



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Efecto de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (α -tocoferol) sobre la inducción de micronúcleos y de apoptosis en ratones CD-1 tratados con pentóxido de vanadio (V_2O_5)”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

PRESENTA

LOURDES MONTSERRAT HERNÁNDEZ CORTÉS

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **HERNÁNDEZ CORTÉS LOURDES MONTSERRAT**, con número de cuenta **308265598**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **01 de septiembre de 2015** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

VOCAL Dra. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ

SECRETARIO Biól. CARLOS MARTÍNEZ MONTOYA

SUPLENTE Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

SUPLENTE Biól. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

Mario Agustín Altamirano Lozano
Maria del Carmen García Rodríguez
Juan José Rodríguez Mercado
Reynalda Roldán Pérez

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (α-tocoferol) sobre la inducción de micronúcleos y de apoptosis en ratones CD-1 tratados con pentóxido de vanadio (V₂O₅).**

Opción de titulación: Tesis.

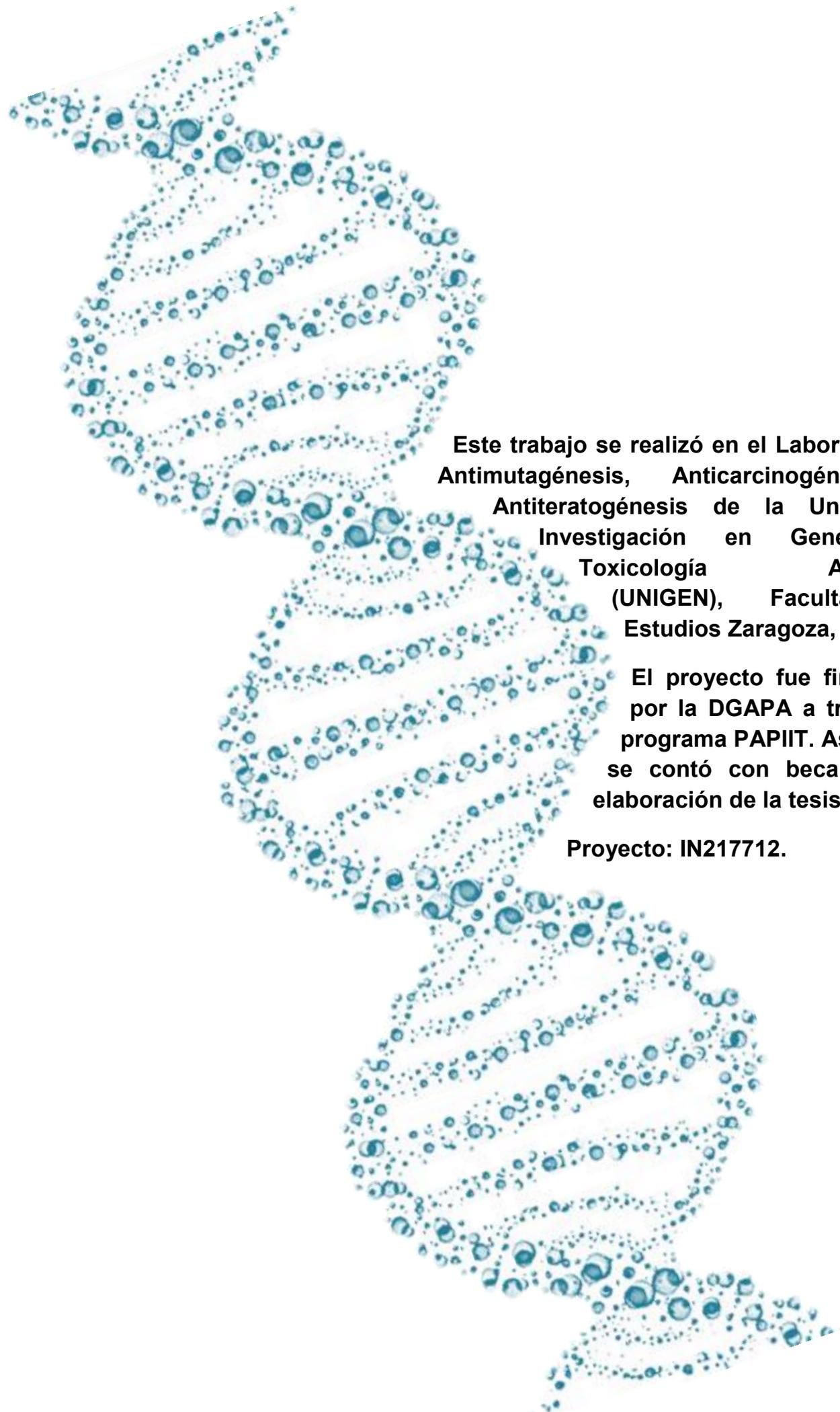
Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABERÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F. a 03 de julio de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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



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

El proyecto fue financiado por la DGAPA a través del programa PAPIIT. Así mismo se contó con beca para la elaboración de la tesis.

Proyecto: IN217712.

¿Quién soy yo?

Yo soy las manos de mis abuelos.

Soy las lágrimas de mi madre.

La fuerza de mi padre.

Las bromas de mis hermanos.

Soy el amor de quien me ha amado.

Y la disciplina de mis maestros.

Soy la inspiración de muchos para seguir adelante

y la gente que aplaudió mis éxitos.

Soy los consejos de cien hombres.

No soy sólo yo.

Soy la suma de todos.

El orgulloso resultado del trabajo de otros.

Aquellos que han tocado mi vida, de tantas maneras.

Llegó el momento.

Es tiempo de dar.

Dedicado a:

Mi madre, Laura de la Soledad, por todo el amor que siempre me diste, por siempre motivarme a seguir adelante. Por ser un ejemplo de vida. Simplemente porque eres el ángel más grande que puedo tener. ¡Adelante siempre adelante!

Mi padre, Cirilo Cristobalito, por siempre estar al pendiente de mí y de mis estudios, porque me enseñaste la mejor herencia que me puedes dejar es la herencia. Gracias por tu fortaleza, tu ejemplo y tus sabios consejos.

Mis hermanos:

Orlando, gracias por enseñarme tantas cosas desde que era una niña, por tu compañía en las tantas desveladas de la carrera y porque siempre te has preocupado por cada uno de nosotros.

Laura, por cuidarme y estar al pendiente de nosotros sobre todo estos últimos años. Por echarme porras cuando más lo necesitaba. Y gracias por ese angelito, Saúl, que siempre con sus risas me hace el día.

Brenda, por ser siempre mi compañera y por esas pláticas sin fin durante mis desveladas para que yo no me durmiera. Por echarme ánimos y por siempre compartir una sonrisa.

Gracias por todos sus esfuerzos y sacrificios
para que esto fuera posible. ¡Lo hicimos!
Los amo mucho 6 ∞

Toda mi familia, materna y paterna, cercana y no tan cercana, por su apoyo incondicional y por creer en mí en todo momento. Por estar en los momentos más difíciles y también los más felices, los amo.

Mis amigos (Andrea, Brenda, César, Cinthia, Janet, Javier, Karen, Larissa, Luis, María, Mariana, Mirella, Noé, Rodrigo, Rosita, Sandra, Shirley) por cada momento que hemos pasado juntos, pero sobre todo gracias por estar en los momentos más difíciles y demostrarme su amistad, porque aunque no siempre nos vemos, sé que están ahí. Gracias por todos esos ratos de relajo y risas. ¡Los quiero!

Los integrantes del laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis (Fanny, Gaby, Javier, Tona) porque más que mis compañeros del laboratorio se convirtieron en mis amigos en muy poco tiempo y me he encariñado mucho con ustedes, por su apoyo y compañía durante la realización de este proyecto y gracias por las tantas risas en momentos de estrés dentro y fuera del laboratorio y. ¡Los quiero!

Dra. María del Carmen García Rodríguez gracias por permitirme ser parte de su laboratorio. Porque sus conocimientos, disciplina, paciencia y motivación han sido primordiales para mi formación profesional. Mi más sincera gratitud por brindarme su confianza y apoyo en todo momento pero sobre todo gracias por su gran amistad.

Miembros del jurado: Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, Biól. Carlos Martínez Montoya, Dr. Juan José Rodríguez Mercado y Biól. Reynalda Roldán Pérez por compartirme un poco de su conocimiento y por su valiosa aportación para la mejora de esta tesis.

¡Gracias totales! Porque ustedes creyeron y confiaron en mí.

ÍNDICE

	Pág.
Índice de abreviaturas.....	i
Resumen.....	iii
1. Introducción.....	1
1.1 Genotoxicidad.....	1
1.1.2 Ensayos para la evaluación de genotoxicidad.....	2
1.1.3 Micronúcleos.....	3
1.2 Apoptosis y necrosis.....	4
1.3 Evaluación de viabilidad y muerte celular.....	5
1.4 Metales pesados.....	6
1.5 Vanadio.....	7
1.5.1 Toxicocinética del vanadio.....	7
1.5.2 Pentóxido de vanadio.....	10
1.6 Estrés oxidante.....	11
1.7 Antioxidantes.....	11
1.7.1 Ácido ascórbico.....	12
1.7.2 α -tocoferol.....	14
2. Planteamiento del problema.....	16
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivos.....	17
4.1 General.....	17
4.2 Particulares.....	17
5. Material y método.....	18
5.1 Animales.....	18
5.2 Reactivos.....	18
5.3 Tratamientos.....	19
5.4 Tiempos de evaluación.....	21

5.5 Ensayo de MN.....	21
5.5.1 Preparación de laminillas	21
5.5.2 Toma de muestras	22
5.5.3 Evaluación de muestras	22
5.6 Evaluación de la viabilidad y muerte celular	22
5.6.1 Preparación de colorantes	22
5.6.2 Toma de muestras	22
5.6.3 Evaluación de muestras	23
5.7 Análisis estadístico	24
6. Resultados.....	25
6.1 MN evaluados con los tratamientos de Ac. asc., α -TOH y V_2O_5	26
6.2 Evaluación de apoptosis y necrosis en células nucleadas de sangre periférica cuando se administraron los tratamientos de Ac. asc., α -TOH y V_2O_5	33
6.3 Evaluación de la citotoxicidad en sangre periférica de ratones tratados con Ac. asc., α -TOH y V_2O_5	37
7. Discusión	43
8. Conclusiones y comentarios finales	52
9. Referencias bibliográficas	53
10. Anexos	65

Índice de abreviaturas

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
$\alpha\text{-TO}^\bullet$	Radical α -tocoferoxil
$\alpha\text{-TOH}$	α -tocoferol
χ^2	Chi-cuadrada
A^\bullet	Radical ascorbilo
Ac. asc.	Ácido ascórbico
ACGIH	American Conference of Governamental Industrial Hygienists
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BrEt	Bromuro de etidio
CAT	Catalasa
$^\bullet\text{CCl}_3$	Radical triclorometil
Cd	Cadmio
Cu	Cobre
DHA	Ácido dehidroascórbico
DIF	Differential Induction Frequency
ECETOC	European Centre for Ecotoxicology of Chemicals
EFSA	European Food Safety Authority
ENC	Eritrocitos Normocromáticos
EPA	Enviromental Protection Agency
EPC	Eritrocitos Policromáticos
ERO's	Especies Reactivas de Oxígeno
FDA	Food and Drugs Administration
GSH	Glutación
GSH-PX	Glutación peroxidasa
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
ig	Intragástrico
ip	Intraperitoneal
IARC	International Agency for Research on Cancer
IPCS	International Programme on Chemical Safety
LD_{50}	Dosis Letal media

MN	Micronúcleo (s)
NA	Naranja de Acridina
NAC	Nacetil-cisteína
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NIF	Net Induction Frequency
O_2^\bullet	Radical superóxido
OH^\bullet	Radical hidroxilo
Pb	Plomo
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
RET	Reticulocitos
RL	Radical libre
ROO^\bullet	Radical peroxilo
SOD	Superóxido dismutasa
V	Vanadio
V (IV)	Vanadio tetravalente
V (V)	Vanadio pentavalente
V_2O_5	Pentóxido de vanadio

Resumen

El vanadio es un metal pesado considerado por la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) como un posible carcinógeno para el humano, y aunque ha mostrado efectos citotóxicos y tóxicos generalizados, existen pocas evidencias de sus efectos genotóxicos *in vivo*. En contraparte, algunas vitaminas como la C y la E presentan propiedades antioxidantes, por lo que han llamado la atención en estudios relacionados con la modulación y el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con el daño al ADN y el estrés oxidante. En este estudio se evaluó el efecto del ácido ascórbico (Ac. asc.) y del α -tocoferol (α -TOH) sobre el daño genotóxico inducido por el pentóxido de vanadio (V_2O_5), mediante la cuantificación de las frecuencias de micronúcleos (MN), así como de los efectos sobre la viabilidad celular, la apoptosis y la necrosis en sangre periférica de ratones macho de la cepa CD-1. Grupos de cinco ratones fueron tratados con Ac. asc. 100 mg/kg por vía intraperitoneal (ip), α -TOH 20 mg/kg por vía intragástrica (ig), V_2O_5 (40 mg/kg) y con los antioxidantes (Ac. Asc. y α -TOH) cuatro horas antes del tratamiento con el V_2O_5 . Se realizaron evaluaciones de las frecuencias de MN en eritrocitos policromáticos (EPC) de sangre periférica, así como de los EPC respecto a los eritrocitos normocromáticos (ENC), las muestras se tomaron de la vena caudal a las 24, 48 y 72 horas después de la administración de los tratamientos. Para el análisis de apoptosis y viabilidad celular se empleó la tinción diferencial con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BrEt), las muestras de sangre se tomaron únicamente a las 48 horas. Los resultados mostraron un incremento significativo en la frecuencia de MN y de las células apoptóticas en el grupo tratado solo con V_2O_5 . Mientras que en los grupos tratados solo con los antioxidantes se disminuyen las frecuencias basales de MN. Cuando se administraron los antioxidantes previamente al tratamiento de V_2O_5 , se disminuyeron las frecuencias de MN y de células apoptóticas. Particularmente el Ac. asc. tuvo un efecto mayor en la modulación del daño genotóxico inducido por el V_2O_5 .

1. Introducción

El crecimiento demográfico, la industria y las nuevas tecnologías han provocado la producción y emisión de agentes tóxicos en el agua, aire y suelo. Dentro de los agentes tóxicos se encuentran los metales pesados. En muchos de los casos la exposición a estos agentes incrementa el riesgo de las alteraciones en la salud como las enfermedades crónico-degenerativas como el Alzheimer y enfermedad de Parkinson e incluso la inducción de algunos tipos de cáncer (Albert, 1998; Clarkson *et al.*, 1988). En contraparte, se ha encontrado que algunos componentes vegetales al presentar propiedades antioxidantes pueden llegar a proteger del daño al ADN y de la inducción de algunos tipos de cáncer (Surh, 2003). Particularmente el α -tocoferol y el ácido ascórbico son dos componentes vegetales que presentan un alto potencial antioxidante (Zhou *et al.*, 2005). Por lo que, la posibilidad de emplear sustancias que pudieran contrarrestar o prevenir los efectos causados al ADN, abre un campo de investigación muy importante.

1.1 Genotoxicidad

El término “genotoxicidad” es empleado para referir cualquier tipo de daño causado sobre el material genético (no sólo ADN, sino también componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y compartimiento de los cromosomas dentro de la célula). A los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética se les llama genotóxicos y pueden ser de origen físico, químico o biológico. De acuerdo a los efectos de los genotóxicos se les puede asociar con mutágenos, carcinógenos o teratógenos. La “intensidad” del daño genético depende de la dosis recibida, el nivel de exposición, la distribución y de la retención, así como de la eficiencia de los sistemas de activación metabólica, de detoxificación y reactividad de la sustancia con macromoléculas de las células (Abrevaya, 2008; Hernández-Rincón, 2010).

La respuesta celular al daño en el ADN es fundamental para su supervivencia. Una vez reconocido el daño, se inician determinados procesos de señalización que desencadenan los primeros pasos para reparar el daño antes de la replicación o la segregación de los cromosomas, ya que de no ser el caso se puede fijar el daño y por ende conducir a una mutaciones (Zhou y Elledge, 2000; Norbury y Hickson, 2001).

1.1.2 Ensayos para la evaluación de genotoxicidad

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

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

1.1.3 Micronúcleos

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

Los MN se pueden originar por alguno de estos eventos:

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

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

Cuando los EPC son expulsados de la medula ósea, el núcleo queda extruido y sí un MN se ha formado permanece en el citoplasma, estos eritrocitos aun contiene ARN y son basófilos, lo que los diferencia fácilmente de los ENC en los que se ha degradado el ARN y son acidófilos (Hayashi *et al.*, 1990).

El ensayo de MN es una de las técnicas más adecuadas para identificar la respuesta integrada a la compleja mezcla de contaminantes y un índice valioso para la detección de daño genético acumulado durante la vida de las células (Bolognesi y Hayashi, 2011). Se caracteriza por su simplicidad, fiabilidad, sensibilidad y rapidez. Además, es ampliamente utilizado para detectar la genotoxicidad de contaminantes ya sea clastogénicos y aneugénicos y para evaluar las aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (Rocha *et al.*, 2011). Un incremento en la frecuencia de MN en animales tratados con agentes

químicos, indica que estos agentes son inductores de daño cromosómico. Sin embargo la presencia de MN indica un daño cromosómico, pero no de qué tipo, ni qué cromosomas estuvieron involucrados (Hayashi *et al.*, 2000).

1.2 Apoptosis y necrosis

La muerte celular en los tejidos de los organismos es un evento natural y no produce alteraciones de las funciones, por el contrario, la cantidad de células en los diferentes tejidos está determinada por un balance homeostático entre la proliferación de las células nuevas y la muerte de las células no funcionales. Existen dos tipos de muerte celular, una es la que se produce como consecuencia de una lesión celular masiva (necrosis) y la otra que es un mecanismo controlado de muerte celular (apoptosis) (Elena, 2002).

La apoptosis es el tipo de muerte celular programada que regula el desarrollo normal y la homeostasis de los organismos multicelulares. Uno de los propósitos de la apoptosis a nivel celular es la auto-“eliminación” de células dañadas o senescentes (Norbury y Hickson, 2001). Este proceso implica un consumo de ATP, debido a la serie de cascadas de señalización, mediado primordialmente por caspasas (cisteinilaspártato proteasas). Los cambios morfológicos característicos de la apoptosis son: la condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo y del ADN, dando origen a los cuerpos apoptóticos que contienen material celular degradado (Ramírez y Rojas, 2010). Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el inicio y desarrollo de la apoptosis son variados, y dependen de un estímulo inicial, por ejemplo la respuesta al estrés celular ocasionado por la exposición a compuestos tóxicos (Robertson y Orrenius, 2000) (Figura 1B).

Por su parte, la necrosis ocurre de manera aguda, por una forma no fisiológica, mediante una agresión que causa lesión en una porción importante del tejido. Este proceso es desencadenado por toxinas, hipoxia severa, agresión masiva y cualquier otra condición que genere disminución de ATP (Elena, 2002).

En este proceso se crean cambios histológicos, debido a que hay ganancia de volumen celular, como la desorganización y lisis del citoplasma, con dilatación del retículo endoplasmático y las mitocondrias, disolución de la cromatina y pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática, por lo que hay salida del material intracelular. El ADN es fragmentado al azar. Debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular, el contenido del citoplasma es vertido al espacio extracelular, se genera el proceso de inflamación, en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitosis (Elena, 2002; Ramírez y Rojas, 2010) (Figura 1A).

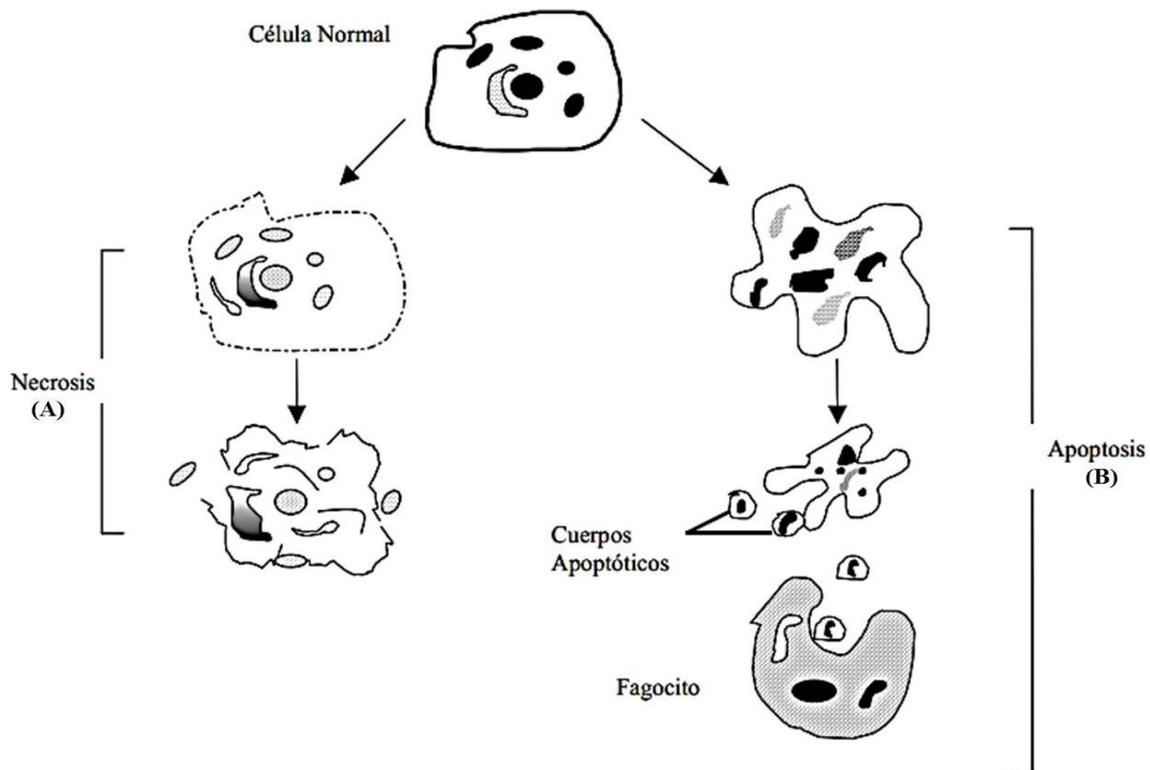


Figura 1. Procesos de la necrosis y de la apoptosis. (A) El proceso de necrosis muestra el edema, la pérdida de la integridad de la membrana celular y la salida de los organelos intracelulares al espacio exterior. (B) El proceso de apoptosis muestra integridad de la membrana después de la condensación de la cromatina y los cuerpos apoptóticos (Tomado de Elena, 2002).

1.3 Evaluación de viabilidad y muerte celular

El análisis de la muerte celular puede ser llevado a cabo tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*. Existen varios métodos que permiten la adecuada diferenciación

entre la muerte por apoptosis y necrosis. La valoración de la integridad de la membrana a través de la tinción con colorantes vitales pueden ser específicos si se analizan las características morfológicas de las células directamente. El análisis de la muerte celular puede ser llevado a cabo tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* (Allen *et al.*, 1997).

El método por tinción diferencial con fluorocromos, utilizando una mezcla de los colorantes de NA/BrEt, es uno de los métodos utilizados para la evaluación de apoptosis y necrosis. El colorante NA tiene la capacidad de introducirse a las células, tanto viables, como no viables mostrando una fluorescencia verde al intercalarse dentro de un ácido nucleico de doble cadena (ADN), o bien mostrando fluorescencia roja-naranja si se une a un ácido nucleico de cadena sencilla (ARN). El BrEt se introduce únicamente a las células no viables debido a la pérdida de integridad de la membrana plasmática, de tal manera que puede intercalarse en el ADN mostrando una fluorescencia roja. Además de que con esta técnica se pueden diferenciar a las células apoptóticas tempranas de las apoptóticas tardías (McGahon *et al.*, 1995; Baskic *et al.*, 2006; García-Rodríguez *et al.*, 2013).

1.4 Metales pesados

Los metales pesados están presentes en nuestro ambiente debido tanto a fuentes naturales como antropogénicas. Aunque de forma específica es mayor la exposición a estos agentes en la actividad industrial, la población en general también entran en contacto con estos agentes mediante el agua, los alimentos y el aire, en donde pueden afectar funciones biológicas importantes (Sullivan y Krieger, 2001; Beyersmann y Hartwing, 2008). Es por ello que la contaminación por metales pesados es considerado un problema de salud ambiental (Zarei *et al.*, 2013). Algunos compuestos metálicos pueden inducir daño genotóxico y teratógeno y están asociados con algunos tipos de cáncer (Newman e Intosh, 1991).

Por otra parte, también es importante señalar que algunos de los metales pesados son micronutrientes esenciales para algunos seres vivos, tal es el caso del hierro, cadmio, zinc, arsénico, vanadio, cobre, cromo, entre otros (Ortiz-Monasterio *et al.*, 1987; Friberg y Nordberg, 1990; Guillespie *et al.*, 1990).

1.5 Vanadio

El vanadio (V) es un elemento relativamente abundante con una amplia distribución en la naturaleza, ocupando el lugar 22 entre los elementos más abundantes y se puede encontrar en 68 minerales. Es emitido principalmente por fuentes naturales y por la quema de aceites combustibles (IPCS, 1999; García, 2006). Este metal participa en la síntesis de clorofila en organismos fotosintéticos y es un micronutriente para varias especies marinas y terrestres. No se ha demostrado que el vanadio sea esencial para los humanos y no tiene valor nutricional, pero debido a sus múltiples mecanismos de acción se ha estimado que, en el caso de ser necesario, la ingesta aproximada sería de 15 µg por día (Lagerkvist *et al.*, 1986, EFSA, 2004).

Para los humanos la principal fuente de exposición al V es la contaminación atmosférica producida principalmente por la quema de combustibles, es por ello que es considerado un contaminante ambiental. Se ha estimado que de las 64 mil toneladas de vanadio descargadas anualmente, alrededor del 91% son producto de la actividad industrial, de la combustión de combustibles fósiles y el resto son derivadas de la erosión del suelo, emisiones volcánicas, incendios forestales y otros procesos biogénicos (IPCS, 1988; IPCS, 2001).

1.5.1 Toxicocinética del vanadio

Para la población general, los alimentos representan la mayor fuente de exposición a vanadio, seguida de la vía aérea. La entrada de vanadio al organismo de los mamíferos ocurre a través de la piel, por el tracto gastrointestinal y por el

sistema respiratorio (Figura 2) (Mukherjee *et al.*, 2004). Diariamente consumimos alrededor de 1 µg de vanadio procedentes del aire, entre 11 y 30 µg provenientes de los alimentos (hongos, mariscos, semillas de eneldo, perejil, pimienta negra, entre otros) y de 1 a 30 µg/l provenientes del agua bebida lo que da un total de entre 10 y 70 µg de vanadio al día (WHO, 1990).

El vanadio es transportado por las proteínas albúmina y transferrina y son rápidamente transportados por la sangre a distintos tejidos. Las condiciones de pH neutro propician el dominio de V (V) en plasma. Se tiene bien establecido que el V (V) entra a la célula por mecanismos de transporte aniónico, principalmente por los canales de fosfato. En el interior de la célula el V (V) puede ser nuevamente reducido a V (IV) por el glutatión y otros sustratos donde permanece unido (Cantley *et al.*, 1978; Yang *et al.*, 2003).

En estudios de farmacocinética en eritrocitos se ha descrito que la entrada de vanadio al interior de la célula se da en dos etapas. En la etapa inicial, V (V) cruza la membrana celular a través del sistema de intercambio aniónico, en tanto que en la segunda etapa el cruce es mucho más lento e involucra el producto reducido, V (IV) y un mecanismo de paso semejante al de los cationes divalentes (Heinz *et al.*, 1982).

El V (IV) puede generar especies reactivas de oxígeno (ERO's) para destruir el sistema antioxidante de la célula, siendo más susceptible al generación del estrés oxidante. El peróxido de hidrógeno se puede producir debido a la reducción con NADPH que puede preceder a la actividad de enzimas por otra parte, la oxidación de V (IV) a V (V) también puede ser iniciado por la generación del radical hidroxilo a través de reacción de Fenton (Cuesta *et al.*, 2011; Kordowiak y Holko, 2009; Aureliano y Gándara, 2005). Se ha propuesto que el estrés oxidante puede ser generado como consecuencia de las reducciones que se producen intracelularmente por el vanadio (Evangelou, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004). Sin embargo, el mecanismo por el cual los compuestos de vanadio promueven la producción de ERO's y del estrés oxidante es poco clara y poco concluyente.

Finalmente, el V acumulado en los diferentes tejidos y órganos (hígado, riñón, bazo, huesos, cerebro y corazón) es eliminado mayormente por la bilis y en menor cantidad por las heces y orina. Las concentraciones de V en orina son generalmente mayores en las personas altamente expuestas (Mukherjee *et al.*, 2004).

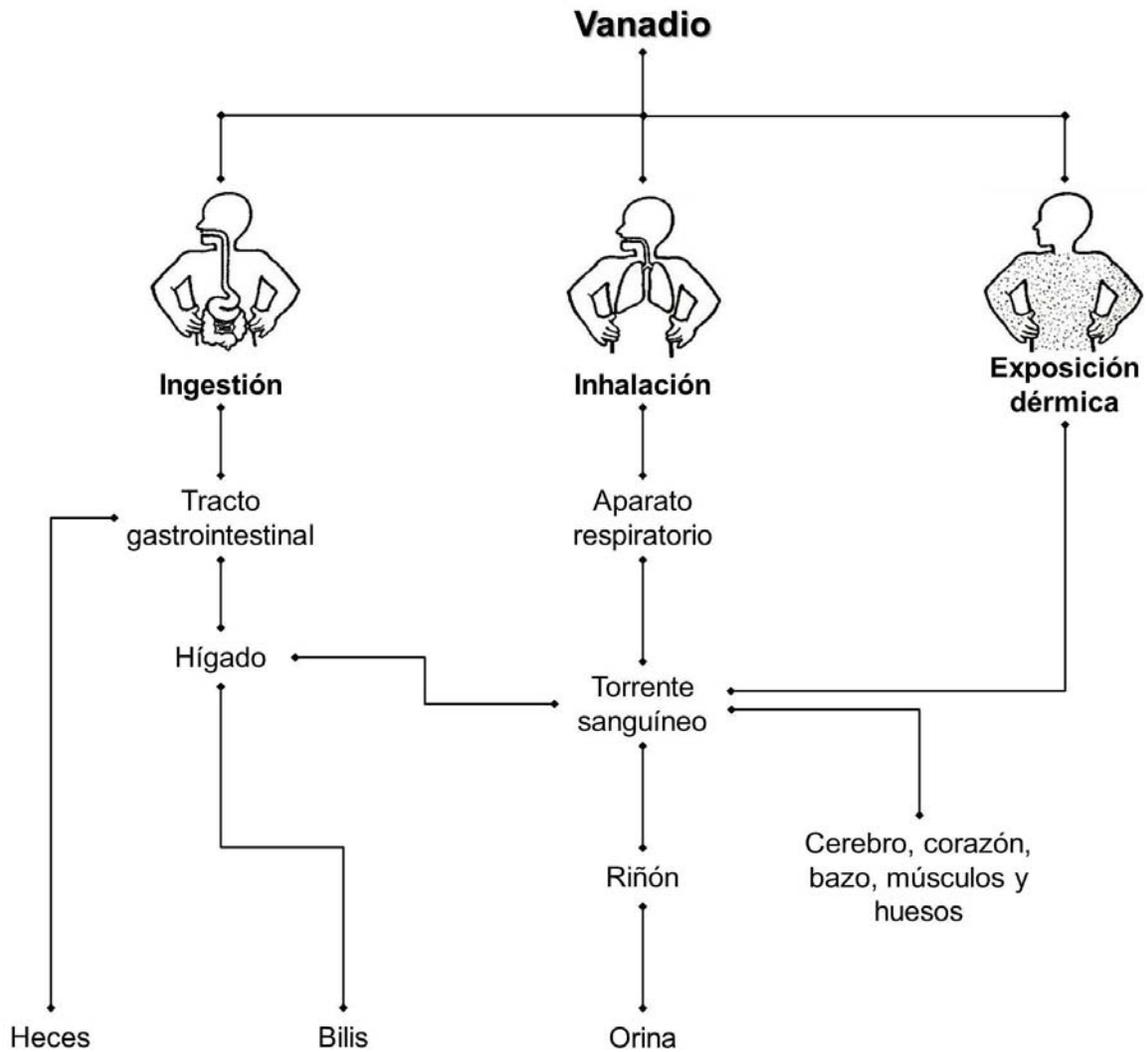


Figura 2. Toxicocinética del vanadio (Modificado de Mukherjee *et al.*, 2004)

1.5.2 Pentóxido de vanadio

La toxicidad de los compuestos del V aumenta conforme la valencia de este elemento aumenta, siendo los pentavalentes los más tóxicos (García, 2006).

El V_2O_5 es el compuesto más comercial del vanadio. Es una sal de color amarillo-rojizo, su límite de exposición ocupacional a polvos y humos es de 0.05 mg/m^3 . Es ligeramente soluble en agua y muy soluble en disolventes orgánicos como el anhídrido acético, acetato de etilo y acetona (Lagerkvist *et al.*, 1986, IPCS 1988, 2001). Es utilizado principalmente en la fabricación de acero y en menor cantidad en la fabricación de plásticos, cerámica, caucho y otros productos químicos. En la industria agrícola se emplea en la elaboración de fungicidas e insecticidas y como micronutriente en fertilizantes (IPCS, 1988; García, 2006).

El V_2O_5 ha sido designado como posible cancerígeno para los seres humanos por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), ya que la evidencia de la carcinogenicidad es insuficiente en seres humanos y suficientes en animales de experimentación, lo que lo clasifica en el Grupo 2B: posiblemente carcinogénico para los humanos (IARC, 2006). En 2009, el Consejo Americano de Gobierno y de Higienistas Industriales (ACGIH por sus siglas en inglés) colocó al V_2O_5 en la categoría A3: carcinógeno animal confirmado con relevancia desconocida para los seres humanos (ACGIH, 2009).

La inducción de MN por el V o sus compuestos han sido reportados por varios autores (Migliore *et al.*, 1993, Zhong *et al.*, 1994, Ciranni *et al.*, 1995, Rojas-Lemus *et al.*, 2014). Zhong *et al.* (1994) reportó el daño genotóxico del V_2O_5 , en la línea celular de pulmón de hámster chino (V79), observando un incremento significativo de las frecuencias de MN además de que se reportó que el V_2O_5 tiene efectos aneuploidógenos. Mientras que en un estudio *in vivo* con ratones se observó un incremento significativo en la frecuencia de MN después de las 24 horas como consecuencia de la inhalación del V_2O_5 (0.02 M) (Rojas-Lemus *et al.*, 2014). Sin embargo la información respecto a la genotoxicidad y el potencial carcinogénico de V_2O_5 en modelos *in vivo* son limitados y no concluyentes.

1.6 Estrés oxidante

Uno de los mecanismos propuestos por los que los metales pesados pueden inducir daño al ADN es el estrés oxidante, el cual consiste en un desbalance entre los pro-oxidantes y los antioxidantes, que resulta en daño macromolecular y en la alteración de la señalización y el control redox. Posiblemente este desbalance, podría implicar la interrupción de circuitos redox sin que ocurra un desequilibrio global de pro-oxidantes y antioxidantes (Forman *et al.*, 2004; Jones, 2006).

1.7 Antioxidantes

Los antioxidantes son un conjunto de compuestos químicos o productos biológicos que contrarrestan de una manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales libres (RL) u oxidantes, tales como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que altera las funciones celulares. Por lo que los antioxidantes pueden actuar eliminando ERO's, removiendo iones metálicos que pueden catalizar reacciones de oxidación y rompiendo cadenas en secuencias de iniciación oxidativa (Zamora, 2007). Según evidencias clínicas y experimentales, los antioxidantes de los alimentos, tales como la vitamina E, la C, la A y los flavonoides pueden tener efectos beneficiosos en la protección contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidante (Zhou *et al.*, 2005).

La eficiencia de los antioxidantes se basa en dos factores (Thomas, 2000):

1. La capacidad de reaccionar rápidamente con radicales oxidantes para así formar un nuevo radical.
2. El radical formado de novo es menos reactivo que el radical predecesor.

Los antioxidantes se han clasificados en dos principales sistemas, el enzimático y no enzimático. El sistema de defensa correspondiente a las enzimas antioxidantes o endógenas incluye a enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-PX), tioredoxina reductasa y glutatión reductasa. La

SOD es una metaloenzima ampliamente encontrada en células procariontes y eucariontes, que permite la dismutación del ion superóxido en peróxido de hidrógeno y cuya acumulación se evita por el sistema de catalasa/glutación peroxidasa, transformándolo en oxígeno molecular, agua y glutación oxidado (Robbins y Zhao, 2011).

El sistema de antioxidantes no enzimático o exógeno está determinado por una serie de compuestos llamados depuradores de RL, los cuales intervienen logrando retrasar la producción y acción de los RL. Algunos antioxidantes no enzimáticos de las células son el glutación, ácido lipoico, la bilirrubina, las ubiquinonas, los bioflavonoides, el α -TOH, el Ac. asc., el β -caroteno, acetil-L-carnitina, coenzima Q10, curcumina, nacetil-cisteína (NAC), resveratrol, selenio; mientras que los minerales selenio, cobre, zinc y magnesio forman parte de la estructura molecular de algunas de las enzimas antioxidantes (Lademann, *et al.*, 2011).

La defensa antioxidante contra RL inducidas por metales y sus efectos citotóxicos y genotóxicos representa un aspecto importante de la investigación en salud (Mekawy *et al.*, 2012). Antioxidantes no enzimáticos tales como el α -TOH, el Ac. asc. y el β -caroteno, forman una parte del sistema antioxidante por su capacidad para neutralizar o controlar la toxicidad de xenobióticos y de las ERO's, además de evitar el daño celular (Kadry *et al.*, 2012).

1.7.1 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$), es una vitamina hidrosoluble, compuesta por 6 carbonos en forma de lactano, lo que permite funcionar como cofactor en diversas reacciones de hidrolización y amidación al transferir electrones a enzimas que proporcionan equivalentes reductores. Esta vitamina es capaz de actuar como antioxidante y como secuestrador de RL, lo cual le confiere diversas funciones en nuestro organismo. Al ser un antioxidante hidrosoluble que remueve los RL del plasma, citoplasma y mitocondrias, atrapa iones superóxido y radicales peróxido

antes de que inicie la peroxidación lipídica, protegiendo con esto a las membranas celulares y atenuando de esta manera a progresión de las enfermedades relacionadas con el daño al ADN y con el estrés oxidante (Padayatty, *et al.*, 2002; Johnston, 2003).

De acuerdo a Konigsberg (2008), el mecanismo antioxidante del Ac. asc., la neutralización en fase acuosa de las especies reactivas, así como la regeneración de otros antioxidantes como el α -TOH, β -carotenos, glutatión, y ácido úrico. Tanto el Ac. asc. como el ascorbato (forma aniónica del Ac. asc.) puede donar sus electrones a especies reactivas potencialmente dañinas para neutralizarlas, como producto de esta interacción se forma el radical ascorbilo (A^{\bullet}). El A^{\bullet} es una molécula radical de baja reactividad, debido a que su electrón desapareado se encuentra estabilizado por resonancia y a su capacidad para regenerarse hasta forma nuevamente Ac. asc. o donar un segundo electrón y formar ácido dehidroascórbico (DHA). La molécula de DHA puede reducirse y formar nuevamente Ac. asc., por reacción directa libre de enzimas o a través de la acción de las enzimas NADH y GSH (Figura 3).

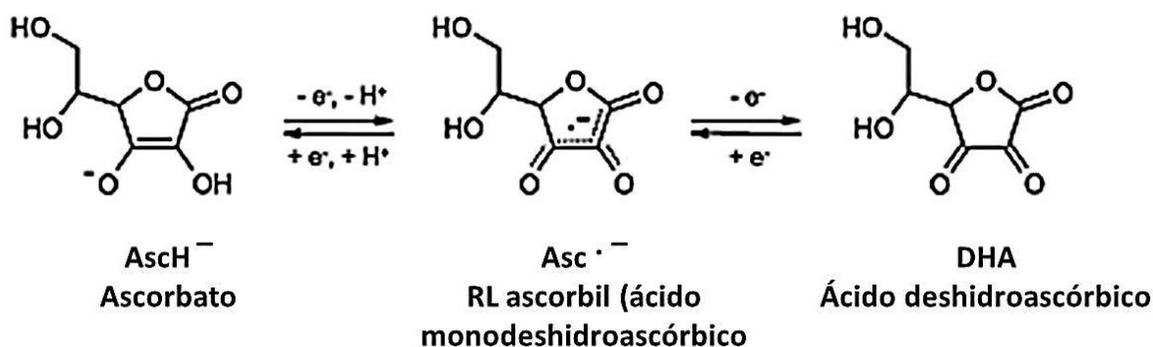


Figura 3. Regeneración del ascorbato (Cerqueira *et al.*, 2007).

La mayor parte de los mamíferos y de las plantas sintetizan Ac. asc. de forma endógena a partir de la glucosa y de la galactosa. Sin embargo, los seres humanos carecen de esta capacidad, por lo que se obtiene con la ingesta de frutas y verduras. Entre los alimentos con alto contenido de Ac. asc., se encuentra

en los cítricos, el brócoli, la coliflor, las espinacas, el nopal, el chile poblano, la patata, el tomate, el kiwi, la fresa, la guayaba y el mango (Naidu, 2003; Valdés, 2006).

La recomendación de ingesta diaria de Ac. asc. es de 90 mg/día para hombres y de 75 mg/día para mujeres, lo cual se puede obtener con el consumo de cinco porciones de frutas o verduras (200 mg/kg), en pacientes con enfermedades crónicas como el cáncer o la diabetes, los fumadores, mujeres embarazadas o personas con intensa actividad física, necesitan dosis mayores en su dieta habitual (Valdés, 2006; Lee, 2009).

1.7.2 α -tocoferol

El α -tocoferol es la forma biológicamente más activa de los tocoferoles y tocotrienoles los cuales se caracterizan por tener en su estructura química un núcleo heterocíclico oxigenado, un núcleo cromano, un grupo OH, además de grupos metilo y una cadena lateral de origen terpénico (Figura 4). En las células se encuentra principalmente en las membranas y en las lipoproteínas plasmáticas (Gliszczynska-Swiglo y Sikorska, 2004).

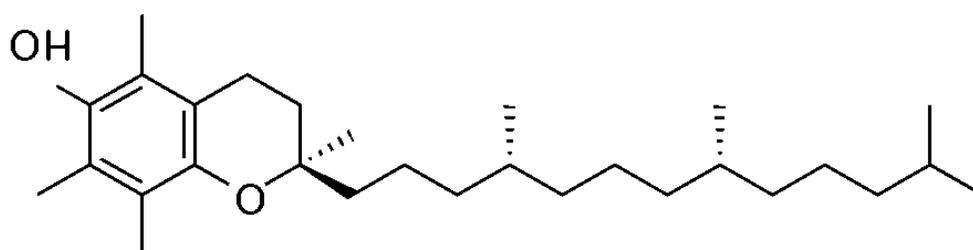


Figura 4. Estructura química del α -TOH (Cerqueira *et al.*, 2007).

Esta vitamina es el principal antioxidante de la fase lipídica, ya que previene la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, deteniendo la cadena de auto-oxidación, además de participar en la estabilidad de las lipoproteínas e influir en la arquitectura de los fosfolípidos. Lo cual, de forma progresiva puede ocasionar patologías cardíacas y cáncer. El α -TOH atrapa principalmente radicales peroxilo y es capaz de actuar sobre radicales alcoxilo, superóxido, oxígeno singulete y especies reactivas de nitrógeno (Landvik *et al.*, 2002; Pryor, 2003; Niki y Noguchi, 2004). Los tocoferoles interrumpen la autoxidación lipídica mediante la donación de un hidrogeno al radical peróxilo (ROO^\bullet) y se transforma en el radical α -tocoferoxil ($\alpha\text{-TO}^\bullet$) cuyo electrón desapareado se estabiliza por deslocalización electrónica, sin la posibilidad de abstraer hidrógeno de moléculas lipídicas estables y continuar la reacción en cadena de la lipoperoxidación. El α -TOH también elimina radicales triclorometil (CCl_3^\bullet), hidroxilo (OH^\bullet), superóxido (O_2^\bullet) y oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) (Konigsberg, 2008). El α -TOH se puede encontrar principalmente en aceites vegetales (soja, maíz, algodón y girasol), partes verdes de las plantas así como en el tejido adiposo de los animales (Sayago *et al.*, 2007). Para la población mexicana se sugiere una ingesta diaria de 15 mg/día (Konigsberg, 2008).

2. Planteamiento del problema

En la actualidad las poblaciones humanas se encuentran expuestas a metales pesados, debido al aumento de la contaminación ambiental. La exposición a estos agentes incrementa el riesgo de las alteraciones en la salud como lo son algunos tipos de cáncer, así como enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con el daño al ADN como lo son el Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, diabetes, entre otras. El vanadio es un metal pesado con una amplia distribución en el ambiente, este metal es uno de los elementos traza presentes en los combustibles fósiles, por lo que la quema de estos combustibles es la principal fuente de emisión del vanadio en el ambiente, por consiguiente las personas se encuentran constantemente expuestas a este metal, aumentando el riesgo de sufrir los efectos del vanadio en la salud. Ya que el vanadio al cruzar la membrana celular se reduce y como consecuencia de las reducciones que se producen intracelularmente por el vanadio se puede generar el estrés oxidante. Particularmente el V_2O_5 puede tener efectos genotóxico mediante el incremento de MN. Además resulta de interés estudiar si es posible proteger o modular el daño genotóxico inducido por este compuesto mediante la administración previa del Ac. asc. y α -TOH, en ratones macho de la cepa CD-1.

3. Hipótesis

Si el Ac. asc. y el α -TOH presentan actividad antioxidante y los compuesto pentavalentes del vanadio presentan daño genotóxico, mediante el incremento de MN, entonces se espera que al administrar previamente los antioxidantes (Ac. asc. y α -TOH) a ratones tratados con V_2O_5 , se espera que se disminuyan las frecuencias de MN, así como los efectos sobre la viabilidad celular, la apoptosis y la necrosis.

4. Objetivos

4.1 General

Evaluar el efecto del Ac. asc. y del α -TOH sobre el daño genotóxico inducido por el pentóxido de vanadio, mediante la cuantificación de las frecuencias de MN, así como de los efectos sobre la viabilidad celular, la apoptosis y la necrosis en sangre periférica de ratones macho de la cepa CD-1.

4.2 Particulares

- ④ Establecer la dosis del V_2O_5 que induzca daño genotóxico y citotóxico, mediante la evaluación de MN en EPC de muestras de sangre periférica y la evaluación de la frecuencia de EPC con relación a los ENC, tomadas cada 24 horas después de la administración de los tratamientos durante 72 horas en ratones macho de la cepa CD-1.
- ④ Establecer la dosis de V_2O_5 que induce apoptosis, por medio de la evaluación de la fragmentación nuclear en células viables y no viables de sangre periférica del ratón.
- ④ Determinar las dosis de Ac. Asc. y α -TOH que no inducen daño genotóxico ni citotóxico, mediante la evaluación de MN en EPC de sangre periférica y de la relación de EPC con respecto a los ENC, así como de la viabilidad celular en células nucleadas de la sangre periférica del ratón.
- ④ Evaluar el efecto del Ac. asc. y α -TOH sobre el daño genotóxico inducido por el V_2O_5 mediante la evaluación de las frecuencias de MN en sangre periférica de ratones macho de la cepa CD-1.
- ④ Evaluar el efecto del Ac. asc. y del α -TOH sobre el daño citotóxico inducido por el V_2O_5 , mediante la evaluación de la frecuencia de EPC con relación a los ENC y la evaluación de la viabilidad celular en células nucleadas de la sangre periférica del ratones macho de la cepa CD-1.

- ④ Evaluar el efecto del Ac. asc. y del α -TOH sobre la apoptosis cuando se administran los antioxidantes previamente al tratamiento del V_2O_5 , por medio de la evaluación de la fragmentación nuclear en células viables y no viables de sangre periférica del ratón.

5. Material y método

5.1 Animales

Se emplearon ratones macho sexualmente maduros de la cepa CD-1, de entre 45 y 60 días de edad con un peso de 25 a 35 g. Se desarrolló el pie de cría en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, con animales obtenidos del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Los ratones se alimentaron con nutricubos (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 horas.

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

5.2 Reactivos

Todos los reactivos empleados en el estudio se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Colorante NA [CAS No. 10127-02-3]; BrEt [CAS N° 1239-45-8]; α -TOH $C_{29}H_{50}O_2$ [CAS No. 10191-41-0]; Ac. asc. $C_6H_8O_6$ [CAS No. 50-81-7]; V_2O_5 [CAS No. 1314-62-1].

5.3 Tratamientos

El Ac. asc. y el V_2O_5 fueron preparados en una solución mediante su disolución en agua destilada estéril, mientras que el α -TOH fue disuelto en aceite de maíz. Una vez preparados los reactivos se administraron inmediatamente, el α -TOH por vía oral mediante sonda intragástrica (ig), mientras que el Ac. asc. y el V_2O_5 por vía intraperitoneal (ip).

Se conformaron los grupos experimentales formados por cinco individuos cada uno y se dividieron de la siguiente manera:

- a) Grupo testigo para el grupo de Ac. asc., solo se le administró el vehículo (0.25 ml de agua inyectable).
- b) Grupo testigo para el grupo de α -TOH (0.25 ml de aceite de maíz).
- c) Grupo de V_2O_5 , se le administró una dosis única de 40 mg/kg de peso corporal de V_2O_5 vía ip
- d) Grupos de antioxidantes, se les administró Ac. asc. en una dosis única de 100 mg/kg de peso corporal vía ip; α -TOH en dosis única de 20 mg/kg de peso corporal vía ig
- e) Grupos combinados, a los que se les administró el tratamiento antioxidante (Ac. asc. o α -TOH) y cuatro horas después el V_2O_5 (Figura 5 y 6).

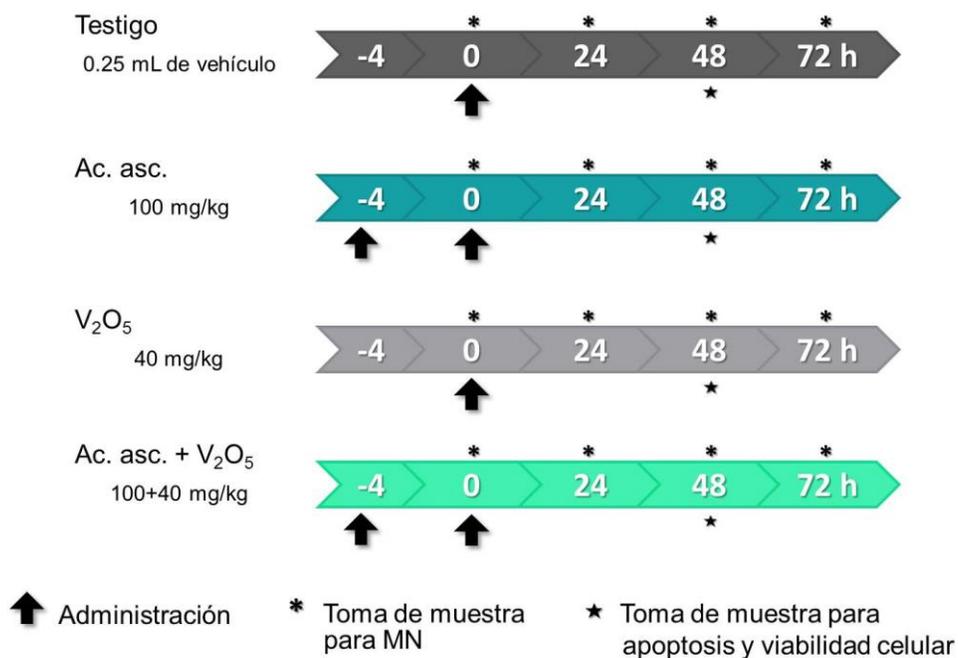


Figura 5. Protocolo para la administración de los tratamientos de Ac. asc. y V_2O_5 por vía ip y toma de muestra para MN, apoptosis y viabilidad celular.

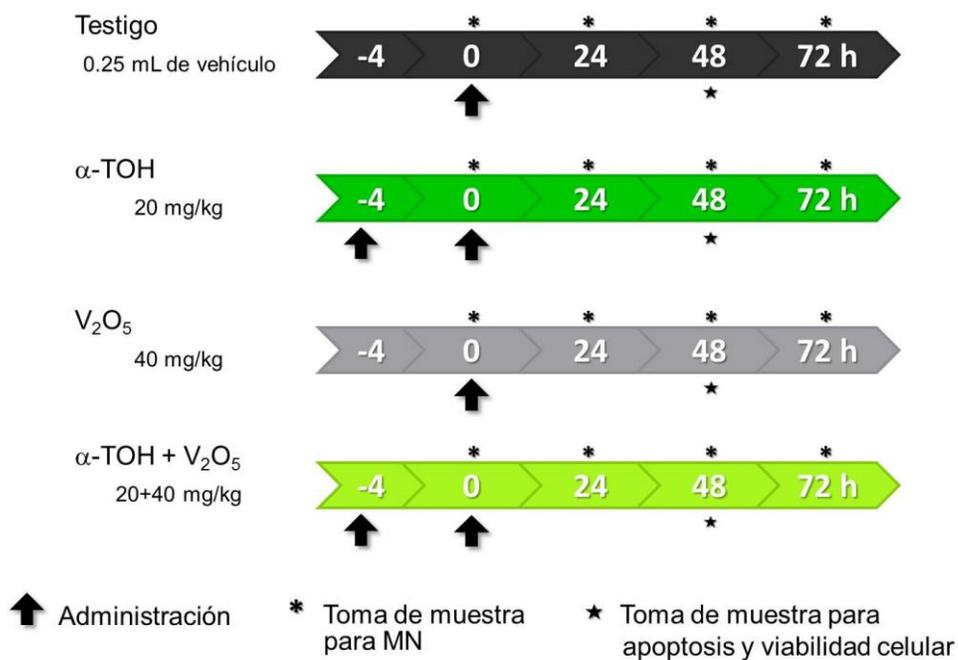


Figura 6. Protocolo para la administración de los tratamientos de α -TOH por vía ig y V_2O_5 por vía ip y toma de muestra para MN, apoptosis y viabilidad celular.

5.4 Tiempos de evaluación

Una vez seleccionadas las dosis del V_2O_5 , Ac. asc. y α -TOH, se administraron las dosis de acuerdo a los protocolos. Los antioxidantes (Ac. asc. y α -TOH) fueron administrados 4 horas antes de la administración del V_2O_5 . Posteriormente se evaluó el daño genotóxico mediante el análisis de la frecuencia de MN y la citotoxicidad mediante la frecuencia de EPC con respecto a la de ENC, con muestras obtenidas de sangre periférica.

La dosis empleada para los tratamientos con V_2O_5 , Ac. asc. y α -TOH fueron seleccionados con base en estudios previos realizados en nuestro laboratorio en los que se observaron que el V_2O_5 en una dosis de 40 mg/kg incrementa la frecuencia de MN, induciendo daño genotóxico (Altamirano-Lozano *et al.*, 2013), mientras que para los tratamientos con Ac. asc. y α -TOH no se observaron efectos genotóxicos tras la administración de 100 mg/kg de Ac. asc. y 40 mg/kg de α -TOH (García-Rodríguez *et al.*, 2012).

5.5 Ensayo de MN

5.5.1 Preparación de laminillas

Se preparó una solución de NA en agua desionizada a una concentración de 1 mg/ml. Se tomó 10 μ l de esta solución y fue colocada sobre portaobjetos precalentados a 70°C aproximadamente, extendiendo el colorante en todo el portaobjetos con ayuda de otro portaobjetos. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en la obscuridad hasta su uso de acuerdo con la técnica de Hayashi (1990).

5.5.2 Toma de muestras

A los animales se les cortó la punta de la cola con ayuda de tijeras, obteniendo sangre periférica, la cual se colocó directamente sobre las laminillas preparadas previamente con NA. Inmediatamente después se colocó un cubreobjetos sobre las muestras y se sellaron con silicón líquido. Las preparaciones se guardaron en cajas de plástico en la oscuridad y después de 24 horas se analizaron bajo el microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión amarilla.

5.5.3 Evaluación de muestras

Se evaluó el daño citotóxico analizando la frecuencia de EPC con respecto a los ENC de 2000 eritrocitos totales; mientras que el daño genotóxico fue evaluado con la frecuencia de MN presentes en los EPC analizando 2000 eritrocitos totales.

5.6 Evaluación de la viabilidad y muerte celular

5.6.1 Preparación de colorantes

Se preparó una solución con 10 µg/ml de NA + 10 µg/ml de BrEt utilizando solución amortiguadora de fosfatos (PBS), de acuerdo a la técnica descrita por McGahon *et al.* (1995), con modificaciones (García-Rodríguez *et al.*, 2013).

5.6.2 Toma de muestras

Después de la administración de los tratamientos establecidos, se obtuvieron muestras de sangre periférica de los ratones únicamente a las 48 horas. Las

muestras se obtuvieron de sangre periférica de la vena caudal de los ratones. La sangre se extrajo directamente en un volumen aproximado de 100 μ l y se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm. Se retiró el sobrenadante e inmediatamente se agregó la mezcla de colorantes. Posteriormente se colocaron las muestras sobre laminillas limpias y se cubrieron con cubreobjetos.

5.6.3 Evaluación de muestras

Las evaluaciones se realizaron mediante la observación de las muestras bajo un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión de luz amarilla. Se evaluaron 200 células nucleadas por ratón; para la evaluación de la viabilidad se contabilizaron las células viables y no viables y posteriormente se calcularon los valores porcentuales, empleando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\text{total de células viables (no apoptóticas+apoptóticas tempranas)}}{\text{total de células contadas}} \times 100$$

$$\% \text{ de células no viables} = \frac{\text{total de células no viables (apoptóticas tardías+necróticas)}}{\text{total de células contadas}} \times 100$$

Mientras que para el análisis de apoptosis y necrosis se cuantificaron las células no apoptóticas, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas. Posteriormente se calcularon los valores porcentuales de viabilidad, apoptosis y necrosis de cada grupo estudiado, empleando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de células no apoptóticas} = \frac{\text{total de células no apoptóticas}}{\text{total de células contadas}} \times 100$$

$$\% \text{ de células apoptóticas} = \frac{\text{total de células apoptóticas (apoptóticas tempranas + tardías)}}{\text{total de células contadas}} \times 100$$

$$\% \text{ de células necróticas} = \frac{\text{total de células necróticas}}{\text{total de células contadas}} \times 100$$

5.7 Análisis estadístico

A los datos obtenidos en los experimentos se les aplicó un análisis de varianzas (ANOVA por sus siglas en inglés) seguido de una prueba Tukey o Dunnet según el caso, para determinar la significancia entre las medias de cada grupo. Se utilizó el paquete estadístico SPSS. Para la inducción de MN se calculó la Frecuencia Neta de Inducción de MN (NIF por sus siglas en inglés) y la Frecuencia de Inducción Diferencial de MN (DIF por sus siglas en inglés) (García-Rodríguez *et al.*, 2001). Los datos obtenidos de los análisis del NIF y DIF, así como los resultados obtenidos del ensayo de apoptosis, necrosis y viabilidad celular se analizaron mediante una prueba chi-cuadrada (χ^2) utilizando el paquete Statistica V6 (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001). Para todos los casos, se tomaron los datos con una $p < 0.05$ como significativos estadísticamente (Adler *et al.*, 1998).

6. Resultados

En la figura 7, se observa la tinción obtenida con NA para la técnica de MN, se pueden identificar los ENC como sombras, debido a que estos no se tiñen porque ya se ha degradado el ARN (Figura 7A), mientras que los EPC se tiñen de color anaranjado fluorescente debido a que aún contienen ARN (Figura 7B). Los MN se observan como cuerpos redondos de color amarillo fluorescente, debido a la presencia de ADN (Figura 7C).

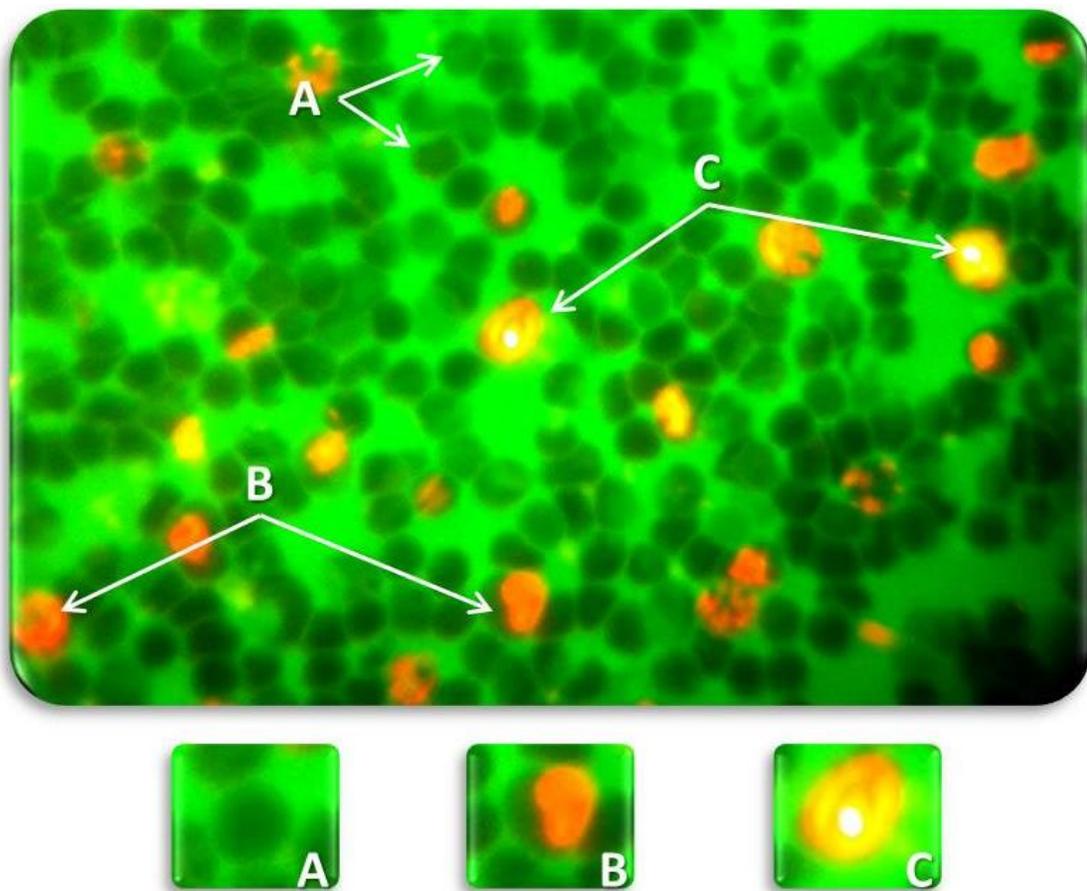


Figura 7. Eritrocitos de sangre periférica de ratón teñidos con la técnica de MN empleando la NA. Se observan los (A) ENC, (B) EPC y (C) MN.

6.1 MN evaluados con los tratamientos de Ac. asc., α -TOH y V_2O_5

En el cuadro 1 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluados en sangre periférica de las 0 a las 72 horas después de la administración de los tratamientos con Ac. asc. (100 mg/kg por vía ip), V_2O_5 (40 mg/kg por vía ip) y la combinación de Ac. asc.+ V_2O_5 (100+40 mg/kg por vía ip respectivamente). Se observa que la administración sola del Ac. asc. no incrementa los promedios de MN, por el contrario los disminuye al compararlos con el grupo testigo. Sin embargo, en el grupo tratado con V_2O_5 se observa un incremento de alrededor de 2 a 5 MN en los promedios de MN que resultaron estadísticamente significativos al compararse con el grupo testigo y con su propia hora 0 (cuando aún no se habían administrado los tratamientos). Cuando se administró previamente el tratamiento de Ac. asc. al de V_2O_5 se disminuyeron los promedios de MN en todas las horas evaluadas en comparación con el grupo tratado solo con V_2O_5 , por lo que ya no resultan estadísticamente significativo al compararse con el grupo testigo.

Cuadro 1. Promedio de las frecuencias de MN en sangre periférica de ratones tratados con Ac. asc. y V_2O_5 .

Grupo	Dosis (mg/kg)	N	Hora	MN / 2000 EPC $\bar{x} \pm d.e.$	ANOVA
Testigo	0	5	0	1.0 \pm 0.7	
			24	1.6 \pm 0.5	
			48	1.8 \pm 0.8	
			72	2.4 \pm 0.5	
Ac. asc.	100	5	0	1.0 \pm 0.7	
			24	0.4 \pm 0.5	
			48	0.6 \pm 0.5	
			72	0.6 \pm 0.9	
V_2O_5	40	5	0	2.8 \pm 0.8	
			24	4.4 \pm 0.5	a, c
			48	6.0 \pm 1.2	a, b, c
			72	7.8 \pm 1.6	a, b, c
Ac. asc.+ V_2O_5	100 + 40	5	0	2.2 \pm 0.4	
			24	1.8 \pm 0.8	
			48	1.4 \pm 0.5	
			72	1.6 \pm 0.9	

^a: p< vs. testigo; ^b: p< vs. V_2O_5 hora 0; ^c: p< vs. Ac. asc.+ V_2O_5 .

Dado que los promedios de MN basales fueron muy variables a la hora 0, se calculó la NIF de MN con la finalidad de contabilizar solo los MN que se indujeron después de la administración de los tratamientos. Este cálculo consiste en restar el número de MN observados a la hora 0, a las siguientes horas de evaluación de cada tratamiento, como lo indica la siguiente fórmula:

$$\text{NIF} = \text{MN}_a X_i - \text{MN}_a X_0$$

Dónde:

a = grupo

X_i = tiempo de evaluación

X_0 = tiempo 0

En la figura 8 se muestra el análisis por tiempo y por grupo del NIF calculado para 10,000 EPC. Al realizar este análisis se corroboró el efecto observado en el cuadro 1, ya que persiste la reducción de las frecuencias de MN en el grupo tratado únicamente con Ac. asc. al compararlo con el grupo testigo, sin embargo con este cálculo podemos observar que la reducción fue del 200 y 128.5% a las 24 y 72 horas respectivamente. De igual manera en el grupo tratado con ambos tratamientos (Ac. asc.+V₂O₅), la disminución de las frecuencias de los MN en comparación con el grupo tratado solo con el V₂O₅ fue del 125% a las 24 y 48 horas, mientras que para las 72 horas fue del 112%.

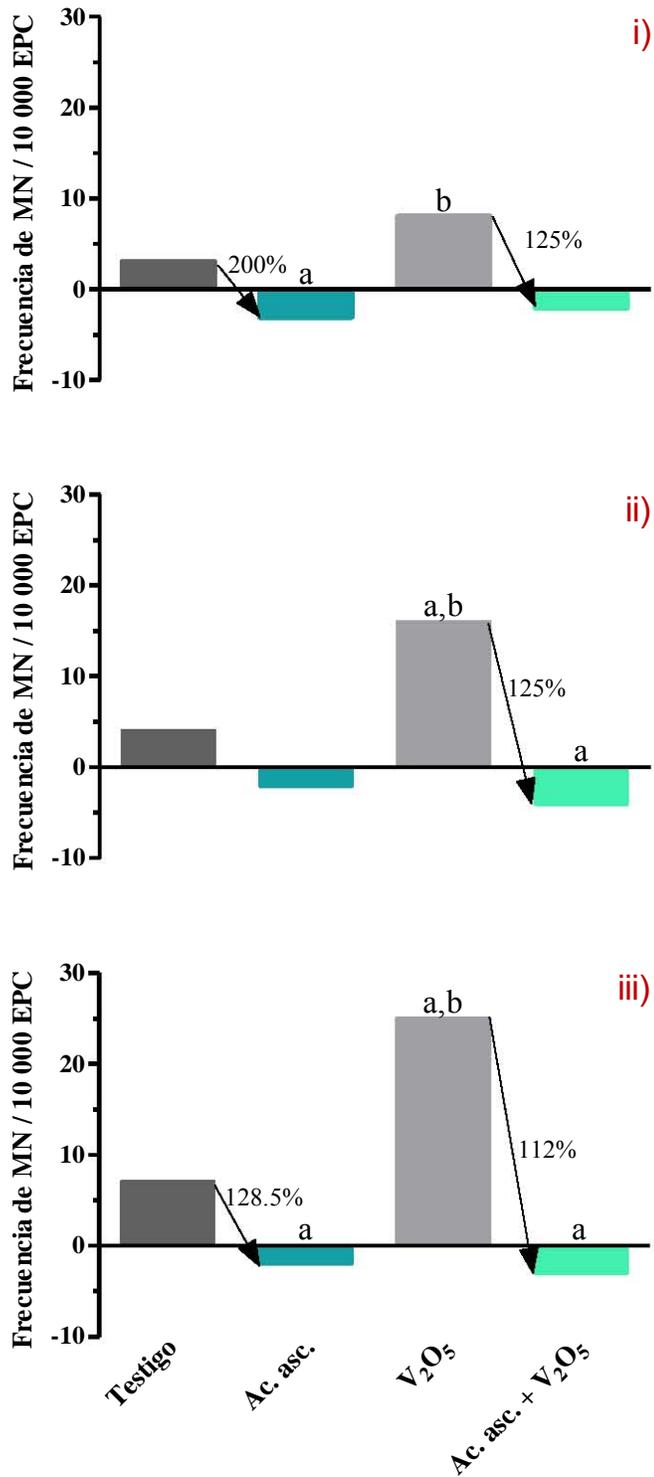


Figura 8. Análisis del NIF de MN calculado por grupo para 10,000 EPC, en los diferentes tiempos evaluados: i) 24, ii) 48 y ii) 72 horas. ^a: p< vs. testigo; ^b: p< vs. Ac. asc.+V₂O₅.

Con la finalidad de descartar los MN inducidos por el manejo de los ratones durante el experimento, se calculó la DIF de MN. Este análisis consiste en restar los valores de MN observados en todas las horas de evaluación del grupo testigo a sus correspondientes horas de los grupos tratados.

$$\text{DIF} = \text{MN}_a X_i - \text{MN}_t X_i$$

Dónde:

a = grupo

X_i = tiempo de evaluación

t = grupo testigo

En la figura 9 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN al realizar el análisis del DIF. Se puede observar que el manejo de los animales no presenta efecto sobre los MN evaluados, ya que el grupo tratado con Ac. asc. muestra una tendencia a la disminución de las frecuencias basales de MN, al igual que el grupo combinado (Ac. asc. + V_2O_5). El grupo tratado con el V_2O_5 tiene un comportamiento similar al observado en el análisis del NIF.

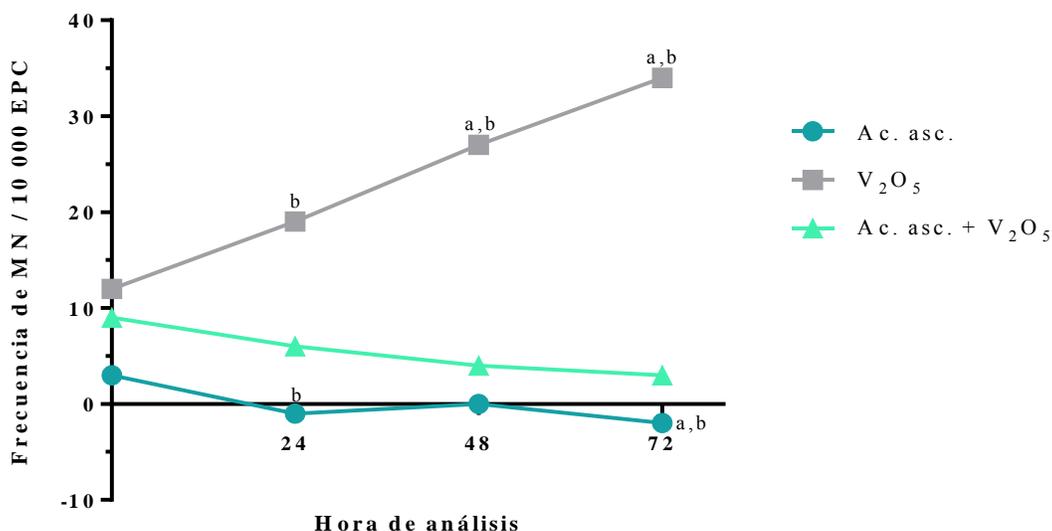


Figura 9. Análisis del DIF de MN por tiempo y por grupo, calculado para 10 000 EPC, en los diferentes tiempos evaluados: 0, 24, 48 y 72 horas. ^a: p< vs. hora 0; ^b: p< vs. Ac. asc.+V₂O₅.

En el cuadro 2 se muestran los promedios de MN de las muestras de sangre periférica, evaluadas de las 0 a las 72 horas cuando se administraron los tratamientos de α -TOH (20 mg/kg por vía ig), V₂O₅ (40 mg/kg por vía ip) y la combinación de los tratamientos (α -TOH+V₂O₅) (20 mg/kg por vía ig + 40 mg/kg por vía ip). Se observó que la administración sola del α -TOH tuvo un leve incremento de los promedios de MN al compararlo con el grupo testigo. En contraparte, en el grupo tratado únicamente con V₂O₅ se observó un incremento significativo en los promedios de MN (alrededor de 2 a 7 MN) a partir de las 24 horas cuando se comparó con el grupo testigo y contra su propia hora 0 a partir de las 48 horas. Mientras que en el grupo donde se combinaron los tratamientos (α -TOH+V₂O₅) se disminuyeron significativamente los promedios de MN en comparación con el grupo V₂O₅.

Cuadro 2. Promedio de las frecuencias de MN en ratones tratados con α -TOH y V_2O_5 .

Grupo	Dosis (mg/kg)	N	Hora	MN / 2000 EPC $\bar{x} \pm d.e.$	ANOVA
Testigo	0	5	0	0.3 \pm 0.50	
			24	0.5 \pm 0.60	
			48	0.8 \pm 0.90	
			72	0.5 \pm 0.60	
α -TOH	20	5	0	0.6 \pm 0.90	
			24	1.0 \pm 0.70	
			48	0.6 \pm 0.50	
			72	0.6 \pm 0.50	
V_2O_5	40	5	0	2.8 \pm 0.80	
			24	4.4 \pm 0.50	a, c
			48	6.0 \pm 1.20	a, b, c
			72	7.8 \pm 1.60	a, b, c
α -TOH+ V_2O_5	20 + 40	5	0	1.4 \pm 0.90	
			24	2.0 \pm 0.70	
			48	2.4 \pm 0.50	
			72	1.6 \pm 0.50	

^a: p< vs. testigo; ^b: p< vs. V_2O_5 hora 0; ^c: p< vs. α -TOH + V_2O_5 .

Al realizar el NIF por tiempo y grupo (Figura 10) se observó un efecto similar al observado cuando se calcularon los promedios (Cuadro 2), ya que en el grupo tratado solo con α -TOH se disminuyeron las frecuencias basales de MN respecto al grupo testigo. Mientras que en el grupo de V_2O_5 se observó un aumento significativo de las frecuencias de MN con respecto al grupo testigo. En el grupo de α -TOH+ V_2O_5 se observó una disminución de las frecuencias de MN (62.5, 68.75 y 96%, a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente), siendo estadísticamente significativo contra el grupo de V_2O_5 (48 y 72 horas).

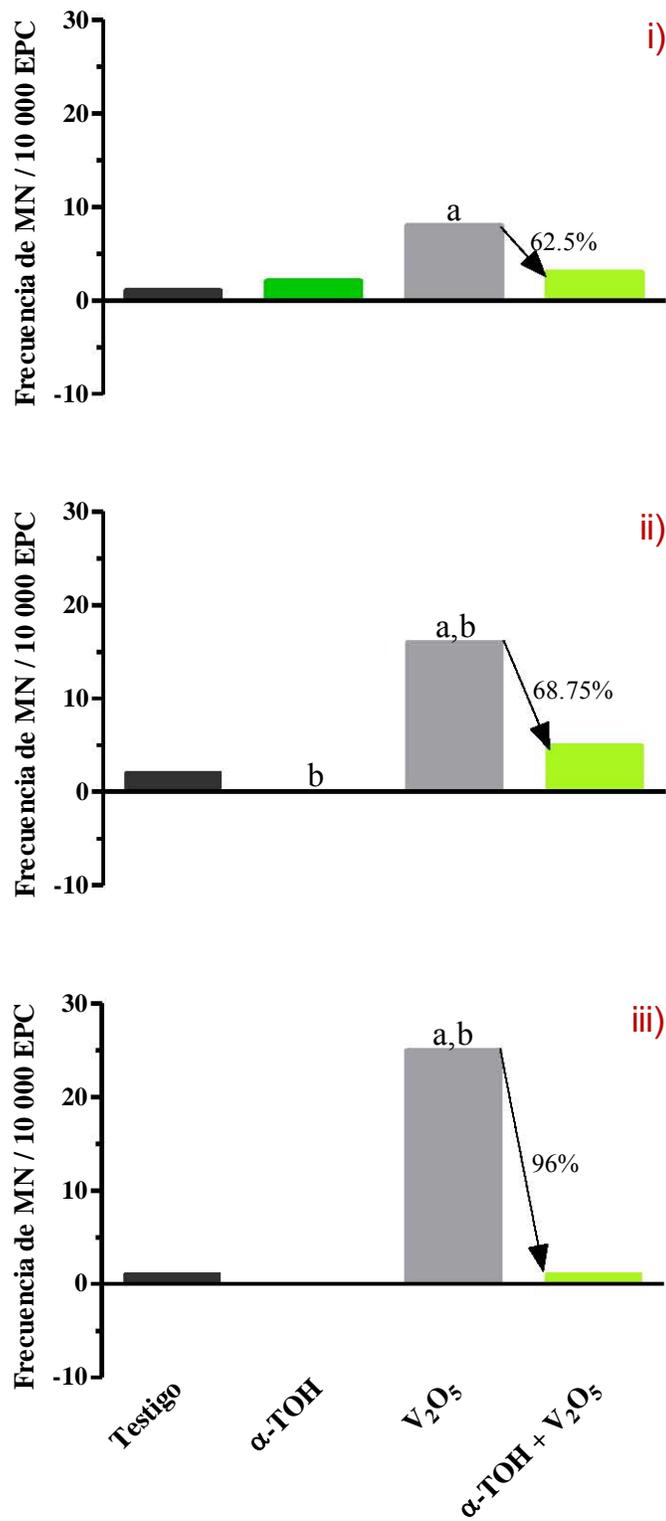


Figura 10. Análisis del NIF de MN calculado por grupo para 10 000 EPC, en los diferentes tiempos evaluados: i) 24, ii) 48 y iii) 72 horas. ^a: p< vs. testigo; ^b: p< vs. α-TOH+V₂O₅.

En la figura 11 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN al realizar el análisis del DIF. En este análisis se observa un comportamiento similar al del análisis del NIF, ya que tanto el grupo tratado solo con α -TOH, como el tratado con α -TOH+V₂O₅ tienen una tendencia a disminuir las frecuencias basales de MN. Mientras que el grupo tratado únicamente con V₂O₅ aumenta significativamente las frecuencias de MN respecto a su hora 0.

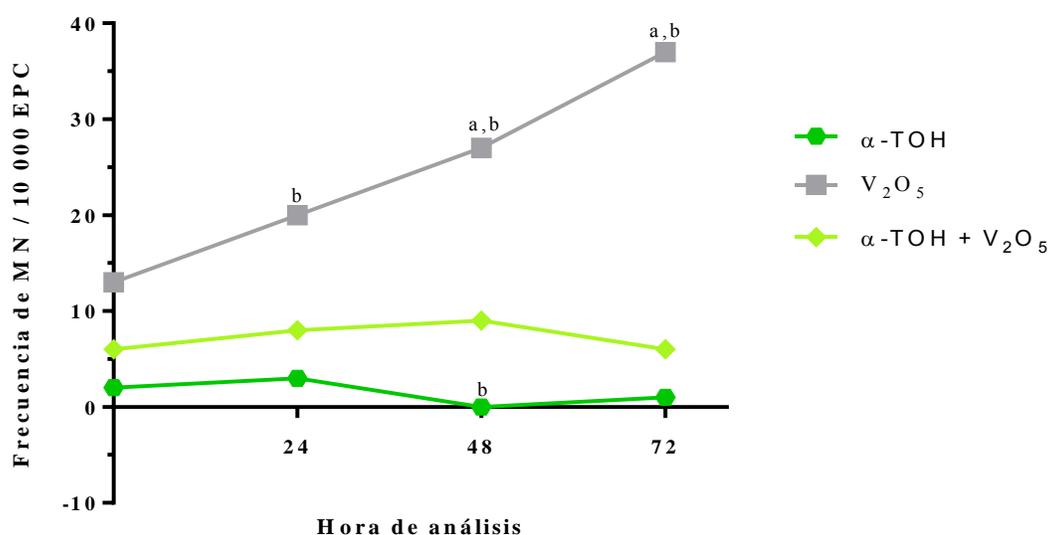


Figura 11. Análisis del DIF de MN por tiempo y por grupo, calculado para 10 000 EPC, en los diferentes tiempos evaluados: 0, 24, 48 y 72 horas. ^a: p< vs. hora 0, ^b: p< vs. α -TOH +V₂O₅.

6.2 Evaluación de apoptosis y necrosis en células nucleadas de sangre periférica cuando se administraron los tratamientos de Ac. asc., α -TOH y V₂O₅

En la figura 12, se observa la tinción obtenida con la técnica de tinción diferencial realizada con NA/BrEt, la cual permite determinar si las células están o no en apoptosis y en qué estado, temprano o tardío, además de que permite diferenciar a las células necróticas. Las células no apoptóticas son aquellas que muestran

una membrana y cromatina intacta, debido a que presentan una membrana intacta no permite la entrada del BrEt pero si de la NA, la cual se intercala con el ADN, dando la tinción verde (Figura 12A). Mientras que las células apoptóticas, son aquellas que presentan la cromatina condensada o fragmentada y tienen una tinción verde fluorescente ya que la membrana aún está intacta y el BrEt no puede atravesarla (Figura 12B). Las células apoptóticas tienen la cromatina fragmentada y muestran la formación de vesículas en la membrana, lo que permite la entrada del BrEt que al intercalarse con el ADN se tiñen de color rojo fluorescente (Figura 12C). Por otra parte, las células necróticas presentan una cromatina con una estructura organizada y tienen una tinción roja fluorescente (Figura 12D).

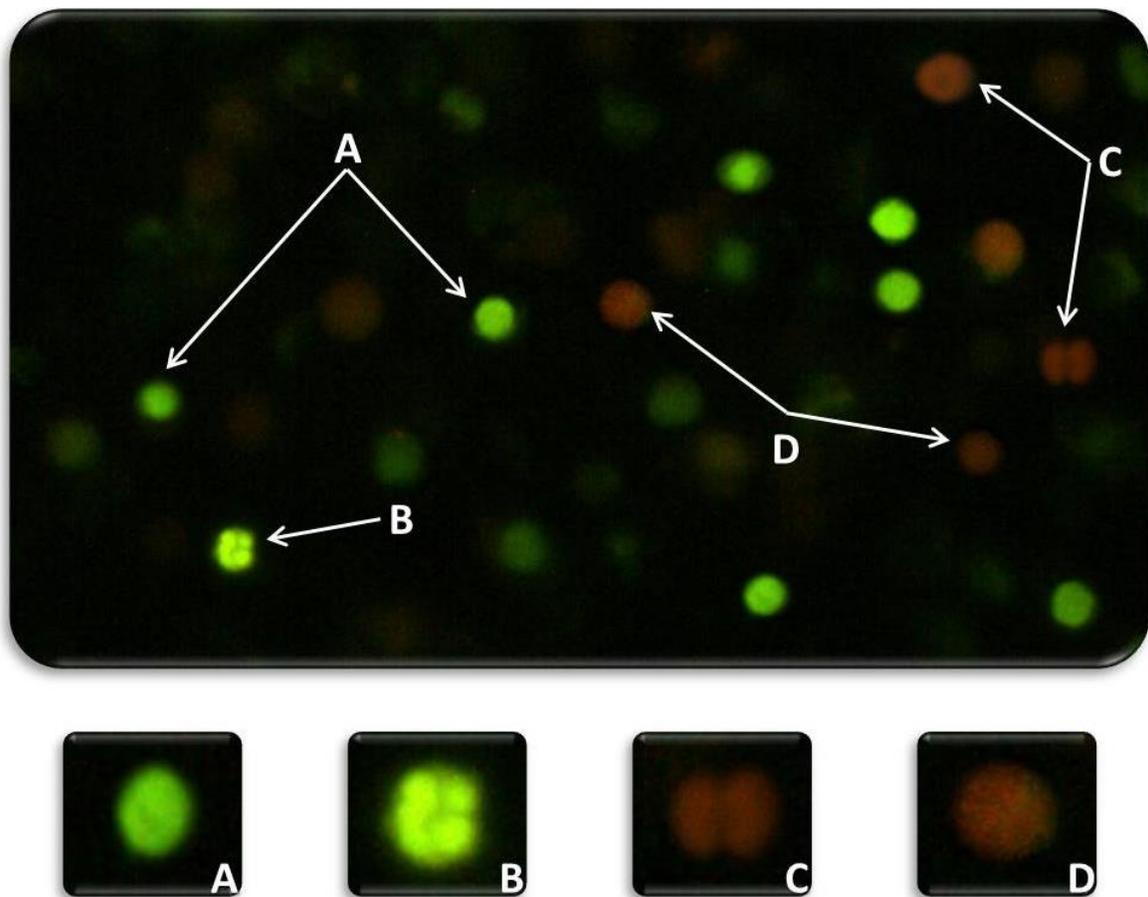
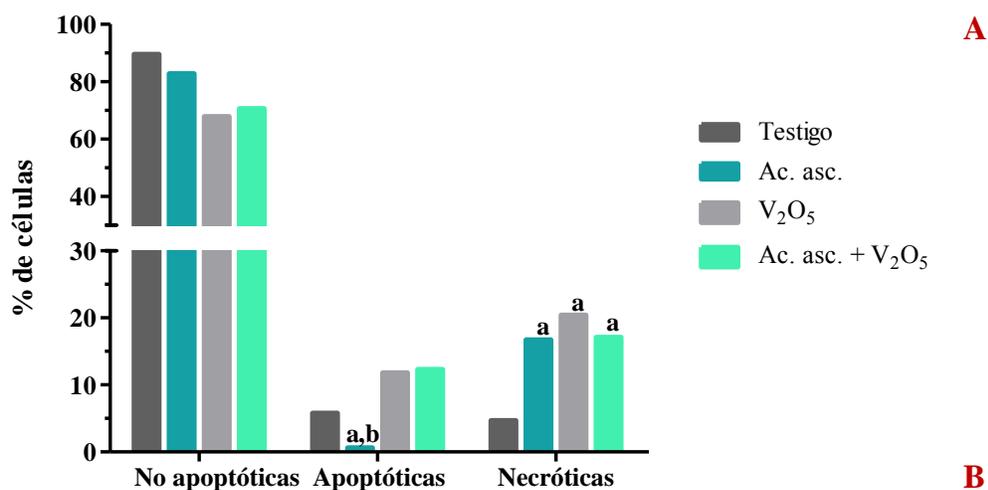


Figura 12. Células nucleadas de sangre periférica de ratón teñidas con NA/BrEt. Se observan las células (A) no apoptóticas, (B) apoptóticas tempranas, (C) apoptóticas tardías y (D) necróticas.

En la figura 13 se muestran las evaluaciones de la apoptosis y necrosis en los grupos tratados con Ac. asc. y V₂O₅ evaluados a la hora 48. En la figura 13A se observa que la administración sola de Ac. asc. disminuye significativamente los porcentajes de las células apoptóticas al compararlos con el grupo testigo. Mientras que, los porcentajes de las células apoptóticas se incrementaron en los grupos V₂O₅ y el Ac. asc.+V₂O₅. Sin embargo, los porcentajes de las células necróticas se incrementaron en los tres grupos de manera significativa.

Al calcular los promedios de estos datos y realizarles un ANOVA (Figura 13B) se puede observar que los incrementos en las células apoptóticas para los tratamientos de Ac. asc, V₂O₅ y Ac. asc. + V₂O₅ si tienen un efecto significativo al igual que las células necróticas.

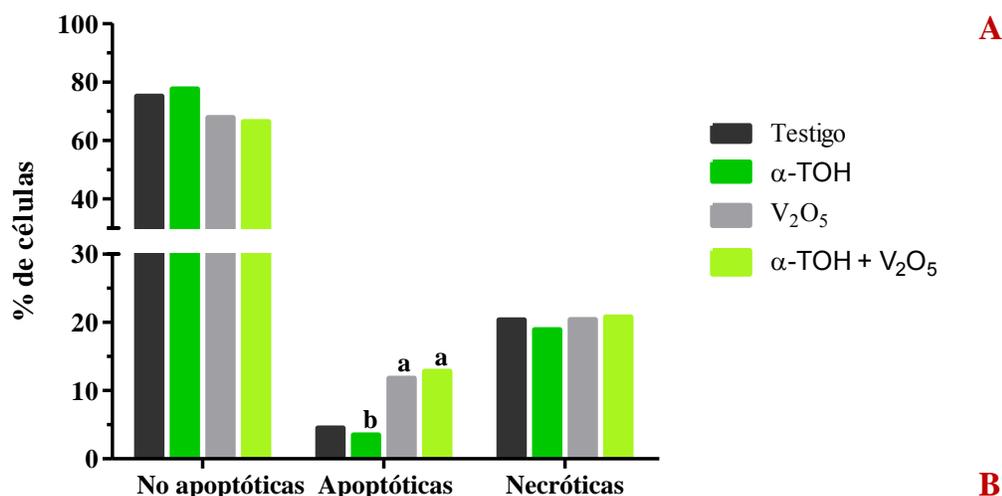


Grupo	Dosis (mg/kg)	N	$(\bar{x} \pm d.e.)$			
			No apoptóticas	A. tempranas	A. tardías	Necróticas
Testigo	0	5	179.0 ± 2.6	11.6 ± 2.1	0.0 ± 0.0	9.4 ± 2.1
Ac. asc.	100	5	165.4 ± 2.7 ^{a,b}	1.0 ± 0.7 ^{a,b}	0.2 ± 0.4	33.4 ± 2.5 ^a
V ₂ O ₅	40	5	135.6 ± 5.3 ^a	21.2 ± 5.6 ^a	2.4 ± 1.3 ^{a,b}	40.8 ± 5.4 ^a
Ac. asc.+V ₂ O ₅	100+40	5	141.2 ± 1.6 ^a	23.8 ± 2.4 ^a	0.8 ± 0.5	34.2 ± 1.9 ^a

Figura 13. (A) Análisis del porcentaje de células no apoptóticas, apoptóticas y necróticas. (B) Promedios de las frecuencias de las células no apoptóticas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas. ^a: p< vs. testigo; ^b: p< vs. Ac. asc.+V₂O₅.

En la figura 14 se muestran los datos obtenidos para el análisis de la apoptosis en los grupos tratados con α -TOH y V_2O_5 evaluados a la hora 48. En la figura 14A se observa que en los grupos tratados con V_2O_5 ya sea solo o en combinación, se incrementaron significativamente los porcentajes de las células apoptóticas respecto al grupo testigo. En cuanto a las células necróticas, se observa un porcentaje similar en los tres grupos tratados al compararlos con el grupo testigo.

Al calcular los promedios y realizarles un ANOVA (Figura 14B) se corroboró el incremento de las células apoptóticas en los grupos de V_2O_5 y combinado observado en la Figura 14A. Y al comparar los resultados de las células apoptóticas tempranas y tardías obtenidas en estos grupos con los de los grupos del Ac. asc. (Figura 13B) se observó que hay una mayor cantidad de células apoptóticas tempranas que apoptóticas tardías.



Grupo	Dosis (mg/kg)	N	$(\bar{x} \pm d.e.)$			
			No apoptóticas	A. tempranas	A. tardías	Necróticas
Testigo	0	5	150.2 \pm 2.2	9.0 \pm 0.8	0.0 \pm 0.0	40.8 \pm 2.6
α -TOH	20	5	155.2 \pm 7.4 ^b	6.8 \pm 13.2 ^b	0.2 \pm 0.5	37.8 \pm 4.1
V_2O_5	40	5	135.6 \pm 5.3 ^a	21.2 \pm 5.6 ^a	2.4 \pm 1.3 ^{a,b}	40.8 \pm 5.4
α -TOH+ V_2O_5	20+40	5	132.8 \pm 5.3 ^a	25.0 \pm 3.5 ^a	0.6 \pm 0.5	41.6 \pm 4.6

Figura 14. (A) Análisis del porcentaje de células no apoptóticas, apoptóticas y necróticas. (B) Promedios de las frecuencias de las células no apoptóticas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas. ^a: p< vs. testigo; ^b: p< vs. α -TOH+ V_2O_5 .

6.3 Evaluación de la citotoxicidad en sangre periférica de ratones tratados con Ac. asc., α -TOH y V_2O_5

En el cuadro 3 se muestran los promedios de los EPC con relación a los ENC (1000 células totales) cuando se administraron los tratamientos de Ac. asc. y V_2O_5 . Tanto en el grupo tratado solo con el Ac. asc. como en Ac. asc.+ V_2O_5 se observa una reducción significativa de los promedios de EPC de las 24 a las 72 horas (grupo tratado solo con Ac. asc.) y de las 48 a las 72 horas (grupo Ac. asc.+ V_2O_5) al compararse con el el grupo testigo.

Cuadro 3. Promedios de los EPC en ratones macho tratados con Ac. asc., V_2O_5 y Ac. asc.+ V_2O_5 .

Grupo	Dosis (mg/kg)	N	Hora	EPC / 1000 ENC <i>media \pm d.e.</i>	ANOVA
Testigo	0	5	0	127.4 \pm 5.9	
			24	123.2 \pm 11.2	
			48	133.6 \pm 10.1	
			72	128.8 \pm 4.9	
Ac. asc.	100	5	0	100.6 \pm 2.0	
			24	68.8 \pm 1.9	a, b
			48	67.2 \pm 3.0	a, b
V_2O_5	40	5	0	123.8 \pm 6.6	
			24	125.4 \pm 4.2	
			48	124.8 \pm 4.3	c
Ac. asc.+ V_2O_5	100 + 40	5	0	101.2 \pm 4.7	
			24	95.8 \pm 5.3	
			48	88.4 \pm 1.3	a
			72	87.6 \pm 1.9	a,d

^a: p< vs. testigo; ^b: p< vs. Ac. asc. hora 0; ^c: p< vs. Ac. asc.+ V_2O_5 ; ^d: p< vs. Ac. asc.+ V_2O_5 hora 0.

En el cuadro 4 se muestran los promedios de los EPC con respecto a los ENC (1000 células totales) en los grupos tratados con α -TOH y V_2O_5 . En el grupo tratado solo con α -TOH se observa un decremento significativo en los promedios

de EPC, comparándolo con el grupo testigo y con su propia hora 0. En el grupo tratado únicamente con V_2O_5 , se observa un incremento significativo al compararlo con el grupo testigo e incluso es significativo a las 72 horas contra su propia hora 0. Mientras que en el grupo de α -TOH+ V_2O_5 , los promedios de EPC se disminuyen significativamente al compararlo con el grupo testigo y el grupo de V_2O_5 .

Cuadro 4. Promedios de las frecuencias de EPC en ratones macho tratados con α -TOH, y V_2O_5 y α -TOH+ V_2O_5 .

Grupo	Dosis (mg/kg)	N	Hora	EPC / 1000 ENC <i>media ± d.e.</i>	ANOVA
Testigo	0	4	0	115.0 ± 3.9	
			24	115.5 ± 4.0	
			48	111.7 ± 3.4	
			72	114.0 ± 2.2	
α -TOH	20	5	0	103.4 ± 3.6	
			24	75.4 ± 3.4	a, b
			48	66.2 ± 7.0	a, b
			72	67.8 ± 2.4	a, b
V_2O_5	40	5	0	123.8 ± 6.6	
			24	125.4 ± 4.2	a, c
			48	124.8 ± 4.3	a, c
			72	136.6 ± 3.0	a, c
α -TOH+ V_2O_5	20 + 40	5	0	116.0 ± 4.4	
			24	87.0 ± 3.4	a
			48	84.6 ± 3.4	a
			72	87.4 ± 2.2	a

^a: p< vs. testigo; ^b: p< vs. α -TOH hora 0; ^c: p< vs. α -TOH+ V_2O_5 .

Debido a que en los grupos estudiados se observa una alta variabilidad en la relación de los EPC con respecto a los ENC, se realizó el análisis de viabilidad celular en células nucleadas de sangre periférica con la tinción diferencial de NA/BrEt con la que se pueden diferenciar a las células viables y no viables en función de la integridad de la membrana. Las células viables son aquellas que muestran una tinción de verde fluorescente debido a que la NA se intercala con el

ADN (Figura 15A), por el contrario, cuando la célula no es viable el BrEt se intercala con el ADN y se une débilmente con el ARN, dando un aspecto de naranja a rojo fluorescente (Figura 15B).

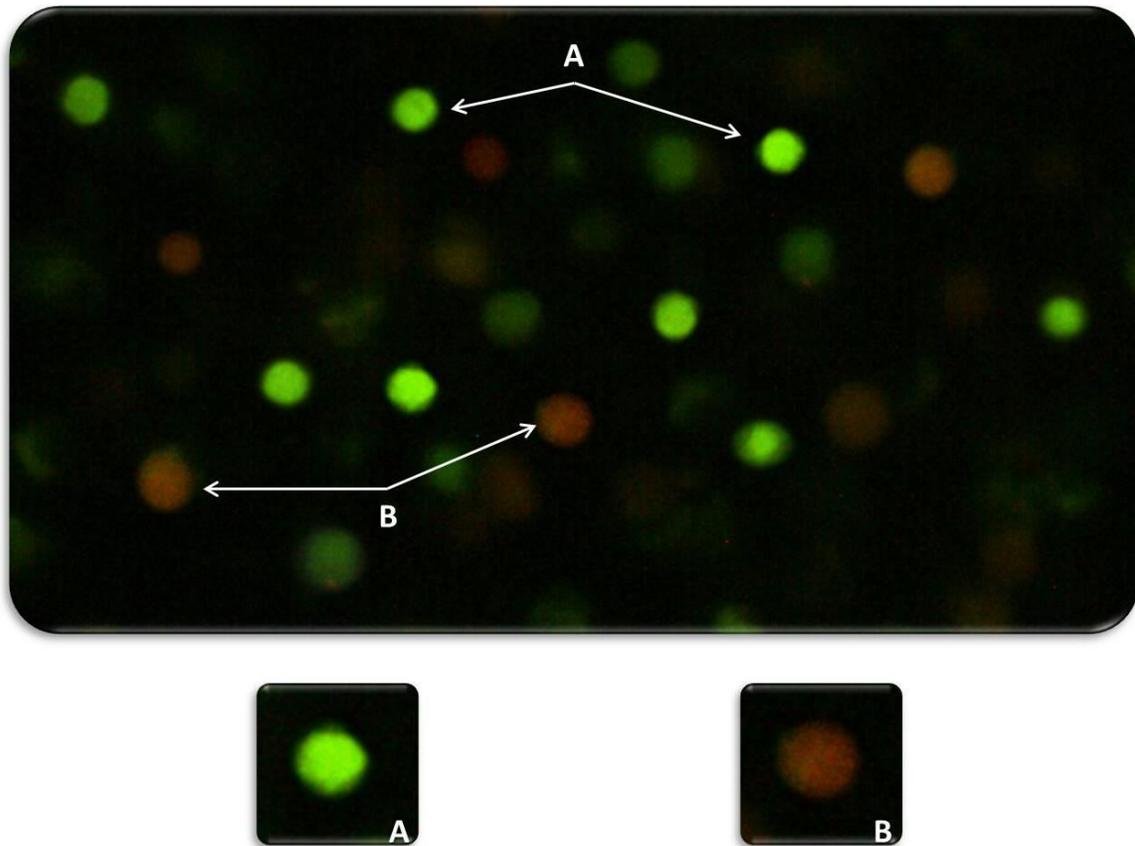


Figura 15. Células nucleadas de sangre periférica de ratón teñidas con NA/BrEt. Se observan las células viables (A) y no viables (B).

En la figura 16 se observa en los tres grupos, a los que se les administró Ac. asc. y V_2O_5 hubo un incremento significativo en las células no viables a las 48 horas al compararse con el grupo testigo.

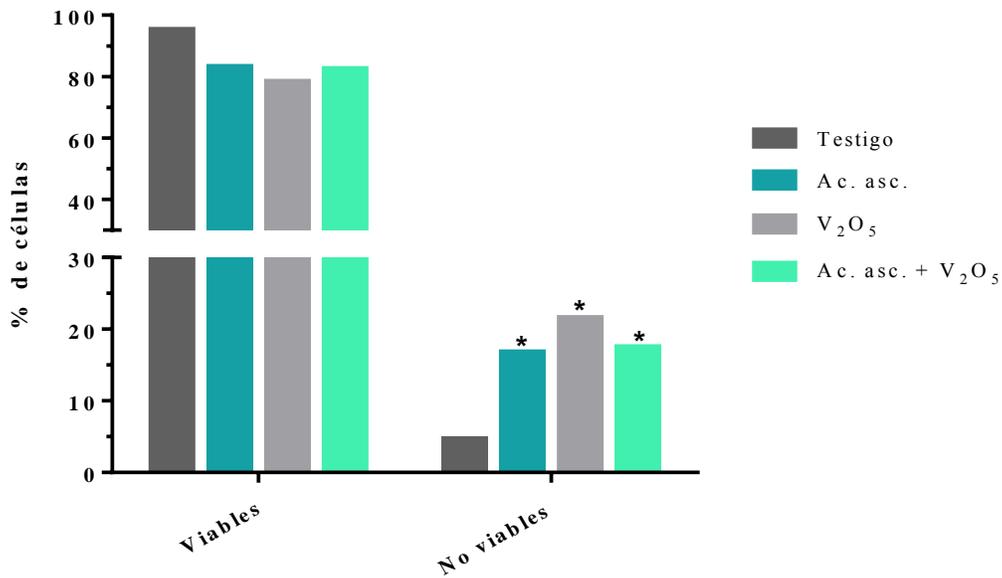


Figura 16. Análisis de las frecuencias de células viables y no viables de los grupos tratados Ac. asc., V₂O₅ y Ac. asc.+V₂O₅. *: p< vs. testigo.

En la figura 17 se observa que a diferencia del análisis EPC/ ENC, el porcentaje de células no viables es similar en todos los grupos tratados, solo en el grupo tratado α -TOH, hay un ligero decremento. Por otra parte, al comparar el efecto de los grupos de la Figura 16 con los de la Figura 17, se observa que el grupo testigo del Ac. asc. presenta una mayor viabilidad celular que el testigo del α -TOH. También se observa que el porcentaje de células no viables en el grupo de Ac. asc. es mayor que el observado en el grupo del α -TOH, comparándolo con su respectivo testigo.

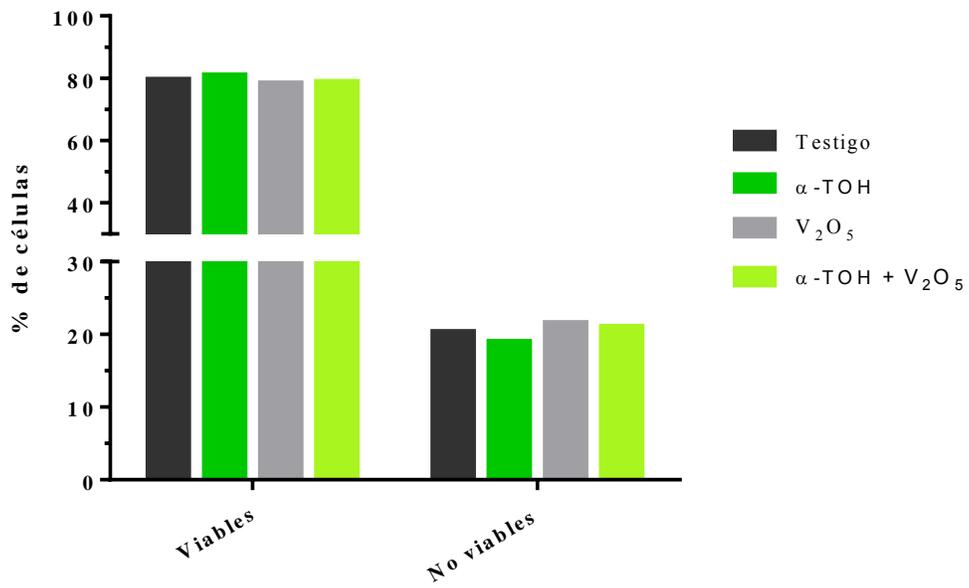


Figura 17. Análisis de las frecuencias de las células viables y no viables de los grupos tratados con α -TOH, V_2O_5 y α -TOH+ V_2O_5 .

Cuadro 5. Resumen de los resultados obtenidos en los diferentes parámetros de evaluación

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Vía de administración	Evaluación				
			MN	Apoptosis	EPC / ENC	No viables	Necróticas
Ac. asc.	100	ip	-	--	--	++	++
α -TOH	20	ig	+/-	-	--	+/-	+/-
V_2O_5	40	ip	++	++	+/-	++	++
Ac. asc.+ V_2O_5	100+40	ip	--	++	--	++	++
α -TOH+ V_2O_5	20+40	ig-ip	--	++	--	+/-	+/-

-: decremento leve; --: decremento moderado; +: incremento leve; ++: incremento moderado; +/-: sin efecto.

7. Discusión

La contaminación ambiental por metales pesados constituye en la actualidad una preocupación a nivel mundial por los riesgos que conlleva para la salud humana. Aunque algunos metales pesados como el V son micronutrientes y se encuentran en casi todos los seres vivos en concentraciones elevadas presentan efectos tóxicos (EFSA, 2004). El V_2O_5 ha sido considerado por la IARC como un posible carcinógeno para el humano y que aunque ha mostrado efectos citotóxicos y tóxicos generalizados, existen pocas evidencias *in vivo* de sus efectos sobre el ADN y de los mecanismos de inducción del daño (IARC, 2006). Se ha propuesto que algunos compuestos metálicos son capaces de atravesar la membrana celular y durante esta reducción generar EROs y RL, mismos que pueden interaccionar y dañar biomoléculas como el ADN (Evangelou, 2002, Mukherjee *et al.*, 2004). En contraparte, en estudios epidemiológicos se ha observado que los componentes antioxidantes de las frutas y los vegetales, son un factor importante en la modulación de algunas enfermedades relacionadas con el daño al ADN, así como de algunos tipos de cáncer (Zhou *et al.*, 2005; Zamora, 2007). En particular el Ac. asc., es una vitamina esencial y un importante agente antioxidante que se sintetiza químicamente a partir de la glucosa, mientras que el α -TOH es el principal antioxidante de la fase lipídica, ya que previene la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, deteniendo la cadena de auto-oxidación, además de participar en la estabilidad de las lipoproteínas e influir en la arquitectura de los fosfolípidos (Cerqueira *et al.*, 2007). De ahí que, en el presente estudio se evaluó el efecto del Ac. asc. y del α -TOH sobre el daño citotóxico y genotóxico inducido por el V_2O_5 , mediante la evaluación de la viabilidad celular y la inducción de MN y la apoptosis en ratones macho de la cepa CD-1.

Se observó que la administración sola de los antioxidantes, Ac. asc. y α -TOH, en una única dosis de 100 mg/kg por vía ip y 20 mg/kg por vía ig respectivamente, no produjeron: a) efectos tóxicos aparentes, b) efectos genotóxicos y c) inducción de apoptosis. Solo se observaron efectos citotóxicos con la administración del Ac. asc. (incremento en células necróticas y no viables).

Para ambos grupos tratados con los antioxidantes (Ac. asc. y α -TOH) no se observaron efectos tóxicos aparentes ya que los ratones tratados mostraron un comportamiento, pelaje y peso normal. Nuestros resultados concuerdan con estudios realizados por otros autores, ya que se ha reportado que la administración de 50 mg/kg de Ac. asc. a ratones (durante 90 días), no indujo muerte, no hubo pérdida de peso, ni efectos en el comportamiento. No se observaron síntomas tóxicos externos en la apariencia general, piel y pelo, con respecto al patrón de comportamiento en cuanto a la ingesta de agua, alimentos y actividad física (Ghosh *et al.*, 2006). En otro estudio donde se empleó una dosis mayor, 290 mg/kg por vía ip en intervalos de 2 días, se observó un comportamiento normal y no se reportaron efectos tóxicos aparentes (Park *et al.*, 2012). En otro estudio realizado en ratones que fueron tratados con Ac. asc. y α -TOH, no se observaron efectos tóxicos, hepatotóxicos ni nefrotóxicos y por el contrario se reportó que tanto el Ac. asc. como el α -TOH, contrarrestaban los efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos inducidos por el cisplatino (Maliakel, 2008). Así mismo, Vrolijk *et al.* (2015) no reportaron signos de toxicidad en ratones a los cuales se les administraron concentraciones de 1.25, 5 o 10 mM de α -TOH, sin embargo a dosis muy altas pueden presentar signos de toxicidad e incluso la muerte.

Cabe señalar que las dosis que se emplearon en este estudio, 100 mg/kg de Ac. asc. y 20 mg/kg de α -TOH, son menores a la LD₅₀ reportadas para ratones (USP DI, 1999) y estas dosis pueden alcanzarse en humanos con la ingesta recomendada de cinco frutas o verduras (Cadenas y Packer, 2002).

De igual manera, al administrar los antioxidantes solos no indujeron daño genotóxico mediante el incremento de las frecuencias de MN. Se ha demostrado que los antioxidantes exógenos, como el α -TOH y el Ac. Asc., presentes en frutas y verduras siempre oponen la actividad de la defensa antioxidante endógena. Los estudios clínicos han demostrado que una dieta rica en frutas, verduras, granos enteros, legumbres y ácidos grasos omega 3, está asociada con una menor incidencia y mortalidad por diferentes enfermedades crónicas, además de que la

dieta al contener un alta cantidad de diverso antioxidantes puede ser un factor en la protección contra enfermedades degenerativas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, esto por su alto contenido (Jacob y Burri, 1996; Hughes y Ong 1998; Willet, 2006).

En un estudio realizado en ratones que fueron tratados con Ac. asc. (1 mg/kg) no se reportó efectos genotóxicos de Ac. asc., en el estudio evaluaron el índice y frecuencia del daño genotóxico por medio del ensayo cometa, así como el ensayo de MN, los cuales no reportaron actividad genotóxica del Ac. asc., ya que los índices de genotoxicidad evaluados mediante el ensayo cometa no se incrementaron significativamente, ni se observó un aumento en la frecuencia de MN en reticulocitos (RET). En otros estudios realizados con ratones tratados con nicotina como agente genotóxico y Ac. asc. como antioxidante, donde el Ac. asc. fue administrado en una única dosis de 1 mg/kg se pudo observar que el Ac. asc. no mostraba efectos genotóxicos ni mutágenos, por el contrario disminuía la frecuencia de MN presentes en RET (Kahl *et al.*, 2012). Mientras que, cuando se trataban con 500 mg/kg por vía ig a ratones con Ac. asc. durante 5 días consecutivos, se observó que el Ac. asc. no incrementa las frecuencias de intercambio de cromatinas hermanas ni el porcentaje de aberración cromosómica, así como tampoco se incrementaron los promedios de MN, por el contrario se disminuyen en comparación con el grupo testigo (Das *et al.*, 2013). La reducción de la frecuencia basal de los MN, puede estar relacionada con la capacidad que tiene el Ac. asc. para eliminar los RL de las ERO's y de esta forma neutralizando el estrés oxidante generado intracelularmente de forma espontánea en las reacciones de óxido-reducción que son fundamentales para la obtención de la energía entre otros procesos en los seres vivos (Crott y Fenech, 1999; Konigsberg, 2008). El ascorbato reacciona con las ERO's, que inactiva y se convierte en un radical poco reactivo, radical ascorbilo. Por lo tanto el ascorbato reduce de manera eficiente el daño *in vivo* reduciendo así el riesgo de cáncer suprimiendo el estrés oxidante inducido por los RL (Crott y Fenech, 1999).

Al realizar la evaluación de la apoptosis en el grupo tratado con Ac. asc. no se observó un incremento en los porcentajes de células apoptóticas, esto al compararlo con el grupo testigo, por el contrario los porcentajes disminuyeron significativamente. Mientras que los porcentajes de las células necróticas incrementaron significativamente. Siendo mayor el porcentaje de células necróticas que apoptóticas y de acuerdo con Turley *et al.* (1995) las células necróticas observadas podrían ser un estado progresivo de la apoptosis.

Al evaluar la citotoxicidad del Ac. asc. se pudo observar un incremento en los porcentajes de células no viables y necróticas, lo que nos podría indicar un posible efecto citotóxico. Se ha observado que el Ac. asc. presenta una doble faceta en el sentido de que se presenta una actividad pro-oxidante derivada de propiedad antioxidante. Aparte de la reducción de fuentes de oxidantes como H₂O₂, el ascorbato también reduce los iones de metal como el Fe³⁺ y Cu³⁺, proceso durante el cual se generan los RL. Esta reacción de ascorbato que genera radicales libres altamente reactivos en presencia de iones de metales de transición se denomina reacción de Fenton (Carr y Frei, 1999; Naidu, 2003).



Este efecto pro-oxidante se ha observado en diversos estudios, y se ha observado que depende de la dosis y de sus compuestos derivados (Kishino *et al.*, 2008). Belin *et al.* (2009) estudiaron los efectos del Ac. asc. sobre células Raji *in vitro* con un período de tratamiento de 96 h, informó una disminución en la densidad celular o la proliferación celular, además de una disminución en el porcentaje de células viables conforme aumentaba la dosis y el tiempo de exposición al Ac. asc.. Belin *et al.*, proponen que el Ac. asc. puede inhibir la división celular y además promover la necrosis.

En cuanto al α -TOH, se observó que tampoco tuvo efecto genotóxico, ya que no se incrementaron los MN, y esto concuerda con un estudio realizado en ratas Wistar tratadas con una dosis de 100 mg/kg de α -TOH vía ig, se observó que el α -TOH no incrementó la frecuencia de MN durante los 21 días que fueron observadas, también mediante el ensayo cometa observaron que las colas de los cometas en el grupo tratado con α -TOH no tenía un aumento significativo con respecto al grupo testigo, así mismo el ensayo cometa se realizó en células del hígado y de la misma manera se observó que el α -TOH no incrementaba la longitud de las colas de los cometas sino por el contrario se veían disminuidas al compararlas con el grupo testigo (Singh *et al.*, 2008). También en otro estudio realizado por Kan *et al.* (2012), en el cual emplearon peces *Oreochromis niloticus* alimentados con 100 mg/kg de α -TOH en su dieta durante 30 días, al realizar el ensayo de MN se observó que la frecuencia de MN no incrementa significativamente en las tres evaluaciones realizadas (10, 20 y 30 días), además cuando se comparó con el grupo testigo se observó una disminución significativa.

Al evaluar la apoptosis en el grupo tratado con α -TOH no se observó un incremento en los porcentajes de células apoptóticas con respecto al grupo testigo, por el contrario disminuyen aunque no de manera estadísticamente significativamente. Se tiene reportado en diversos estudios que el α -TOH tiene poca o ninguna actividad apoptótica (Kimmick *et al.*, 1997; Neuzil *et al.*, 2002; Sylvester y Theriault, 2003; Kline *et al.*, 2004; Schneider, 2005; Sylvester y Shah, 2005). Los porcentajes de células necróticas fueron similares en todos los grupos, sin embargo hubo un mayor porcentaje de células necróticas que apoptóticas, esto coincide con lo reportado por Avula y Fernandes (2000) ya que observaron un incremento mayor de células necróticas que apoptóticas, en ratones macho CD-1 tratados con 75 o 500 IU/kg de α -TOH.

Cuando se evaluó la citotoxicidad en el grupo de α -TOH, no se observaron efectos citotóxicos, ya que no hubo un incremento significativo en la frecuencia de EPC con relación a los ENC y por el contrario disminuye las frecuencias basales. Como se mencionó anteriormente este parámetro debe tomarse con reserva, debido a

que cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (Krishna *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 2000). De ahí que se evaluó la viabilidad celular y la inducción de apoptosis, mismas que no tuvieron un incremento significativo. De acuerdo a Weber *et al.* (2002), el α -TOH tiene poco o ningún efecto sobre el crecimiento celular, la función celular o la viabilidad, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

En este estudio se observó que la administración sola del V_2O_5 , en una única dosis de 40 mg/kg por vía ip produjo: a) efectos tóxicos aparentes, b) efectos genotóxicos, c) inducción de apoptosis, d) efectos citotóxicos y e) efectos sobre la viabilidad celular.

Cuando se administraron 40 mg/kg de V_2O_5 , se observó que el tratamiento tuvo leves efectos tóxicos aparentes (pelo erizado, bajo consumo de agua, pérdida del apetito y de actividad). Algunos de estos signos de toxicidad han sido observado en diversos estudios, como en el realizado por Villani *et al.* (2007) en el que se trataron ratones CD-1 vía oral con vanadio tetravalente, donde se observó que el consumo de alimentos y agua disminuyó. La anorexia en ratones a causa del tratamiento de vanadio ha sido documentada en la literatura (Goldfine *et al.*, 1995; Merriti y Brown, 1995). Mustapha *et al.* (2014) y Olapade *et al.* (2011) han reportado una disminución en la actividad locomotora en ratones tratados con vanadio. La disminución en la actividad física también fue reportada por Todorich *et al.*, 2011, en ratas vía ip con metavanadato de sodio.

Por otra parte, cuando se administraron 40 mg/kg de V_2O_5 , se observaron efectos genotóxicos, esto debido a que hubo un incremento significativo de la frecuencia de MN en todas las horas de evaluación, esto podría corroborarse con el daño genotóxico reportado en el estudio *in vitro* por Rojas *et al.* (1996), en el cual se emplearon cultivos de linfocitos humanos y se reporta que el V_2O_5 induce daño al ADN. En otro estudio *in vitro*, se observó un incremento significativo en el índice de mutación y en las frecuencias de MN en la línea celular del pulmón de hámster chino (V79) que fue expuesto al V_2O_5 , además se reportó que el V_2O_5 tiene

efectos aneuploidogénicos (Zhong *et al.*, 1994). En un estudio *in vivo*, Rojas-Lemus *et al.* (2014) reportan un incremento significativo en la frecuencia de MN después de las 24 horas en que los ratones estuvieran expuestos al V_2O_5 (0.02 M). En diversos modelos experimentales que fueron tratados con diferentes compuestos de vanadio se tiene documentado la genotoxicidad además de la reprotoxicidad, hematotoxicidad, neurotoxicidad, inmunotoxicidad y neurotoxicidad que el V_2O_5 puede ocasionar (González-Villalva *et al.*, 2009; Afeseh Ngwa *et al.*, 2009; Ávila-Costa *et al.*, 2004, 2005; IPCS, 2000; Altamirano-Lozano *et al.*, 1996; 1999).

En cuanto a la evaluación de la apoptosis, en el grupo de V_2O_5 , se observó que hay un aumento en el porcentaje de las células apoptóticas, esto puede estar relacionado con la liberación de ERO's para destruir el sistema antioxidante de la célula, en el proceso de oxidación de V (IV) a V (V), ya que el aumento en la concentración de ERO's en el interior de la célula, es uno de los factores que pueden desencadenar la muerte celular, particularmente la muerte por apoptosis (Aureliano y Gándara, 2005; Kordowiak y Holko, 2009; Cuesta *et al.*, 2011). Además de que cuando se altera el estado oxidante intracelular, se puede desencadenar un proceso apoptótico (Wang *et al.*, 2006) de ahí que se sugiere que la apoptosis inducida por V_2O_5 pudiera eliminar las células micronucleadas durante el proceso de eritropoyesis (García-Rodríguez *et al.*, 2014).

Por otra parte, al evaluar la citotoxicidad del V_2O_5 , se pudo observar que en el parámetro de los EPC con relación a los ENC, hubo un ligero aumento que indica su posible efecto citotóxico, este efecto fue demostrado al realizar las evaluaciones de viabilidad celular, en el que se observa que el porcentaje de células no viables incrementa significativamente al compararse con el grupo testigo, así mismo hay un aumento significativo de las células necróticas, lo que deja demostrado su efecto citotóxico. En un estudio realizado con la línea V79, el V_2O_5 en tratamientos de 1, 2, 3 y 4 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas, se notó una disminución significativa en la viabilidad (Zhong *et al.*, 1994).

En nuestro estudio cuando se combinaron los tratamientos de Ac. asc. y V_2O_5 , se observó un decremento significativo en las frecuencias de MN al compararlo con el grupo de V_2O_5 . Se ha observado en varios estudios que el Ac. asc. es capaz de disminuir el daño genotóxico provocado por diferentes agentes genotóxicos. En estudios previos realizados con ratones tratados con nicotina como agente genotóxico y Ac. asc. como antioxidante, el Ac. asc. fue administrado en una única dosis de 1 mg/kg se pudo observar que el Ac. asc. no mostraba efectos genotóxicos ni mutágenos, por el contrario disminuía la frecuencia de MN-RET (aproximadamente el 60%) al compararlos con el grupo tratado con nicotina (Kahl *et al.*, 2012). También, en un estudio realizado en ratas preñadas que fueron expuestas a luz ultravioleta A y tratadas con una dosis de 23.3 mg de Ac. asc. en el agua potable a partir de los 15 hasta los 22 día de gestación y se observó que el Ac. asc. fue capaz de disminuir significativamente la frecuencia de eritrocitos micronucleados y la frecuencia de los MN-EPC, esta disminución pudo ser debido a la acción del Ac. asc. como un eliminador de RL, así como la acción protectora del Ac. asc. contra el estrés oxidativo (Zúñiga-González *et al.*, 2015). En un estudio realizado en ratones, al administrar 500 mg/kg de Ac. asc. por vía ig durante 5 días consecutivos, reportaron que el Ac. asc. reduce significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas así como de MN-EPC inducidos por metronidazol y por metronidazol combinado con la exposición a la radiación (entre 40 y 60%) (Das *et al.*, 2013).

En el grupo de α -TOH+ V_2O_5 se disminuyen significativamente las frecuencias de MN. Esto puede ser debido al efecto antioxidante que tiene el α -TOH, ya que se ha reportado la capacidad antioxidante que puede presentar. En un estudio realizado en peces (tilapia del Nilo), se observó el efecto protector del α -TOH (400 mg/kg) sobre el daño genotóxico inducido por una combinación de metales (Cd, Cu, Pb y Zn), ya que se observó que el α -TOH disminuye significativamente las frecuencias de MN (95%) y de células binucleadas (aproximadamente 60%) al compararlas con el grupo de metales (Harabawy y Mosleh, 2014). En el estudio realizado por Kan *et al.* (2012) (mencionado anteriormente) se indujo daño genotóxico mediante un pesticida (deltametrina) y se observó el efecto

antigenotóxico del α -TOH, se reportó un decremento significativo de las frecuencias de MN en las tres evaluaciones realizadas (10, 20 y 30 días) siendo mayor el decremento a los 20 días.

En cuanto a la apoptosis, tanto en el grupo de Ac. asc.+V₂O₅ como el de α -TOH+V₂O₅, se observó que hubo un incremento significativo en los porcentajes de las células apoptóticas al compararlo con el grupo de Ac. asc., lo cual podría ser explicado por lo anteriormente mencionado, de que la apoptosis inducida por el V₂O₅ podría eliminar las células micronucleadas durante el proceso de eritropoyesis (García-Rodríguez *et al.*, 2014).

Al evaluar la citotoxicidad en el grupo de Ac. asc.+V₂O₅, se observó que hubo una disminución en los porcentajes de células no viables y en la relación de EPC/ENC. Se ha observado que el Ac. asc. modula los efectos pro-oxidantes del V₂O₅, esto fue observado en un cultivo celular de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME3 tratadas con V₂O₅ (2mM) y Ac. asc. (0.025mM) (Gonçalves *et al.*, 2010).

En el grupo tratado con α -TOH+V₂O₅, se observó una ligera disminución en los porcentajes de células no viables y una disminución significativa en la relación de EPC/ENC. De acuerdo con Olapade *et al.* (2011) el α -TOH tiene efectos protectores sobre el daño provocado por el vanadio, en un cultivo celular tratado con vanadio (3mg/kg) y 500 mg/kg de α -TOH.

8. Conclusiones y comentarios finales

- ⑤ La administración sola del Ac. asc. y α -TOH (100 mg/kg por vía ip y 20 mg/kg por vía ig, respectivamente) no inducen daño genotóxico, ya que no se incrementaron las frecuencias de MN, ni las frecuencias de células apoptóticas.
- ⑤ La administración sola del Ac. asc. disminuyó de forma significativa las células apoptóticas basales.
- ⑤ La administración sola de V_2O_5 (40 mg/kg por vía ip) induce daño genotóxico ya que incrementó significativamente la frecuencia de MN, así como las células apoptóticas.
- ⑤ La administración de los antioxidantes (Ac. asc. y α -TOH) disminuyó el daño genotóxico inducido por el V_2O_5 , ya que se redujeron los MN teniendo un mayor efecto en el grupo tratado con Ac. asc. Sin embargo, la administración de Ac. asc. y α -TOH no presentaron efectos sobre la apoptosis inducida por el Ac. asc. y α -TOH.
- ⑤ La administración sola del Ac. asc. tiene efecto citotóxico, debido a disminuye la viabilidad celular y la relación de EPC/ENC. Mientras que la administración sola del α -TOH solo disminuyó la relación de EPC/ENC.
- ⑤ La administración sola de V_2O_5 induce daño citotóxico, ya que incrementó tanto el porcentaje de células no viables como el de células necróticas, aunque no modificó la relación de EPC/ENC.

9. Referencias bibliográficas

- Abrevaya X. 2008. ¿Qué es la genotoxicidad? *Intra Med Artículos* (4711).
- ACGIH, Consejo Americano de Gobierno y de Higienistas Industriales. 2009. Vanadium Pentoxide: TLV Chemical Substances. 7ª ed. Documentation. p. 9.
- Adler ID, Bootman J, Favor J, Hook G, Schriever G, Welzl G, Whorton E, Yoshimura I, Hayashi M. 1998. Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat Res* 417: 19-30.
- Afeseh Ngwa H, Kanthasamy A, Anantharam V, Song Ch, Witte T, Houk R, Kanthasamy AG. 2009. Vanadium induces dopaminergic neurotoxicity via protein kinase C delta dependent oxidative signaling mechanisms: relevance to etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 240(2): 273-285.
- Albert L. 1998. Curso Básico de Toxicología Ambiental. 2a ed. Limusa. México. pp. 311.
- Allen RT, Hunter WJ III, Agrawal DK. 1997. Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis. *J Pharmacol Toxicol* 37: 215-228.
- Altamirano-Lozano M, Álvarez-Barrera L, Basurto-Alcántara F, Valverde M, Rojas E. 1996. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratog, Carcinog Mutagen* 16: 7-17.
- Altamirano-Lozano M, Valverde M, Álvarez-Barrera L, Molina B, Rojas E. 1999. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratog Carcinog Mutagen* 19: 243-255.
- Altamirano-Lozano MA, Montaña-Rodríguez AR, García-Cárdenas GP, Peralta-García P, García-Rodríguez MC. 2013. Estudio de las frecuencias de micronúcleos en sangre periférica de ratón CD-1 tratados con trióxido de cromo, sulfato de talio y pentóxido de vanadio *in vivo*. *Rev Int Contam Ambie* 29(4): 154.
- Ames B. 1989. Mutagens and carcinogens: endogenous and exogenous factors. *Environ Mol Mut* 14: 66-77.

- Aureliano M, Gandara RMC. 2005. Decavanadate effects in biological systems. *J Inorg Biochem* 99: 979-985.
- Ávila-Costa MR, Flores EM, Colín-Barenque L, Ordóñez JL, Gutiérrez AL, Niño-Cabrera HG, Mussali-Galante P, Fortoul TI. 2004. Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochem Res* 29(7): 1365-1369.
- Ávila-Costa MR, Colín-Barenque L, Zepeda-Rodríguez A, Antuna SB, Saldivar L, Espejel-Maya G, Mussali-Galante P, Ávila-Casado MC, Reyes-Olivera A, Anaya-Martínez V, Fortoul TI. 2005. Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation: a mice experimental model. *Neurosci Lett* 381(1-2): 21-25.
- Avula CR y Fernandes G. 2000. Effect of dietary vitamin E on apoptosis and proliferation of murine splenocytes. *Nutrition Research* 20(2): 225-236.
- Baskic D, Popovic S, Ristic P, Arsenijevic NN. 2006. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int* 30: 924-932.
- Belin S, Kaya F, Duisit G, Giacometti S, Ciccolini J, Fonte's M. 2009. Antiproliferative effect of ascorbic acid is associated with the inhibition of genes necessary to cell cycle progression. *PLoS ONE* 4(2): e4409.
- Beyersmann D y Hartwing A. 2008. Carcinogenetic metal compounds: recent insight into molecular and celular mechanisms. *Arch Toxicol* 82: 493-512.
- Bolognesi C y Hayashi M. 2011. Micronucleus assay in aquatic animal. *Mutagenesis* 26(1): 205-213.
- Cadenas E y Packer L. 2002. Handbook of antioxidants: Second edition revise and expanded. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 744.
- Cantley LC, Cantley LG y Josephson L. 1978. Vanadate inhibits the red cell (Na⁺, K⁺) ATPase from the cytoplasmic side. *Nature* 272: 552-554.
- Carr AC y Frei B. 1999. Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 13: 1007-10024.
- Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. 2007. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quím Nova* 30(2): 441-449.

- Ciranni R, Antonetti M, Migliore L. 1995. Vanadium salts induce cytogenetic effects *in vivo* treated mice. *Mutat Res* 343: 53-60.
- Clarkson WT, Friberg L, Norberg FG, Sager RP. 1988. Biological Monitoring of Toxic Metals. Plenum Press. New York. pp. 369-382.
- Crott JW, Fenech M. 1999. Effect of vitamin C supplementation on chromosome damage, apoptosis and necrosis *ex vivo*. *Carcinogenesis* 20(6): 1035-1041.
- Cuesta S, Frances D, Garcia GB. 2011. ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate. *Neurotoxicol Teratol* 33: 297-302.
- Das RL, Giri S, Singh S, Giri A. 2013. Effects of radiation and vitamin C treatment on metronidazole genotoxicity in mice. *Mut Res/Genet Toxicol Environ Mutagen* 753(2): 65-71.
- EFSA. European Food Safety Authority. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission Related to the Tolerable Upper Intake Level of Vanadium. *EFSA J.* 33, 1-22.
- Elena GA. 2002. Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Rev Arg Anest* 60(6): 391-401.
- EPA. Environmental Protection Agency. 1984. Health Assessment Document for Chromium. Environmental Assessment and Criteria Office. Research Triangle Park, NW.
- Evangelou AM. 2002. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 42: 249-265.
- FDA. 2000 Redbook. IV. C.1.d. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. pp. 1-6.
- Fenech M y Crott J. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 504: 131-136.
- Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. 2004. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: 246-256.

- Friberg L y Nordberg GF. 1990. Handbook on the toxicology of metals. 2° ed. Elsevier. Science Publishers BV. Vol. II. pp. 185-205.
- García GB. 2006. El vanadio, un elemento ambiguo. *Acta Toxicol Argent* 14(2): 32-36.
- García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. 2001. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res* 496: 145-151.
- García-Rodríguez MC y Altamirano-Lozano MA. 2006. La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón *in vivo*. *Bioquímica* 32: 15-24.
- García-Rodríguez MC, Serrano-Reyes G, Altamirano-Lozano MA. 2012. Comparative study in vivo of the genotoxic damage induced by CrO₃ and the effects of the antioxidants: Ascorbic acid, alfa-tocopherol and beta-carotene. *Free Radical Bio Med* 53(1): S216.
- García-Rodríguez MC, Carvente-Juárez MM, Altamirano-Lozano MA. 2013. Antigenotoxic and apoptotic activity of green tea polyphenol extracts on hexavalent chromium-induced DNA damage in peripheral blood of CD-1 mice: analysis with differential acridine orange/ethidium bromide staining. *Oxid Med Cell Longev* 13: 1-9.
- García-Rodríguez MC, García-Cárdenas GP, Montaña-Rodríguez AR, Altamirano-Lozano MA. 2014. Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio [I]) en ratones de la cepa CD-1: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular. *Acta Universitaria* 24(2): 91-96.
- Ghosh M, Talukdar D, Ghosh S, Bhattacharyya N, Ray M, Ray S. 2006. In vivo assessment of toxicity and pharmacokinetics of methylglyoxal Augmentation of the curative effect of methylglyoxal on cancer-bearing mice by ascorbic acid and creatine. *Toxicol Appl Pharm* 212: 45-58.
- Gliszczynska-Swiglo A y Sikorska E. 2004. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *J Chromatogr A* 1048: 195-198.
- Goldfine AB, 1995. In vivo and in vitro studies of vanadate in human and rodent diabetes mellitus. *Mol Cell Biochem* 153: 217-231.

- Gonçalves S, Ferreira R, Alves-Pereira I. 2010. Ascorbate prevents pro-oxidant effects of vanadium pentoxide on wild type *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME3. *Abstracts / Toxicology Letters* 196S: S304-S305.
- González-Villalva A, Rodríguez Lara V, Montaña LF, Lima-Melo A, Ramírez G, Fortoul TI. 2009. Blood changes generated after vanadium inhalation. *Curr Top Toxicol* 6: 31-38.
- Guillespie JR, Hymphreys AD, Baird CA, Robinson AE. 1990. Química. Reverté. España. pp. 1139.
- Harabawy AS y Mosleh YY. 2014. The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 104:28-35.
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T y Ishidate M. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res* 245: 245-249.
- Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M, Oleson FB Jr., Pacchierotti F, Romagna F, Shimada H, Soutu S, Vannier B. 1994. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 312: 293-304.
- Hayashi M, MacGregor J, Gatehouse D, Adler I, Blaker D, Dertinger S, Krishna G, Morita T, Ruso A, Suto S. 2000. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II: Some aspects of protocol design including repeated treatment, integration with toxicity testing and automated scoring. *Env Mol Mutagen*. 35: 234-252
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. 1983. The induction of the micronuclei as a measure of genotoxicity. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 123: 61-118.
- Heinz A, Rubinson KA, Grantham JJ. 1982. The transport and accumulation of oxovanadium compounds in human erythrocytes *in vitro*. *J Lab Clin Med* 100: 593-612.
- Hernández-Rincón S. 2010. Citotoxicidad y genotoxicidad del compuesto de minerales trióxido (MTA): una revisión bibliográfica. *Endod Div RAOA* 98(4): 313-321.

- Hughes K y Ong CN. 1998. Vitamins selenium, iron and coronary heart disease risk in Indian, Malays and Chinese in Singapore. *J Epidemiol Comm Health* 52(3): 181-185.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. 2006. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Cobalt in hard-metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. Lyon, France, vol. 86.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety. 1988. Vanadium. Environmental health criteria, World Health Organization, Ginebra, No. 81
- IPCS, International Programme on Chemical Safety. 1999. International Chemical Safety Card - Vanadium pentoxide. World Health Organization, Ginebra, (ICSC 0596).
- IPCS, International Programme on Chemical Safety. 2000. Concise International Chemical Assessment Document. Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. World Health Organization.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety. 2001. Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds, World Health Organization, Ginebra, No. 29.
- Jacob RA y Burri BJ. 1996. Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr* 63(6): 985S-990S.
- Johnston C. 2003. Vitamina C. En: Conocimientos actuales sobre nutrición. Washington: Organización Panamericana de la Salud. pp. 191-199.
- Jones DP. 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Sign* 8 (9-10):1865-1879.
- Kadry SM, Marzouk MS, Amer AM, Hanna MI, Azmy AH, Hamed HS. 2012. Vitamin E as antioxidant in female african catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to chronic toxicity of atrazine. *J Aquat Biol Fish* 16(2): 83-98.
- Kahl VFS, Reyes JM, Sarmiento MS, Da Silva J. 2012. Mitigation by vitamin C of the genotoxic effects of nicotine in mice, assessed by the comet assay and micronucleus induction. *Mutat Res/ Genet Toxicol Environ Mutagen* 744: 140-144.

- Kan Y, Cengiz EI, Ugurlu P, Yanar M. 2012. The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. *Environ Toxicol Pharmacol* 34(2): 170-179.
- Kimmick GG, Bell RA, Bostick RM. 1997. Vitamin E and breast cancer: A review. *Nutr Cancer* 27: 109-117.
- Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, Eichenlaub-Ritter U, Decordier I. 2003. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol Lett* 140: 63-74.
- Kishino K, Hashimoto K, Amano O, Kochi M, Liu W, Sakagami H. 2008. Tumor specific cytotoxicity and type of cell death induced by sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate. *Anticancer Res* 28: 2577-2584.
- Kline K, Yu W, Sanders BG. 2004. Vitamin E and breast cancer. *J Nutr* 134: 3458S-3462S.
- Konigsberg M. 2008. Radicales libres y estrés oxidante. El manual moderno. México.
- Kordowiak AM y Holko P. 2009. Vanadium derivatives as compounds of high biological significance. Part I. Antidiabetic activity. *Postepy Biol Komorki* 36: 361-376.
- Krishna G, Nath J, Ong T. 1986. Sister chromatid exchanges in mice by vitamin C inhibition. *Cancer Res* 46: 2670-2674
- Krishna G y Hayashi M. 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 455: 155-166.
- Lademann J, Patzelt A, Schanzer S, Richter H, Meinke MC, Sterry W. 2011. Uptake of antioxidants by natural nutrition and supplementation: pros and cons from the dermatological point of view. *Skin Pharmacol Physiol* 24(5): 269-273.
- Lagerkvist G, Nordberg GF, Vouk V. 1986. Vanadium. En: *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, Vol. II, pp. 638-663.
- Landvik VS, Diplock TA, Packer L. 2002. Efficacy of vitamin E in human health and disease. En: Cadena E, Packer L. editores. *Handbook of antioxidants*. 2da ed. Ed. New York: Marcel Dekker. pp. 75-97.

- Lee Wang-Jae. 2009. The prospects of vitamin C in cancer therapy. *Immune Netw* 9(5): 147-152.
- Maliakel DM, Kagiya TV, Nair CK. 2008. Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and a-tocopherol. *Exp Toxicol Pathol* 60(6): 521-527.
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 239: 29-80.
- McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. 1995. The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in vitro. *Method Cell Biol* 46: 153-185.
- Mekkawy IAA, Mahmoud UM, Wassif ET, Naguib M. 2012. Protective roles of tomato paste and Vitamin E on Cadmium-induced histological and histochemical changes of liver of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *J Fisher Aqua Sci* 7: 240-265.
- Merritti K y Brown SA. 1995. Distribution of titanium and vanadium following repeated injection of high dose salts. *J Biomed Mater Res* 29: 1175-1178.
- Migliore L, Bocciardi R, Macri C, Jacono FL. 1993. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutat Res* 319: 205-213.
- Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. 2004. Vanadium-an element of atypical biological significance. *Toxicol Lett* 21: 135-143.
- Müller L, Kikuchi Y, Probst G, Shechtman L, Shimada H, Sofuni T, Tweats D. 1999. ICH harmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat Res* 436: 195-225.
- Mustapha O, Oke B, Offen N, Sirén AL, Olopade J. 2014. Neurobehavioral and cytotoxic effects of vanadium during oligodendrocyte maturation: a protective role for erythropoietin. *Environ Toxicol Pharmacol* 38(1): 98-111.
- Naidu KA. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J* 2: 7.

- Neuzil J, Zhao M, Ostermann G, Sticha M, Gellert N, Weber C, Eaton JW, Brunk UT. 2002. Alpha-tocopheryl succinate, an agent with in vivo anti-tumour activity, induces apoptosis by causing lysosomal instability. *Biochem J* 362: 709-715.
- Newman MC e Intosh AW 1991. Metal ecotoxicology: concepts & applications. Lewis Publishers. Boca Raton. USA. pp. 395.
- Niki E y Noguchi N. 2004. Dynamics of antioxidant action vitamin E. *Acc Chem Res* 37: 45-51
- Norbury CJ y Hickson ID. 2001. Cellular Responses to DNA Damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 367-401.
- Olopade JO, Fatola IO, Olopade FE. 2011. Vertical administration of vanadium through lactation induces behavioural and neuromorphological changes: protective role of vitamin E. *Niger J Physiol Sci* 26(1): 55-60.
- Ortiz-Monasterio PF, Cortinas de Nava C, Maffey GL. 1987. Manejo de los desechos industriales peligrosos en México. Universo Veintiuno. México. pp. 235.
- Padayatty JS, Daruwala R, Wanga Y, Eck KP, Song J, Koh SW, Levine M. 2002. Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. En: Cadena E, Packer L, editores. Handbook of antioxidants. 2da ed. Ed. New York: Marcel Dekker. pp. 117-145
- Park JH, Davis KR, Lee G, Jung M, Jung Y, Park J, Yi SY, Lee MA, Lee S, Yeom CH, Kim J. 2012. Ascorbic acid alleviates toxicity of paclitaxel without interfering with the anticancer efficacy in mice. *Nutr Res* 32(11): 873-883.
- Pryor WA. 2003. Vitamina E. En: Conocimientos actuales sobre nutrición. Washington: Organización Panamericana de la Salud. pp. 170-177.
- Ramírez AME y Rojas LM. 2010. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Latreia* 23(2): 166-177.
- Robbins D y Zhao Y. 2011. The role of manganese superoxide dismutase in skin cancer. *Enzyme Res* 2011: 1-7.
- Robertson JD y Orrenius S. 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 30: 609-627.

- Rocha CAM, Da Cunha LA, Pinheiro RHS, Bahia MO, Burbano RMR. 2011. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of *Colossoma macropomum* exposed to methylmercury. *Genet Mol Biol* 34(4): 694-697.
- Rojas E, Valverde M, Herrera LA, Altamirano-Lozano M, Ostrosky-Wegman P. 1996. Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluated by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat Res* 359: 77-84.
- Rojas-Lemus M, Altamirano-Lozano M, Fortoul TI. 2014. Sex differences in blood genotoxic and cytotoxic effects as a consequence of vanadium inhalation: micronucleus assay evaluation. *J Appl Toxicol* 34: 258-264.
- Sayago A, Marín M, Aparicio I, Morales R. 2007. Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceite* 58(1): 74-86.
- Schneider C. 2005. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res* 49: 7-30.
- Singh M, Kaur P, Sandhir R, Kiran R. 2008. Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. *Mutat Res* 654(2): 145-149.
- Sullivan JB y Krieger GR. 2001. Clinical Environmental Health and Toxic Exposures. Lippincott William and Wilkins. Philadelphia. pp. 16-23.
- Surh Y-J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3: 768-780.
- Sylvester PW y Theriault A. 2003. Role of tocotrienols in the prevention of cardiovascular disease and breast cancer. *Curr Top Nutraceutical Res* 1: 121-136.
- Sylvester PW y Shah SJ. 2005. Mechanisms mediating the antiproliferative and apoptotic effects of vitamin E in mammary cancer cells. *Front Biosci* 10: 699-709.
- Thomas MJ. 2000. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 16(7-8): 716-718.
- Todorich B, Olopade JO, Surguladze N, Zhang X, Neely E, Connor JR. 2011. The mechanism of vanadium-mediated developmental hypomyelination is related to destruction of oligodendrocyte progenitors through a relationship with ferritin and iron. *Neurotox Res* 19(3):361-73.

- Turley JM, Funakoshi S, Ruscetti FW, Kasper J, Murphy WJ, Long DL, Birchenall-Roberts MC. 1995. Growth inhibition and apoptosis of RL human B lymphoma cells by vitamin E succinate and retinoic acid, role of transforming growth factor β . *Cell Growth Differ* 6(6): 655-663.
- USP DI. 1999. Drug Information for the Health Care Professional. Vol 1. Massachusetts, Micromedex, Inc. pp. 612-614.
- Valdés F. 2006. Vitamina C. *Acta Dermosifiliogr* 97(9): 557-568.
- Villani P, Cordelli E, Leopardi P, Siniscalchi E, Veschetti E, Fresegna AM, Crebelli R. 2007. Evaluation of genotoxicity of oral exposure to tetravalent vanadium in vivo. *Toxicol Lett* 170: 11-18.
- Vrolijk MF, Opperhuizen A, Jansen EH, Godschalk RW, Van Schooten FJ, Bast A, Haenen GR. 2015. The shifting perception on antioxidants: the case of vitamin E and β -carotene. *Redox Biol* 4: 272-278.
- Wang X-F, Xing M-L, Shen Y, Zhu X, Xu L-H. 2006. Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology* 228: 16-23.
- Weber T, Lu M, Andera L, Lahm H, Gellert N, Fariss MW, Korinek V, Sattler W, Ucker DS, Terman A, Schroder A, Erl W, *et al.*, 2002. Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo. *Clin Cancer Res* 8: 863-869.
- WHO. 1990 "Vanadium and some vanadium salts". International Programme on chemical safety (IPCS). Environmental Health Criteria (EHC) 42.
- Willett WC. 2006. The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutr* A 9: 105-110.
- Yang X-G, Wang K, Lu J, Crans DC. 2003. Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane. *Coordination Chem Res* 237: 103-111.
- Zamora JD. 2007. Antioxidants: micronutrients fighting for health. *Rev Chil Nutr* 34: 1-11.

- Zarei I, Pourkhabbaz, A, Alipour H, Khazaei SH, 2013. Acute toxicity and the effects of copper sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) on the behavior of the black fish (*Capoeta Fusca*). *Iran J Toxicol* 6(19): 771-778.
- Zhong BZ, Gu ZW, Wallace WE, Whong WZ, Ong T. 1994. Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res* 321: 35-42.
- Zhou B-B S y Elledge SJ. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-439.
- Zhou B, Wu LM, Yang L, Liu ZL. 2005. Evidence for α -tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. *Free Radical Bio Med* 38: 78-84.
- Zúñiga-González GM, Gómez-Meda BC, Zamora-Pérez AL, Martínez-González MA, Muñoz de Haro IA, Pérez-Navarro AE, Armendáriz-Borunda J, Gallegos-Arreola MP. 2015. Micronucleated erythrocytes in newborns of rat dams exposed to ultraviolet-A light during pregnancy; protection by ascorbic acid supplementation. *Mutat Res/ Genet Toxicol Environ Mutagen* 782: 36-41.

10. Anexos

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

- i. V Congreso Especies Reactivas del Oxígeno en Biología y Medicina.**
Morelos, México. Celebrado del 18 al 21 de marzo del 2015.
Título del trabajo: “Effect of ascorbic acid and alpha-tocopherol on the induction of micronucleous and apoptotic cells in mice treated with vanadium pentoxide”.
Autores: Hernández-Cortés LM, Altamirano-Lozano MA y García-Rodríguez MC.
- ii. XV Foro de Investigación Escolar de Biología. FES Zaragoza, UNAM.**
Iztapalapa, México D.F. Celebrado del 28 al 30 de enero del 2015.
Título del trabajo: “Efecto del ácido ascórbico sobre la inducción de micronúcleos y de apoptosis en ratones de la cepa CD-1 tratados con pentóxido de vanadio”.
Autores: Hernández Cortés Lourdes Montserrat y García Rodríguez Ma. del Carmen.
- iii. XIX Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. UAM Iztapalapa.**
Iztapalapa, México D.F. Celebrado del 26 de noviembre del 2014.
Título del trabajo: “Efecto del ácido ascórbico sobre la inducción de micronúcleos y de apoptosis en ratones CD-1 tratados con metales pesados (pentóxido de vanadio y trióxido de cromo”
Autores: Hernández-Cortés Lourdes Montserrat, Serrano-Reyes Gabriela, Altamirano-Lozano Mario y García-Rodríguez Ma. del Carmen.

iv. 1er Simposio Iberoamericano AGEs. Los AGEs en la salud.

Guanajuato, México del 1 al 3 de octubre del 2014.

Título del trabajo: “Evaluación de micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular en ratones expuestos a reguladores de glicación no enzimática (ácido ascórbico y vanadio [V])”.

Autores: García-Rodríguez MC, Hernández-Cortés LM, Altamirano-Lozano MA

v. Congreso Nacional de Genética 2014.

Xalapa, Veracruz. Celebrado del 30 de septiembre al 3 de octubre del 2014.

Título del trabajo: “Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición de ratones CD-1 a metales pesados (Cromo[IV], Talio[IV] y Vanadio [V]). Micronúcleos, apoptosis y viabilidad”.

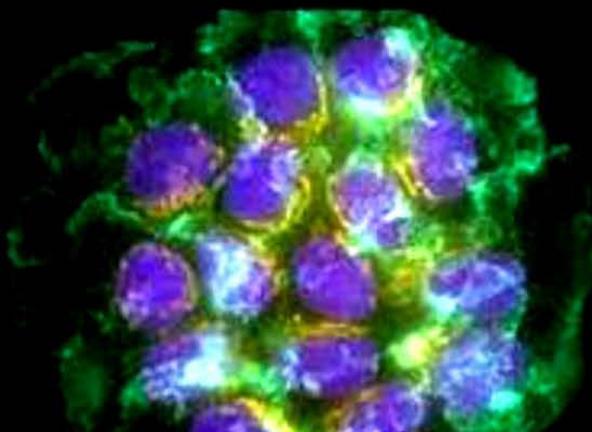
Autores: Altamirano-Lozano MA, Hernández-Cortés LM, Ramos-Leon J, García-Cárdenas PG, y García-Rodríguez MC.

V Congreso de la Rama de Especies
Reactivas del Oxígeno en Biología y Medicina
de la SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA

18-21 marzo, 2015. Hacienda San José Vista Hermosa, Morelos.



PROGRAMA





**EFFECT OF ASCORBIC ACID AND ALPHA-TOCOPHEROL ON THE INDUCTION OF
MICRONUCLEOUS AND APOPTOTIC CELLS IN MICE TREATED WITH VANADIUM
PENTOXIDE**

Hernández-Cortés, LM; Altamirano-Lozano, MA and García-Rodríguez, MC* Unidad de

Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de
Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM, PO Box 9-020, C.P. 15000, D.F., México.
Tel: 56230772. *carmen.garcia@unam.mx

Vanadium is a heavy metal considered by IARC (International Agency for Research on Cancer) as a possible carcinogen for humans, and although it has shown cytotoxic effects and widespread toxicity, there is few evidence of its genotoxic effects *in vivo*. However, some vitamins like ascorbic acid and alpha-tocopherol have antioxidant properties, so they have called attention in studies related to the modulation and the treatment of chronic-degenerating diseases related to DNA damage and oxidative stress such as cancer. In this study, we evaluated the effect of ascorbic acid and alpha-tocopherol on the induction of micronucleous and apoptotic cells in mice treated with vanadium pentoxide [V₂O₅]. Groups of five CD-1 mice were treated with: a) 100 mg/kg of ascorbic acid or 20 mg/kg of alpha-tocopherol; b) 40 mg/kg of V₂O₅ and c) with ascorbic acid or alpha-tocopherol prior to V₂O₅. The micronucleous were evaluated in agreement to the technique proposed by Hayashi *et al* (1990)¹, whereas the apoptosis and cellular viability was realized in agreement to the technique modified by García-Rodríguez *et al* (2013)². Blood samples were obtained from the tail vein 0, 24, 48 and 72 h after each treatment. The results showed a significant increase in the frequency of micronucleous and the apoptotic cells in the group treated only with V₂O₅. While in the groups treated only with ascorbic acid or alpha-tocopherol decreased basal frequencies of micronucleous and increased the cell viability. In the mice treated with V₂O₅ which were administered previously with ascorbic acid or alpha-tocopherol it was observed that this was able of modulate the effect of high levels of genotoxic like cytotoxic because it decreased the frequency of micronucleous and apoptotic cells. Particularly ascorbic acid had a more consistent effect on the modulation of the genotoxic damage induced by vanadium pentoxide, probably to its antioxidant potential. With base in these results, it is suggested that, although exposure of human populations to metallic compounds such as vanadium may represent a genetic and cytotoxic risk, the substances with antioxidant potential such as ascorbic acid and alpha-tocopherol can prevent or modulate these effects.

Financial support was obtained from DGAPA-UNAM IN217712.

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

²García-Rodríguez MC, Cervante-Juarez MM, Altamirano-Lozano MA. (2013). Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. *Oxid Med Cell Longev*; 1-9





XV FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

Solicitud de registro de trabajo
28-30 de enero de 2015



Título: (Mayúsculas)

EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LA INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS Y DE APOPTOSIS EN RATONES CD-1 TRATADOS CON PENTÓXIDO DE VANADIO

Autores: (sepárelos con una coma e indique con superíndice 1 si es alumno, con 2 si es docente)

Lourdes Montserrat Hernández Cortés¹, Ma. del Carmen García Rodríguez²

Modalidad y Ciclo:

Por favor marque con una x

X	Oral		Básico
	Cartel		Intermedio
	Video	X	Terminal

Resumen:

(Máximo 300 palabras, Times New Roman 12 pts., interlineado sencillo, renglón seguido, sin sangría y justificado)

El vanadio es un metal pesado considerado por la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) como un posible carcinógeno para el humano, y aunque ha mostrado efectos citotóxicos y tóxicos generalizados, existen pocas evidencias de sus efectos genotóxicos *in vivo*. Por otra parte, se ha observado que los componentes antioxidantes de las frutas y los vegetales, son un factor importante en la modulación de algunas enfermedades relacionadas con el daño al ADN como el cáncer. En particular el ácido L-ascórbico (aa), es una vitamina esencial y un importante agente antioxidante que se sintetiza químicamente a partir de la glucosa. En el presente estudio se evaluó el efecto de aa sobre el daño genotóxico, la apoptosis y viabilidad celular inducidos por el pentóxido de vanadio (V_2O_5). Grupos de cinco ratones fueron tratados vía intraperitoneal con 100 mg/kg de aa, 40 mg/kg de V_2O_5 ó 100-40 mg/kg de aa- V_2O_5 . Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. Se observó que el aa disminuye las frecuencias de micronúcleos (MN), la inducción de apoptosis e incrementa la viabilidad celular, mientras que el V_2O_5 incrementa las frecuencias de MN y la inducción de apoptosis. Cuando se combinaron los tratamientos, el aa fue capaz de modular el efecto tanto genotóxico como citotóxico del V_2O_5 , ya que el aa incrementa la viabilidad celular. Con base en estos resultados, se sugiere que aunque la exposición de las poblaciones humanas a compuestos metálicos como el V_2O_5 , puede representar un riesgo genético y citotóxico, sustancias con potencial antioxidante como el aa pueden prevenir o modular estos efectos. *Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN217712.*

Palabras clave: (3-5 palabras)

Antioxidante, ácido ascórbico, pentóxido de vanadio, micronúcleos, apoptosis.

40

Aniversario
1974-2014



Casa abierta al tiempo
UNIDAD IZTAPALAPA

MEMORIAS

XIX

simposio del
departamento de
Ciencias de la
Salud

Noviembre 26, 27 y 28 del 2014





**EFFECTO DEL ÁCIDO
ASCÓRBICO SOBRE LA
INDUCCIÓN DE
MICRONÚCLEOS Y DE
APOPTOSIS EN
RATONES CD-1
TRATADOS CON
METALES PESADOS
(PENTÓXIDO DE
VANADIO Y TRIÓXIDO
DE CROMO)**

**Hernández-Cortés
Lourdes Montserrat,
Serrano-Reyes
Gabriela, Altamirano-
Lozano Mario y
García-Rodríguez Ma.
del Carmen***

Unidad de Investigación en
Genética y Toxicología
Ambiental (UNIGEN).
Facultad de Estudios
Superiores Zaragoza, UNAM.
México D.F.
*carmen.garcia@unam.mx

La contaminación ambiental por metales pesados constituye en la actualidad una preocupación a nivel mundial por los riesgos que conlleva para la salud humana. Aunque algunos metales son micronutrientes y se encuentran en casi todos los seres vivos (ej. el vanadio y el cromo) en concentraciones elevadas presentan efectos tóxicos. El pentóxido de vanadio (V_2O_5) ha sido considerado por la "International Agency of Research on Cancer" (IARC) como un posible carcinógeno para el humano, y que aunque ha mostrado efectos citotóxicos y tóxicos generalizados, existen pocas evidencias *in vivo* de sus efectos sobre el ADN y de los mecanismos de inducción del daño. Por otra parte, a los compuestos del cromo [VI] la IACR los reconoce como potentes cancerígenos, aunado a sus efectos genotóxicos y citotóxicos. Los compuestos metálicos del cromo [VI] son capaces de atravesar la membrana celular y reducirse a cromo [III], durante esta reducción se generan especies reactivas de oxígeno y radicales libres; mismos que pueden interaccionar y dañar biomoléculas como el ADN. En contraparte, en estudios epidemiológicos se ha observado que los componentes antioxidantes de las frutas y los vegetales, son un factor importante en la modulación de algunas enfermedades relacionadas con el daño al ADN, así como de algunos tipos de cáncer. En particular el ácido L-ascórbico (aa), es una vitamina esencial y un importante agente antioxidante que se sintetiza químicamente a partir de la glucosa. De ahí que, en el presente estudio se evaluó el efecto del aa sobre el daño genotóxico inducido por metales pesados con potencial cancerígeno, como lo son el V_2O_5 y el trióxido de cromo (CrO_3). Grupos de cinco ratones fueron tratados por vía intraperitoneal con 100 mg/kg de aa, 40 mg/kg de V_2O_5 , 20 mg/kg de CrO_3 , 100-40 mg/kg de aa- V_2O_5 y 100-20 mg/kg de aa- CrO_3 . Las muestras de sangre periférica fueron tomadas de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. Los MN se evaluaron de acuerdo a la técnica de propuesta por Hayashi *et al.* (1990)¹, mientras que la apoptosis y viabilidad celular se realizó de acuerdo a la técnica modificada por García-Rodríguez *et al.*, (2013)². Los resultados mostraron un incremento significativo en la frecuencia de MN en ambos grupos tratados solo con los metales pesados. Mientras que, la administración sola del aa disminuyó las frecuencias basales de MN e incrementó la viabilidad celular. De igual manera, tanto el V_2O_5 como el CrO_3 cuando se administraron solos incrementaron las células apoptóticas. Cuando a los ratones tratados con los metales pesados, previamente se les administro el aa, se observó que este fue capaz de modular el efecto tanto genotóxico como citotóxico, ya que se disminuyeron las frecuencias de MN y de células apoptóticas. Cabe señalar que se observó un efecto más consistente en la modulación del daño genotóxico inducido por el V_2O_5 . Con base en estos resultados, se sugiere que aunque la exposición de las poblaciones humanas a compuestos metálicos como los de cromo [VI] y vanadio [V] puede representar un riesgo genético y citotóxico, sustancias con potencial antioxidante como el aa pueden prevenir o modular estos efectos. *Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN217712.*

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

²García-Rodríguez MC, Cervante-Juarez MM, Altamirano-Lozano MA. (2013). Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. *Oxid Med Cell Longev*; 1-9.

**XIX Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud.
26-28 de Noviembre, 2014**

9



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

1 - 3
octubre
2014

Marfil, Guanajuato, México.

Sede:
Espacios Magnos de Rectoría
de Campus Guanajuato.

1er. Simposio Iberoamericano

AGES

Los AGES y la Salud

Productos Finales de Glicación Avanzada

MEMORIAS DEL EVENTO



Mount
Sinai



TOURO UNIVERSITY
CALIFORNIA



Guanajuato
México

Síguenos en internet:

info@agesenlasalud.com
www.agesenlasalud.com

AGE-albumin treatment. ITT (%/min) was worsened in animals treated with AGE-albumin (2.6 ± 0.5 ; $p < 0.05$) when compared to C-albumin (3.4 ± 0.6), but was similar between C+NAC (3.6 ± 0.7) and AGE+NAC (3.8 ± 0.4 , NS). NAC reduced urinary TBARS concentration (nmol/24h) (AGE-albumin + NAC = 166 ± 26.1) compared to AGE-albumin (247 ± 45.6 ; $p < 0.05$).

In conclusion, chronic administration of homologous AGE-albumin in rats induces lipid peroxidation and reduces insulin sensitivity, which can be prevented by NAC. NAC may contribute to prevent chronic complications associated with AGE in DM.

Funding: FAPESP, Brazil (#2012/18724-2; #2012/04831-1)

32. Evaluación de micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular en ratones expuestos a reguladores de glicación no enzimática (ácido ascórbico y vanadio [V])

García-Rodríguez Ma. del Carmen*, Hernández-Cortés Lourdes Montserrat y Altamirano-Lozano Mario

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN).
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México D.F.
*carmen.garcia@unam.mx

El vanadio es un metal considerado por la IARC como un carcinógeno para el humano, sin embargo dada su química de coordinación, presenta efectos insulino-miméticos y habilidades para poder mejorar la homeostasis de la glucosa y la resistencia a la insulina en modelos animales diabéticos. Por otra parte, el ácido L-ascórbico (aa), es una vitamina esencial y un importante agente antioxidante que se sintetiza químicamente a partir de la glucosa. El aa ha mostrado que puede intervenir en la glicación no enzimática de las proteínas, al bloquear la unión de los grupos amino libres con el carbonilo de la glucosa, además de disminuir la producción de radicales libres en la fase de auto-oxidación de la glucosa.

En el presente estudio se evaluó la cinética de micronúcleos (MN), apoptosis y viabilidad celular en ratones expuestos a reguladores de glicación no enzimática (aa y vanadio). Grupos de cinco ratones fueron tratados por vía intraperitoneal con aa (100 mg/kg), V_2O_5 (40 mg/kg) y aa- V_2O_5 . Se tomaron muestras de sangre de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos.

Se observó que el aa disminuye las frecuencias de MN, la inducción de apoptosis e incrementa la viabilidad celular, mientras que el V_2O_5 incrementa



las frecuencias de MN y la inducción de apoptosis. Cuando se combinaron los tratamientos de aa- V_2O_5 , el aa fue capaz de modular el efecto tanto genotóxico como citotóxico del V_2O_5 .

Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN217712.

33. Estudio analítico de glicación in vitro de albumina de suero humano, mediante cromatografía de líquidos con detector másico de alta resolución

Alma Rosa Corrales Escobosa, Alejandra Sarahi Ramírez Segovia, Katarzyna Wrobel, Kazimierz Wrobel. e-mail: alma:rce@ugto.mx

Departamento de Química, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Cerro de la Venada s/n, Col. Pueblito de Rocha, CP 36040. Guanajuato, Gto, México

Introducción: Elucidación de los mecanismos de glicación de proteínas es un reto actual de la investigación en la salud, siendo espectrometría de masas una herramienta muy poderosa en estos estudios. Resulta interesante identificar y caracterizar estructuralmente sitios específicos de modificación en albumina de suero humano (HSA), ya que glicación de HSA ha sido propuesta como un marcador de control glicémico en diabetes.

Objetivo: Localizar los sitios específicos en HSA, susceptibles a modificación en presencia de metilglioxal y glucosa como agentes glicantes.

Materiales y Métodos: Se analizaron las muestras de HSA después de su incubación con glucosa y con metilglioxal en relación molar aprox. 1:57. Los hidrolizados (tripsina) fueron introducidos al sistema cromatográfico (Ultimate3000 RLSCnano, Dionex) para retención de péptidos en trampa capilar y su posterior separación en columna capilar de fase inversa; la detección y obtención de espectros MS/MS se llevó a cabo utilizando el modelo maXis impact ESI-QTOF-MS (Bruker).

Resultados: Para evaluación comparativa de los perfiles de péptidos en HSA modificado versus HSA sin modificación, se utilizó el programa ProfileAnalysis. Con base en el análisis PCA y la prueba t, se obtuvo la gráfica de volcán que permitió seleccionar los valores m/z con diferencias significativas entre muestras. Identificación de péptidos en HSA sin modificación se realizó mediante espectros MS/MS y buscador MASCOT; para HSA modificado se utilizó Biotools con editor de secuencia definiendo posibles modificaciones.



Sociedad Mexicana de Genética
Universidad Veracruzana

CONAGEN CATORCE DOS MIL

Congreso Nacional de Genética 2014

"In memoriam Frederick Sanger: de la secuenciación de proteínas y DNA a los Metagenomas"

Temáticas

Genética Animal
Genética Clínica
Genética Cuantitativa
Genética de Microorganismos
Genética de Poblaciones
Genética del Desarrollo
Genética Evolutiva
Genética Humana
Genética Microbiana
Genética Molecular
Genética Toxicológica
Genética Vegetal
Bioética
Bioinformática
Biotecnología e Ingeniería Genética
Carcinogénesis
Citogenética clásica y molecular
Código de Barras
Epigenética
Farmacogenética
Genómica
Mejoramiento Genético Animal y Vegetal
Mutagénesis
Nanogenética
Nutrigenómica
Teratogénesis

Además, se recibirán trabajos sobre el proceso de enseñanza-aprendizaje de la Genética, en los diferentes niveles educativos, así como su problemática y el uso de las TIC's

Fechas

XXI Curso Citogenética

Del 1° al 5 de Septiembre

Congreso

Martes 30 de Septiembre al
Viernes 3 Octubre del 2014

*Fecha límite para
recibir resúmenes*

Miércoles 10 de Septiembre del 2014

*Conferencias,
Carteles, Concursos
y Eventos Culturales*

Informes

<http://smgac.org.mx>
smg.2013.2015@gmail.com

EFFECTO GENOTÓXICO Y CITOTÓXICO DE LA EXPOSICIÓN DE RATONES CD-1
A METALES PESADOS (CROMO [VI], TALIO [I] Y VANADIO [V]):
MICRONÚCLEOS, APOPTOSIS Y VIABILIDAD CELULAR

Altamirano-Lozano M.A., Hernández-Cortés L.M., Ramos-Leon J., García-Cárdenas, G.P. y García-Rodríguez M.C.*

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

*carmen.garcia@unam.mx; Tel. 56230772

La contaminación ambiental por metales pesados constituye en la actualidad una preocupación a nivel mundial, por los riesgos que conlleva para la salud humana. Compuestos metálicos como los del cromo hexavalente (Cr [VI]) son capaces de atravesar la membrana celular y reducirse a Cr [III], durante esta reducción se generan especies reactivas de oxígeno y radicales libres; mismos que pueden interaccionar y dañar biomoléculas como las proteínas, los lípidos y el ADN. Por su parte, los compuestos metálicos del talio monovalente (Tl [I]) y del vanadio pentavalente (V [V]), aunque han mostrado efectos citotóxicos y tóxicos generalizados, existen pocas evidencias *in vivo* de sus efectos sobre el ADN y de la posible vía de inducción de daño. En el presente estudio se compararon los efectos genotóxicos y citotóxicos de compuestos metálicos del Cr [VI], Tl [I] y V [V], mediante la evaluación de la inducción de apoptosis, la cinética de micronúcleos (MN), la viabilidad celular y la relación entre eritrocitos policromáticos y normocromáticos (EPC/ENC). Grupos de cinco ratones fueron tratados con CrO₃ (20 mg/kg), Tl₂SO₄ (20 mg/kg) y V₂O₅ (40 mg/kg). Las muestras de sangre periférica fueron tomadas de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. Los resultados mostraron un incremento significativo en la frecuencia de MN en los grupos tratados tanto con el CrO₃ como con el V₂O₅. Sin embargo, los tres compuestos metálicos incrementaron en forma significativa las células apoptóticas viables y no viables (Cr>Tl>V). En cuanto a la citotoxicidad se observó que aunque la relación de EPC/ENC disminuyó en los grupos tratados con el CrO₃ y el Tl₂SO₄, particularmente este último presentó la mayor disminución de las células viables. El V₂O₅ no presentó efectos citotóxicos evaluados con estos parámetros, ya que no hubo efectos significativos al compararse con el grupo testigo. Con base en estos resultados, se corrobora que la exposición de las poblaciones humanas a compuestos metálicos como los de Cr [VI], Tl [I] y V [V] puede representar un riesgo genético y citotóxico. **Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN217712.**

