación del sistema de defensa antioxidante/detoxicante de la célula: antioxidantes no enzimáticos como el glutatión y otras sustancias captadores de ERO's (como los compuestos polifenólicos), así como la activación de enzimas antioxidantes de fase I (GPx y GR) y enzimas detoxificantes de fase II (GST, glucuronidasas, sulfatasas y metilasas) (Valko *et al.*, 2006; Ramos, 2008).

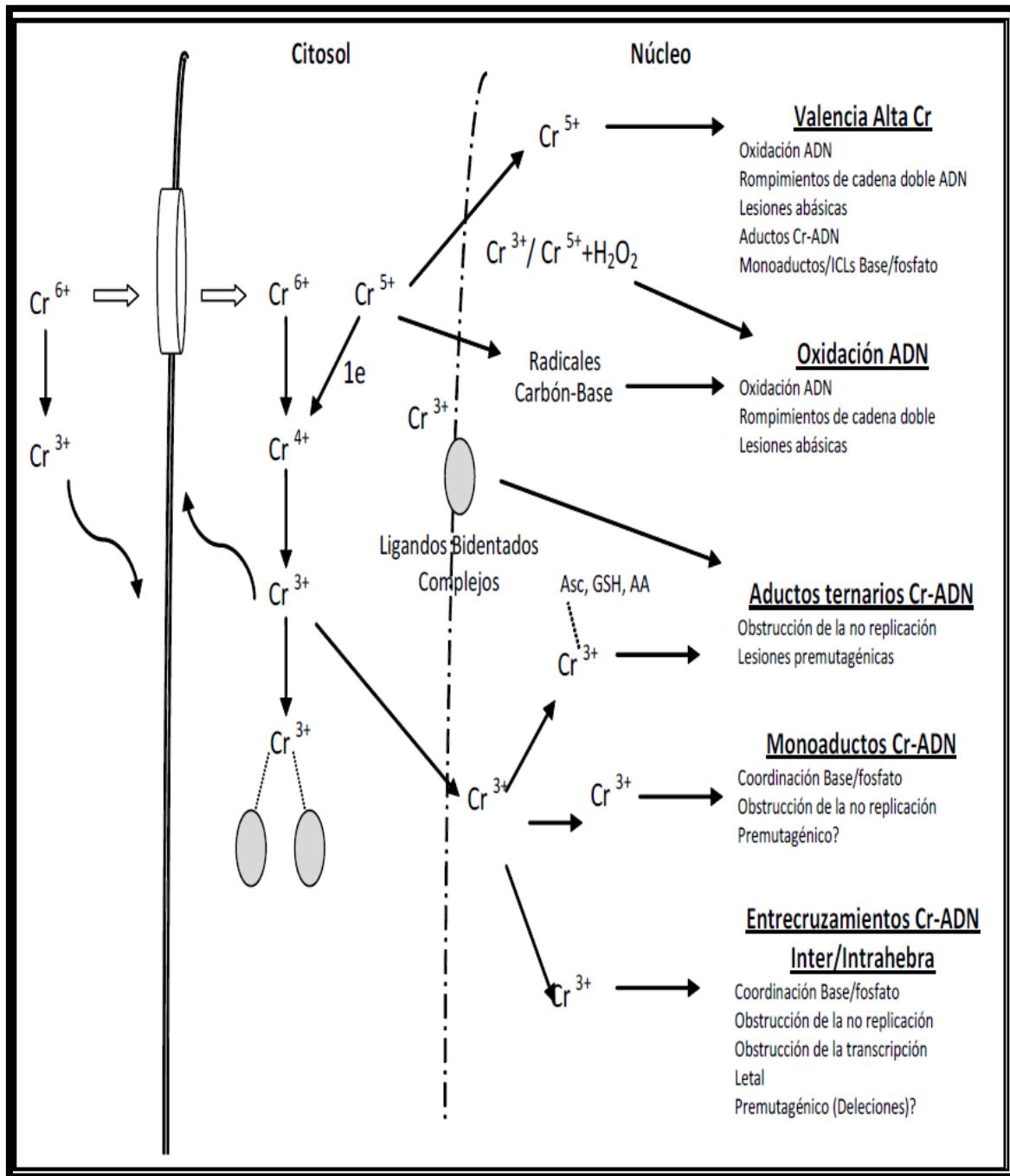


Figura 6. Metabolismo del cromo y su genotoxicidad (Tomada de Pereyra 2010 y modificada de O'Brien et al., 2003).

3. Evaluación de daño genotóxico

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; sustituciones de pares de bases, adiciones o supresiones. Se detectan mediante procesos de secuenciación de muestras de ADN (Cole y Skopek, 1994).
- b) Alteraciones en la integridad del ADN; lesiones premutagénicas, como la formación de aductos, ligamientos cruzados intra e interbanda y rompimientos de una o dos hebras. 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 (AC); que se subdividen a su vez en estructurales y numéricas. Las aberraciones estructurales consisten en deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. Aberraciones numéricas incluyen aneuploidías y poliploidías. 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 micronúcleos (MN)) (Mavournin, 1990; Müller *et al.*, 1999; Krishna y Hayashi, 2000). Las pruebas para evaluar genotoxicidad no sólo son indispensables para evaluar el daño que puede producir un agente al material genético, sino también, como herramienta necesaria para determinar el mecanismo de acción.

3.1 Micronúcleos (MN)

Uno de los ensayos propuestos, para evaluar los niveles de genotoxicidad, es el ensayo de MN capaz de detectar indirectamente rotura o pérdida cromosómica, también permite identificar el daño citogenético asociado a la frecuencia de AC. Esta técnica, es simple, rápida y comúnmente usada como ensayo de corto término (Schmid y Leduber, 1973).

La técnica de MN fue desarrollada por Boller y Schmid en 1970. 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 Ledebur, 1973; Krishna y Hayashi, 2000).

Un MN es un pequeño cuerpo de cromatina, formado por fragmentos de cromosomas o por cromosomas completos que durante la anafase no se incorporaron dentro del núcleo de la

células hijas durante la mitosis, el MN que se forma se incluye en el citoplasma (Figura 7) (Schmid y Leduber, 1973).

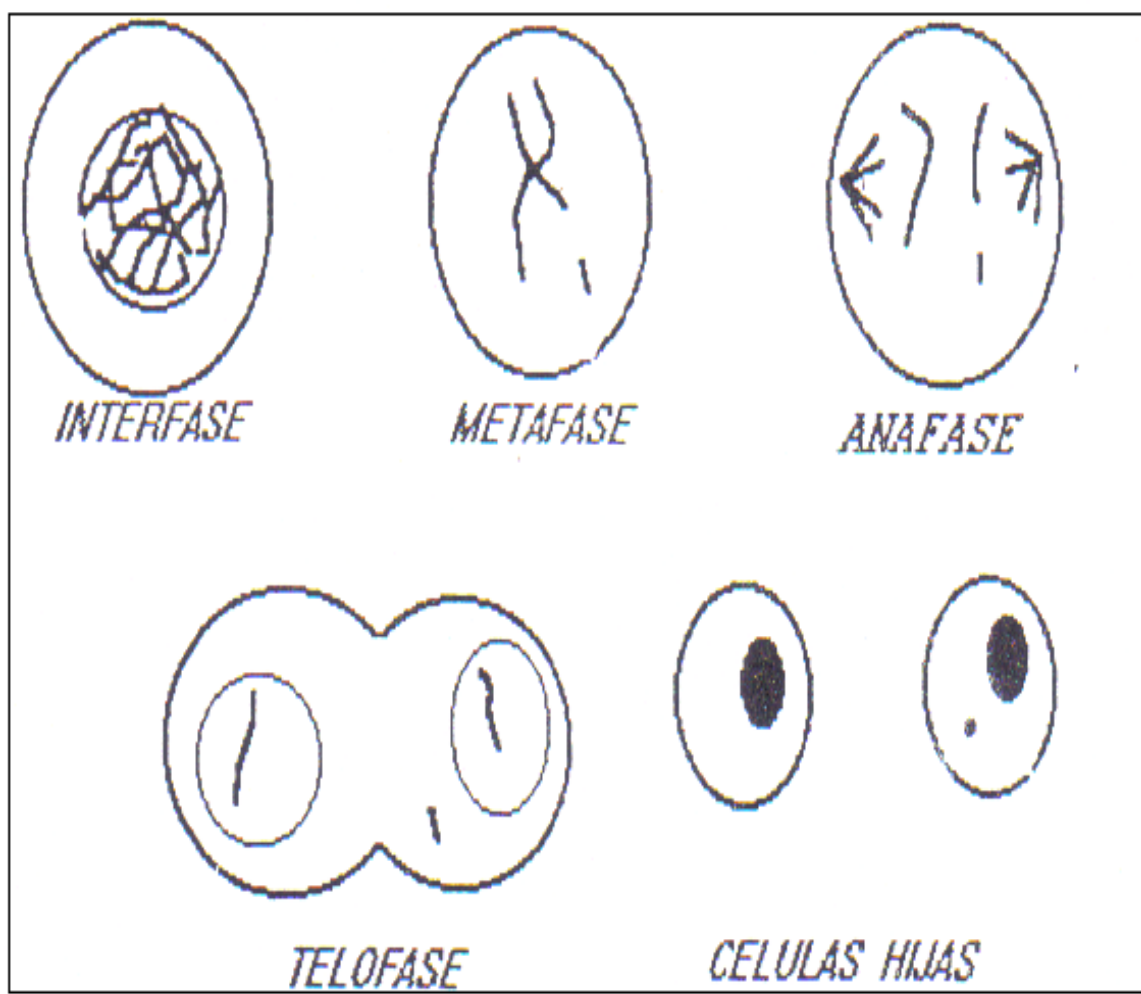


Figura 7. Formación de un Micronúcleo (Tomado de López, 2001)

Los MN pueden ser evaluados en diferentes tipos celulares como: 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 (Schmid y Leduber, 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).

La visualización de los MN en células eritroides es fácil, ya que éstas células carecen de un núcleo principal; en estas células se distinguen claramente a los eritrocitos jóvenes y a los maduros. Los eritrocitos policromáticos (EPC, eritrocito joven) aun conservan el ARN ribosomal. Los eritrocitos normocromáticos (ENC, eritrocito maduro) ya perdieron el ARN ribosomal y retienen altas concentraciones de hemoglobina. Los eritrocitos se pueden diferenciar entre ENC y EPC utilizando diferentes colorantes como May-Gruenwald, Giemsa y Naranja de Acridina (NA) (Schmid y Leduber, 1973; Hayashi *et al.*, 1990).

Utilizando la técnica de tinción con NA, los MN, EPC y los ENC se pueden distinguir utilizando un microscopio de fluorescencia. Los EPC presentan color rojo por el ARN que aún contienen, a diferencia de los ENC que no se tiñen (Ya perdieron el ARN), y los MN se tiñen de color verde fluorescente por la presencia de ADN (Figura 8) (Hayashi *et al.*, 1990).

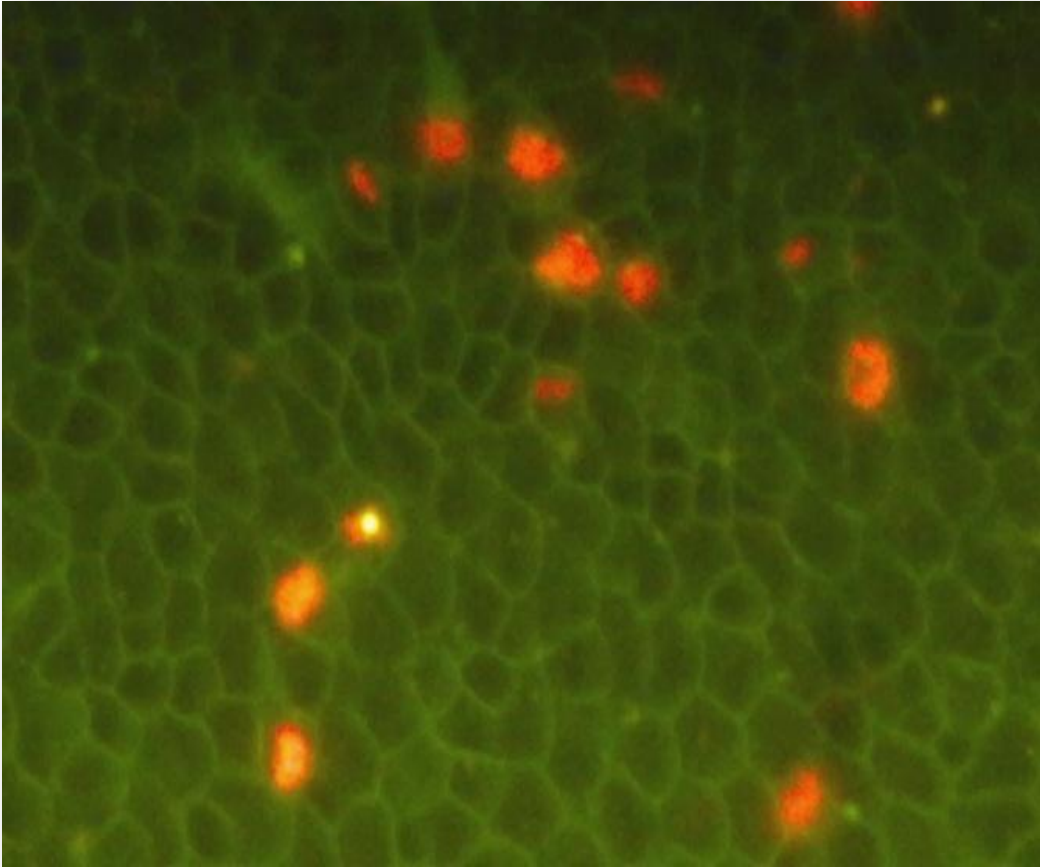


Figura 8. Frotis sanguíneo donde se muestra los EPC en color rojo, los MN en color amarillo y sin tinción (color oscuro) los ENC

II. Justificación

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de determinados alimentos vegetales o ciertos polifenoles proporciona un efecto protector frente al desarrollo de enfermedades relacionadas con el daño al material genético. Particularmente, la actividad protectora de los polifenoles no sólo se asocia a sus propiedades anticarcinogénica y antimutagénica, sino también a sus actividades antioxidante y anti-inflamatoria. En este sentido, estudios epidemiológicos han relacionado el consumo de té verde con una disminución del riesgo de padecer algunos tipos de cáncer entre otras enfermedades relacionadas con el daño genotóxico; sin embargo, el consumo de esta bebida rica en antioxidantes en determinados casos, no se correlaciona con el efecto observado con la administración directa de algunos flavonoides como la quercetina y la rutina. En contraparte, se ha observado que los radicales libres generados por el estrés oxidante pueden estar implicados en el desarrollo de enfermedades relacionadas con daño genotóxico. Los metales pesados y en particular los compuestos de Cr (VI) son altamente genotóxicos, proponiéndose como mecanismo de inducción de daño el estrés oxidante, mediante la generación de ERO's y RL. De ahí que se proponga que para contrarrestar los efectos dañinos de los agentes genotóxicos o carcinogénos, como los metales pesados a los que las poblaciones humanas pueden estar expuestas de manera natural u ocupacional, se utilicen sustancias con propiedades antioxidantes, como una estrategia de prevención y tratamiento. De ahí que, resulta de interés estudiar la administración del té verde (bebida rica en antioxidantes) y de dos de sus principales flavonoides (quercetina y rutina) en modelo *in vivo* (ratón), con la finalidad de evaluar el posible efecto protector de daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃ mediante la evaluación de la frecuencia de MN en sangre periférica de ratón y las frecuencias de EPC con respecto a las de ENC.

III. HIPÓTESIS

Si los compuestos polifenólicos presentan actividad antioxidante y los compuestos de cromo (VI) inducen daño genotóxico y citotóxico mediante la generación de ERO's y RL entonces si se administra té verde durante 10 días y sus flavonoides (quercetina y rutina) a ratones hembra de la cepa CD-1, se espera que se reduzca el daño genotóxico y citotóxico causado por el CrO₃, mediante la disminución en la inducción de MN en sangre periférica por el potencial antioxidante del té verde y sus flavonoides.

IV. OBJETIVOS

1.1 General

- Evaluar el efecto protector del té verde y sus principales flavonoides con potencial antioxidante (quercetina y rutina) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃ mediante la evaluación de la frecuencia de MN en sangre periférica de ratón y las frecuencias de EPC con respecto a las de ENC.

1.2 Particulares

- 1.- Evaluar el efecto del té verde sobre el daño genotóxico inducido por el CrO₃ mediante la evaluación de la frecuencia de MN en sangre periférica, en ratones tratados con una sola dosis de 20mg/Kg de CrO₃.
2. Evaluar el efecto del té verde sobre el daño citotóxico inducido por el CrO₃ mediante la evaluación de la frecuencia de EPC con respecto a los ENC en sangre periférica de ratones tratados con una sola dosis de 20mg/Kg de CrO₃.
- 3.- Evaluar el efecto de los flavonoides (quercetina y rutina) del té verde sobre el daño genotóxico inducido por el CrO₃ mediante la evaluación de la frecuencia de MN en sangre periférica de ratones tratados con una sola dosis de 20mg/Kg de CrO₃.
- 4.- Evaluar el efecto de los flavonoides (quercetina y rutina) del té verde sobre el daño citotóxico inducido por el CrO₃ mediante la evaluación de la frecuencia de EPC con respecto a los ENC en sangre periférica de ratones tratados con una sola dosis de 20mg/Kg de CrO₃.
- 5.- Evaluar el efecto de la administración simultánea de quercetina y rutina sobre el daño genotóxico inducido por el CrO₃ mediante la evaluación de la frecuencia de MN en sangre periférica de ratones tratados con una sola dosis de 20mg/Kg de CrO₃.
- 6.- Evaluar el efecto de la administración simultánea de quercetina y rutina sobre el daño citotóxico inducido por el CrO₃ mediante la evaluación de la frecuencia de EPC con respecto a los ENC de ratones tratados con una sola dosis de 20mg/Kg de CrO₃.
7. Comparar los efectos de la administración del té verde y de los flavonoides (quercetina y rutina) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃ mediante la evaluación de la frecuencia de MN y EPC con respecto a los ENC en sangre periférica de ratones tratados con una sola dosis de 20mg/Kg de CrO₃.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Animales

Se emplearon ratones hembra de la cepa CD-1 de 2 a 3 meses de edad, los cuales fueron obtenidos del Laboratorio Harlan de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), los cuales fueron aclimatados en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Se alimentaron con nutricubos (Purina), con libre acceso al agua. Se mantuvieron bajo condiciones ambientales de temperatura y circulación de aire controladas, así como períodos de luz-obscuridad (12-12 hrs).

2. Reactivos

Todos los reactivos empleados en el estudio fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Colorante NA [CAS No. 10127-02-3]; quercetina dihidratada [CAS No. 6151-25-3]; rutina [CAS No. 207671-50-9]; CrO₃ [CAS No. 133-82-0].

El té verde que se utilizó fue orgánico de una marca comercial obtenida de las altas montañas de la provincia de Fujian, China (USDA organic uncl less tea).

3. Tratamientos

El té verde se preparó mediante la infusión de 3g (dos bolsas) de té en 100ml de agua potable (3 min), posteriormente se dejó enfriar durante 10 min y se colocó en bebederos oscuros. Las infusiones del té verde se prepararon diariamente durante los días de tratamiento. La cantidad consumida del té verde se midió diariamente y con esta se calculó el índice de consumo de té verde por ratón.

Los flavonoides y el CrO₃ se aplicaron por vía i.p.; fueron preparados en una solución mediante su disolución en agua destilada estéril. Una vez preparados los reactivos se administraron inmediatamente en un volumen de alrededor de 0.25ml por ratón.

Se emplearon grupos de cinco hembras, de acuerdo a los lineamientos para pruebas de genotoxicidad de la FDA, EPA Y la IARC.

Para el protocolo uno los grupos fueron divididos de la siguiente forma:

- a) Testigo; tratados únicamente con agua potable vía oral acceso libre.
- b) té verde; administración de 6.5 ml vía oral acceso libre por 10 días.
- c) CrO₃; administración de 20 mg/kg vía i.p.
- d) té verde-CrO₃; combinación de ambos tratamientos.

Para el protocolo dos los grupos fueron divididos de la siguiente forma:

- a) Testigo; tratados únicamente con el vehículo.
- b) rutina; administración de 625 mg/kg (dos dosis) por vía i.p.
- c) CrO₃; administración de 20 mg/kg vía i.p.
- d) rutina-CrO₃; combinación de ambos tratamientos.

Para el protocolo tres los grupos fueron divididos de la siguiente forma:

- a) Testigo; tratados únicamente con el vehículo.
- b) quercetina; administración de 100 mg/kg por vía i.p.
- c) CrO₃; administración de 20 mg/kg vía i.p.
- d) quercetina-CrO₃; combinación de ambos tratamientos.

Para el protocolo cuatro los grupos fueron divididos de la siguiente forma:

- a) Testigo; tratados únicamente con el vehículo.
- b) rutina-quercetina; combinación de ambos tratamientos.
- c) CrO₃; administración de 20 mg/kg vía i.p.
- d) rutina-quercetina; CrO₃; combinación de los tres tratamientos.

4. Establecimiento de las dosis de té verde, rutina, quercetina y CrO₃

La dosis para los tratamientos fueron seleccionados de acuerdo a lo reportado en estudios previos, en donde se observó que la administración de CrO₃ por vía i.p. de 20 mg/kg de peso corporal era inductora de daño genotóxico (Chorvatovicová *et al.*, 1991; Sarkar *et al.*, 1993; García-Rodríguez *et al.*, 2001), mientras que la dosis de rutina de 625 mg/kg, no causa efectos genotóxico (da Silva *et al.*, 2002). La dosis de 100 mg/kg de quercetina se basó en resultados de estudios previos del laboratorio, donde se observó que su administración por vía i.p. a ratones de la cepa CD-1, no incrementaba la frecuencia de MN (Mateos-Nava, 2007).

5. Tiempos de evaluación

Una vez seleccionada la dosis del CrO₃ y de los flavonoides, y 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 ratones hembra de la cepa CD-1 se les administró una dosis de 6.5 ml/kg de té verde vía oral (*ad libitum*) (grupo testigo positivo) y 20 mg/kg de CrO₃ vía i.p. (grupo testigo negativo) (Protocolo 1, figura 9), la administración del tratamiento de té verde, para el grupo testigo positivo y para el grupo experimental fue durante 10 días, para el grupo experimental la

administración se realizó antes de la administración del tratamiento con CrO₃ considerando como hora 0 el día 10, posteriormente se tomaron muestras cada 24 horas hasta la hora 72.

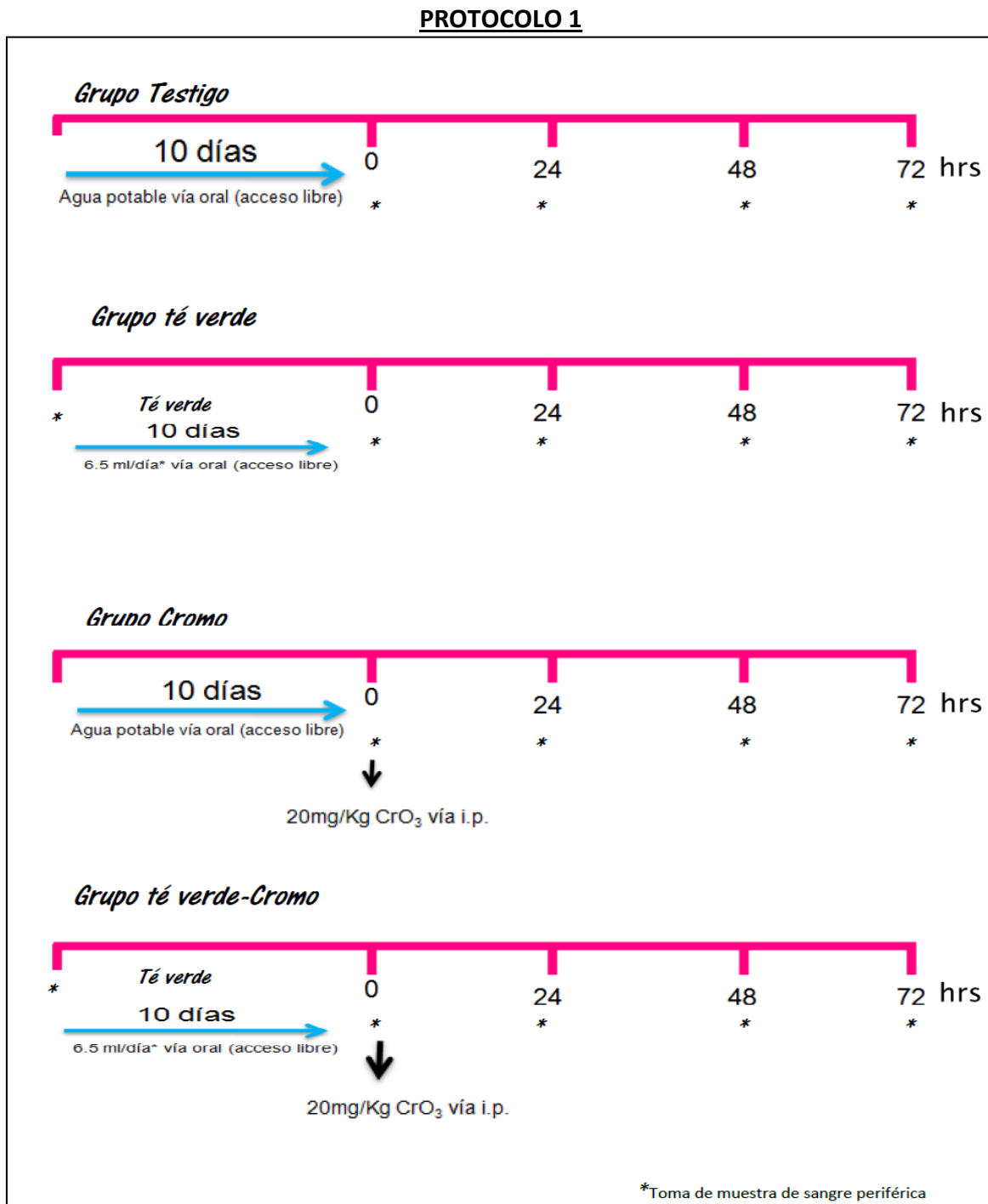


Figura 9. Protocolo para la administración de tratamientos vía i.p. de té verde (6.5 ml/kg) y CrO₃ (20mg/kg)

A ratones hembra de la cepa CD-1 se les administraron dos dosis de 625 mg/Kg de rutina vía i.p. y 20 mg/Kg de CrO₃ vía i.p. (Protocolo 2, figura 10), la administración del tratamiento de rutina fue cada 24 horas, la administración de CrO₃ fue 2 horas después de la administración de la segunda dosis de Rutina, considerando como hora 0 la administración de CrO₃, posteriormente se tomaron muestras cada 24 horas hasta la hora 72.

PROCOLO 2

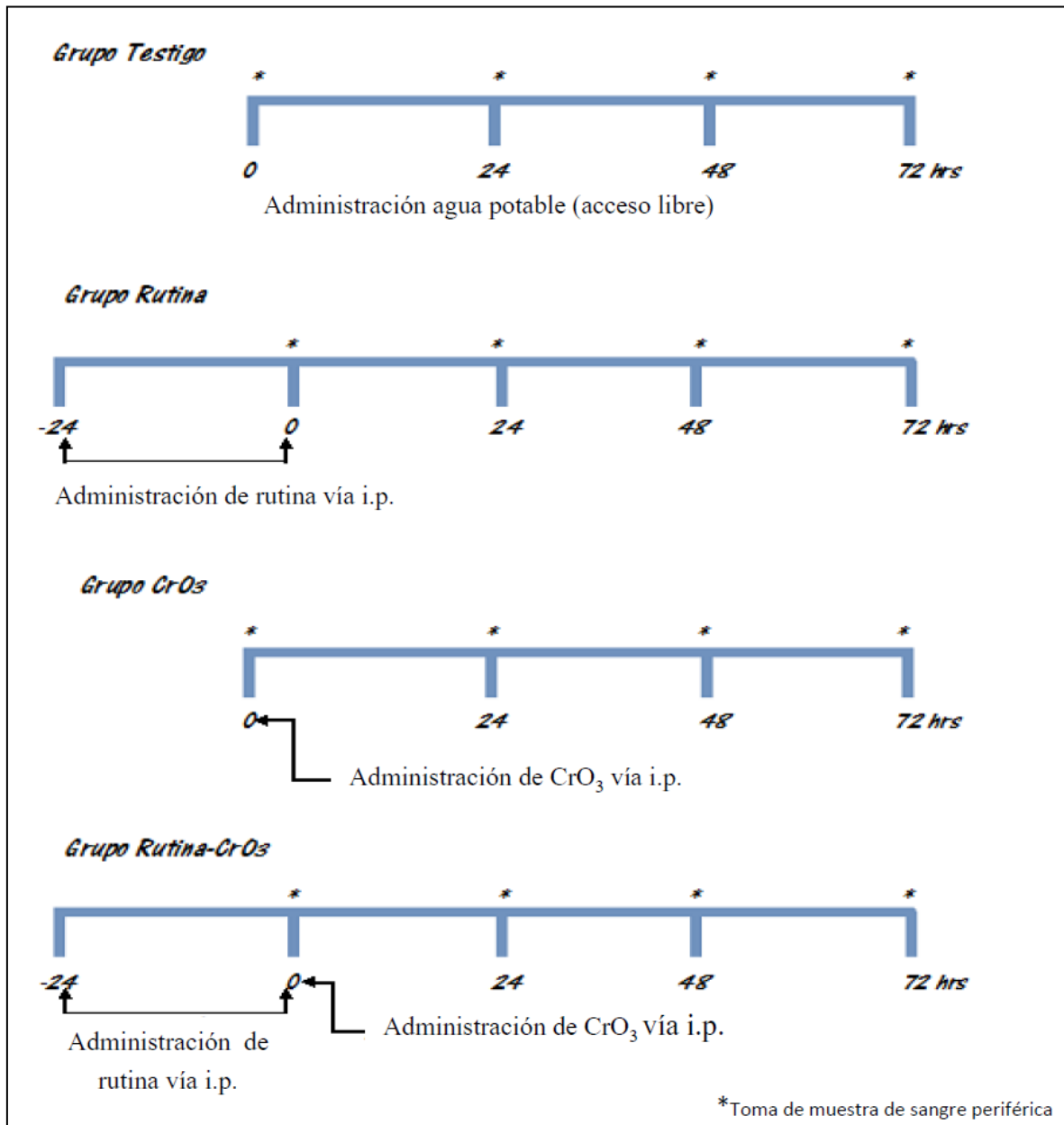


Figura 10. Protocolo para la administración vía i.p. del tratamiento de rutina (625 mg/kg) dos dosis, antes de la aplicación vía i.p. del CrO₃ (20 mg/kg)

A ratones hembra de la cepa CD-1 se les administró una dosis de 100 mg/kg de quercetina y 20 mg/kg de CrO₃ vía i.p. (Protocolo 3, figura 11), la administración del tratamiento de quercetina fue 2 horas antes de la administración del tratamiento con CrO₃ considerando como hora 0 la administración del CrO₃, posteriormente se tomaron muestras cada 24 horas hasta la hora 72.

PROCOLO 3

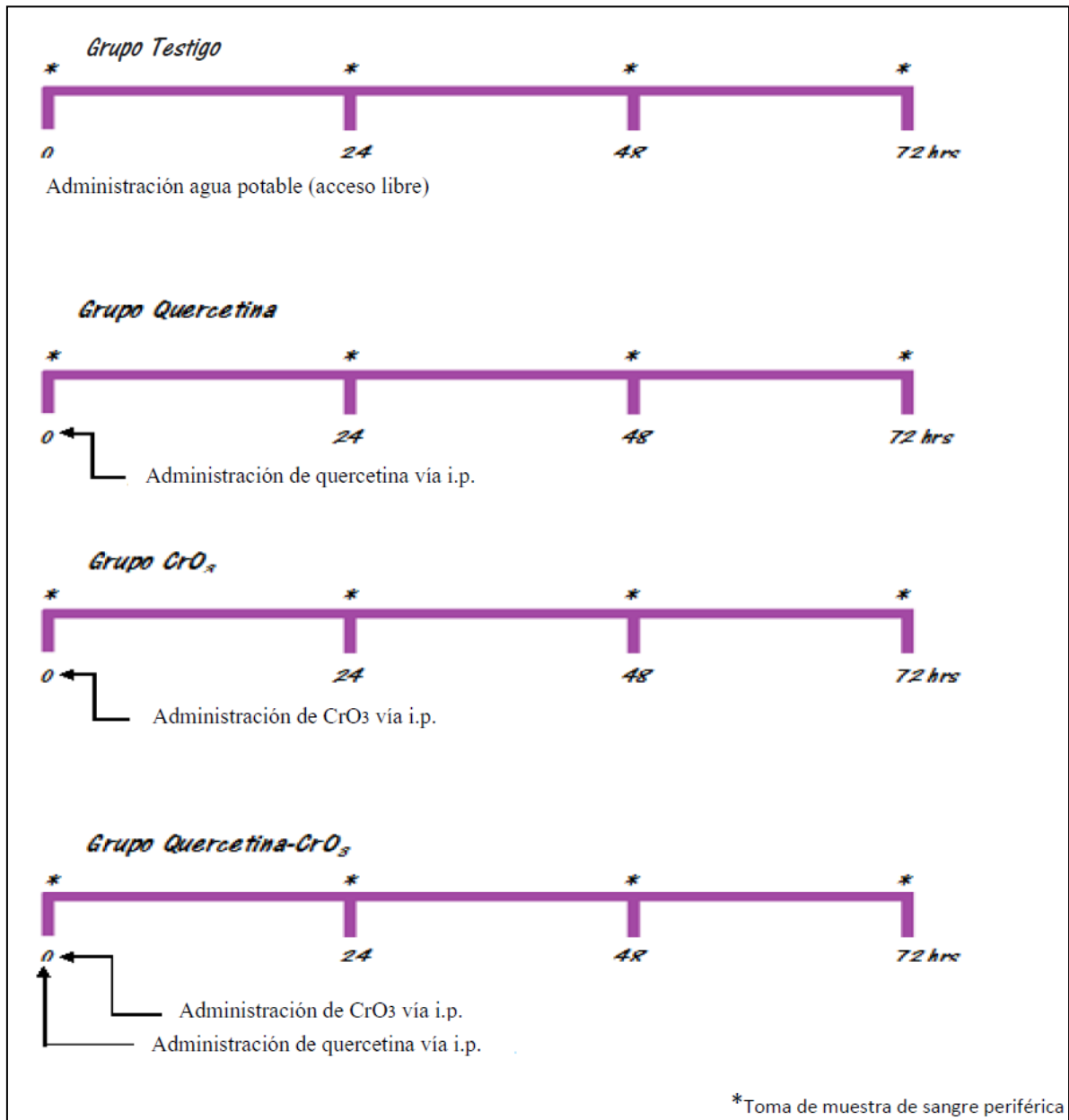


Figura 11. Protocolo para la administración de tratamientos vía i.p. de quercetina (100 mg/kg) y CrO₃ (20 mg/kg)

A ratones hembra de la cepa CD-1 se les administró dos dosis de 625 mg/kg de rutina, una sola dosis de 100 mg/kg de quercetina y 20 mg/kg de CrO₃ (Protocolo 4, figura 12), la administración de la segunda dosis de rutina fue 24 horas después de la primera, se administró quercetina 2 horas después de la administración de la segunda dosis de rutina, la administración de CrO₃ fue 2 horas después de la administración de quercetina, considerando como hora 0 la administración del CrO₃, posteriormente se tomaron muestras cada 24 horas hasta la hora 72.

PROTOCOLO 4

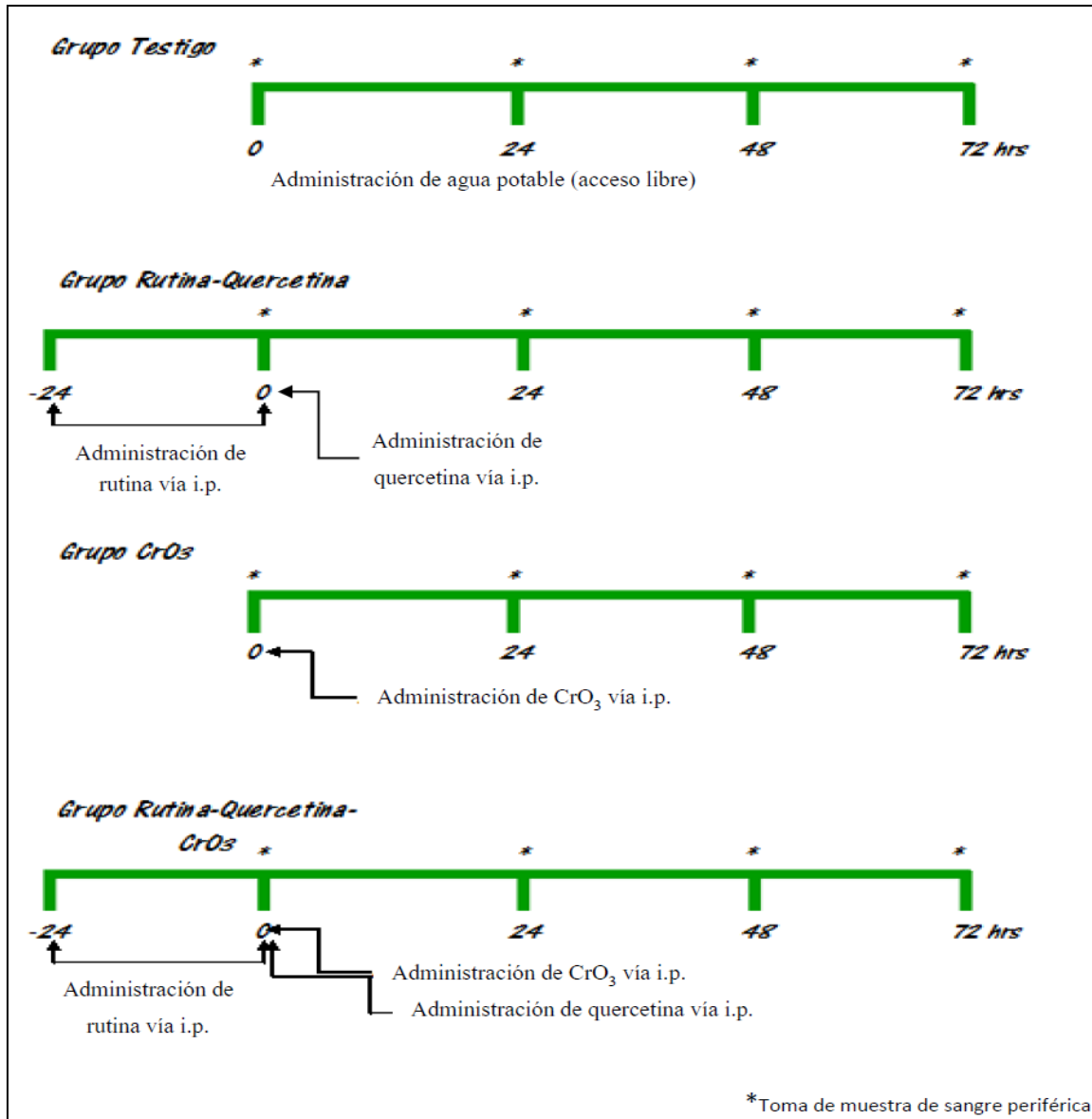


Figura 12. Protocolo para la administración de tratamientos vía i.p. de rutina-quercetina (625 mg/kg-100 mg/kg, respectivamente) y CrO₃ (20 mg/kg)

VI. EVALUACIONES

1. Preparación de laminillas

Se prepararon laminillas con NA previamente a la toma de muestras. El NA se preparó con agua desionizada (1 mg/1ml). Se tomaron 10 μ l de esta solución y se colocó sobre laminillas precalentadas aproximadamente a 70°C, con la 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 posterior (Hayashi *et al.*, 1990).

2. Toma de muestras

Las muestras de sangre de los ratones se obtuvieron realizando un pequeño corte de la punta de la cola con la ayuda de unas tijeras, se colocaron de 5 a 15 μ l de sangre (equivalentes de 1 a 3 gotas de sangre), al centro de las laminillas previamente preparadas con NA, posteriormente se colocó un cubreobjetos (24x50mm) y se sellaron con pegamento. Las preparaciones fueron guardadas en cajas de plástico y en oscuridad, a una temperatura de 4°C. El análisis de las preparaciones se realizó después de 24 horas de haber sido preparadas, procurando no exceder de 8 días. En cada toma de muestras se realizaron dos 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. En el tratamiento con té verde, se tomaron muestras a partir del primer día de administración del té verde (día 0) y posteriormente hasta el día 10 (hora 0).

3. Evaluación de muestras

Las evaluaciones se realizaron en los eritrocitos de las muestras de sangre, en el microscopio de fluorescencia (luz azul) con filtro de luz amarilla (Nikon OPTIPHOT-2). La tinción obtenida con el NA permitió diferenciar a los EPC de los ENC e identificar la presencia de MN. Para la evaluación del daño citotóxico se cuantificó la frecuencia de EPC respecto a los ENC de 2000 eritrocitos totales. En la evaluación del daño genotóxico se cuantificó la frecuencia de MN respecto a los EPC analizando 2000 eritrocitos totales (Hayashi *et al.*, 2000).

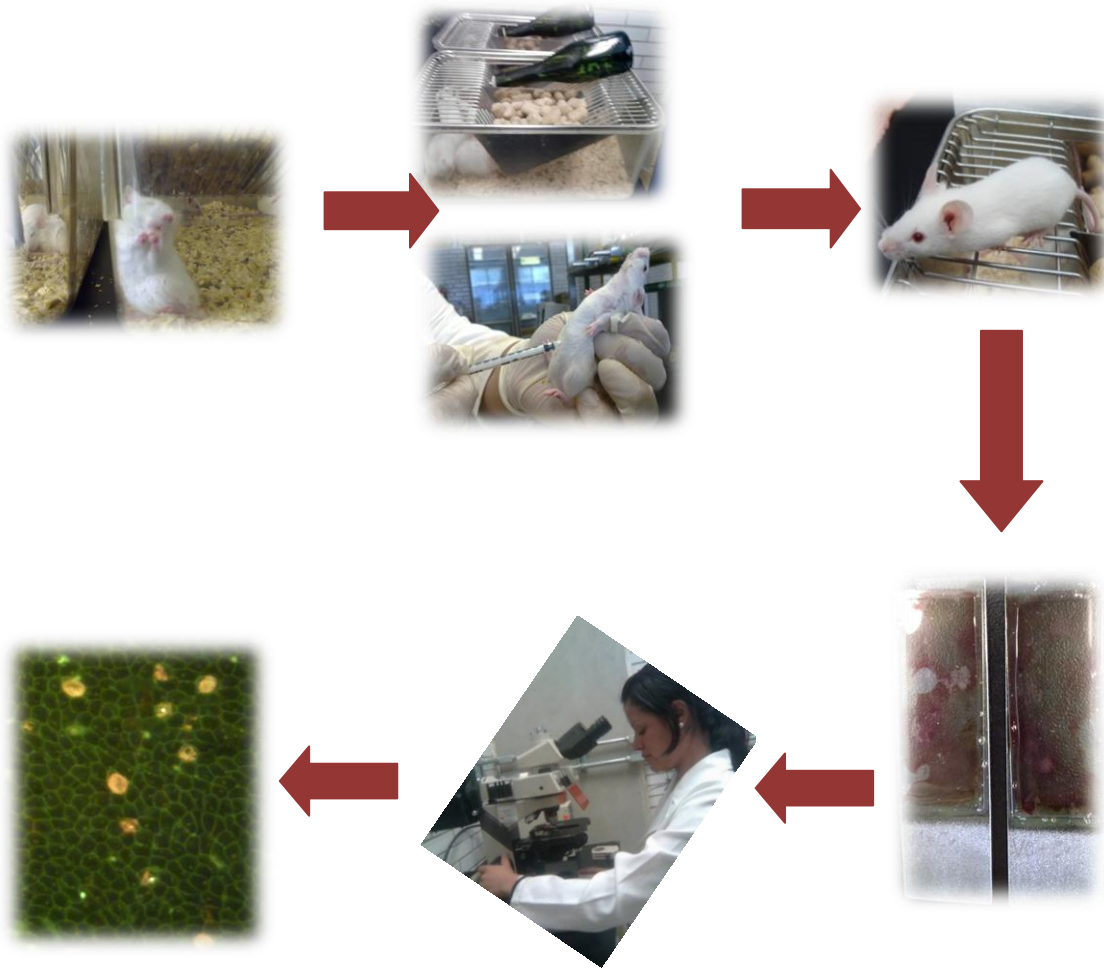


Figura 13. Administración de tratamientos, toma de muestra y evaluación de laminillas

A ratones hembra de la cepa CD-1 se les administraron tratamientos ya sea por vía oral (té verde) o vía i.p. (flavonoides y CrO_3), posterior a eso se les tomaron muestras de sangre de la vena caudal, las cuales se colocaron en laminillas tratadas con NA, 24 hrs después se evaluaron en un microscopio de fluorescencia (figura 13).

4. Análisis estadísticos

Los resultados que se obtuvieron de la frecuencia de MN y la frecuencia de EPC se analizaron en el paquete estadístico SPSS/PC V16TM. Los resultados se presentan en una media \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm d. e.$), que se compararon mediante un análisis de varianza de una sola dirección, seguida de una prueba de Tukey.

Se calculó la Frecuencia de Inducción Neta de MN (NIF por sus siglas en ingles) para descartar la inducción espontánea que obtengan los grupos a la hora 0 ya que no se les había aplicado ningún tratamiento y la Frecuencia de Inducción Diferencial de MN (DIF por sus siglas en ingles) que permitió descartar la posibilidad de que el efecto observado fuera producto de la manipulación, restando la inducción que hay en el grupo testigo. El NIF y el DIF se analizaron con una Chi-cuadrada utilizando el paquete Statistica^{V6} (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001). En todos los casos se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los promedios de las frecuencias de MN ($\bar{x} \pm d. e.$) observados en las muestras de sangre periférica tomadas de los grupos tratados con té verde y CrO_3 . Se observa que aunque se presentó un incremento de alrededor de dos MN en el grupo al que se administró solo el té verde por 10 días al compararse con el grupo testigo no resultó estadísticamente significativo. En el grupo al que se aplicaron los 20 mg/kg de CrO_3 hubo un incremento de alrededor de 9 MN en el día 11 y 12 (24 y 48 horas después de la aplicación del CrO_3) el cual resultó estadísticamente significativo al compararse con el grupo testigo y con la evaluación realizada antes de administrar el tratamiento (día 0). Cuando se combinaron los tratamientos de té verde y CrO_3 se observó una disminución de las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 , resultando aún estadísticamente significativas en el día 11 y 12 al comparar con el grupo testigo, por lo que se puede decir que el té verde disminuyó parcialmente las frecuencias de MN inducidas por la administración del CrO_3 .

En el cuadro 2 se muestra el consumo promedio de té verde durante los diez días de tratamiento, se observa que los grupos tratados con té verde bajaron su consumo de líquidos (alrededor de un 40%) en comparación con el grupo testigo que en promedio consumieron 10ml/ratón /día.

A las frecuencias de MN se les calculó el valor neto de la frecuencia de la inducción de MN (NIF), partiendo de que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo. El NIF se calculó restando el número de MN observados en la hora 0 a las siguientes horas de evaluación (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

$$\text{NIF} = \text{MNa}_{xi} - \text{MNa}_{x0}$$

Donde:

a= grupo

xi= tiempo de evaluación (24, 48 ó 72 h)

x0= tiempo 0

Cuadro 1. Promedio de la inducción de MN-EPC en sangre periférica de todos los grupos

Tratamiento	Dosis	N	Tiempo de análisis (día)	MN-EPC 2000 células ($\bar{x} \pm d. e.$)
Testigo	0	5	0	1.4±1.1
			10	1.4±1.1
			11	1.4±0.9
			12	1.4±0.5
			13	1.0±1.0
Té verde	6.5ml/día	5	0	1.4±0.5
			10	3.0±0.7
			11	1.0±1.0
			12	1.6±2.5
			13	2.6±2.3
CrO ₃	20mg/Kg	5	0	1.6±0.5
			10	1.6±0.5
			11	10.0±2.7 ^{a,b}
			12	9.8±3.1 ^{a,b,d}
			13	4.4±1.8
Té verde-CrO ₃	6.5ml/día-- 20mg/Kg	5	0	1.6±1.8
			10	1.4±1.1
			11	6.2±1.3 ^{a,c}
			12	5.8±3.4 ^{a,c}
			13	1.6±0.5

Significancia de $p < 0.05$; ^a vs testigo; ^b vs CrO₃ día 0; ^c vs té verde-CrO₃ día 0; ^d vs té verde-CrO₃ día 12

Cuadro 2. Consumo promedio de té verde

Grupo	N	Días de tratamiento	Consumo/ grupo (ml)	Consumo/ día/grupo (ml)	Consumo/ día/ratón (ml)
Testigo	5	10	500	50	10
Té verde	5	10	283	28.3	5.6
Té verde-CrO ₃	5	10	325	32.5	6.5

En la figura 14 se muestra el análisis del NIF, se observa una disminución de las frecuencias de MN cuando se administró el té verde previo a la aplicación del CrO₃ de 43, 47 y 93 % a las 24, 48 y 72 horas respectivamente al comparar con el grupo al que solamente se le aplicó el CrO₃, siendo mayor la disminución a las 72 horas. Sin embargo, las frecuencias de MN observadas aún resultan estadísticamente significativas al compararse con el grupo testigo.

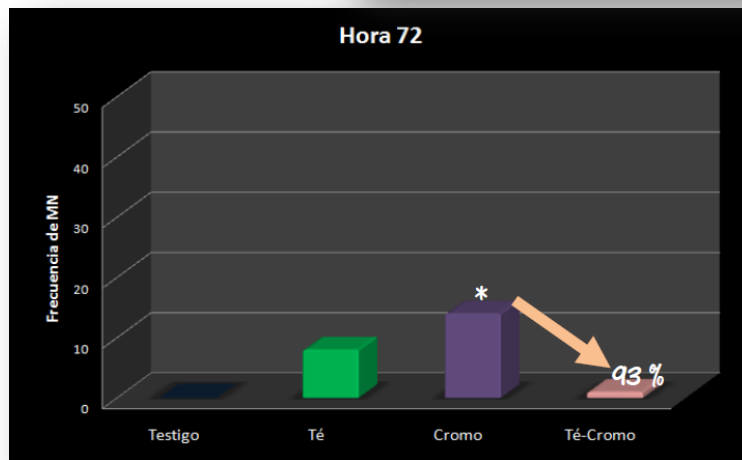
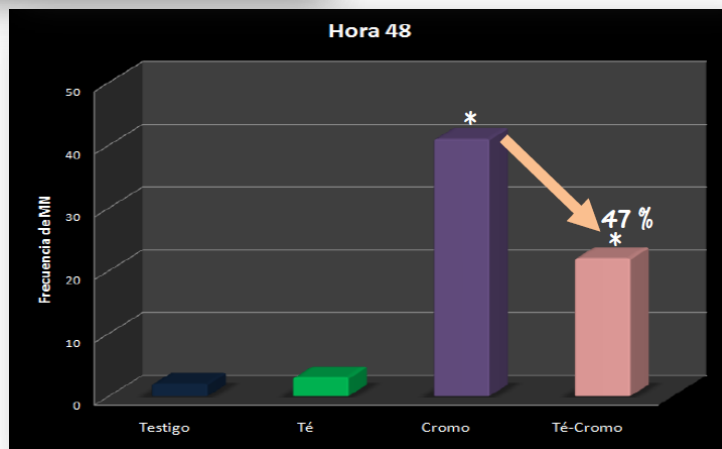


Figura 14. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10,000 EPC, cuando se administro una dosis 3gr/100ml de té verde vía oral acceso libre (*:p< 0.05)

A los valores obtenidos también se les calculó la Frecuencia Diferencial en la Inducción de MN (DIF) con el fin de considerar los MN inducidos por el manejo de los animales durante el estudio. Este análisis consiste en restar las frecuencias de MN observadas en cada hora de evaluación del grupo testigo a las respectivas frecuencias de MN de los grupos tratados (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2006).

$$DIF = MN_a x_i - MN_t x_i$$

Dónde:

a= grupo

t= grupo testigo

x_i = tiempo de evaluación (24,48 o 72 hrs.)

En la figura 15 se muestra el comportamiento del DIF, en donde se observa que cuando se administró el té verde previo a la aplicación del CrO_3 (línea verde) se presentó un comportamiento intermedio entre el grupo tratado solo con té verde (línea azul) y el tratado con CrO_3 (línea roja), lo que confirma la disminución parcial de las frecuencias de MN.

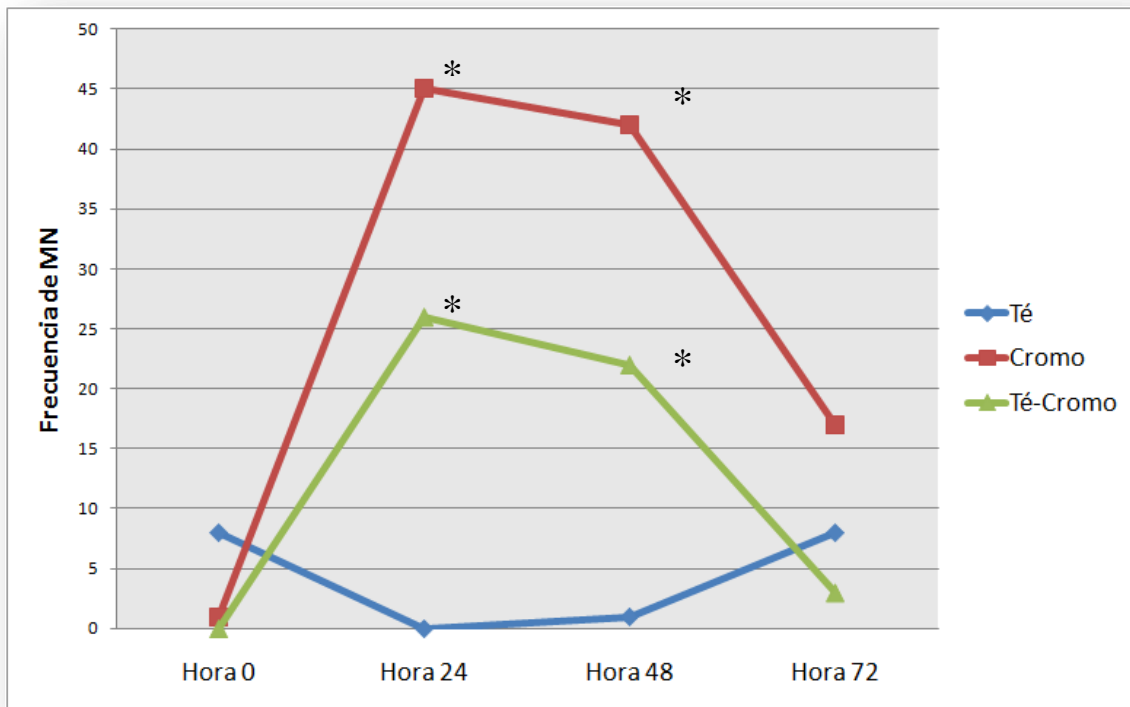


Figura 15. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN, cuando se administró una dosis de 3g/100ml de té verde vía oral acceso libre (*:p< 0.05)

Dado que la administración de té verde disminuyó parcialmente las frecuencias de MN inducidas por el CrO_3 , se administraron dos de los flavonoides con potencial antioxidante presentes en el té verde (rutina y quercetina). En el cuadro 3, se muestran los promedios de las frecuencias de MN cuando se administraron dos dosis de 625 mg/kg de rutina por vía i.p. Como se muestra en el cuadro, la administración sola de la rutina no modificó las frecuencias de MN al compararse con el grupo testigo. En el grupo en el que se administró la rutina previamente a la aplicación de CrO_3 , se presentó una disminución de las frecuencias de MN inducidas por el tratamiento del CrO_3 del 83, 82 y 78 % a las horas 24, 48 y 72, respectivamente (figura 16), por lo que se puede decir que la administración de la rutina incremento la reducción de las frecuencias de MN en comparación con lo observado con el tratamiento del té verde. En la figura 17 se puede observar que el comportamiento del grupo tratado con rutina- CrO_3 (línea verde) es muy similar al comportamiento observado en el grupo que solo fue tratado con rutina (línea azul).

Cuadro 3. Promedios de las frecuencias de MN-EPC en hembras tratadas con CrO₃ y Rutina vía i.p.

Tratamiento	Dosis mg/Kg	N	Tiempo de análisis (hora)	MN-EPC 2000 células ($\bar{x} \pm d. e.$)
Testigo	0	5	0	1.4 \pm 1.1
			24	1.4 \pm 0.8
			48	1.4 \pm 0.5
			72	1.0 \pm 1.0
Rutina	625	5	0	0.4 \pm 0.5
			24	1.8 \pm 1.3
			48	1.6 \pm 1.5
			72	1.8 \pm 0.8
CrO ₃	20	5	0	1.6 \pm 0.5
			24	10.0 \pm 2.7 ^{abcd}
			48	9.8 \pm 3.1 ^{abcd}
			72	4.4 \pm 1.8 ^b
rutina- CrO ₃	625-20	5	0	1.2 \pm 0.8
			24	2.6 \pm 1.1
			48	2.6 \pm 2.3
			72	1.8 \pm 0.8

Significancia de p<0.05; ^a vs Testigo; ^b rutina hora 0; ^c vs CrO₃ hora 0; ^d vs rutina-CrO₃

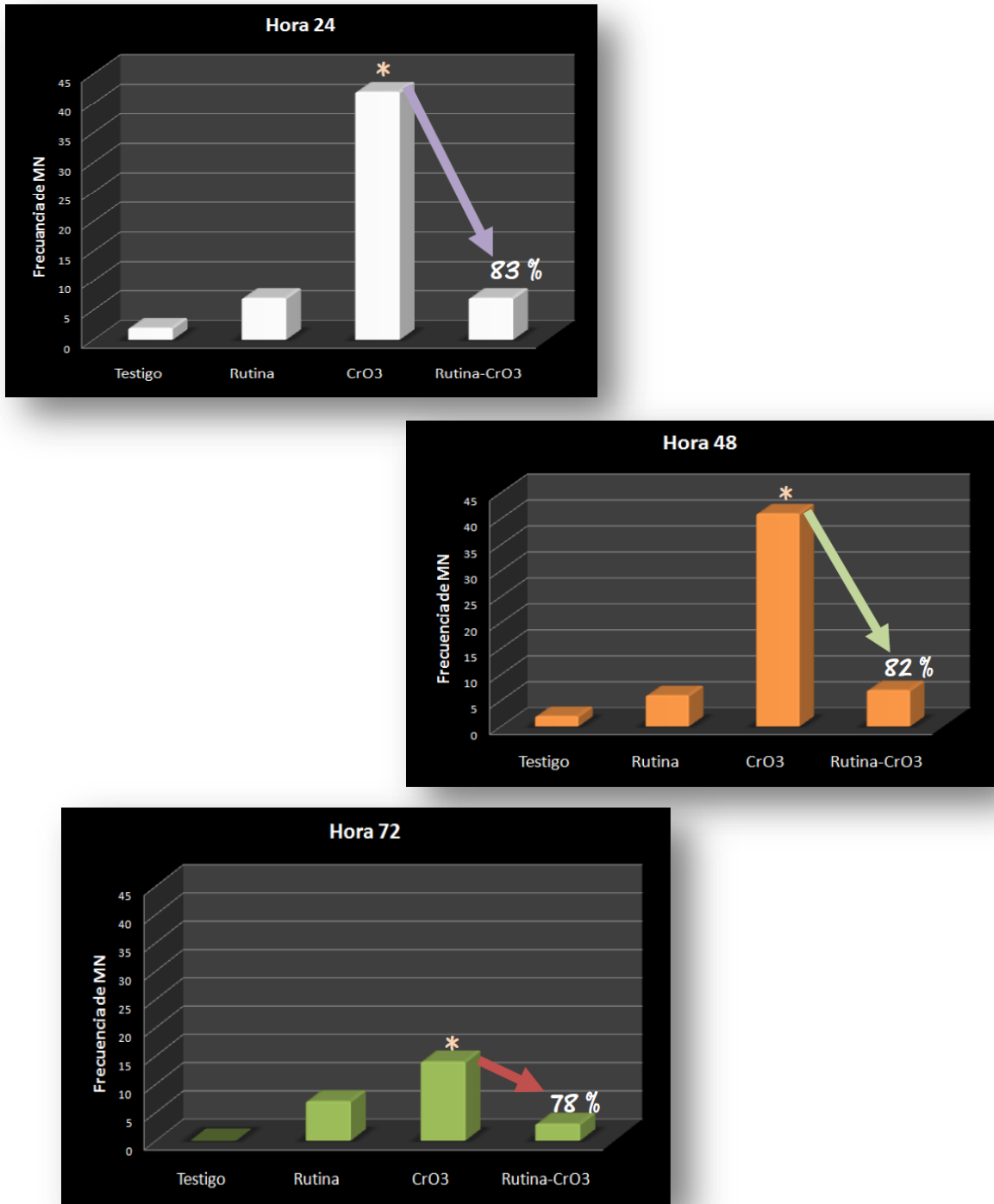


Figura 16. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10,000 EPC, cuando se administro dos dosis de 625 mg/Kg de rutina vía i.p. (*:p< 0.05)

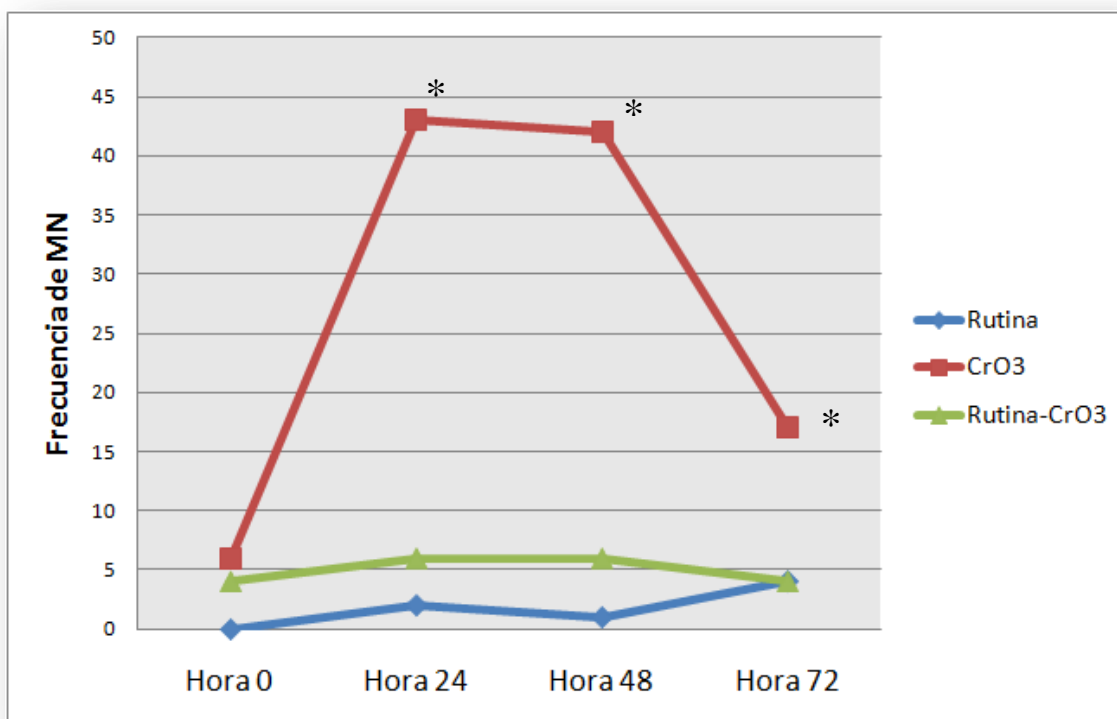


Figura 17. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN, cuando se administraron dos dosis de 625 mg/Kg de rutina vía i.p. (*:p< 0.05)

En el cuadro 4, se muestran los resultados de los promedios de las frecuencias de MN cuando se administraron 100 mg/kg de quercetina por vía i.p. Se observa que la administración sola de quercetina no modificó las frecuencias de MN al compararse con el grupo testigo. En el grupo que se combinaron los tratamientos de quercetina y CrO₃ se observa una disminución de las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO₃, que sin embargo, resultan estadísticamente significativas a las 48 horas al compararlas con el grupo testigo. En la figura 18 se muestra el análisis del NIF cuando se administraron los tratamientos de quercetina, CrO₃ y quercetina-CrO₃. Se observa que en el grupo que se combinaron los tratamientos (quercetina y CrO₃) la mayor disminución de las frecuencias de MN se presenta a las 24 y 72 horas (88 % y 85% respectivamente), mientras que a las 48 horas solo se disminuyó un 53 % con respecto al grupo tratado solo con CrO₃. Las frecuencias de MN observadas en el grupo tratado con quercetina-CrO₃, aún resultan estadísticamente significativas al compararse con el grupo testigo. Los resultados indican que la quercetina presenta a la hora 24 un efecto protector mayor que el té verde y la rutina, sin embargo, la disminución en las frecuencias de MN observada a las 48 horas no se presentó en los tratamientos con rutina y té verde. En la figura 19 se puede observar que el comportamiento

del grupo tratado con quercetina y CrO₃ (línea verde) tiende más al comportamiento observado para el grupo CrO₃ (línea roja).

Cuadro 4. Promedios de las frecuencias de MN-EPC en hembras tratadas con CrO₃ y quercetina vía i.p.

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	N	Tiempo de análisis (hora)	MN-EPC 2000 células ($\bar{x} \pm$ d. e.)
Testigo	0	5	0	1.4 \pm 1.1
			24	1.4 \pm 0.8
			48	1.4 \pm 0.5
			72	1.0 \pm 1.0
quercetina	100	5	0	0.8 \pm 1.0
			24	0.8 \pm 0.8
			48	0.4 \pm 0.5
			72	1.0 \pm 0.7
CrO ₃	20	5	0	1.6 \pm 0.5
			24	10.0 \pm 2.7 ^{abcd}
			48	9.8 \pm 3.1 ^{abcd}
			72	4.4 \pm 1.8 ^b
quercetina-CrO ₃	100-20	5	0	2.0 \pm 1.0
			24	3.6 \pm 1.5
			48	6.4 \pm 1.8 ^{abcd}
			72	3.0 \pm 1.0

Significancia de p<0.05; ^a vs Testigo; ^b vs quercetina; ^c vs CrO₃ hora 0; ^d vs quercetina-CrO₃

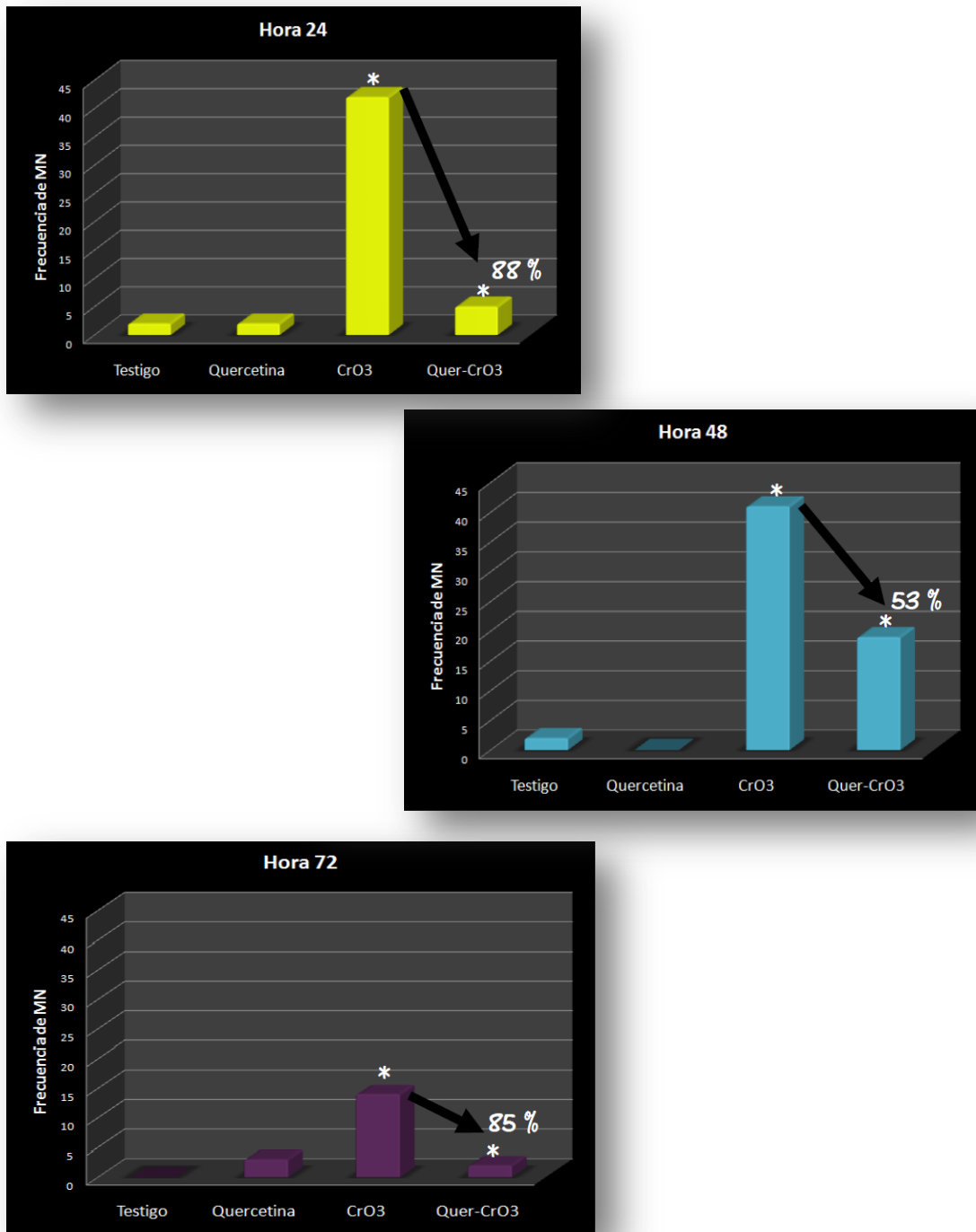


Figura 18. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10,000 EPC, cuando se administró una dosis de 100 mg/Kg de quercetina vía i.p. (*:p< 0.05)

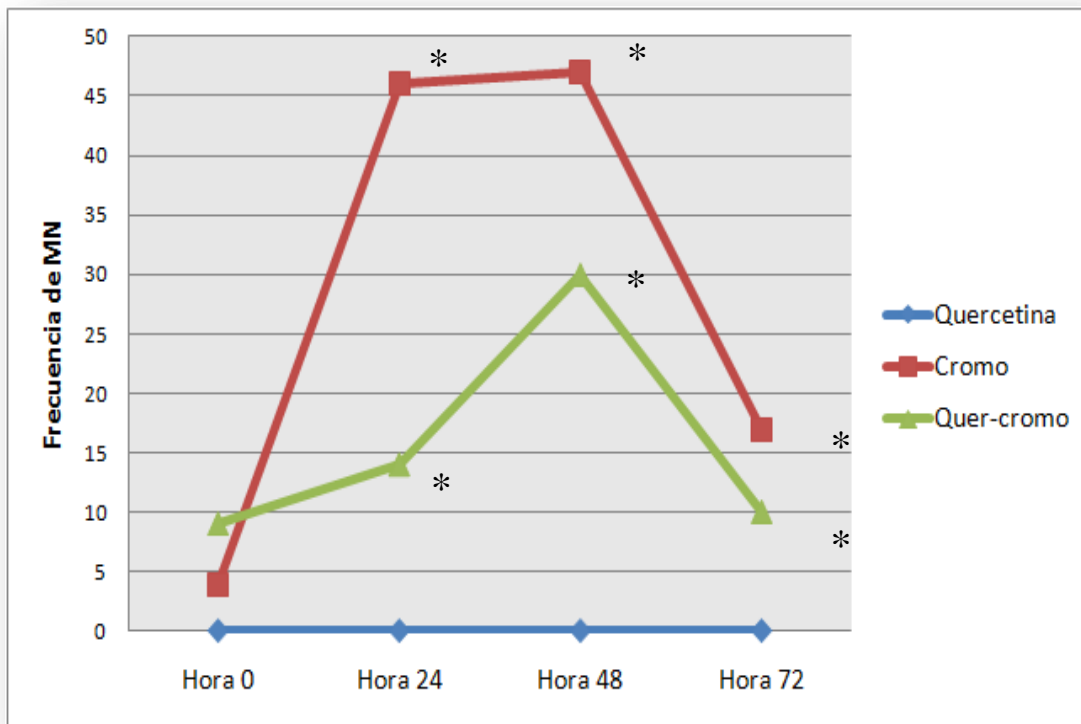


Figura 19. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN, cuando se administró una dosis de 100 mg/Kg de quercetina vía i.p. (*:p< 0.05)

Dado que con los tratamientos de rutina y quercetina se observaron los porcentajes más altos de protección del efecto genotóxico del CrO_3 (hora 24 y 48), se administraron simultáneamente estos tratamientos. En el cuadro 5 se muestran los promedios de las frecuencias de MN con los tratamientos de 625 mg/kg de rutina (dos dosis) y 100 mg/kg de quercetina por vía i.p., del CrO_3 y de la combinación de los tratamientos CrO_3 -rutina-quercetina. Se observa que, la co-administración de rutina y quercetina incrementa los promedios de las frecuencias de MN (aproximadamente 2 MN) a las 48 horas, a diferencia de la administración por separado de rutina y quercetina (Cuadro 3 y 4), sin embargo este incremento no resultan estadísticamente significativo al compararse con el grupo testigo. En el grupo en el que se combinaron los tratamientos de antioxidantes (rutina y quercetina) con el CrO_3 , se disminuyeron los promedios de las frecuencias de MN a las 24, 48 y 72 horas con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 , sin embargo, el promedio de MN aún resultan estadísticamente significativo a la hora 48 comparada con el grupo testigo. Al realizar el análisis del NIF (Figura 20) se observa que la disminución de los MN en el grupo combinado de antioxidantes- CrO_3 , es del 83 %, 42 % y 35 % a las 24, 48 y 72 horas respectivamente al compararse con el grupo tratado con CrO_3 . En la figura 21, se muestra el comportamiento de

las frecuencias de MN, se observa que en el grupo en el que se combinaron los tratamientos de antioxidantes (rutina y quercetina) con el de CrO₃ (línea verde) es muy similar al comportamiento que presenta el grupo en el que solo se administraron los antioxidantes (línea azul), lo que confirma la protección del daño al ADN inducido por el CrO₃.

Cuadro 5. Promedios de las frecuencias de MN-EPC en hembras tratadas con CrO₃, rutina y quercetina vía i.p.

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	N	Tiempo de análisis (hora)	MN-EPC 2000 células ($\bar{x} \pm d. e.$)
Testigo	0	5	0	1.4±1.1
			24	1.4±0.8
			48	1.4±0.5
			72	1.0±1.0
rutina-quercetina	625-100	5	0	1.8±1.1
			24	1.6±0.8
			48	3.2±1.7
			72	2.4±1.1
CrO ₃	20	5	0	1.6±0.5
			24	10.0±2.7 ^{abcd}
			48	9.8±3.1 ^{abcd}
			72	4.4±1.8 ^d
rutina-quercetina- CrO ₃	625-100-20	5	0	0.8 ± 0.4
			24	2.2 ± 1.0
			48	5.6 ± 2.0 ^{abcd}
			72	2.6 ± 1.3

Significancia de p<0.05; ^a vs Testigo; ^b vs rutina-quercetina; ^c vs CrO₃; ^d vs rutina-quercetina-CrO₃

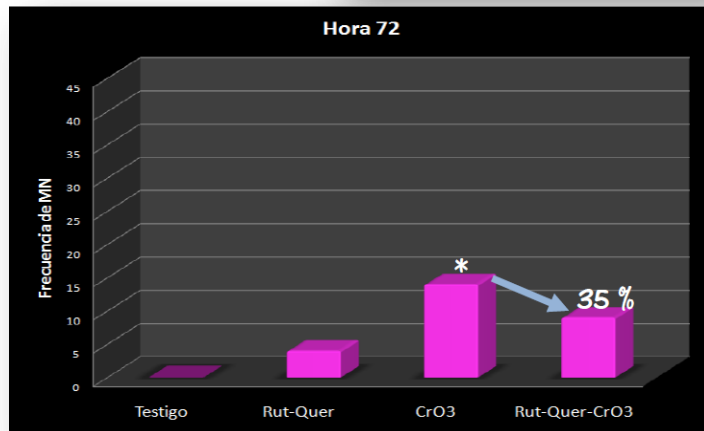
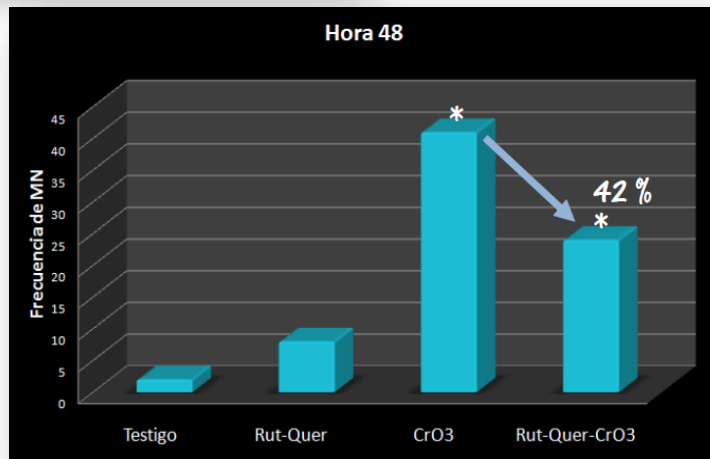
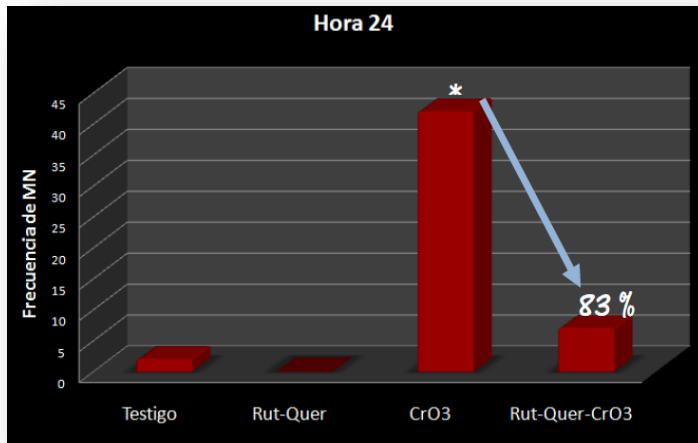


Figura 20. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 10,000 EPC, cuando se administró 625 mg/kg de rutina y 100 mg/Kg de quercetina vía i.p. (*:p< 0.05)

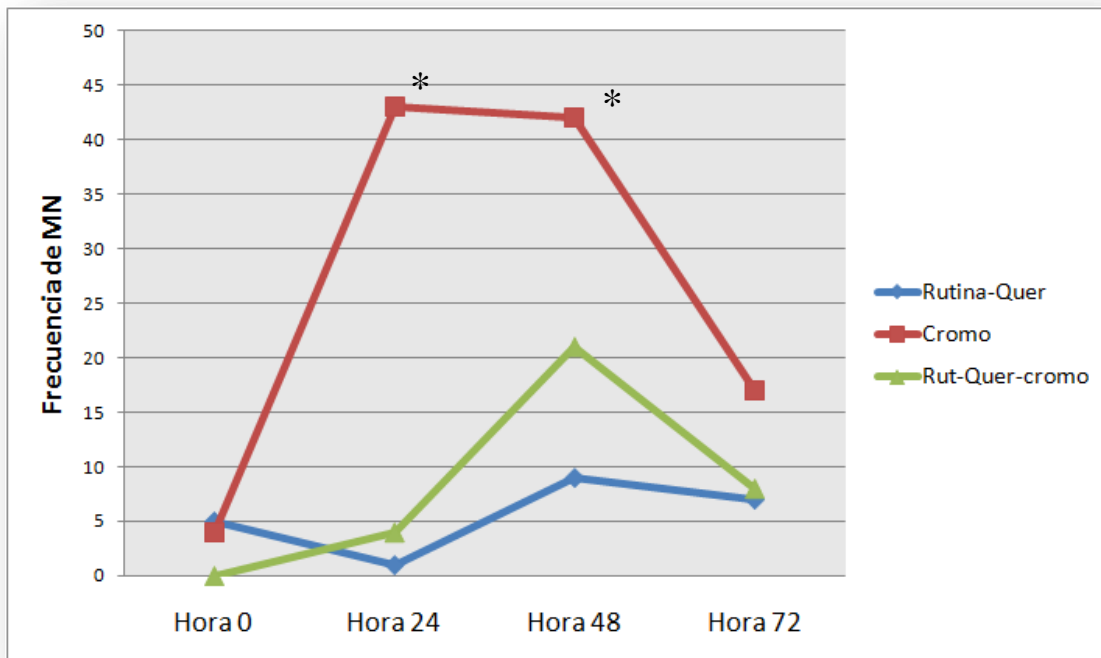


Figura 21. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN, cuando se administró rutina y quercetina simultáneamente vía i.p. (*:p< 0.05)

En el cuadro 6 se muestra a manera de resumen los porcentajes de disminución de MN a las 24, 48 y 72 horas de evaluación con cada uno de los antioxidantes empleados en el estudio cuando se combinaron con el CrO₃, con la finalidad de poder comparar la protección del daño genotóxico inducido por el CrO₃, tanto del té verde como de los flavonoides administrados tanto individual como simultáneamente. Se puede observar que el porcentaje de disminución presentó el siguiente orden: rutina > quercetina > té verde > rutina-quercetina.

Cuadro 6. Comparación de la protección de los diferentes tratamientos al ser administrados previamente a la administración de 20 µg/g de CrO₃, vía i.p.

Hora	té verde (6.5 ml/día/ratón) vía oral (<i>ad libitum</i>)	rutina (2X625 mg/kg) vía i.p.	quercetina (100 mg/kg) vía i.p.	rutina-quercetina (2X625 mg/kg-100 mg/Kg) vía i.p.
24	43 %	83 %	88 %	83 %
48	47 %	82 %	53 %	42 %
72	93 %	78 %	85 %	35 %

Efecto del té verde, rutina, quercetina y CrO₃ sobre la frecuencia de EPC con respecto a la frecuencia de ENC en ratones hembra.

En el cuadro 7 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC con respecto a las frecuencias de ENC en ratones hembra CD-1 tratados con té verde, rutina, quercetina y CrO₃ en los diferentes protocolos empleados en el estudio, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos. Con base a estos resultados podemos inferir que ninguno de los tratamientos tiene efectos citotóxicos, sin embargo este parámetro debe tomarse con reserva.

Cuadro 7. Promedios de las frecuencias de EPC en hembras tratadas con té verde, rutina, quercetina y CrO₃

Tratamiento	Dosis	N	Tiempo de análisis (día)	EPC / 2000 células ($\bar{x} \pm d. e.$)
Testigo	0	5	0	252.6±57.9
			24	253.2±58.6
			48	239.4±32.4
			72	230.8±54.5
CrO₃	200 mg/Kg	5	0	280.2±20.7
			24	268.2±42.7
			48	285.6±40.9
			72	284.0±12.4
té verde		5	0 (-10 días)	226.2±53.9
			0	232.4±79.8
			24	272.2±93.7
			48	279.2±77.6
Rutina	625 mg/kg	5	0	230.0±42.0
			24	297.0±73.2
			48	261.6±53.8
			72	220.8±22.9
Quercetina	100 mg/Kg	5	0	204.6±17.9
			24	204.0±35.6
			48	245.6±40.9
			72	272.4±24.8
té verde- CrO₃	-200 mg/Kg	5	0 (-10 días)	228.8±56.5
			0	227.6±22.8
			24	233.2±69.2
			48	251.6±33.3
rutina- CrO₃	625 mg/Kg-200 mg/Kg	5	0	226.6±32.6
			24	213.8±18.7
			48	259.2±32.6
			72	232.2±35.3
quercetina- CrO₃	100 mg/Kg-200 mg/Kg	5	0	177.2±25.3
			24	182.4±10.8
			48	200.8±13.7
			72	189.2±16.4
rut-quer- CrO₃	625 mg/Kg-100 mg/Kg-200 mg/Kg	5	0	190.2±32.5
			24	180.8±22.1
			48	195.0±13.9
			72	186.8±11.9

VIII. DISCUSIÓN

Se ha propuesto que es posible contrarrestar los efectos dañinos inducidos por agentes genotóxicos mediante el empleo de antimutágenos, como lo pueden ser algunos antioxidantes (Surh y Ferguson 2003). De ahí que se proponga que los antimutágenos naturales presentes en la dieta pueden constituir una opción importante como agentes quimiopreventivos en el tratamiento de algunas enfermedades relacionadas con el daño al ADN como lo son algunos tipos de cáncer. El té verde y sus flavonoides se encuentran dentro de los compuestos estudiados como agentes quimiopreventivos dadas sus propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anticarcinogénicas (Arencibia *et al.*, 2003). Existen muchos estudios que sostienen que el consumo de las fuentes de flavonoides pueden presentar efectos protectores contra enfermedades relacionadas con el daño al ADN (Álvarez y Orallo, 2003; Arencibia *et al.*, 2003). Por lo que, en el presente estudio se evaluaron los efectos del té verde y sus flavonoides (quercetina y rutina) sobre el daño genotóxico inducido por el CrO₃.

Como se observa en los resultados la administración de té verde, rutina y quercetina por sí solas no presentaron efectos tóxicos aparentes. En diversos estudios se ha observado que componentes de las frutas y los vegetales presentan una alta capacidad antioxidante, a la cual se le ha relacionado efectos benéficos para la salud y no se han observado efectos tóxicos aparentes debido a que al ser componentes de la dieta presentan muy baja o nula toxicidad. Katiyar *et al.* (2007), administraron té verde a ratones y tampoco observaron signos de toxicidad, de igual manera, no se han encontrado cambios significativos en perfiles de química sanguínea que demuestren que la administración repetida de té verde presente efectos tóxicos en humanos (Pastore y Fratellone, 2006). Coimbra *et al.* (2006) evaluaron los efectos de té verde sobre el estrés oxidante en humanos y encontraron que hay una disminución en los productos de peroxidación lipídica en un 50 %, lo cual indica que la administración de té verde no tiene efectos tóxicos sobre el organismo sino que al contrario lo ayuda a protegerse del estrés oxidante causado por agentes endógenos. Los flavonoides son la subclase de polifenoles más grande y abundante del mundo vegetal, encontrándose principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de los flavonoides se estima como 23 mg/día; así los flavonoides representan una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana (Pineda *et al.*, 1999; Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Molina, 2009). Particularmente, se ha observado que la administración de la rutina, no induce signos de toxicidad al administrarla durante un periodo de 52 semanas en grandes dosis a ratas Wistar (Tamura *et al.* 2010).

De igual manera, se observó que la administración de té verde durante diez días por vía oral (libre acceso) no incrementa de manera estadísticamente significativa las frecuencias de MN, por lo que se puede decir que no presentó efectos genotóxicos. En estudios en los que se han administrado diversas dosis de té verde de manera aguda y crónica, tampoco se han reportado efectos genotóxicos, si no por el contrario observaron disminución de daño

genotóxico, por lo que se ha planteado que los mecanismos pueden estar relacionados con activación enzimática (Narisawa y Fukaura, 1993; Wang *et al.*, 2000; Dufresne y Farnworth, 2001; Lin *et al.*, 2003; Isbrucker *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2008). La administración de dos dosis de 625 mg/Kg de rutina no incremento de manera estadísticamente significativa la frecuencia de MN. En estudios previos de evaluaciones de genotoxicidad realizados con la técnica de MN, tampoco se encontró inducción de MN o daño genotóxico al ser administradas dosis de 2x2500, 2x1250 y 2x625 mg/Kg en ratones (da Silva *et al.*, 2002). En estudios *in vitro* realizados en cultivos de células de mamíferos tampoco se ha reportado genotoxicidad, ni en cultivos de linfocitos humanos (Ündeğer *et al.*, 2004; Marcarini *et al.*, 2011). La administración de 100 mg/Kg de quercetina tampoco incrementó las frecuencias de MN. En estudios previos en cultivos celulares (linfocitos humanos y células HepG2), tampoco se observó daño genotóxico al administrar concentraciones diferentes dosis de quercetina (Ündeğer *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2008). En estudios realizados en ratas Brown Norway y Wistar, a las cuales se les administraron dosis de 8 a 80 mg/kg de peso por vía oral durante 3, 14 y 40 días, no se observaron daños al ADN, al evaluar las células de médula ósea y de bazo (Cierniak *et al.*, 2004; Kapiszewska *et al.*, 2007; Papiez *et al.*, 2008; Uzun *et al.*, 2010). Cabe señalar que, la quercetina ha mostrado tener tanto propiedades antimutagenicas como mutagenicas (Ündeğer *et al.*, 2004). El efecto antioxidante y prooxidante de la quercetina ha sido descrita por varios estudios; en un estudio en donde se utilizan células HepG2 se observó el efecto antioxidante cuando las células son incubadas con una dosis de 10 a 100 $\mu\text{mol/L}$ de quercetina por 30 minutos, pero cuando las células son incubadas con una dosis de 100 $\mu\text{mol/L}$ por más tiempo se observa un efecto prooxidante por parte de la quercetina (Gyo-Nam y Hae-Dong, 2009). Se ha descrito que la administración de quercetina, a grandes dosis presenta una baja actividad mutagénica (da Silva *et al.*, 2002), así como su administración de manera crónica, se ha relacionado con el desarrollo de tumores en el tracto urinario de las ratas (Álvarez y Orallo, 2003). La genotoxicidad que llega a presentar la quercetina, puede ser el resultado de la producción de ERO's, mediante su oxidación, por lo que se ha planteado que la quercetina, puede presentar procesos de auto-oxidación y dar lugar al ion superóxido que a su vez puede conducir a la formación de H_2O_2 e inducir daño al ADN (Rueff *et al.*, 1992; Gaspar *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1994). Sin embargo, se ha observado que la quercetina, no induce daño genotóxico *in vivo*, lo que ha sido relacionado con su baja biodisponibilidad y por su degradación (en su forma aglicona) causada por la microflora bacteriana intestinal o por O-metilación, glucuronidación y sulfatación en el tracto gastrointestinal (Boerma *et al.*, 2002).

Por otra parte, cuando se administraron 20 mg/kg de CrO_3 por vía i.p., se observó que se incrementaron las frecuencias de MN, lo cual corrobora el daño genotóxico previamente reportado para los compuestos de Cr (VI) y en particular para el CrO_3 (García-Rodríguez *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2003; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2006; Henkler *et al.*, 2010). En el presente estudio se realizó la cinética de inducción de MN mediante las evaluaciones durante 72 horas, se observó que el mayor efecto se presentó en las 24 y 48 horas, lo cual puede estar relacionado con la farmacocinética en general del compuesto, ya que se ha

reportado que la distribución y biotransformación de los agentes químicos se presenta entre las 24 y 48 horas después de su administración (Heddle *et al.*, 1983; Hayashi *et al.*, 1990). El mecanismo de daño genotóxico de los compuestos de Cr(VI) se ha relacionado con su reducción intracelular de Cr (VI) a Cr(III), ya que los compuestos de Cr(VI) al tener la capacidad de atravesar la membrana celular a través de transportadores de aniones no específicos son reducidos dentro de la célula rápidamente por la interacción con moléculas citoplasmáticas a cromo (V), (IV) y (III) los cuales tienen afinidad con las bases y los grupos fosfato de la cadena de ADN, durante este proceso se generan ERO's y RL, mismos que también pueden inducir daño a la cadena del ADN mediante rupturas y formación de aductos en la cadena de ADN, así como entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteína e inhibición de la síntesis de ADN (O'Brien *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006). Estos efectos pueden conducir a la formación de MN y AC (Sirover y Loeb, 1976; Levis y Majone, 1979; Gómez-Arroyo *et al.*, 1981; Tsuda y Kato, 1997; García-Rodríguez *et al.*, 2001).

Cuando se administró previamente el té verde por vía oral (acceso libre durante 10 días) a la aplicación del CrO₃ se disminuyeron las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado sólo con CrO₃ en un 43, 47 y 93 % para las 24, 48 y 72 horas respectivamente, por lo que la administración de té verde protegió del daño genotóxico inducido por CrO₃. Sasaki *et al.*, (1993) observaron también protección de daño genotóxico del té verde, ya que al administrarlo por vía oral se disminuyeron las frecuencias de MN inducidas por el benzo-a-pireno en muestras de sangre periférica de ratón. En otros estudios también se ha reportado la capacidad del té verde de proteger del daño genotóxico tales como la disminución en la formación de aductos de ADN en pulmón de ratones inducidos por el carcinógeno cetona nitrosamina (NNK) (Xu *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 1995), la supresión de AC inducidas por AFB1 en células de medula ósea de ratas (Ito *et al.*, 1989). Por lo que, se ha propuesto al té verde para prevenir el daño de agentes que inducen genotoxicidad (Narisawa y Fukaura, 1993; Dong-Xin *et al.*, 2003). Cabe señalar, que también se ha observado que la administración de té verde puede inhibir los procesos de carcinogénesis en ratón (Katiyar *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995, Yang *et al.*, 2002; 2005). En un estudio realizado por Katiyar *et al.*, (2007), observaron que la administración de té verde como única fuente de líquido a ratones disminuye los papilomas en un 80 %, los queratoacantomas en un 53 % y los carcinomas en un 32 %. Por su parte, Srinivasan *et al.* (2008), observaron que la administración de té verde reduce el número y tamaño de tumores inducidos por 4-Nitroquinolina 1-óxido (4-NQO) en la cavidad oral de ratas. En otros estudios, también se ha observado el té verde tiene la capacidad de inhibir la proliferación celular en células cancerígenas renales (Carvalho *et al.*, 2010). Particularmente en humanos, se ha observado en estudios epidemiológicos llevados a cabo en la ciudad de Shanghai, que el consumo de té verde reduce el riesgo de desarrollar cáncer de esófago (Gao *et al.*, 1994).

Dentro de los mecanismos planteados para el té verde sobre los procesos carcinogénicos se encuentra su capacidad de inhibir la formación de aminas heterocíclicas, las cuales se han asociado con el desarrollo de cáncer de páncreas, colon y mama (Parvez *et al.*, 2006; Ogura *et al.*, 2008) y su potencial antioxidante, ya que la suplementación de té verde puede reducir

el daño oxidante renal en ratas inducido por agentes cancerígenos con propiedades oxidantes (Khan *et al.*, 2009). Estudios en humanos así como en modelos animales, han mostrado protección contra enfermedades causadas por estrés oxidante, al consumir aproximadamente de 1 a 2.5g de té verde/150-200ml de agua. Kada *et al.* (1985) también reportan como mecanismo anticarcinogénico del té verde a su actividad bioantimutagenica contra mutaciones resultantes de la alteración de ADN-polimerasa III en la cepa NIG1125 de *Bacillus subtilis* (bacteria Gram positiva).

El hecho de que en el presente estudio la administración oral de té verde (acceso libre durante diez días) disminuyera las frecuencias de MN indica que el té verde protege del daño al ADN en EPC causado por agentes genotóxicos como el CrO₃. La mayor protección del té verde se observó a la hora 72 (93 %), esto puede ser debido a que durante las primeras horas de evaluación (hora 24 y 48), aún se estaba llevando a cabo la distribución y biotransformación del CrO₃ (Hedde *et al.*, 1983; Hayashi *et al.*, 1990) y para la hora 72 el efecto del CrO₃ es menor por lo que la dosis de té verde fue la suficiente para proteger casi totalmente el efecto del Cr (VI). El mecanismo de protección de daño genotóxico del té verde puede estar relacionada con el potencial antioxidante que le confieren algunos de sus componentes como lo son los flavonoides. Se ha descrito que los compuestos de Cr (VI) inducen daño al ADN mediante la generación de ERO's y RL, por lo que los componentes antioxidantes del té verde pudieran interaccionar con los RL y ERO's, y de esa forma inhibir el daño genotóxico. Por otra parte, como se describió solo se observó una protección parcial del té verde sobre el daño genotóxico inducido por el CrO₃, lo cual pudo deberse a: i) El origen del té empleado, ya que se ha observado que la cantidad de polifenoles presentes en el té, dependen de factores ambientales como el clima, la cantidad de luz recibida, temperatura, disponibilidad de nutrientes, practicas de horticultura y la edad de las hojas empleadas (Kuroda y Hara, 1999; Komes *et al.*, 2010), ii) las diferencias individuales en el metabolismo y biodisponibilidad de cada flavonoide presente en el té verde (Lambert y Elias, 2010), iii) la forma en la que se preparó la infusión de té verde, ya que ésta juega un papel importante en el grado de protección debido a que pueden perderse los compuestos fenólicos que contiene, se ha demostrado que sí después de preparar la infusión el extracto se filtra se garantiza que el filtrado contendrá un mayor porcentaje (16-30%) de flavonoides lo cual resultara en una mayor protección (Ogura *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Komes *et al.*, 2010; Lambert y Elias, 2010), iv) el tiempo y la temperatura durante la extracción del té verde, ya que se ha descrito que para obtener una gran contenido polifenólico, la extracción idónea del té verde debe ser a temperaturas altas (80-100°C) por poco tiempo (10-15 minutos) (Komes *et al.*, 2010), v) la presentación del té, ya que se ha demostrado que la presentación en polvo proporciona una mayor protección al conservar la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de té por lo que se ha sugerido que en lugar de consumir el té verde más común se consuma la presentación en polvo que se utiliza en la ceremonia del té (Weil y Daley, 2002), vi) el tiempo de almacenamiento del té, ya que se ha observado que durante las primeras 4 horas una vez preparado es cuando se presenta la mayor concentración de los polifenoles (Yang *et al.*, 2007; Komes *et al.*, 2010), vii) el bajo

consumo de la cantidad de té verde por los ratones (y como consecuencia el bajo consumo de flavonoides). Se ha observado que al utilizar grandes concentraciones de té verde, siempre dan inhibiciones completas contra la actividad mutagénica, debido a una mayor concentración de los polifenoles del té verde en el plasma, incrementando así el estado antioxidante de las células en una manera dosis-dependiente (Stavric *et al.*, 1996; Clement, 2009). Se ha descrito que por cada 2 gramos de té en 200 ml de agua contiene aproximadamente de 30 a 40 % de flavonoides (Caderni *et al.*, 2000; Fujiki *et al.*, 2002; Chandra *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007; Srinivasan *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Katiyar, 2010; Komes *et al.*, 2010). Dado lo anterior se plantea estudiar directamente los efectos de los componentes antioxidantes del té verde.

Al evaluar el efecto de compuestos antioxidantes presentes en el té verde contra el daño genotóxico inducido por la aplicación de 20 mg/Kg de CrO₃, mediante las evaluaciones de las frecuencias de MN, se redujeron las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado sólo con CrO₃. Se ha propuesto que la rutina posee una gran actividad antioxidante debido a su capacidad para inactivar los RL (Yang *et al.*, 2008). La actividad antioxidante de la rutina ha sido descrita como el resultado de la combinación de la quelación de metales vía la estructura ortho-hidroxi fenolicos y por la capacidad de neutralizar RL. Como consecuencia de su estructura fenolica la rutina puede actuar como donador de hidrogeno y suprimir la formación de RL, en los tres diferentes estados de formación: La formación de ion superóxido, la formación de radicales hidroxil en la reacción de fenton y la formación de radicales lipidicos (López-Revuelta *et al.*, 2006; Caillet *et al.*, 2007). La quercetina también ha mostrado una gran actividad antioxidante debido a su capacidad para neutralizar RL y por la quelación de metales, también se ha propuesto que es capaz de modular actividades de diferentes enzimas que activan carcinógenos, modificar vías de señales de transducción, interaccionar con receptores y otras proteínas, e interaccionar con varias biomoléculas (Aherne y O'Brien, 2000; Murakami *et al.*, 2008; Uzun *et al.*, 2010). Las actividades químicas de la quercetina y rutina se deben principalmente a la donación de electrones, que se debe a la presencia del grupo hidroxilo fenólico. Esta propiedad es esencial para su gran actividad antioxidante en especial para la neutralización de RL, como son el ion superóxido, radicales perhidroxil y radicales peroxil (Murakami *et al.*, 2008). Como se describió en los resultados, la administración previa de rutina (dos dosis vía i.p.) al tratamiento con CrO₃ también disminuyó las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado sólo con CrO₃ en un 83, 82 y 78% para las 24, 48 y 72 horas respectivamente, por lo que, la rutina presentó una mayor protección contra el daño inducido por CrO₃. Estudios previos realizados en cultivos celulares (células Caco-2), se ha reportado que la rutina protege en un 18% contra el daño genotóxico inducido por Tert-butil-hidroperoxido, mediante la quelación de iones metálicos (Aherne y O'Brien, 2000). Otros estudios en los que se ha evaluado la actividad antiradical de la rutina han mostrado que puede neutralizar RL formados a partir de 2,2-difenil-1-picoyhidracil (DPPH) en cultivos de células HepG2 (Ramos *et al.*, 2008). En cultivos celulares de linfocitos humanos se observó que su incubación con rutina junto con mitomicin C, los protege contra el daño al ADN, inducido por mitomicin C, mediante la formación de peróxido y radicales

hidroxil, lo cual sugiere que la protección observada por la rutina se debe a su gran capacidad de neutralizar RL (Ündegör *et al.*, 2004). En cultivos de células hepáticas se observó la actividad antígenotóxica de la rutina, al disminuir el porcentaje del daño, inducido por benzo[a]pireno, hasta en un 50% (Marcarini *et al.*, 2011). Hyun-Jung *et al.* (2000) evaluaron la habilidad de varios flavonoides, entre ellos la rutina, contra el daño inducido por benzo[a]pireno en células HepG2, en su estudio las células fueron tratadas con 4 μM de benzo[a]pireno y con 131.8 μM de rutina por 72 horas, con lo cual se observó una reducción del daño hasta en un 50 %. Romero *et al.* (2002) demostraron que 96 horas de tratamiento de rutina disminuye la proliferación de células LNCaP (cáncer de próstata), sus resultados muestran que la rutina, a concentraciones de 50 y 75 μM , inhibe la proliferación de estas células a partir de la hora 24 de tratamiento; también se ha observado en otros estudios *in vitro* que la rutina tuvo un notable efecto en cuanto a la eliminación de RL formados a partir de DPPH, estos resultados indicaron una gran actividad de inhibición o eliminación de RL por parte de la rutina, en particular de los radicales hidroxil (Yang *et al.*, 2008).

Cuando se combinaron los tratamientos de quercetina y CrO_3 se presentó un efecto dual, ya que a las 24 y 72 horas se disminuyeron las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 , en un 88 y 85 % respectivamente, mientras que a la hora 48 se incrementó con respecto al grupo testigo, esto puede deberse a un efecto tanto antioxidante como prooxidante (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Estudios previos en cultivo de células CACO-2 se observó que la quercetina protegió en un 50% contra el daño al ADN inducido por tert-butil hidroperóxido, mediante la quelación de iones metálicos y eliminación de RL (Aherne y O'Brien, 2000). En un estudio realizado en células HepG2, se observó que la incubación con 10 a 100 $\mu\text{mol/L}$ de quercetina disminuye la generación de ERO's inducida por H_2O_2 , en una manera dosis-dependiente; estos resultados indican que el mecanismo por el cual la quercetina protegió fue por la eliminación de las ERO's o por la degradación del H_2O_2 (Gyo-Nam y Hae-Dong, 2009). Otro estudio en el cual se utilizaron las mismas células, se observó una disminución en los niveles de ERO's inducido por tert-butil hidroperóxido, al incubarse con 5 y 10 μM de quercetina por 2 y 20 horas (Alía *et al.*, 2006). Ramos *et al.* (2008), observaron que la quercetina a una dosis de 25 y 50 μM protege contra el daño al ADN, inducido por tert-butil hidroperóxido, en células HepG2, en un 17 y 29% respectivamente. Liu y Zheng (2002) también observaron, que la quercetina protege contra el daño al ADN inducido por H_2O_2 , en un rango de dosis de 3.1-25 μM . Estudios *in vivo* han mostrado que la administración de quercetina inhibe la peroxidación lipídica inducida por Fe^{2+} en hígado de ratas (Cai *et al.*, 1997). En otro estudio se observó que la administración de 50 mg/kg de peso de quercetina a ratas winstar, protege contra la genotoxicidad inducida por nicotina, mediante la disminución de la peroxidación lipídica, disminución de daño al ADN y el incremento en el estado antioxidante (Muthukumaran *et al.*, 2008). En otro estudio se observó que la administración a ratas de 50 mg/kg de peso de quercetina, protege contra el daño al ADN inducido por radiación UVA, al neutralizar las ERO's (Erden-Inal y Kahraman, 2000). Wätjen *et al.* (2005), observaron que la administración de quercetina (10-25 $\mu\text{mol/L}$)

protege contra el daño al ADN inducido por H_2O_2 . Se ha observado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* que la quercetina puede ejercer tanto efectos antioxidantes como prooxidantes, que van a depender del estado redox de la célula y del tiempo y la dosis empleada de quercetina; se ha descrito que bajas dosis de quercetina resulta en un efecto antioxidante, mientras que a grandes dosis se obtiene un efecto prooxidante (Papiez *et al.*, 2008; Vargas y Burd, 2010). El efecto prooxidante de la quercetina se debe principalmente a su oxidación. El primer producto de la oxidación de la quercetina es el radical semiquinona, este radical es inestable y rápidamente sufre una segunda reacción de oxidación la cual produce otra quinona; las moléculas de oxígeno reaccionan con estos radicales resultando en la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . Estas ERO's afectan las vías de señalización celular redox y causan daño oxidante a la célula. Esta oxidación que presenta la quercetina puede explicar la razón por la cual acelera el daño celular y/o actúa como un mutágeno (Murakami *et al.*, 2008; Gibellini *et al.*, 2011). Lo cual podría estar relacionado con el incremento de MN observado a la hora 48 en nuestro estudio. Se ha observado que la administración a animales de experimentación de quercetina de manera crónica, durante periodos relativamente largos, se ha relacionado con el desarrollo de tumores en el tracto urinario de las ratas, sin embargo no se ha podido confirmar en otros estudios (Alvarez y Orallo, 2003). En estudios en cultivos celulares se ha observado que la administración de 100 $\mu\text{mol/L}$ de quercetina por largos periodos de tiempo, resulta en un efecto prooxidante para las células HepG2 (Gyo-Nam y Hae-Dong, 2009). En otro estudio *in vitro* observaron daño celular, al incubar las células por 72 horas con grandes dosis de quercetina (25 μM) (Ramos *et al.*, 2008).

En el presente estudio se observó que la administración de rutina y quercetina, de manera independiente, tuvo un mayor porcentaje de protección que la administración de té verde. La mayor protección observada por parte de los flavonoides administrados, comparada con la protección observada por la administración de té verde, pudo deberse a que la dosis empleada tanto de rutina como de quercetina 2 X 625 mg/kg y 100 mg/Kg, respectivamente, supera de manera significativa, a las que se consumen solo con té verde, ya que se ha observado que el consumo de una taza de té verde (2 g de té) sólo contiene 2-10 % de estos flavonoides, también se ha descrito que por cada Kg de té verde se encuentran aproximadamente 2.8 gramos de quercetina y 5.1 gramos de rutina (Wang *et al.*, 2001; Rijken *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010). En este estudio también se puede observar que se presentó una ligera diferencia en los porcentajes de protección de rutina comparada con quercetina, ésta diferencia puede deberse al efecto prooxidante que presenta la quercetina al oxidarse.

Debido a que en los tratamientos combinados de rutina y quercetina se observó la protección más alta (83% y 88 %) sobre el daño al ADN inducido por la exposición a CrO_3 de los ratones CD-1, se decidió evaluar el efecto de la administración simultánea de estos dos flavonoides. La administración simultánea de rutina y quercetina, incrementa las frecuencias de MN a las 48 y 72 horas (aproximadamente 2 MN) que no resultan estadísticamente significativas y que puede ser debido a un efecto sinérgico entre estos dos flavonoides y al efecto prooxidante por parte de la quercetina (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). La protección

observada al administrar simultáneamente estos dos flavonoides, fue menor que la que se presentó con la administración independiente de cada uno de los tratamientos. En estudios previos *in vitro* se observó que la rutina tuvo un notable efecto en cuanto a la eliminación de RL formados a partir de DPPH, estos resultados indicaron una gran actividad de inhibición o eliminación de RL por parte de la rutina, en particular de los radicales hidroxil (Yang *et al.*, 2008). En otro estudio se observó que la administración a ratas de 50 mg/Kg de peso de quercetina, protege contra el daño al ADN inducido por radiación UVA, al neutralizar las ERO's (Erden-Inal y Kahraman, 2000). La baja protección que se observó en este estudio al administrar rutina y quercetina simultáneamente, comparada con la protección observada al administrarlos individualmente, se puede deber a que se presentó un efecto sinérgico entre estos dos flavonoides. Se ha propuesto que la rutina es rápidamente absorbida en la membrana apical de las células intestinales de absorción, debido a que es un glucósido, una vez absorbida la rutina es hidrolizada a su forma aglicona (quercetina) por β -glucosidasa de los microorganismos intestinales, de esta manera el flavonoide es más activo (Gyo-Nam y Hae-Dong, 2009) y se metaboliza por las transferasas de las células intestinales de absorción (Gibellini *et al.*, 2011). Sin embargo, la conversión metabólica de la rutina, reduce la actividad para eliminar los RL, comparada con la actividad de la administración de quercetina sin haber pasado por hidrolización (Murakami *et al.*, 2008). La baja actividad para eliminar los RL, más el efecto prooxidante de quercetina, contribuyen a una pérdida o enmascaramiento de la protección oxidante, situación que se pudo haber presentado en nuestro estudio al administrar simultáneamente rutina y quercetina, por lo que se disminuyó la protección al ADN inducido por el CrO_3 , en comparación con las tratamientos independientes.

En cuanto al efecto citotóxico, al administrar los tratamientos empleados en el presente estudio, no se observaron modificaciones estadísticamente significativas en las frecuencias de MN en ninguna de las horas de evaluación. Se ha descrito que el daño citotóxico puede determinarse por la reducción de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC (Vallarino-Kelly y Morales-Ramírez, 2001). Sin embargo, cabe mencionar que la evaluación de este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (Krishna *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 2000). En estudios previos tampoco se han reportado efectos sobre las frecuencias de EPC con respecto a los ENC con tratamientos de Cr(VI) (García-Rodríguez, 2006; Macedo, 2010) ni con los tratamientos con los flavonoides empleados en el presente estudio (da Silva *et al.*, 2002; Coimbra *et al.*, 2006; Papiez *et al.*, 2008; Marcarini *et al.*, 2011).

IX. Conclusiones y comentarios finales

- La administración de té verde, rutina y quercetina a ratones de la cepa CD-1 no inducen daño genotóxico, ya que no incrementan de manera estadísticamente significativa la frecuencia de MN con respecto al grupo testigo.
- La administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. induce daño genotóxico ya que incrementó la frecuencia de MN de manera estadísticamente significativa.
- La administración previa del té verde y de los flavonoides protege del daño genotóxico inducido por el tratamiento de CrO₃, ya que se presentó una disminución en las frecuencias de MN a las 48 horas en el siguiente orden: rutina (82 %)> quercetina (53 %)> té verde (47 %).
- La administración de quercetina previa al tratamiento de CrO₃ presenta un efecto dual, ya que se disminuyen las frecuencias de MN a las 24 y 72 horas y se incrementan a la hora 48, por lo que se sugiere que la quercetina presenta un efecto anti y prooxidante.
- La administración simultánea de rutina y quercetina presenta una menor protección del daño genotóxico inducido por el CrO₃ en comparación con las administraciones independientes de cada uno de los tratamientos, lo cual puede ser debido a una interacción entre ambos flavonoides.
- La administración de los tratamientos, té verde y flavonoides, y CrO₃ no presentan efectos citotóxicos, al ser evaluados con la relación de EPC con respecto a los ENC, ya que no se modificaron las frecuencias al comparar con los grupos testigos, sin embargo, estos datos deben tomarse con reserva.

X. Referencias bibliográficas

- Adler, I. D; Bootman, J; Favor, J; Hook, G; Schriver-Schwemmer, G; Welzl, G; Whorton, E; Yoshimura, I; Hayashi, M. Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutation Research*. 1998; 417: 19-30.
- Aherne, A. Sharon; O'Brien, Nora. Mechanism of protection by the flavonoides, quercetin and rutin, against *tert*-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in CACO-2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; 6: 507-514.
- Alía, Mario; Ramos, Sonia; Mateos, Raquel; Granado-Serrano, Ana Belén; Bravo, Laura; Goya, Luis. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006; 212: 110-118.
- Álvarez, Castro E; Orallo, Cambeiro F. Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Bioquímica*. 2003; 10: 130-140.
- Anderson, D; Yu, T. W; Phillips, B. J; Schmezer, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research*. 1994; 307: 261-271.
- Arencibia, Arrebola D.F; Rosario, Fernandez Luis Alfredo; López, Ferial Yulieé; Díaz, Rivero Daiyana. Las plantas, fuentes de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. *Revista de Toxicología*. 2003; 37-51
- Arts, I. C; van de Putte, B; Hollman, P. C. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem*. 2000; 48: 1746-1751.
- ATDRS Agency for Toxic Substances and Disease Registry Toxicological Profile for Chromium September. P. H. S. US Department of Health and Human Services. 2000.
- Avello, Marcia; Suwalsky, Mario. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. 2006; 494: 161-172.
- Bagchi, D; Vuchetich, P. J; Bagchi, M; Hassaoun E; Tran, M. N; Tangs, L; Stosh. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate (Chromium VI) and Cadmium Chloride (CadmiumII) to rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997; 3: 471-478.

- Bender, M. Relationship on DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production, en: Generoso, W., Shelby F., Serres, F. DNA repair and mutagenesis in eukaryotes. Plenum. New York. 1980; 245-265.
- Bianchi, V; Dal, T. R; Debetto, P; Gino, L. A; Luciani, S; Majone, F; Tamino, G. Mechanism of Chromium Toxicity in mammalian cell cultures. Toxicology. 1980; 17: 219-224.
- Bieger, J. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. J. Nutr. 2008; 138: 1417-1420.
- Boersma, M. G; Van der Woude, H; Bogaards, J; Boeren, S; Vervoot, J; Cnubben, N. H. P; Van Lersel, M. L. P. S; Van Bladeren, P. J; Rietjens, I. M. C. M. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transfeeeeerases. Chem. Res. Toxicol. 2002; 15: 662-670.
- Boller, K; Schmid, W. Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon. Humangenetik. 1970; 1: 35-54.
- Bootman, D. A; Schlegel, T; Ardee, A. P. Anticarcinogenic potential of DNA-repair modulators. Mutation Research. 1988; 202: 393-411.
- Bridges, C. C; Zalups, R. K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. Toxicol Appl Pharmacol. 2005; 3: 274-308.
- Brooks, A. L; Schmizu, R. W; Bemson; Dautcher, J. S. The inductor 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. 1984; 150.
- Caderni, G; Filippo, C. D; Luceri, C. Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogénesis induced by azoxymethane in F344 rats. Carcinogenesis. 2000; 21: 1965-1969.
- Cai, Q; Rahn, R; Zhanga, R. Dietary flavonoides, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. Cancer Lett. 1997; 19: 99-107.
- Caillet, S; Yu, H; Lessard, S; Lamoureux, G; Ajdukovic, D; Lacroix, M. Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. Food Chemistry. 2007; 100: 542-552.
- Canada, A; Giannella, E; Nguyen, T; Mason, R. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. Fre Radic. Biol. Med. 1997; 22: 749-760.

- Carvalho, Márcia; Jerónimo, Carmen; Valentão, Patrícia; B., Andrade Paula; M., Silva Branca. Green tea: A promising anticancer agent for renal cell carcinoma. *Food Chemistry*. 2010; 122: 49-54.
- Chandra, K. Amar; De, Neela. Goitrogenic/ antithyroidal potential of green tea extract in relation to catechin in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48: 2304-2311.
- Chandra, Mohan K.V.P.; Hara, Abraham S. K; S. Nagini. Comparative evaluation of the chemopreventive efficacy of green and black tea polyphenols in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Clinical Biochemistry*. 2005; 38: 879-886.
- Chorvatovicová, D; Ginter, E; Kosinova, A; Zloch, Z. Effects of vitamins C and E on toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium in rat and guinea pig. *Mutation Research*. 1991; 262: 41-46.
- Cierniak, A; Papiez, M; Kapiszewska, M. Modulatory effect of quercetin on DNA damage, induced by etoposide in bone marrow cells and on changes in the activity of antioxidant enzymes in rats. *Rocz. Akad. Med. Białymst.* 2004; 49: 167-169.
- Clarkson, W. T; Friberg, L; Norberg, F. G; Sager, R. P. *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Ed. Plenum Press. New York. 1988; 369-382.
- Clement, Yuri. Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. *Preventive Medicine*. 2009; 49: 83-87.
- Clifford, M. N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med*. 2004; 70: 1103-1114.
- Coimbra, Susana; Castro, Elisabeth; Rocha-Pereira, Petronila; Rebelo, Irene; Rocha, Susana y Santos-Silva. Alice. The effect of green tea in oxidative stress. *Clinical Nutrition*. 2006; 25: 790-796.
- Cole, J; Skoper, 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*. 1994; 304: 33-106.
- Conte, C; Mutti, I; Puglisi, P; Ferrarin, A; Regina, G; Maestri, E; Marmiroli, N. DNA fingerprinting analysis by a pcr based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere*. 1998; 37: 2739-2749.
- Crespy, V. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J. Agric. Food Chem*. 2002; 50: 618-621.

- Da Silva, J; Herrmann, S. M; Heuser, V; Peres, W; Possa, Marroni N; González-Gallego, J; Erdtman, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*. 2002; 40: 941-947.
- Day, A. J; Williamson, G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br. J.* 2001; *Nutr.* 86 Suppl 1, S105-10.
- De Flora, S; Bennicelli, C; Camoirano, A; Serra, D; Romano, M; Rossi, G.A; Morelli, A; De Flora, A. In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathiones metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis*. 1985; 6: 1735-1745.
- De Pascual-Teresa, S; Santos-Buelga, C; Rivas-Gonzalo, J. C. Quantitative analysis of flavan 3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 5331-5337.
- De Vizcaya, Ruiz Andrea M. G; Del Razo, M. Luz. Daño oxidativo y enfermedades crónico-degenerativas asociadas a la contaminación ambiental. En *Radicales libres y estrés oxidativo*, de Fainstein Mina Konigsberg. México, Manual Moderno. 2008; 459-474.
- Delgado, M. E; Haza, A. I; Arranz, N; García, A; Morales, P. Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *European Journal of Nutrition*. 2008; 47: 479-490.
- Delgado, M. E; Haza, A. I; García, A; Morales, P. Myricetin, quercetin, (+)-catechin and (-)-epicatechin protect against N-nitrosamines-induced DNA damage in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro*. 2009; 23: 1292-1297.
- Depault, François; Cojocar, Marilena; Fortin, Fléchère; Chakrabarti, Saroj; Lemieux, Nicole. Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy in situ end-labeling (EM-ISEL) assay. *Toxicology in vitro*. 2006; 20: 513-518.
- Díaz, Sobac Rafael. Polifenoles. En *Radicales libres y estrés oxidativo*, de Fainstein Mina Konigsberg. México, Manual Moderno. 2008; 303-315.
- Dong-Xin, Lin; Thompson, A. Patricia; Candee, Teitel; Chen, Jun-shi; Kadlubar, F. Fred. Direct reduction of N-acetoxy-PhIP by tea polyphenols: a possible mechanism for chemoprevention against PhIP-DNA adduct formation. *Mutation Research*. 2003: 193-200.

- Dufresne, J. Christiane; Farnworth, R. Edward. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2001; 12: 404-421.
- Escamilla, Jiménez Christopher Isaac; Cuevas, Martínez Elvis Yane; Guevara, Fonseca Jorge. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Medigraphic. Rev Fac Med UNAM*. 2009; 2: 73-75.
- FDA Redbook. IV.C.1.d. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. 2000; 1-6.
- Ferguson, L. R; Philpott, M; Karunasinghe, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*. 2004; 198: 147-59.
- Flórez, Martínez S; Gallego, González J; J. M. Culebras, M. J; Tuñón, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Revisión. *Nutrición Hospitalaria*. 2002; 6: 271-278.
- Foulkes, E. C. Biological effects of heavy metals. CRC Press. 1990; 36-44.
- Fujiki, Hirota; Suganuma, Masami; Imai, Kazue; Nakachi, Kei. Green tea: cancer preventive beverage and/or drug. *Cancer Letters*. 2002; 188: 9–13.
- Gao, Y.T; McLaughlin, J.K; Blot, W.J; Ji, B.T; Dai, Q; Fraumeni, F. Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption. *J. Natl. Cancer Inst*. 1994; 86: 855-858.
- García-Rodríguez M.C; Altamirano-Lozano M. La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón in vivo. *Bioquímica*. 2007; 32: 15-24.
- García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res* 2001; 496: 145-51.
- García-Rodríguez, M. C. y Altamirano-Lozano, M. Estudios de los efectos de la clorofilina sobre la acción genotóxica y teratogénica del cromo VI. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, FES Zaragoza, UNAM. 2006.
- Gaspar, J; Laires, A; Monteiro, M. Quercetin and the mutagenicity of wines. *Mutagenesis*. 1993; 8: 51-55.
- Gilbellini, Lara; Pinti, Marcello; Nasi, Milena; Montagna, P. Jonas; De Biasi, Sara; Roat, Erika; Bertonecelli, Linda; Cooper, L. Edwin; Cossarizza, Andrea. Quercetin and Cancer Chemoprevention. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011; 1-15.

- Gómez-Arroyo, S. Altamirano, M. y Villalobos, R. Sister-chromatid exchanges induced by some chromium compound in human lymphocytes in vitro. *Mutación Research*. 1981; 91: 425-431.
- Gracia, Nava Manuel Alejandro. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. 2006.
- Graf, B. A. Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *J. Nutr.* 2006; 136: 39-44.
- Granado Serrano, Ana Belén. Estudios de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales de experimentación. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas. 2010.
- Guo, Shuhong; Bezard, Erwan; Zhao, Baolu. Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS-NO pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005; 39: 682-695.
- Gyo-Nam, Kim; Hae-Dong, Jang. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism in H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Natural Compounds and their role in apoptotic cell signaling pathways*. 2009; 1171: 530-537.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- Hansberg, Torres Wilhelm. El dioxígeno y sus especies reactivas. En *Radicales libres y estrés oxidativo*, de Fainstein Mina Konigsberg. México, Manual Moderno. 2008; 25-46.
- Harwood, M; Danielewska-Nikiel, B; Borzelleca, J. F; Flamm, G. W; Williams, G. M; Lines, T. C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45: 2179-2205.
- Hasegawa, R; Chujo, T; Sai-Kato, K; Umemura, T; Tanimura, A; Kurokawa, Y. Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane. *Food Chemistry Toxicol.* 1995; 33: 961-970.
- Hayashi, M; Mac, Gregor J; Gatehouse, D; Adler, I; Blaker, D; Dertinger, S; Krishna, G; Morita, T; Ruso, A; Suto, S. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatment, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Env. Mol. Mutagen.* 2000; 35: 234-252

- Hayashi, Makoto; Morita, Takeshi; Kodama, Yukio; Sofuni, Toshio; Ishidate, Motoi Jr. The micronucleus assay with mouse peripherals blood reticulocytes using acrimine orange-coated slides. *Mutation Research*. 1990; 245: 245-249.
- Heddle, A. J.; Hite, M.; Kirkhart, M. K.; Salamone, F. M. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. Ed. Elsevier Science Publisher. 1983; 83: 165-1110.
- Hemmink, K.; Dipple, A.; Shuker, D.; Fadlubar, F.; Segerback, D.; Bartsch, H. Adducts identification and biological significance. International Agency for Research on Cancer Lyons. IARC Scientific Publications. 1994; 125. 478.
- Henkler, F; Brinkmann, J; Luch, A. The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis Induced by Metals and Xenobiotics *Cancers*. 2010; 2: 376-396.
- Hertog, M. G.,L., Hollman, P. C.,H. & Katan, M.,B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric.n. Food. Chem*. 1992; 40: 2379-2383.
- Hong, S. J., Kim, S. I., Kwon, S. M., Lee, J. R. & Chung, B. C. Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med. J*. 2002; 43: 236-241.
- Hyun-Jung, K; Hyang-Sook, C; Yang, R. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced cytotoxicity and cytochrome P4501A activity by dietary flavonoides in human liver cells model: structure-activity relationship. *Biotech Lett*. 2000; 22: 1941-1946.
- Inal, Erden Mine; Kahraman, Ahmet. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology*. 2000; 154: 21-29.
- Isbrucker, R. A; Edwards, J. A; Wolz, E; Davidovich, A; Bausch, J. Safety estudios on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2. Dermal, acute and short-term toxicity studies, *Food Chem. Toxicol*. 2006; 44: 636-650.
- Ito, Y; Ohnishi, S; Fujie, K. Chromosome aberrations induced by aflatoxin B1 in rat bone marrow cells in vivo and their suppression by green tea. *Mutation Research*. 1989; 222: 253-261.
- Jhonson, J.J., Bailey, H.H. y Mukhtar, H. Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: A translational perspective. *Phytomedicine*. 2010; 17: 3-13.
- Kada, T; Kaneko, K; Matsuzaki, S; Matsuzaki, T; Hara, Y. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. A case of the green tea factor. *Mutation Research*. 1985; 150: 127-132.

- Kapiszewska, M; Cierniak, A; Papiez, M. A; Pietrzycka, A; Stepniewski, M; Lomnicki, A. Prolonged quercetin administration diminishes the etoposide-induced DNA damage in bone marrow cells of rats. *Drug Chem. Toxicol.* 2007; 30: 67-81.
- Katiyar, K. Santosh. Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2010; 1-9.
- Katiyar, S. K; Agarwal, R; Zaim, M. T; Mukhtar, H. Protection against *N*-nitrosodiethylamine and benzo[*a*]pyrene-induced forestomach and lung tumorigenesis in A/J mice by green tea. *Carcinogenesis.* 1993; 14: 849-855.
- Katiyar, Suchitra; Elmets, A. Craig; Katiyar, K. Santosh. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2007; 18: 287–296.
- Khan, A. Sara; Priyamvada, Shuba; Farooq, Neelam; Khan, Sheeba; Wasim, Khan Md. Y Yusufi, N. K. Ahad. Protective effect of green tea extract on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Pharmacological Research.* 2009; 59: 254-262.
- Khan, S.A; Priyamvada, S; Khan, W; Farooq, N; Yusufi, A.N. Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacol Research.* 2009; 60: 382-391.
- Kim, S. Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. *Nutr. Cancer.* 2000; 37: 41-48.
- Kimura, M., Arai, Y., Shimoj, K. & Watanabe, S. Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J. Epidemiol.* 1998; 8: 168-175.
- Klauning, J, y L. M. Kamendulis. The role oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004; 44: 239-267.
- Koda, Tomoko; Kuroda, Yoshiki; Imai, Hideki. Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats. *Nutrition Research.* 2008; 28: 629-634.
- Komes, Draženka; Horžic, Dunja; Belščak, Ana, Kovacevic, Ganic Karin; Vulic, Ivana. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International.* 2010; 43: 167-176.
- Krishna, G; Nath, J; Ong, T. Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C Inhibition *Cancer Res.* 1986; 46: 2670-2674.
- Krishna, Gopala; Hayashi, Makoto. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research.* 2000; 455: 155-166.

- Kuhnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 1976; 24: 117-191.
- Kuroda, Y. Antimutagenesis studies in Japan. In: Kuroda, Y., Shankel, D. M. y Waters, M. D. Editors. *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II.* New York, Plenum Press. 1990; 1-22.
- Kuroda, Yukiaki; Hara, Yukihiko. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research.* 1999; 436: 69-97.
- Lafay, S. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *J. Nutr.* 2006; 136: 1192-1197.
- Lambert, D. Joshua; Elias, J. Ryan. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: Arole in cáncer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2010; 501: 65-72.
- Lambert, D. Joshua; Yang, S. Chung. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutation Research.* 2003; 523-524: 201-208.
- Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G. Y., Liao, J. & Yang, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005; 81: 284S-291S.
- Lee, M. J. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1995; 4: 393-399.
- Levis, A. G. y Majone, F. Cytotoxic and clastogenic effects of soluble chromium compounds on mammalian cells cultures. *Br. J. Cancer.* 1979; 40: 523-533.
- Lin, Y. S; Wu, S. S; Lin, J. K. Determination of tea polyphenols and caffeine in tea flowers (*Camellia sinensis*) and their hydroxyl radical scavenging and nitric oxide suppressing effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2003; 51: 975-980.
- Liu, G. A; Zheng, R. L. Protection against damaged DNA in the single cell by polyphenols. *Pharmazie.* 2002; 57: 852-854.
- Liu, S.; Dixon, K. induction of mutagenic DNA by chromium (VI) and Glutathione. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 1969; 28: 71-79.
- López, Santiago Victoria. Estudio del efecto genotóxico y teratógeno del trióxido de cromo (CrO₃) durante el desarrollo fetal del ratón in vivo. Tesis de licenciatura. UNAM FES ZARAGOZA. México. 2001.

- López-Revuelta, Abel; Sánchez-Gallego, José I; Hernández-Hernández, Angel; Sánchez-Yagüe, Jesús; Llanillo, Marcial. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damage by oxidative stress. 2006; 161: 79-91.
- Lushchaka, Oleh V; Kubraka, Olha I; Lozinskya, Olexandr V; Storeyb, Janet M; Storey, Kenneth B; Lushchak, Volodymyr I. Chromium(III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney. *Aquatic Toxicology*. 2009; 93: 45-52.
- Macedo, C. Protección diferenciada de la clorofilina sobre el efecto genotóxico del trióxido de cromo en ratones machos in vivo. Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 2010.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79: 727-747.
- Manach, C; Monrad, C; Texier, O; Favier, M.-L; Agullo, G; Demigné, C; Régéat, F; Rémésy, C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *Journal of Nutrition*. 1995; 125: 1911-1922.
- Marcarini, Juliana Cristina; Ferreira, Tsuboy Marcela Stefanini; Cabral, Luiz Rodrigo; Ribeiro, Regina Lucia; Hoffmann-Campo, Clara Beatriz; Sérgio, Mantovani Mário. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2011; 63: 459-465.
- Martínez-Flórez, S., Gonzáles-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, J. M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 2002; 6: 271-278.
- Mateos-Nava, Rodrigo A. Efectos del vino tinto sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃ en el ratón *in vivo*. Tesis de licenciatura. UNAM FES ZARAGOZA. México. 2007.
- Mavournin, K. H.; Blakey, D. H.; Cimino, M. C.; Salamone, M. F.; 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.* 1990; 239: 29-80.
- Medeiros, G. H. Marisa. Daño al DNA. En *Radicales libres y estrés oxidativo*, de Fainstein Mina Konigsberg. México, Manual Moderno. 2008; 119-134.
- Mertz, W. Chromium Occurrence and Function in Biological Systems. *Physiological Reviews*. 1969; 42.

- Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón. Japan's specifications and standards for food additives. Octava edición. Enzymatically Decomposed Rutin. 2007; 221-222.
- Molina, Quijada Dulce M.A. Contenido de compuestos fitoquímicos y su relación con la capacidad antioxidante de extractos de pimientos (*Capsicum annum* L.) cultivados en el noroeste de México. Tesis de maestría. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. 2009
- Morita, Osuma; Kanapp, F. John; Tamaki, Yasushi; Stump, G. Donald; Moore, S. John; Nemeč, D. Mark. Effects of green tea catechin on embryo/fetal development in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2009; 47: 1296-1303.
- Müller, L.; Kikuchi, Y.; Probst, G. Schechtman, L.; Shimada, H.; Sofuni, T.; Tweats, D. ICH Harmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasons and impact. *Mutation Res*. 1999; 436: 195-225.
- Murakami, Akira; Ashida, Hitoshi; Terao, Junji. Multitargeted cancer prevention by quercetin. 2008; 269: 315-325.
- Muthukumar, Shanmugavelu; Ram, Sudheer Adluri; P, Menon Venugopal; Nalini, Namasivayam. Protective effect of quercetin on nicotine-induced prooxidant and antioxidant imbalance and DNA damage in Wistar rats. *Toxicology*. 2008; 243: 207-215.
- Nakazato, T., Ito, K., Ikeda, Y. & Kizaki, M. Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin. Cancer Res*. 2005; 11: 6040-6049.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F. & Scaccini, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem*. 2002; 50: 5735-5741.
- Narisawa, T; Fukaura, Y. A very low dose of green tea polyphenols in drinking water prevents N-methyl-N-nitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res*. 1993; 84: 1007-1009.
- Nassiri-Als, Marjan; Shariati-Rad, Schwann; Zamansoltani, Farzaneh. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2008; 32: 989-993.
- Natsume, M. Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic. Biol. Med*. 2003; 34: 840-849.

- Newman, M. C.; Intosh, A. W. Metal Ecotoxicology. Ed. Lewis Publishers. 1991; 395.
- Norseth, T. The carcinogenicity of Chromium. Environmental Health Perspectives. 1981; 121-130.
- O'Brien, T. J.; Fornsglio, J. L.; Ceryak, S.; Patierno, S. R. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. Mutation Res. 2003; 533. 3-36.
- Ogura, R; Ikeda, N; Yuki, K; Morita, O; Saigo, K; Blackstock, C; Nishiyama, N; Kasamatsu, T. Genotoxicity studies on green tea catechin. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46: 2190-2200.
- Olinski, R; Gackowski, D; Foksinski, M; Rozalski, R; Roszkowski, K; Jaruga, P. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, artherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. Free Radicals Biol. 2002, 33: 192-200.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Buijsman, M. N., van Amelsvoort, J. M. & Katan, M. B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. J. Nutr. 2003; 133: 1806-1814.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Vree, T. B. & Katan, M. B. Bioavailabilities of quercetin-3 glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. J. Nutr. 2000; 130: 1200-1203.
- Papiez, M. A; Cierniak, A; Krzysciak, W; Bzowska, M; Taha, H. M; Jozkowicz, A; Piskula, M. The changes of antioxidant defense system caused by quercetin administration do not lead to DNA damage and apoptosis in the spleen and bone marrow. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46: 3053-3058.
- Parvez, Suhel; Tabassum, Heena; Rehman, Hasibur; Dev, Banerjee Basu; Athar, Mohammad; Raisuddin, Sheikh. Catechin prevents tamoxifen-induced oxidative stress and biochemical perturbations in mice. Toxicology. 2006; 109-118.
- Pastore, L. Robert; Fratellone, Patrick. Potential health benefits of Green Tea (*Camellia sinensis*): A narrative review. Diet and Nutrition. 2006; 6: 531-539.
- Pérez, Trueba Gilberto. Los flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. Revista Cubana Invest Biomed. 2003; 22: 48-57.
- Pineda, Alonso Daymy; Salucci, Mónica; Lázaro, Regina; Maiani, Giuseppe y Ferro-Luzzi, Ana. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. Rev Cubana Alimentación Nutrición. 1999; 2: 104-111.

- Piskula, M. K., Yamakoshi, J. & Iwai, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett.* 1999; 447: 287-291.
- Ramos, A. A; Lima, C. F; Pereira, M. L; Fernandes-Ferreira, M; Pereira-Wilson, C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. *Toxicology Letters.* 2008; 177: 66-73.
- Ramos, Ibarra M. L, Batista, González C. M; Gómez, Meda B. C; Zamora, Pérez A. N. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en salud.* 2006; 001: 7-15.
- Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008; 52: 507-526.
- Rasmussen, S. E., Frederiksen, H., Struntze Krogholm, K. & Poulsen, L. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; 49: 159-174.
- Rijken, Philip J; Wiseman, Sheila A; Weisgerber, Ute M; van Mierlo, C. A. J; Quinlan, Paul T; van de Put, F. Antioxidant and Other Properties of Green and Black Tea. *Handbook of antioxidants. Second Edition, Revised and Expanded.* Taylor & Francis Group, LLC. 2002; p29.
- Romero, A; Paez, A; Ferruelo, M; Luja, N; Berenguer, A. Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells. *BJU Int.* 2002; 89: 950-954.
- Roth, Z; Aroyo, A; Yavin, S; Arav, A. The antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) moderates the deleterious effects of maternal hyperthermia on follicle-enclosed oocytes in mice. *Theriogenology.* 2008; 887-897.
- Roy, M; Chakrabarty, S; Sinha, D; Bhattacharya, R. K; Siddiqi, M. Anticlastogenic, antigenotóxica and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutation Research.* 2003; 523-524: 33-41.
- Rueff, J; Laires, A; Gaspar, J; Borba, H; Rodrigues, A. Oxygen species and the genotoxicity of quercetin. *Mutation Research.* 1992; 265: 75-81.
- Sahu, S. C; Gray, G. C. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Letters.* 1996; 104: 193-196.
- Sarkar, D; Sharma, A; Talukder, G. Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow *in vivo.* *Mutation Research.* 1993; 301: 33-38.

- Sasaki, Y.F; Yamada, H; Shimoi, K; Kator, K; Kinae, N. The clastogen-suppressing effects of green tea, Po-lei tea and Rooibos tea in CHO cells and mice. *Mutation Research*. 1993; 286: 221-232.
- Schmid, W. y Ledebur M. V. The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Res.* 1973; 19: 109-117.
- Seoane, A.I; Dulout, F.N. Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutation Research*. 2001; 490: 99-106
- Shi, X.; Dalal, N. S. The role of superoxide radical in the chromium (VI)-generated hydroxyl radical: The Cr (VI) Haber-Weiss cycle. *Biochemistry and biophysics*. 1992, 323-327.
- Singh, Rash, Nahid Akhtar, y Tariq M. Haqqi. Green tea polyphenol epigallocatechi3-gallate: inflammation and arthritis. *Life Sciences*. 2010; 86: 907-918.
- Sirover, M. A., y Loeb, L. A. Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens. *Science*. 1976; 194: 1434-1436.
- Soares, V; Varanda, E; Raddi, M. *In vitro* basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. *Food Chemistry Toxicol.* 2006; 39: 492-497.
- Soobrattee, G. J; Grass, L; Josephy, P. D; Goldberg, D. M; Diamandis, E. P. Acomparision of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin. Biochem.* 2002; 35: 119-124.
- Srinivasan, Periasamy; Suchalatha, Subramaniyan; Babu, Pon Velayutham Anandh; Devi, Rethinam Sundaresan; Narayan, Shoba; Sabitha, Kuruvimalai Ekambaram; Devi, Chennam Srinivasulu Shyamala. Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2008; 172: 224-234.
- Srinivasan, V. S. Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. *J. Nutr.* 2001; 131: 1349S-50S.
- Stavric, B, T.I Matula, R Klassen, y R.H. Downie. The effect of teas on the In vitro Mutagenic Potential of Heterocyclic Aromatic Amines. *Food and Chemical Toxicology*. 1996; 34: 515-523.

- Surh, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3: 768-780.
- Surh, Y.-J. y Ferguson, L. R. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential—highlights of a symposium. *Mutation Res.* 2003; 523-524.
- Talavera, S. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J. Nutr.* 2003; 133: 4178-4182.
- Tamino, G.; Peretta, L.; Levis, A. G. Effects of trivalent and hexavalent chromium on the physicochemicals properties of mammalian cell nucleic acids and synthetic polynucleotides. *Chem. Biol. interactions.* 1981; 37: 309-319.
- Tamura, T; Mitsumori, K; Muto, S; Kasahara, H; Kobayashi, S; Okuhara, Y; Hayashi, T; Onozato, T; Kuroda, J. Fifty-two week chronic toxicity of enzymatically decomposed rutin in Wistar rats. 2010; 48: 2312-2318.
- Tieppo, J; Vercelino, R; Dias, A. S; Silva Vaz, M. F; Silveira, T. R; Marroni, C. A; Marroni, N. P; Henriques, J. A. P; Picada, J. N. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chemical Toxicology.* 2007; 45: 1140-1146.
- Tsuda, H. y Kato, K. Chromosomal aberrations and morphological transformation in hamster embryonic cells treated with potassium dichromate in vitro. *Mutation Research.* 1977; 46: 87-94.
- Ündeğer, Ülkü; Aydın, Sevtap; Ahmet, Basaran A; Basaran, Nursen. The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. *Toxicology Letters.* 2004; 151: 143-149.
- Uzun, Gokce Fatma; Demir, Filiz; Kalender, Suna; Bas, Hatice; Kalender, Yusuf. Protective effect of catechin and quercetin on chlorpyrifos-induced lung toxicity in male rats. *Food and Chemical Toxicology.* 2010; 48: 1714-1720.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 2006; 160: 1-40.
- Vallarino-Kelly, T; Morales-Ramírez, P. Kinetics of micronucleous induction and citotoxic activity of colchicines in murine erythroblast in vivo. *Mutation Research.* 2001; 495: 51-59.
- Vargas, J. Ashley; Burd, Randy. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. 2010; 7: 418-428.

- Vega, G. S.; Reynaga, O. Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Ed. Limusa. México, D. F. 1990; p727.
- Wang, Huaifu; J., Provan Gordon y Helliwell, Keith. Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trends in Food Science and Technology*. 2000; 11: 152-160.
- Wang, Z.-Y; Wang, L.-D; Lee, M.-J; Ho, C.-T; Huang, M.T; Conney, A.H; Yang, C. S. Inhibition of *N*-nitrosomethylbenzylamine-induced oesophageal tumorogenesis in rats by green tea and black tea. *Carcinogenesis*. 1995; 16: 2143-2148.
- Wätjen, W; Michels, G; Steffan, B; Niering, P; Chovolou, Y; Kampkotter, A; Tran-Thi, Q. H; Proksch, P; Kahl, R. Low concentrations of flavonoides are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DANN damage and apoptosis. *J. Nutr.* 2005; 135: 525-531.
- Weil, A, y R. Daley. *The healthy kitchen*. New York: Alfred, 2002.
- Wu, Fang-Yang; Tsai, Fuu-Jen; Kuo, Hsien-Wen; Tsai, Chang-Hai; Wu, Wu-Yui; Wang, Ruey-Yun; Lai, Jim-Shoung. Cytogenetic study of workers exposed to chromium compounds. *Mutation Research*. 2000; 464: 289-296.
- Xu, Y; Ho, C.-T; Amin, S.G; Han, C; Chung, F.-L. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Research*. 1992; 52: 3875-3879.
- Yang, C. S., Lambert, J. D., Ju, J., Lu, G. & Sang, S. Tea and cancer prevention: and human relevance. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007; 224: 265-273.
- Yang, C. S; Liao, J; Yang, G. Y; Lu, G. Inhibition of lung tumorogenesis by tea. *Exp. Lung Res.* 2005; 31: 135-144.
- Yang, C. S; Maliakal, P; Meng, X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol.* 2002; 42: 25-54.
- Yang, D. Chung; Ju, Jihyeung; Lu, Gary; Xiao, Hang; Hao, Xingpei; Sang, Shengmin; Lambert, D. Joshua. Cancer prevention by tea and tea polyphenols. *Asia Pac J Clinic Nutr.* 2008; 17: 245-248.

XI. Anexos

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

Evento: XV Simposio de Ciencias de la Salud.

Título de la ponencia: “EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DURANTE DIEZ DÍAS DEL TÉ VERDE SOBRE LAS FRECUENCIAS DE MICRÓNÚCLEOS EN RATONES DE LA CEPA CD-1 TRATADOS CON TRIÓXIDO DE CROMO.”

Autores: Nicolás Méndez Tonancy, Altamirano Lozano Mario y García Rodríguez María del Carmen.

Organizador: Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Lugar y fecha: Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México D. F. del 22 al 24 de septiembre de 2010.

Evento: VII Foro de Investigación escolar en Biología.

Título de la ponencia: “ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TÉ VERDE ADMINISTRADO Ad libitum DURANTE DIEZ DÍAS SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO POR CrO3 EN RATONES DE LA CEPA CD-1.”

Autores: Nicolás Méndez Tonancy, Altamirano-Lozano Mario y García Rodríguez María del Carmen.

Organizador: La carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”, UNAM.

Lugar y fecha: Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”, UNAM. México D. F. 2, 3 y 4 de febrero de 2011.

Evento: XIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Título de la ponencia: “ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DEL TÉ VERDE SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO Y CITOTÓXICO INDUCIDO POR CrO3.”

Autores: García-Rodríguez, M.C. Nicolás-Méndez, T. y Altamirano-Lozano, M.

Organizador: Universidad Autónoma de Zacatecas.

Lugar y fecha: Zacatecas, Zacatecas, México. Celebrado del 26 al 27 de mayo de 2011.

Evento: Annual Meeting European Environmental Mutagen Society (EEMS).

Título de la ponencia: "EFFECT OF QUERCETIN AND RUTIN ON GENOTOXICITY OF HEXAVALENT CHROMIUM IN MICE *in vivo*."

Autores: M.C. García-Rodríguez; T. Nicolás-Méndez; M. Altamirano-Lozano.

Organizador: The European Environmental Mutagen Society (EEMS).

Lugar y fecha: Barcelona, España. Del 4 al 7 de julio de 2011.

Evento: VII Congreso de Investigación y I de Posgrado de la FES Zaragoza.

Título de ponencia: "EFECTO *in vivo* DEL TÉ VERDE SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR Cr(VI) EN EL RATÓN."

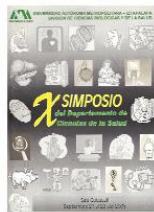
Autores: Tonancy Nicolás-Méndez, Mario Altamirano-Lozano y María del Carmen García-Rodríguez.

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

Lugar y fecha: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México D. F. del 25 al 28 de octubre de 2011.



MEMORIAS



Sala Cuicacalli Septiembre 22, 23 y 24

XV Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DURANTE DIEZ DÍAS DEL TÉ VERDE SOBRE LAS FRECUENCIAS DE MICRONÚCLEOS EN RATONES DE LA CEPA CD-1 TRATADOS CON TRIÓXIDO DE CROMO

Nicolás Méndez Tonancy, Altamirano Lozano Mario y García Rodríguez María del Carmen

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

Al consumo del té verde (*Camellia sinensis*) se la ha asociado con efectos benéficos en la salud como la disminución de algunos tipos de cáncer, enfermedades del corazón y hepáticas, esto debido a que es rico en compuestos con propiedades antioxidantes como los flavonoides (catequinas y miricetina). Se ha descrito que los polifenoles pueden inhibir la tumorigénesis inducida por agentes químicos y físicos (luz ultravioleta) en estudios realizados en ensayos con animales. Debido a que se ha propuesto que hay una relación de daño al ADN en distintos tipos de cáncer el objetivo de este trabajo consistió en evaluar los efectos del té verde al ser administrado durante diez días por vía oral sobre los daños al ADN inducidos por el trióxido de cromo (CrO_3), para la cual se empleó la técnica de micronúcleos (MN). Grupos de cinco ratones hembras de la cepa CD-1 fueron divididas y tratadas de la siguiente manera: a) grupo té verde, al cual se le administró *ad libitum* durante 10 días infusiones de té verde (3 g en 100 ml de agua); b) grupo cromo, el cual fue tratado con una dosis de CrO_3 (20 mg/kg) por vía intraperitoneal; y c) grupo té verde-cromo, en el cual se combinaron los tratamientos del grupo té verde y en el día diez de tratamiento se les aplicó el CrO_3 . Las muestras de sangre para la evaluación de los MN fueron tomadas de la vena caudal al inicio de los tratamientos (té verde), en el día diez de tratamiento con té verde y durante tres días después de los tratamientos con

CrO_3 (cada 24 horas). El daño al ADN se evaluó con las frecuencias de MN y el efecto citotóxico mediante la relación de los eritrocitos policromáticos con respecto a los normocromáticos, en ambos casos se empleó técnica de naranja de acridina. Se realizó una prueba de análisis de varianza, seguida de una prueba de Tukey para determinar estadísticamente si hubo daño al ADN con una $p < 0.05$. En los resultados obtenidos se observa que la administración de té verde durante diez días como única fuente de líquidos no induce MN, por lo que no causa daño al ADN. La aplicación de 20 mg/kg de peso corporal de CrO_3 induce daño al ADN a la hora 48 después de su administración el cual persiste hasta la hora 72 aunque ya no resulta estadísticamente significativo para esta última evaluación. Cuando se combinaron los tratamientos del té verde con el CrO_3 solo se observó una disminución de las frecuencias de MN a las 72 horas al igual que lo observado en previos estudios realizados en nuestro grupo de trabajo donde habíamos administrado el té verde por sonda solo dos días antes de la aplicación del CrO_3 , por lo que se sugiere realizar nuevos experimentos con otros protocolos y dosis de té verde para continuar con los estudios de la posible protección del daño al ADN. Las frecuencias de eritrocitos policromáticos, no se modificaron en ninguno de los tratamientos, lo que sugiere que no se presentaron efectos citotóxicos.

Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN209309.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

División de Ciencias Químico Biológicas

CARRERA DE BIOLOGÍA

VII FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

(VIII FORO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA, XXXVI FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR, XL FORO DE SALIDAS TERMINALES)

Que se llevará a cabo en el Campus II de la Facultad los días, 2, 3 y 4 de febrero de 2011.

MEMORIAS

Objetivos:

- ⊗ Promover y difundir los resultados de los proyectos de docencia-investigación que se desarrollan en los Laboratorios de Investigación Formativa y en los Laboratorios Integrales de Biología.
- ⊗ Ofrecer un espacio de intercambio académico para la comunidad estudiantil.
- ⊗ Contribuir al desarrollo de habilidades que faciliten en el alumno la comunicación de los resultados de su investigación.

**Trabajos con
reconocimiento**



VII Foro de Investigación Escolar
Carrera de Biología
Solicitud de registro de trabajo
2, 3 y 4 de febrero de 2011



Título:
ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TÉ VERDE ADMINISTRADO Ad libitum DURANTE DIEZ DÍAS SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO POR CrO₃ EN RATONES DE LA CEPA CD-1.

Autores:
Nicolás Méndez Tonancy¹; Altamirano-Lozano Mario² y García Rodríguez María del Carmen²

Modalidad	Ciclo
Por favor marque con una x	
X Oral	Básico
Cartel	Intermedio
Video	X Terminal

Resumen:

El té verde (*Camellia sinensis*) es una bebida rica en antioxidantes (flavonoides) y se le han atribuido efectos benéficos para la salud. Por otra parte, se ha descrito que los compuestos de cromo (VI) generan estrés oxidante y se les ha relacionado con daño genotóxico y con la inducción de algunos tipos de cáncer. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar los efectos del té verde sobre el daño genotóxico inducido por el CrO₃. Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD-1 las cuales fueron divididas en grupos de la siguiente manera: a) grupo testigo, se le administró solo agua potable ad libitum; b) grupo té verde, se le administraron durante 10 días infusiones de té verde (3 g en 100 ml de agua) ad libitum; c) grupo CrO₃, el cual fue tratado con una dosis de CrO₃ (20 mg/kg) por vía intraperitoneal; y d) grupo té verde-CrO₃, en el cual se combinaron los tratamientos de té verde y CrO₃. El daño genotóxico se evaluó con las frecuencias de micronúcleos (MN) en las muestras de sangre tomadas de la vena caudal al inicio de los tratamientos, y durante tres días después de la aplicación de CrO₃. Se observó que la administración de té verde como única fuente de líquidos (10 días) no induce MN. La aplicación de 20 mg/kg de peso corporal de CrO₃ induce daño genotóxico desde la hora 24 y persiste hasta las 72 horas. Cuando se combinaron los tratamientos del té verde con el CrO₃ se observó una disminución de las frecuencias de MN la cual fue más evidente a la hora 72. Se sugiere ampliar el estudio empleando otros protocolos y dosis de té verde para completar su posible efecto protector del daño genotóxico. Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN209309.

Palabras clave:
Té verde, genotóxico, micronúcleos, trióxido de cromo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
Organizan el:

XIII CONGRESO NACIONAL



**DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS**

26-27 de Mayo de 2011
Zacatecas, Zac. México



XIII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
Jueves 26 y viernes 27 de mayo de 2011
Zacatecas, Zac.



ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DEL TÉ VERDE SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO Y CITOTÓXICO INDUCIDO POR CrO₃

García-Rodríguez, M.C.* Nicolás-Méndez, T. y Altamirano-Lozano, M.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Batalla 5 de mayo s/n Esq. Fuerte de Loreto. Col. Ejército de Oriente. C.P. 09230, México D.F. Tel (55)56230772.

* grmc@puma2.zaragoza.unam.mx

RESUMEN:

El té verde es una bebida rica en antioxidantes a la que se le han atribuido efectos benéficos para la salud, como la prevención de algunos tipos de cáncer. Mientras que, a los compuestos de cromo (VI) se les ha relacionado con daño genotóxico y con la inducción de cáncer. En este estudio se evaluaron los efectos del té verde sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃. Ratones hembra de la cepa CD-1 fueron divididas en: a) grupo testigo (administración del vehículo); b) grupo té verde, (administración durante 10 días de infusiones de té verde *ad libitum* (6.5 ml/día)); c) grupo CrO₃, (aplicación de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p.); y d) grupo té verde-CrO₃, (combinación de los tratamientos té verde-CrO₃). El daño al ADN fue evaluado mediante el análisis de micronúcleos. Muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal al inicio del tratamiento con té y a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación del CrO₃. La administración de té verde no indujo micronúcleos. La aplicación de CrO₃ induce daño genotóxico desde la hora 24. Cuando se combinaron los tratamientos del té verde con el CrO₃ disminuyeron las frecuencias de micronúcleos (alrededor del 97% a las 72 horas). Proyecto financiado por DGAPA-UNAM IN209309.

ABSTRACT:

Green tea is a beverage that is rich with antioxidants and has been attributed beneficial health effects such as prevention of some types of cancer. On the other hand, chromium (VI) compounds have been associated with genotoxic damage and cancer induction. This study evaluated the effects of green tea on the genotoxic damage induced by CrO₃ on mice. Female mice CD-1 strain were divided into four groups: a) control (vehicle administration), b) green tea group, which was administered with an infusion of green tea *ad libitum* (6.5ml/day) for up to 10 days, c) CrO₃ group, that was applied with CrO₃ 20 mg/kg via i.p. finally d) CrO₃-green tea group to which combined treatments (green tea-CrO₃) were administrated. DNA damage was evaluated by the micronucleus test. Blood samples were obtained from the tail vein at the start of treatment with green tea and at: 0, 24, 48 and 72 hours after CrO₃ injection. It was observed that the administration of green tea did not induce micronuclei. The application of CrO₃ induce genotoxic damage at the time 24 h. When combined treatments of green tea with CrO₃ the samples shown a decreased in the micronucleus frequency (about 97% at 72 hours). Financial support was obtained fom DGAPA-UNAM IN209309.

Palabras clave:

Té verde, micronúcleos, trióxido de cromo, antioxidante, quimioprevención.



XIII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
Jueves 26 y viernes 27 de mayo de 2011
Zacatecas, Zac.



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 generados comercialmente y utilizados como parte integral de nuestra vida cotidiana (Vega y Reynaga, 1990). Dentro de los contaminantes químicos considerados como peligrosos se encuentran los metales pesados, por lo que la exposición a estos causa daño a los organismos, como toxicidad en las células, tejidos u órganos, así como también genotoxicidad y carcinogenicidad (Conte *et al.*, 1998). Aunque los metales poseen variados efectos en la salud como ya se mencionó, son ampliamente utilizados en las actividades industriales (Seoane, 2001). La toxicidad que presentan los metales depende de sus propiedades químicas, así como también del grado de solubilidad y su estado de oxidación (Newman e Itosh, 1991). Dentro de los metales más estudiados por sus efectos cancerígenos se encuentran los compuestos del cromo (VI), los cuales son ampliamente utilizados en diversas industrias. La reducción del cromo (VI) en las células genera especies reactivas de oxígeno (ERO's), que contribuyen al daño al ADN y por lo tanto a la actividad carcinógena del cromo (VI) (Wu *et al.*, 2000).

En contraparte, es posible contrarrestar los efectos dañinos inducidos por agentes tóxicos mediante una dieta preferentemente rica en componentes con propiedades antimutágenas, como lo pueden ser algunos antioxidantes. Se ha observado que la expectativa de vida en las sociedades esta influenciada por el estrés oxidante causado por radicales libres (RL) y Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) que producen daño a macromoléculas como las proteínas y al material genético. Particularmente, se ha encontrado que las frutas, los vegetales y algunos tipos de cereales tienen un alto contenido de componentes con propiedades antioxidantes que pueden neutralizar la acción de los RL y ERO generados por el estrés oxidante (Molina, 2009).

El té verde deriva de *Camellia sinensis*, consumido en la mayor parte del mundo; esta bebida es rica en flavonoides. La actividad de protección que presenta el té verde es debida a su alta concentración de catequinas y sus galatos (Rijken *et al.*, 2002). La actividad antimutagenica del té verde se ha demostrado en sistemas microbianos, en sistemas de células de mamíferos y en estudios *in vivo*. Se considera que el té es un agente que puede inhibir el desarrollo del cáncer, ya que se ha demostrado que el consumo de esta bebida reduce el riesgo de cáncer de estomago, de la cavidad oral, de pulmón y de esófago (Srinivasan *et al.*, 2008). Dado lo anterior el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del té verde sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃ mediante la evaluación de la frecuencia de micronúcleos (MN) en sangre periférica, en ratones tratados con una sola dosis de 20mg/Kg de CrO₃.



METODOLOGÍA

Se emplearon 20 ratones hembra de la cepa CD-1 de 2 a 3 meses de edad las cuales fueron divididas en grupos de cinco organismos de la siguiente manera:

- 1- Grupo testigo, solo se le administró agua potable *ad libitum*.
- 2- Grupo testigo negativo, se le administró té verde durante un período de diez días *ad libitum*.
- 3- Grupo testigo positivo, se le aplicó por vía intra-peritoneal (i.p.) una sola dosis de 20 mg/kg de CrO₃.
- 4- Grupo experimental, se le administraron tanto el té verde por un período de diez días y se le aplicaron 20mg/kg de CrO₃ por vía i.p. en el día 10 de tratamiento con té verde.

El té verde se preparó mediante la infusión de 3g de té en 100ml de agua potable (3 min.), posteriormente se dejó enfriar durante 10 min. y se colocó en bebederos oscuros. Las infusiones del té verde se prepararon diariamente durante los días de tratamiento. La cantidad consumida del té verde fue medida diariamente para calcular el índice de consumo de té verde por ratón.

Toma de muestras

Las muestras de sangre periférica (15 µl) se obtuvieron de la vena caudal de los ratones, mismas que se colocaron en laminillas previamente preparadas con naranja de acridina siguiendo la técnica de Hayashi (1990).

Se tomaron muestras de sangre a todos los grupos en el día que se inició la administración del té verde y hasta el día 10. Una vez que se aplicó el tratamiento con CrO₃ se tomaron muestras nuevamente durante 72 horas, cada 24 horas.

Análisis estadísticos

Los resultados que se obtuvieron de la frecuencia de MN y la frecuencia de EPC se analizaron en el paquete estadístico SPSS/PC V16TM. Los resultados se compararon mediante un análisis de varianza de una sola dirección, seguida de una prueba de Tukey.

El NIF y el DIF se analizaron con una Chi-cuadrada utilizando el paquete Statistica^{v6}. En todos los casos se considero un nivel de significancia de $p < 0.05$ (García-Rodríguez, *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó el efecto genotóxico en hembras a partir de los lineamientos de la Food and Drugs Administration (FDA). Se evaluaron los efectos del té verde sobre el daño genotóxico y citotóxico causado por CrO₃, partiendo de las propiedades



Figura 2. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN calculado para 2000 EPC para el grupo Té verde, el grupo cromo y el grupo combinado.

Los resultados observados en este estudio concuerdan con estudios realizados previamente con té verde, ya que se ha observado que su administración en infusión por vía *ad libitum* a roedores, presenta de igual manera una protección parcial contra agentes que inducen genotoxicidad (Dong-Xin *et al.*, 2003).

La forma en la que se preparó la infusión de té verde juega un papel importante en el grado de protección, ya que de esta manera pierde la mayoría de los compuestos fenólicos que contiene, conservando alrededor del 4.5% del total, sin embargo se ha demostrado que si después de preparar la infusión el extracto se filtra, se garantiza que el filtrado contendrá un mayor porcentaje de flavonoides lo cual resultará en una mayor protección (Orgura *et al.*, 2008). Dado lo anterior se puede plantear que el té verde protege del daño al ADN causado por agentes genotóxicos.

La administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. a los ratones hembra de la cepa CD-1 incrementó de forma estadísticamente significativa las frecuencias de MN, lo cual indica daño genotóxico. Se ha descrito que el Cr (VI) al ingresar al espacio intracelular interactúa con agentes reductantes e inicia el proceso reductor a los estados de Cr (V), Cr (IV) y Cr (III), que genera ERO's y RL que son capaces de producir lesiones en el ADN (O'Brien *et al.*, 2003). La protección observada del té verde puede estar relacionada con las propiedades antioxidantes que se atribuyen, ya que se ha propuesto que el té verde inhibe la producción de ERO's y presenta quelación de iones metálicos (Yang *et al.*, 2007).

En cuanto al efecto citotóxico, se ha descrito que se puede determinar por la reducción de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC. Sin embargo en la administración de los tratamientos de este trabajo, no se observaron modificaciones estadísticamente significativas en las frecuencias de EPC en ninguna de las horas de evaluación. Cabe mencionar que la evaluación de este parámetro se debe tomar con cierta restricción, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, al mismo tiempo se pueden activar los mecanismos de división y enmascarar dicho efecto (Krishna *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

- La administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. incrementa la frecuencia de MN, estadísticamente significativa, lo cual corrobora el daño genotóxico del compuesto.
- La administración de té verde durante diez días como única fuente de líquidos no induce MN, por lo que no es genotóxico.
- La administración previa de té verde durante diez días como única fuente de líquidos disminuye la frecuencia de MN inducida por la aplicación del CrO₃ en ratones de la cepa CD-1.



XIII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
Jueves 26 y viernes 27 de mayo de 2011
Zacatecas, Zac.



- La administración de té verde vía *ad libitum* no modifica las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, por lo que no presenta efectos citotóxicos evaluado con este parámetro.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), mediante la DGAPA con el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), No. de Proyecto IN209309. También agradecemos al M. en C. Alejandro Gordillo Martínez por su apoyo técnico y por las sugerencias en la revisión del trabajo.

REFERENCIAS

- Brooks, A. L; Schmizu, R. W; Bemson, y Dautcher, J. S. 1984. The inducible of sister chromatid exchanges by Environmental Pollutants: Relationship of SCE to other Measures of genetic damage, in: Sister Chromatid Exchange. Tice R. and Hollaender A. Plenum Publishing Corporation. 150.
- Conte, C; Mutti, I; Puglisi, P; Ferrarin, A; Regina, G; Maestri, E; Marmiroli, N. 1998. DNA fingerprinting analysis by a pcr based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. Chemosphere. 37: 2739-2749.
- Dong-Xin, Lin, A. Patricia Thompson, Candee Teitel, Chen Jun-shi, y F. Fred. Kadlubar. 2003. Direct reduction of N-acetoxy-PhIP by tea polyphenols: a possible mechanism for chemoprevention against PhIP-DNA adduct formation. Mutation Research 193-200.
- Hayashi, Makoto; Morita, Takeshi; Kodama, Yukio; Sofuni, Toshio; Ishidate, Motoi Jr. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acrimine orange-coated slides. Mutation Research 245:245-249.
- Hayashi, Makoto; MacGregor, J.T; Gatehouse, D.G; Adler, I; Blkey, D.H; Dertinger, S.D; Krishna, G; Morita, T; Russo, T; Sutuo, S. 2000. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design, and automated scoring. Environmental Mol. Mutagen. 35:234-252.
- Krishna, Gopala; Hayashi, Makoto. 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research 455: 155-166.
- Molina, Quijada Dulce M.A. 2009. Contenido de compuestos fitoquímicos y su relación con la capacidad antioxidante de extractos de pimientos (*Capsicum annum* L.) cultivados en el noroeste de México. Tesis de maestría. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Newman, M.C; Mc. Intosh, A W. 1991. Metal Ecotoxicology. Ed. Lewis Publishers 395.



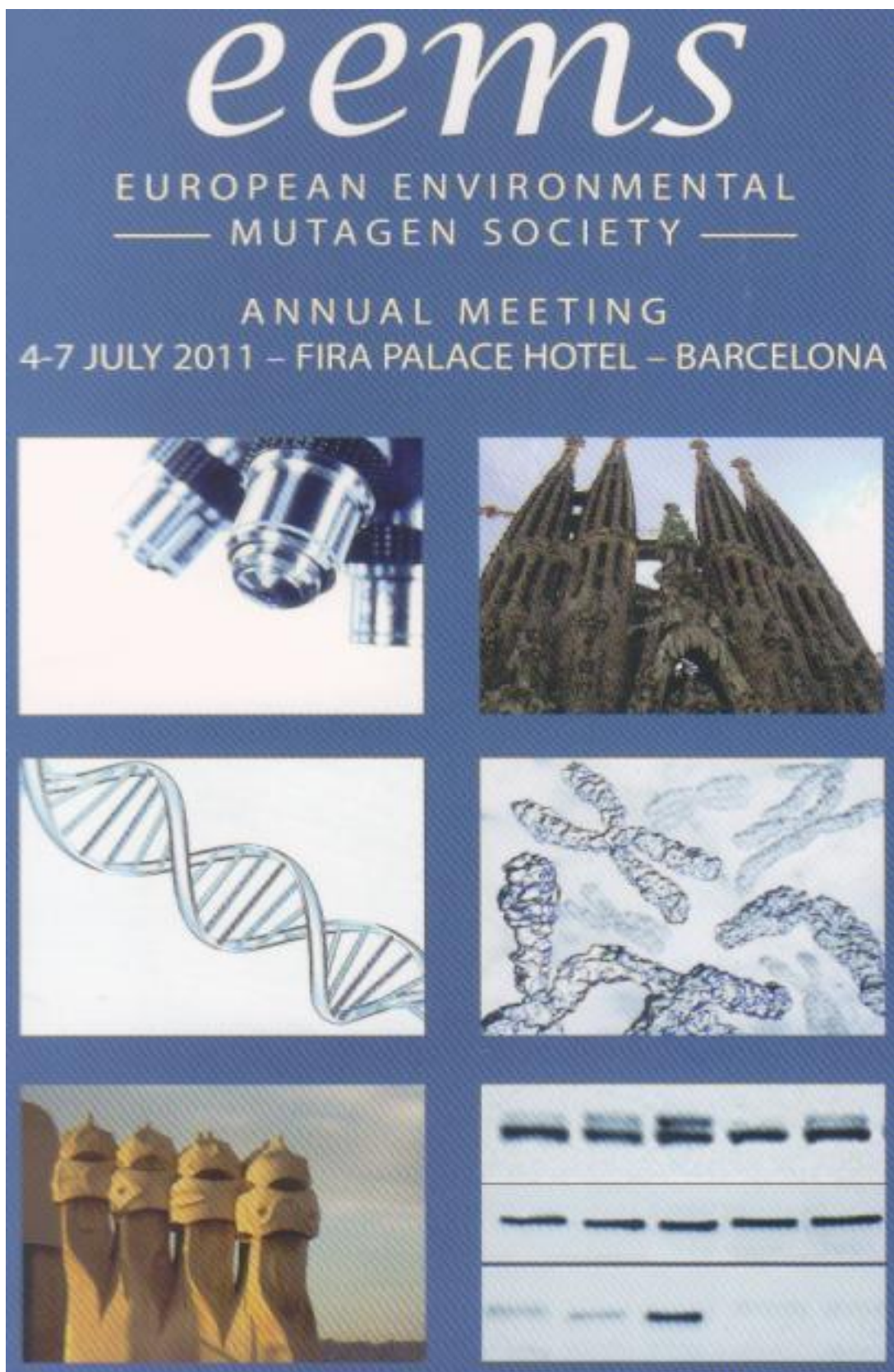
XIII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Jueves 26 y viernes 27 de mayo de 2011

Zacatecas, Zac.



- O'Brien, T.J, S Ceryak, y Patierno S.R. 2003. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response. repair and recovery mechanisms. *Mutation Research* 533: 3-36.
- Orgura, R, y otros. 2008. Genotoxicity studies on green tea catechin. *Food and Chemical Toxicology* 2190-2200.
- Rijken, Philip J; Wiseman, Sheila A; Weisgerber, Ute M; van Mierlo, C. A. J; Quinlan, Paul T; van de Put, F. 2002. Antioxidant and Other Properties of Green and Black Tea. In: *Handbook of antioxidants. Second Edition, Revised and Expanded.* Taylor & Francis Group, LLC. pp:29.
- Seoane, A.I; Dulout, F.N. 2001. Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutation Research* 490:99-106.
- Srinivasan, Periasamy; Suchalatha, Subramaniyan; Babu, Pon Velayutham Anandh; Devi, Rethinam Sundaresan; Narayan, Shoba; Sabitha, Kuruvimalai Ekambaram; Devi, Chennam Srinivasulu Shyamala. 2008. Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer. *Chemico-Biological Interactions* 172:224-234.
- Vega, G. S. And Reynaga, O. 1990. Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agents químicos ambientales. Ed. Limusa. México D.F. 727.
- Wu, Fang-Yang; Tsai, Fuu-Jen; Kuo, Hsien-Wen; Tsai, Chang-Hai; Wu, Wu-Yui; Wang, Ruey-Yun; Lai, Jim-Shoung. 2000. Cytogenetic study of workers exposed to chromium compounds. *Mutation Research* 464:289-296.
- Yang, Chung S, Yoshua D Lambert, Jihyeung Ju, Gang Lu, y Shengmin. Sang. 2007. Tea and cancer prevention: Molecular mechanisms and human relevance. *Toxicology and Applied Pharmacology* 224:265-273.



Effect of Quercetin and Rutin on genotoxicity of Hexavalent Chromium in mice *in vivo*

M.C. García-Rodríguez; T. Nicolás-Méndez; M. Altamirano-Lozano

Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

Flavonoids have been reported to exhibit potent antioxidative. They may scavenge reactive oxygen species (ROS), chelate metal ions, act as chain-breaking antioxidants by scavenging lipid peroxyl radicals, or integrate into the lipid bilayer to prevent lipid damage. As part of our research program to evaluate chemopreventive or chemoprotective potential components of diet, the ability of flavonoids (quercetin and rutin) to reduce genotoxic damage induced by CrO₃ in peripheral blood polychromatic erythrocytes (PCE) of mice, was evaluated in the present study. Mice (CD-1) were treated with the flavonoids quercetin (625 mg/kg) and rutin (100 mg/kg); CrO₃ (20 mg/kg) or with the flavonoids and CrO₃ by i.p. route. DNA damage was evaluated by analysis of micronucleus (MN) using acridine orange technique. Blood samples were obtained from the tail vein at 0, 24, 48 and 72 h after treatment. The results shown that, the treatment flavonoids did not modify MN frequency. CrO₃ treatment MN frequency significantly increases at 12, 24 and 48 h after the injection. Whereas the treatment with flavonoids, prior to CrO₃, decreased MN frequency induced by CrO₃ in all samples evaluated, in fact rutin treatment reduced MN frequency at about 100%. These results indicate that the increase of MN by CrO₃ is blocked by the flavonoids in the protocol used. On the other hand, the frequency of PCE was not-modifying, suggesting a non-cytotoxic effect. Financial support was obtained from DGAPA-UNAM IN209309.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

VII CONGRESO DE INVESTIGACIÓN Y I DE POSGRADO DE LA FES ZARAGOZA



OBJETIVOS

- Difundir los trabajos de investigación en las Ciencias Químico-Biológicas, de la Salud y del Comportamiento.
- Estimular la vinculación Pregrado-Posgrado a través del acercamiento de los grupos de investigación para potenciar y fortalecer el trabajo inter y multidisciplinario.
- Propiciar un espacio de discusión, intercambio de experiencias y colaboración entre los grupos de investigación dentro y fuera de la FES Zaragoza.

PROGRAMA
25 AL 28 DE OCTUBRE DE 2011
AUDITORIOS CAMPO I y II



EFFECTO *in vivo* DEL TÉ VERDE SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR Cr(VI) EN EL RATÓN

Tonancy Nicolás-Méndez, Mario Altamirano-Lozano y Maria del Carmen García-Rodríguez*,

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Batalla 5 de mayo s/n Esq. Fuerte de Loreto. Col. Ejército de Oriente. C.P. 09230, México D.F. Tel (55)56230772.

* *carmen.garcia@unam.mx*

Se ha propuesto que es posible contrarrestar los efectos dañinos inducidos por agentes tóxicos mediante el empleo de antimutágenos, como lo pueden ser algunos antioxidantes. El estrés oxidante es causado por radicales libres (RL) y Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) que inducen daño a macromoléculas como las proteínas y al material genético. El té verde es una bebida rica en antioxidantes a la que se le han atribuido efectos benéficos para la salud. En contraparte, se ha descrito que los compuestos de cromo (VI) generan estrés oxidante y se les ha relacionado con daño genotóxico y con la inducción de algunos tipos de cáncer. En este estudio se evaluaron los efectos del té verde al ser administrado durante diez días por vía oral sobre el daño genotóxico inducido por el CrO₃. Ratonas hembra de la cepa CD-1 fueron divididas en: a) Grupo testigo, al cual se le administró agua potable ad libitum; b) Grupo té verde, al cual se le administró durante 10 días infusiones de té verde (3 g en 100 ml de agua) ad libitum; c) Grupo CrO₃, el cual fue tratado con una dosis de CrO₃ (20 mg/kg) por vía intraperitoneal; d) Grupo té verde-CrO₃, en el cual se combinaron los tratamientos del grupo té verde y en el día diez de tratamiento se les aplicó el CrO₃. El daño de ADN fue evaluado mediante el análisis de micronúcleos. Muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal al inicio del tratamiento con té verde y a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación del CrO₃. Las muestras se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia para identificar la presencia de MN en EPC. En los resultados obtenidos se observó que la administración de té verde durante diez días como única fuente de líquidos no indujo micronúcleos. La aplicación de 20 mg/Kg de peso corporal de CrO₃ induce daño genotóxico desde la hora 24. Cuando se combinaron los tratamientos del té verde con el CrO₃ se disminuyeron las frecuencias de micronúcleos (alrededor del 97% a las 72 horas).

Proyecto financiado por PAPIIT IN209309.

Palabras clave. Flavonoides, Antioxidantes, Genotoxicidad, Micronúcleos.