



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

“Efecto del resveratrol y la (+)-catequina sobre la apoptosis, viabilidad celular, los niveles de 8-OHdG, la frecuencia de micronúcleos y los niveles de antioxidantes endógenos en ratones Hsd:ICR tratados con compuestos de cromo hexavalente”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

TONANCY NICOLÁS MÉNDEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ
FES ZARAGOZA. UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. EDMUNDO GONZÁLEZ BONILLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
FES-ZARAGOZA. UNAM.**

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

“Efecto del resveratrol y la (+)-catequina sobre la apoptosis, viabilidad celular, los niveles de 8-OHdG, la frecuencia de micronúcleos y los niveles de antioxidantes endógenos en ratones Hsd:ICR tratados con compuestos de cromo hexavalente”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

TONANCY NICOLÁS MÉNDEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ
FES ZARAGOZA. UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. EDMUNDO GONZÁLEZ BONILLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
FES-ZARAGOZA. UNAM.**

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2017

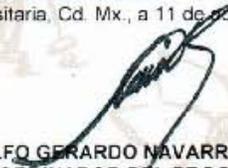
Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de agosto de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **NICOLÁS MÉNDEZ TONANCY** con número de cuenta **406005737** con la tesis titulada "Efecto del resveratrol y la (+)-catequina sobre la apoptosis, viabilidad celular, los niveles de 8-OHdG, la frecuencia de micronúcleos y los niveles de antioxidantes endógenos en ratones Hsd:ICR tratados con compuestos de cromo hexavalente", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARIA DEL CARMEN GARCÍA RODRIGUEZ**:

Presidente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Vocal: DRA. SANDRA GÓMEZ ARROYO
Secretario: DR. EDMUNDO GONZALEZ BONILLA
Suplente: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO
Suplente: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de octubre de 2017.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Investigación realizada gracias al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la UNAM **IN219216**. Proyecto "Los componentes antioxidantes de la dieta en la modulación y protección in vivo del daño genotóxico y citotóxico inducido por metales con potencial cancerígeno: Ensayo Cometa, Micronúcleos, Apoptosis, Enzimas Antioxidantes y 8-hidroxideoxiguanosina".

Al **Posgrado de Ciencias Biológicas**, UNAM, por ser una institución de excelencia que me brindó la oportunidad de iniciarme en la investigación científica y por ayudarme a alcanzar metas personales y profesionales.

Agradezco al **CONACyT** (número de becario 703847/584686) la beca recibida para desarrollar mi proyecto científico y al **PAEP** por el financiamiento brindado para la participación en congresos internacionales (2016; 2017).

A la **Dra. María del Carmen García Rodríguez**, por el espacio para el desarrollo de este trabajo científico; por el apoyo profesional que fue invaluable para lograr concluir con éxito; por compartir siempre su experiencia y ética profesionales, pero sobre todo por su gran amistad.

A mi comité Tutorial, **Dra. Raquel Retana Ugalde**, **Dr. Edmundo González Bonilla** y **Dra. María del Carmen García Rodríguez**. A los miembros del jurado **Dr. Marío Agustín Altamirano Lozano**, **Dra. Sandra Gómez Arroyo** y el **Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero** por su valiosa asesoría, aportaciones, confianza y por todo el apoyo profesional que me brindaron.

Agradezco al **Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero** por su apoyo y asesoría en el análisis y presentación de los resultados.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A **Dante Yaotl Saavedra Nicolás**. Hijo, estas palabras son pocas para agradecerte todo lo que he podido lograr gracias a tu compañía, tu paciencia, tu alegría y tu amor. Eres el motor para continuar cada día, para lograr alcanzar cada meta. Te amo.

A **mi Familia**. A todos y cada uno de ustedes les agradezco infinitamente todo su apoyo incondicional. Gracias por siempre estar a mi lado en las buenas y en las malas. Los amo.

A **Rodolfo**. Gracias por enseñarme que nunca es tarde para iniciar una nueva y gran aventura. Gracias por todos los momentos de felicidad a tu lado, por tu compañía. Te amo.

A **María del Carmen García Rodríguez**. Nunca sabre como agradecerte todo el apoyo y la gran amistad que me has brindado, por creer en mí siempre cuando yo lo dudé. Gracias por enseñarme que la ciencia y la investigación son lo mejor del mundo.

A **Lulú**. Gracias por tu paciencia y tu gran amistad, por todos tus consejos y por creer en mí siempre. Eres una de las más grandes y admirables personas que conozco. Te quiero amiga.

A **Lalo**. Gracias por siempre escucharme, por tu apoyo incondicional y por hacer que nunca perdiera las ganas de seguir adelante. Te quiero amigo.

A **Gaby**. Gracias por tu gran apoyo que fue esencial para iniciar este viaje. Gracias por estar al inicio y al final de esta gran aventura. Gracias por creer en mí. Te quiero.

A **Fanny, Abigail, Gris y Thelma**. Gracias por todo su apoyo. Gracias por sus consejos, por las risas. Gracias por su amistad y valiosa compañía.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Polifenoles	2
2.1.2. Biodisponibilidad y Metabolismo	3
2.1.3. Actividad Antioxidante	3
2.2. (+)-catequina.....	5
2.3. Resveratrol.....	6
2.4. Especies Reactivas de Oxígeno	9
2.4.1. Eliminación de Especies Reactivas de Oxígeno	12
2.5. Estrés Oxidante.....	14
2.5.1. Estrés Oxidante Inducido por Metales	15
2.6. Cromo (VI).....	16
2.7. Evaluación de Daño Genotóxico	19
2.7.1. Micronúcleos	20
2.7.2. 8-oxo-7,8-dihidro-2’desoxiguanina	22
2.7.3. Apoptosis y Viabilidad Celular	25
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
IV. HIPÓTESIS	29
V. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo General.....	30
5.2. Objetivos Particulares.....	30

VI. MATERIAL Y MÉTODO.....	31
6.1. Animales	31
6.2. Reactivos.....	31
6.3. Tratamientos	31
6.4. Ensayo de Micronúcleos y Relación de Eritrocitos Policromáticos/Eritrocitos Normocromáticos.....	35
6.5. Determinación de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina	35
6.6. Evaluación de Apoptosis y Viabilidad Celular	35
6.7. Determinación de la Capacidad Antioxidante Total.....	36
6.8. Determinación de la Concentración Intracelular de GSH	36
6.9. Determinación de la Concentración Intracelular de Superóxido Dismutasa	37
6.10. Análisis Estadístico.....	37
VII. RESULTADOS.....	38
7.1. Determinación de las Dosis no Genotóxicas ni Citotóxicas de (+)-catequina y Resveratrol.....	38
7.1.1. (+)-catequina	38
7.1.2. Resveratrol.....	38
7.2. Efecto de la Administración de 20 y 40 mg/kg de (+)-catequina Sobre el Daño Genotóxico Inducido por CrO ₃	39
7.2.1. Micronúcleos	39
7.2.2. Apoptosis	41
7.3. Efecto de la Administración de 50 mg/kg de Resveratrol Sobre el Daño Genotóxico Inducido por CrO ₃	43
7.3.1. Micronúcleos	43
7.3.2. 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina	44
7.3.3. Apoptosis	45
7.4. Efecto de la Administración de (+)-catequina (20 ó 40 mg/kg) Sobre el Daño Citotóxico Inducido por CrO ₃	46
7.4.1. Relación de Eritrocitos Policromáticos/Eritrocitos Normocromáticos	46

7.4.2. Viabilidad Celular	47
7.5. Efecto de la Administración de 50 mg/kg de Resveratrol Sobre el Daño Citotóxico Inducido por CrO ₃	49
7.5.1. Relación de Eritrocitos Policromáticos/Eritrocitos Normocromáticos	49
7.5.2. Viabilidad Celular	50
7.6. Efecto de la Administración de Resveratrol (50 mg/kg) y CrO ₃ Sobre el Sistema Antioxidante	51
7.6.1. Capacidad Antioxidante Total	51
7.6.2. Concentración de Glutación	52
7.6.3. Actividad de Superóxido Dismutasa	53
Tabla Comparativa de los Parámetros Evaluados en Ratones Hsd:ICR Tratados con Resveratrol y CrO ₃ (media ± d.e.)	54
VIII. DISCUSIÓN	55
IX. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES	67
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
XI. ANEXOS.....	80
ANEXO 1.....	80
ANEXO 2.....	81
ANEXO 3.....	82
ANEXO 4.....	83
ANEXO 5.....	84
ANEXO 6.....	85
ANEXO 7.....	86
ANEXO 8.....	87
ANEXO 9.....	88
ANEXO 10.....	89
ANEXO 11.....	90

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxígeno Singulete
8-OHdG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina
8-oxoG	8-oxo-7,8-dihidroguanina
ABTS	3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato
AC	Aberraciones Cromosomicas
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BER	Reparación por Escisión de Bases
Br-Et	Bromuro de Etidio
CO_3^\bullet	Radical Carbonato
Cr	Cromo
Cr(III)	Cromo Trivalente
Cr(VI)	Cromo Hexavalente
CrO_3	Trioxido de Cromo
DIF	Frecuencia de Inducción Diferencial
EC	(-)-epicatequina
ECETOX	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
ECG	(-)-epicatequina-3-galato
EGC	(-)-epigalocatequina
EGCG	(-)-epigalocatequina-3-galato
ENC	Eritrocitos Normocromáticos
EOx	Estrés Oxidante
EPA	Enviromental Protection Agency

EPC	Eritrocitos Policromáticos
ERO's	Especies Reactivas de Oxígeno
FDA	Food and Drug Administration
GPx	Glutación Peroxidasa
GR	Glutación Reductasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación Reducido
GST	Glutación S-Transferasa
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
HO₂[•]	Radical Hidroperoxil
MDA	Malondialdehido
MN	Micronúcleos
NA	Naranja de Acridina
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NBT	Nitroazul de Tetrazolio
NER	Reparación por Escisión de Nucleotido
NIF	Frecuencia de Inducción Neta
NOXs	NADPH oxidasas
O₂	Oxígeno Molecular
O₂^{•-}	Radical Superóxido
O₃	Ozono
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OGG1	8-oxo-guanina-glucosilasa
OH	Hidroxilo
[•]OH	Radical Hidroxilo

RL	Radicales Libres
RO[•]	Radical Alcoxil
RO₂[•]	Radical Peroxil
SOD	Superóxido Dismutasa
TNB	Ácido 2-nitro-5-tiobenzoico
XO	Xantina Oxidasa

RESUMEN

En la búsqueda de sustancias con propiedades protectoras de daño al ADN se han preferido los componentes de la dieta humana, principalmente las plantas, por su baja toxicidad y su uso común. A los polifenoles como la (+)-catequina y el resveratrol que se encuentran en diversas frutas y vegetales se les han atribuido efectos benéficos para la salud por sus propiedades antioxidantes. En contra parte, metales pesados como los compuestos de cromo hexavalente (Cr(VI)) pueden inducir daño genotóxico a través de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) que se generan durante su reducción intracelular de Cr(VI) a cromo trivalente (Cr(III)). En este estudio se evaluó el efecto del resveratrol y de la (+)-catequina sobre la apoptosis, viabilidad celular, los niveles de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina (8-OHdG), la frecuencia de micronúcleos (MN) y los niveles de antioxidantes endógenos en ratones tratados con compuestos de Cr(VI). Grupos de cinco ratones Hsd:ICR fueron divididos y tratados de la siguiente manera: *a*) testigo, administración de vehículos (agua o etanol al 30 %); *b*) (+)-catequina, tratamiento de 20 ó 40 mg/kg por vía intragástrica; *c*) resveratrol, tratados con 50 mg/kg por vía intragástrica; *d*) Cr(VI), dosis de 20 mg/kg de CrO₃ por vía intraperitoneal; *e*) (+)-catequina-CrO₃; *f*) resveratrol-CrO₃. Las evaluaciones fueron realizadas a las 0, 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos. Se consideró una significancia de $p < 0.05$. Las administraciones solas de la (+)-catequina y el resveratrol no inducen daño genotóxico ni citotóxico, ya que no incrementan las frecuencias de MN ni las células apoptóticas, además de que no modifican la viabilidad celular. El daño genotóxico y citotóxico del CrO₃ se corroboró, ya que se incrementaron significativamente las frecuencias de MN y las células apoptóticas, además de que se disminuyó la viabilidad celular. Se observó una reducción de los niveles de 8-OHdG con el tratamiento de CrO₃ que podría estar relacionado con la inactivación de los mecanismos de reparación del ADN. La administración de 20 mg/kg de (+)-catequina previo al CrO₃ presentó un efecto dual ya que a las 72 horas se observó una reducción de la frecuencia de MN (efecto antioxidante) y a las 48 horas se presentó un incremento de los MN (efecto pro-oxidante). Sin embargo, el tratamiento con resveratrol mostró una protección del daño genotóxico inducido por el CrO₃, ya que hubo una disminución de las frecuencias de MN en todas las horas evaluadas, siendo significativo a las 24 y 48 horas al compararse con el grupo CrO₃. El incremento en las células apoptóticas observado en este grupo podría estar relacionado con el mecanismo por el cual se eliminan las células con daño al ADN, además de que el incremento en los niveles de 8-OHdG sugiere también que se activaron los mecanismos de reparación del ADN. El incremento en la concentración de antioxidantes totales, la disminución de los niveles de glutatión (GSH), y la recuperación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), sugiere que el resveratrol es capaz de intervenir en el mecanismo redox celular.

ABSTRACT

In the search for substances with protective properties against DNA damage, the components of the human diet, mainly plants, have been preferred because of their low toxicity and their common use. Polyphenols such as (+)-catechin and resveratrol found in fruits and vegetables have been associated with beneficial health effects due to their antioxidant properties. In contrast, heavy metals such as hexavalent chromium (Cr(VI)) compounds can induce genetic damage through reactive oxygen species (ROS) that are generated during the intracellular reduction of Cr(VI) to trivalent chromium (Cr(III)). In this study, the effects of resveratrol and (+)-catechin on apoptosis, cell viability, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine (8-OHdG) levels, the micronuclei (MN) frequency and endogenous antioxidant levels in mice treated with Cr(VI) compounds were evaluated. Groups of five Hsd:ICR mice were divided and treated as follows: *a*) control (water and ethanol 30 %); *b*) (+)-catechin, treatment of 20 or 40 mg/kg by gavage ; *c*) resveratrol, treated with 50 mg/kg by gavage; *d*) Cr(VI), 20 mg/kg CrO₃ dose intraperitoneally; *e*) (+)-catechin-CrO₃; *f*) resveratrol-CrO₃. Evaluations were performed at 0, 24, 48 and 72 hours after treatments. A significance of $p < 0.05$ was considered. The administration of resveratrol did not induce genotoxic or cytotoxic damage, since they did not increase MN frequencies or apoptotic cells; besides, they did not modify cell viability. The genotoxic and cytotoxic damage of CrO₃ was corroborated since MN frequencies and apoptotic cells significantly increased, while, the cell viability decreased. A reduction in 8-OHdG levels was observed with the CrO₃ treatment, which could be related to the inactivation of DNA repair mechanisms. The administration of 20 mg/kg of (+)-catechin prior to CrO₃ had a dual effect since a reduction in the MN frequency (antioxidant effect) at 72 hours and also an increase (pro-oxidant effect) at 48 hours were observed. However, treatment with resveratrol showed protection against genotoxic damage induced by CrO₃, because MN frequencies were decreased at all hours evaluated, being significant at 24 and 48 hours when compared to the CrO₃ group. The increase observed in apoptotic cells in this group could be related to the mechanism by which cells with DNA damage are deleted. In addition, the increase in the 8-OHdG levels suggests that the mechanisms of DNA repair were also activated. The increase in total antioxidant concentration, the decrease in glutathione (GSH) levels, and the recovery of superoxide dismutase (SOD) activity suggest that resveratrol is able to intervene in the cellular redox mechanism.

I. INTRODUCCIÓN

Se ha observado que existe una relación inversamente proporcional entre el consumo de vegetales y la incidencia de cáncer (Surh y Ferguson, 2003). De ahí que se proponga el uso de antimutágenos y anticancerígenos que se encuentran en la dieta como un procedimiento para prevenir y tratar algunos tipos de cáncer (Surh y Ferguson, 2003; Ferguson, 2004; Díaz, 2008). Además de que el estudio de sustancias con propiedades protectoras o moduladoras del daño al ADN, surge como una opción complementaria a las investigaciones de genotoxicidad, ya que al conocer los mecanismos de protección se pueden generar alternativas para contrarrestar los efectos de los agentes inductores de daño genotóxico (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007).

Entre los componentes vegetales que han llamado más la atención se encuentran los antioxidantes, ya que su consumo puede contribuir en neutralizar la acción de los radicales libres (RL) generados por agentes inductores de estrés oxidante (EOx) (Pineda *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2003; Molina, 2009). Estudios epidemiológicos han reportado que una dieta rica en antioxidantes disminuye la incidencia de diferentes tipos de cáncer, así como de enfermedades degenerativas (Godic *et al.*, 2014). Los antioxidantes son parte integral de la dieta e incluyen al ácido ascórbico, tocoferoles, tocotrenoles, carotenoides, catequinas, antocianinas, quercetina, resveratrol, entre otros. Todos los alimentos a base de plantas son ricos en estas sustancias; por ejemplo, las frutas como las fresas y el kiwi contienen grandes cantidades de ácido ascórbico; los aceites vegetales y semillas son ricos en vitamina E; el té (*Camellia sinensis*) y la cocoa presentan concentraciones altas de catequinas y el vino tinto posee grandes cantidades de resveratrol (Wachtel-Galor *et al.*, 2014). Diferentes estudios han demostrado que existe una relación inversamente proporcional entre una dieta rica en polifenoles con la reducción de enfermedades relacionadas con el EOx (Kaur y Kapoor, 2001; Williams *et al.*, 2004; Harikumar y Aggarwal, 2008; Du *et al.*, 2016).

Por otra parte, se ha observado un incremento en la exposición de las poblaciones humanas a compuestos xenobióticos, debido principalmente al crecimiento demográfico y a los avances en la industria y la tecnología. Dentro de estos agentes nocivos se encuentran los metales pesados, de los cuales se ha descrito que incrementan la probabilidad de desarrollar cierto tipo de enfermedades relacionadas con el daño al ADN, como lo son algunos tipos de cáncer. Particularmente el Cr(VI) presenta actividad cancerígena y genotóxica mediante la generación de EOx, como uno de sus principales mecanismos (Valko, 2015). De ahí que surge el interés de determinar si antioxidantes como la (+)-catequina y el resveratrol, pueden actuar como protectores o moduladores de los efectos genotóxicos de compuestos como el Cr(VI).

II. ANTECEDENTES

2.1. Polifenoles

Los polifenoles o compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y constituyen uno de los grupos más numerosos e importantes de metabolitos secundarios de plantas, los cuales son parte esencial para la fisiología y morfología debido a que están involucrados en el crecimiento y reproducción, además de proveer protección contra la radiación ultravioleta, resistencia a patógenos y predadores (Bravo, 1998; Heim *et al.*, 2002). Se han descrito más de 8000 polifenoles distintos clasificados de acuerdo a su estructura química básica, es decir, por el número de anillos fenólicos que contienen o el tipo de sustituyente unido a éstos. De los polifenoles actualmente descritos se considera que los flavonoides, lignanos, estilbenos y ácidos fenólicos, son los que se encuentran más ampliamente distribuidos en los alimentos (Rijken *et al.*, 2002; Doo y Maskarinec, 2014; Roleira *et al.*, 2015).

La ingesta de los polifenoles es muy variable, ya que depende en gran medida de los hábitos y preferencias de la población (Clifford, 2004), por lo que el valor medio de consumo en el mundo se estima en 23 mg/día (Heim *et al.*, 2002; Martínez-Fórez *et al.*, 2002; Si y Liu, 2014), aunque los países asiáticos han llegado a reportar un consumo de hasta 40 mg/día (Kuhnau

1976; Tieppo *et al.*, 2007). En este sentido se ha determinado que la ingesta promedio para flavonoides se sitúa entre los 20 y 26 mg/día (Hertog *et al.*, 1992; Kimira *et al.*, 1998; Martínez-Fórez *et al.*, 2002).

2.1.2. Biodisponibilidad y Metabolismo

La biodisponibilidad de los polifenoles no siempre está relacionada con los más abundantes en el organismo, esto es debido a que no presentan la misma actividad. Considerando que la biodisponibilidad consiste en la proporción de nutrientes que se digiere, absorbe y metaboliza a través de una ruta normal (Srinivasan, 2001), la actividad intrínseca de los polifenoles dependerá de su absorción en el intestino que puede ser baja o alta, o de la rapidez de su metabolismo o excreción (Srinivasan, 2001; Manach *et al.*, 2004).

En general, el metabolismo de los polifenoles se produce a través de una secuencia de reacciones comunes para todos ellos, que es similar a la desintoxicación metabólica que sufren muchos xenobióticos para reducir su efecto citotóxico, incrementar su hidrofiliidad y facilitar su eliminación urinaria o biliar (Manach *et al.*, 2004). Los estudios llevados a cabo en animales de experimentación han mostrado que determinados polifenoles pueden ser absorbidos directamente en el estómago (Piskula *et al.*, 1999; Crespy, 2002), mientras que otros llegan intactos al intestino delgado (Lee, 1995; Olthof *et al.*, 2000; 2003). Solo el 5 % del total de polifenoles ingeridos diariamente alcanzan la circulación sanguínea sin cambios en su estructura (Lee, 1995).

2.1.3. Actividad Antioxidante

Los mecanismos de la actividad antioxidante de los polifenoles están determinados principalmente por su estructura química, su configuración y el número total de grupos hidroxilo (OH), donde la configuración de éstos sobre el *anillo B*, es la más importante y la cual determina la capacidad de eliminar ERO's. También se ha observado que la presencia de grupos funcionales en el *anillo C* pueden precisar esta función, mientras que la configuración

del *anillo A* se considera cuestionable para la propiedad antioxidante (figura 1) (Heim *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004). Para que un compuesto polifenólico pueda ser considerado como un antioxidante debe estar presente en una baja concentración comparado con la del sustrato oxidante, ser capaz de retrasar o prevenir la oxidación del sustrato y que los radicales secundarios formados sean estables (Kaur y Kapoor, 2001). Este mecanismo se debe principalmente, a que pueden donar un electrón y/o átomos de hidrogeno para detener la reacción química y reducir así el daño al ADN, la alteración de lípidos y proteínas, y la tasa de mutaciones (Pisoschi y Pop, 2015; Siti *et al.*, 2015). La acción antioxidante comprende no solo la captura de RL, sino también previene su formación, inhibe su propagación y estimula los procesos de reparación celular (González-Torres *et al.*, 2000). Se ha establecido que un antioxidante ideal es aquel que es rápidamente absorbido, que puede prevenir o eliminar la formación de ERO's, reducir los iones metálicos y que sea capaz de activar factores de transcripción para inducir la expresión de enzimas (López-Alarcón y Denicola, 2012; Poljsak, *et al.*, 2013).

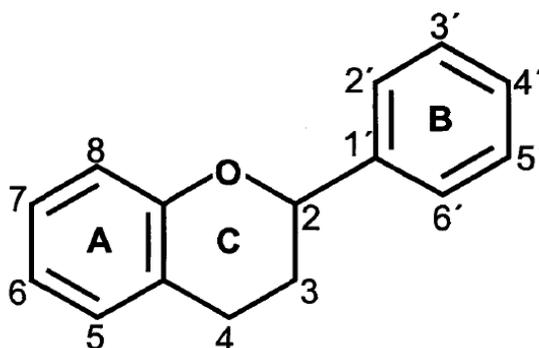


Figura 1. Estructura básica y sistema de numeración de los flavonoides (Tomada de Bravo, 1998).

Se ha descrito también, que los polifenoles tienen la capacidad de activar el sistema antioxidante endógeno, al interactuar con ciertas vías de señalización celular que incrementan la expresión del sistema enzimático y no enzimático (González-Torres *et al.*, 2000; Kondo *et*

al., 2001). En este sentido, la medida de la capacidad antioxidante considera la acción acumulativa y sinérgica de todos los antioxidantes presentes en el plasma y los fluidos corporales proporcionando así un parámetro integrado que puede ayudar en la evaluación de factores fisiológicos, ambientales, nutricionales, entre otras condiciones, que afectan el estado redox *in vivo* (Ghiselli *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005; López-Alarcón y Denicola, 2013).

2.2. (+)-catequina

La (+)-catequina es un polifenol que pertenece al grupo de los flavonoides y constituye uno de los mayores grupos de antioxidantes fenólicos (Roleira *et al.*, 2015). Su estructura química consta de dos anillos bencénicos, A y B, unidos a un anillo heterocíclico, C (figura 2) (Roleira *et al.*, 2015). Se ha observado que la (+)-catequina es un potente antioxidante debido a la presencia y posición específica de sus cinco grupos OH en su estructura que le dan la capacidad de eliminar RL y quelar iones metálicos, en donde la posición específica de los grupos OH en el *anillo B* se consideran los más importantes para determinar la actividad antioxidante, mediante la donación de electrones (figura 2) (Uzun *et al.*, 2010; Demir *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015; Samanta *et al.*, 2016).

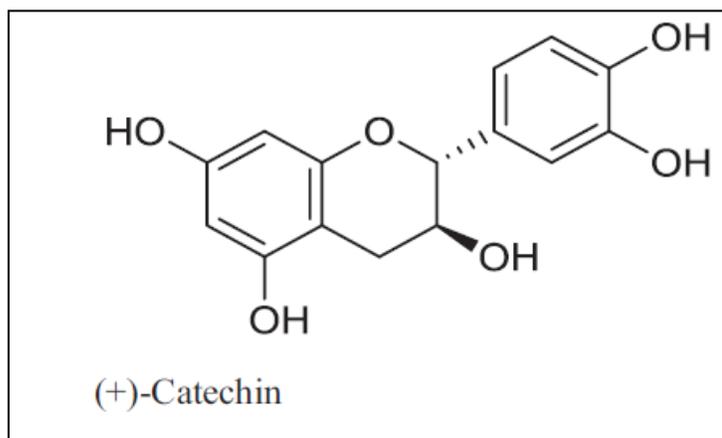


Figura 2. Estructura química de (+)-catequina (Tomado de Roleira *et al.*, 2015).

La (+)-catequina pertenece al grupo de los flavonoides más encontrados y consumidos en la dieta humana (Demir *et al.*, 2011). Se ha descrito que puede ser rápidamente absorbida y metabolizada, y se estima que su consumo diario es de 50 mg/día (Silberberg *et al.*, 2005). La (+)-catequina posee una gran variedad de efectos farmacológicos tales como: cardioprotector, diurético y actividad hipotensora; así también propiedades hepatoprotectoras, anti-inflamatorias, antivirales y anticancerígenas (Monteith, 1990; Demir *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2015). Gokce *et al.* (2010), observaron que la administración de (+)-catequina *in vivo* disminuye la toxicidad pulmonar generada por la exposición a clorpirifós. En otros estudios realizados en ratones, también obtuvieron efectos citoprotectores de la (+)-catequina sobre la toxicidad inducida por el benzo-[a]-pireno (Shahid *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha reportado que la (+)-catequina puede presentar propiedades pro-oxidantes, cuando se encuentran altas concentraciones de iones metálicos como el Cobre (II) (Cu(II)), debido a que estos metales de transición poseen una gran actividad redox, facilitando su rápido reciclaje con el oxígeno molecular (O₂) y la presencia de polifenoles como la (+)-catequina, que consecuentemente lleva a la formación de ERO's y RL como el radical hidroxilo (*OH) (Farhan *et al.*, 2015).

2.3. Resveratrol

El Resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) es un polifenol que se encuentra en el grupo de los estilbenos; fue la primera forma aislada de la raíz de *Veratrum grandiflorum* en 1940. Inicialmente se caracterizó como un fitoalexin, el cual es una sustancia antimicrobiana sintetizada por las plantas en respuesta a algún tipo de infección (Pedras y Ahiahonu, 2005; Nakata *et al.*, 2015). Se piensa que las propiedades fitoalexinicas del resveratrol podría explicar la bioactividad de esta molécula en animales (Udenigwe *et al.*, 2008). El interés sobre el estudio de las propiedades benéficas fue a partir de atribuir a este compuesto los efectos protectores observados para el vino tinto, del cual se ha descrito, ayuda a prevenir enfermedades cardiacas, a incrementar la longevidad y a prevenir o disminuir la progresión de una variedad

de condiciones, incluyendo diversos tipos de cáncer y lesiones isquémicas. El resveratrol, es el mayor componente antioxidante presente en la piel de las uvas donde se puede llegar a encontrar de 50 a 100 μg por gramo de peso, lo que explica la gran concentración presente en el vino tinto (Athar *et al.*, 2007). Se han reportado diferentes concentraciones en aproximadamente 72 especies de plantas, en cacahuates, moras y arándanos (Alarcón y Villegas, 2007; Udenigwe *et al.*, 2008).

El resveratrol existe tanto en su forma *trans* como en su isómero *cis*, siendo la estructura *trans* la más estable y predominante (figura 3). Su configuración química comprende dos anillos aromáticos enlazados por un puente de etileno, los cuales poseen grupos OH unidos por átomos de carbono, como se observa en muchos componentes polifenólicos del grupo de los estilbenos (figura 3) (Udenigwe *et al.*, 2008).

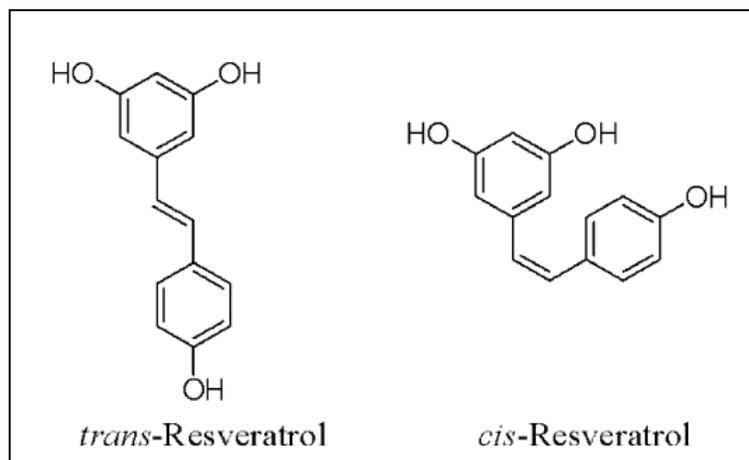


Figura 3. Estructura química *trans* y *cis* del resveratrol (Tomada de Udenigwe *et al.*, 2008).

El metabolismo y biodisponibilidad del resveratrol ha sido estudiado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* y se ha reportado que su eficacia depende de su absorción y metabolismo. Se ha observado que después del tratamiento oral de resveratrol a roedores y seres humanos,

aproximadamente el 70-80 % es absorbido en los intestinos y posteriormente es conjugado a glucorinados y sulfatos (Sinha *et al.*, 2016). En estudios *in vivo* (ratas y seres humanos) se ha descrito una absorción del 70 % y ha sido detectado en heces, orina, bilis, plasma y en órganos como riñón, estómago, intestino e hígado después de una administración oral, vía por la cual, es absorbido más eficientemente (Soleas *et al.*, 2001; Udenigwe *et al.*, 2008).

Diversos estudios epidemiológicos han sugerido que la dieta juega un papel importante en el desarrollo de cáncer y en la prevención de ciertos tipos de enfermedades degenerativas. En este sentido, se ha observado que el resveratrol puede inhibir el progreso de diversos tipos de tumores, además de poseer múltiples actividades biológicas, las cuales involucran un efecto protector contra enfermedades coronarias, infartos a miocardio y aterosclerosis; puede reducir el nivel de lípidos séricos y presenta propiedades anti-inflamatorias, además de su capacidad de eliminar RL e incrementar los niveles de antioxidantes endógenos (Losa, 2003; Alarcón y Villegas, 2007). Jang *et al.* (1997), demostraron en varios modelos animales que el resveratrol presenta actividad protectora en diferentes tipos y estados de carcinogénesis (iniciación, promoción y progresión) atribuido, principalmente, al mecanismo de inducción de apoptosis sobre células cancerígenas mediante la modulación de diferentes vías de señalización con lo cual puede iniciar la reducción de metástasis, modulación de proteínas y la regulación y/o detención de la fase S-G₂ del ciclo celular (Losa, 2003; Udenigwe *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2015). En diferentes estudios se han reconocido sus propiedades benéficas y se han propuesto diversos mecanismos; el efecto anticancerígeno y quimioprotector ha sido asociado principalmente a su actividad antioxidante; a su capacidad de inhibir distintas enzimas como: la ciclo-oxigenasa, la hidroxilasa, la peroxidasa, la proteína C cinasa; impedir la fosforilación de Bcl-2 y de NFκB (Athar *et al.*, 2007). Otra de las propiedades atribuidas al resveratrol es su capacidad de poder incrementar o modular la respuesta antioxidante endógena, modificando la actividad de catalasa, SOD, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-Transferasa (GST) (Banu *et al.*, 2016).

La actividad pro-oxidante del resveratrol se puede presentar mediante auto-oxidación la cual produce peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y RL como el radical superóxido (O₂^{•-}), así como también

complejos de semiquinonas y quinonas, los cuales son tóxicos para la célula (Sinha *et al.*, 2016). En diferentes investigaciones se ha observado que el resveratrol puede actuar como un pro-oxidante en la presencia de altas concentraciones de metales como el Cu(II), en donde la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ estimula la producción de RL (Ahmad *et al.*, 2005; Azmi *et al.*, 2005).

2.4. Especies Reactivas de Oxígeno

Las ERO's son especies químicas intracelulares que contienen oxígeno y son reactivas con lípidos, proteínas y ADN. Dentro de las ERO's se encuentran los RL y las moléculas no radicales que pueden participar en la generación de radicales libres (Turrens, 2003; Ye *et al.*, 2015). Los RL son especies químicas (atómica o molecular) que contienen uno o más electrones desapareados en su último orbital de energía, ya sea por ganancia o pérdida de un electrón de un no radical, o por la ruptura homolítica de una molécula. La presencia de electrones desapareados modifica entonces la reactividad química del átomo o molécula (Halliwell y Gutteridge, 1999; Valko *et al.*, 2007).

Aunque el oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios, a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones a la concentración normal llega a ser tóxico. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de ERO's. Estas especies son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete. Las principales especies son: *a)* las que se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno (O_2 , el ozono (O_3), el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$)) y *b)* las parcialmente reducidas (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$, radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet}), $^{\bullet}\text{OH}$, radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), radical peroxil (RO_2^{\bullet}) y radical alcoxil (RO^{\bullet})). Todas estas moléculas participan en diferentes eventos biológicos, en donde cada una tiene distintas propiedades químicas intrínsecas, las cuales intervienen en su grado de reactividad (Jezek y Hlavatá, 2005; Valko *et al.*, 2007; Page *et al.*, 2010; Glasauer y Chandel, 2013).

El O_2 es considerado un bi-radical debido a que contiene dos electrones desapareados ubicados, cada uno de ellos, en dos diferentes orbitales externos (Turrens, 2003; Valko *et al.*, 2007). Dado que el O_2 posee estos dos electrones en giro paralelo se dificulta tomar dos

electrones libres con giro antiparalelo a la vez, por ello solo los puede recibir de uno en uno para cada orbital molecular externo (reacción univalente), produciendo ERO's (figura 4). Cuando uno de los electrones desapareados del O_2 absorbe energía e invierte su rotación (giro) la especie resultante es el 1O_2 . Existen dos formas del 1O_2 : la sigma (Σ) que es un RL, debido a que conserva los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos (cada electrón en un orbital) como en el caso del O_2 , la diferencia radica en que un electrón tiene giro paralelo y el otro giro antiparalelo, y la delta (Δ), la cual posee dos electrones apareados en un solo orbital, por lo que no es un RL. La formación del O_2^{\bullet} ocurre por la reducción univalente del O_2 , es decir, cuando acepta un electrón, reacción que se puede llevar a cabo después de varios eventos. Este radical es muy inestable y es considerado como el precursor de muchas ERO's y un mediador de las reacciones oxidantes en cadena (Turrens, 2003). El O_2^{\bullet} es convertido, rápidamente, a H_2O_2 ya sea de manera espontánea o a través de la reacción catalizada por la SOD. El H_2O_2 puede ser totalmente reducido a agua (H_2O) o parcialmente reducido a $\bullet OH$, al reaccionar con el O_2^{\bullet} en presencia de metales de transición (figura 4) (Lushchak, 2014).

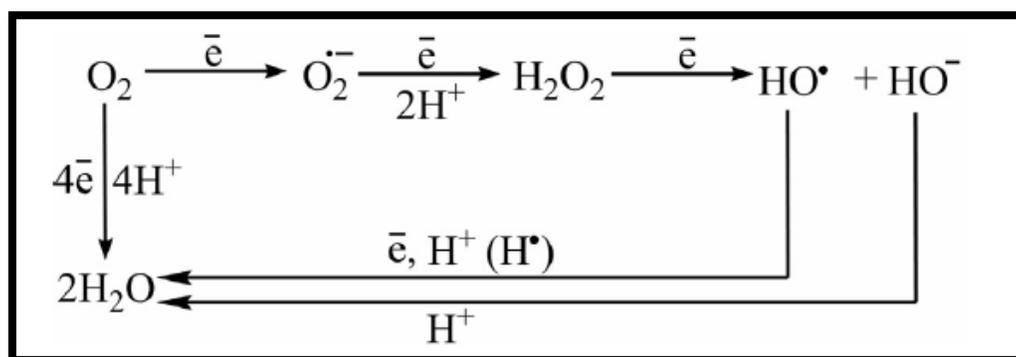


Figura 4. Generación de ERO's a partir de la reducción monovalente del O_2 (Tomada de Lushchak, 2014).

El $\cdot\text{OH}$ es considerado una de las especies oxidantes más dañinas debido su tiempo de vida media corto y a su alta reactividad. La formación de este radical puede lograrse a través de la reacción de Haber-Weiss entre el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 catalizada por un metal de transición (Liochev y Fridovich, 1999; Turrens, 2003).

Anteriormente, se creía que las ERO's solo desempeñaban un papel tóxico para la célula, sin embargo, se ha demostrado que también desempeñan una función importante en la señalización y diferentes eventos celulares, como la muerte celular programada (apoptosis), proliferación, diferenciación, adaptación metabólica, activación de la expresión de proteínas y en la regulación del sistema inmunitario (Hansberg, 2008; Page *et al.*, 2010; Glasauer y Chandel, 2013). Tal es el caso del H_2O_2 , el cual, está asociado con la señalización celular cuando su concentración se encuentra en el rango nanomolar. El H_2O_2 puede difundir a través de la membrana lo que lo convierte en una molécula ideal para la señalización intracelular (Glasauer y Chandel, 2013).

Las vías de generación de ERO's son, la xantina oxidasa (XO), la familia de NADPH oxidasas (NOXs) y la mitocondria, la cual se considera como la principal fuente de ERO's, producidas principalmente en el complejo I, II y III, dentro de la cadena de transporte de electrones (figura 5) (Skulachev, 2012; Glasauer y Chandel, 2013; Nickel *et al.*, 2014).

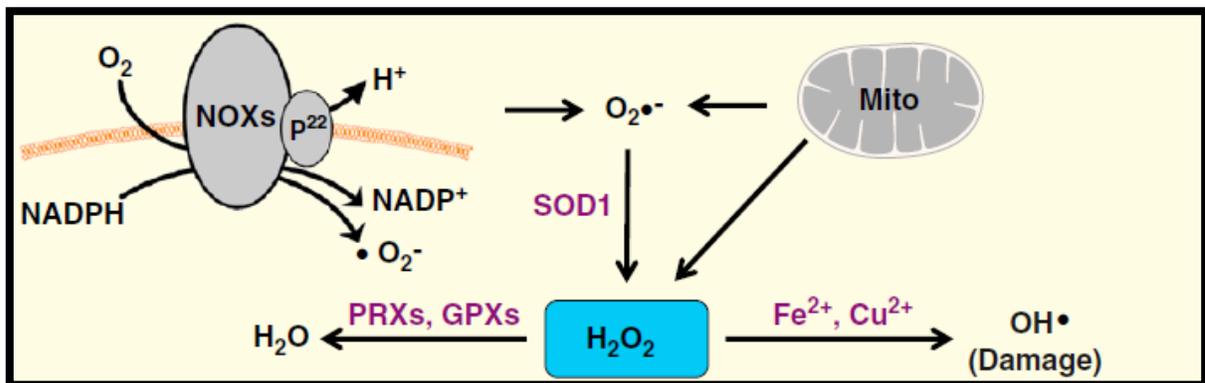


Figura 5. Principales vías de formación de ERO's (Tomada de Glasauer y Chandel, 2013).

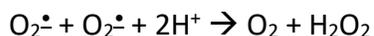
En condiciones normales las ERO's son producidas y utilizadas en compartimentos celulares, y son reguladas mediante los mecanismos antioxidantes presentes, los cuales son considerados como la primera defensa celular antioxidante (Avello, 2006; Pisoschi y Pop, 2015).

2.4.1. Eliminación de Especies Reactivas de Oxígeno

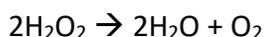
Todos los sistemas biológicos poseen mecanismos de defensa que operan para eliminar o minimizar los efectos negativos de las ERO's (Lushchak, 2012). Estos sistemas antioxidantes son divididos en dos grupos principales, los *antioxidantes de bajo peso molecular* y los *antioxidantes de alto peso molecular*. El primer grupo comprende a sustancias químicamente diferentes como: ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides, antocianinas, polifenoles y ácido úrico; las cuales pueden adquirirse por medio de la dieta (conocidos también como antioxidantes exógenos) (Valko *et al.*, 2007). Otro antioxidante muy importante en este grupo, es el GSH, el cual es sintetizado por muchos organismos vivos y utilizado para controlar las ERO's. La función antioxidante de GSH se presenta al ser cofactor de enzimas antioxidantes como GPx, GST; al eliminar al $\cdot\text{OH}$ y al $\text{O}_2^{\cdot-}$, al inactivar al H_2O_2 y peróxidos lipídicos mediante la acción catalítica de GPx y al intervenir en la generación de las formas activas de antioxidantes importantes como las vitaminas C y E (Valko *et al.*, 2007). Se ha descrito que el GSH es el mayor antioxidante soluble presente en la célula, encontrándose en concentraciones altas en el citosol, el núcleo y la mitocondria en donde sus niveles son ajustados para condiciones y vías específicas (Lushchak, 2012; 2014). Por otra parte, el grupo de antioxidantes de alto peso molecular (conocidos también como antioxidantes endógenos), está conformado por enzimas como: SOD, catalasa, GPx y GST.

Una pequeña fracción de la reducción biológica total del O_2 se produce por una vía univalente, en donde el $\text{O}_2^{\cdot-}$ es el primer intermediario, siendo capaz de iniciar la formación en cadena de los RL, inactivando enzimas específicas e incrementando la producción de ERO's y RL (Lushchak, 2012; 2014).

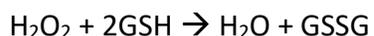
El daño potencial del O_2^{\bullet} es contrarrestado por la SOD que cataliza la dismutación a O_2 más H_2O_2 :



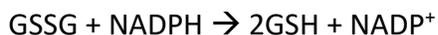
El H_2O_2 producido puede ser dismutado por catalasa, generando dos moléculas de agua más O_2 :



o reducido por diferentes peroxidasas, como GPx:



Sí GPx es utilizada para inactivar el H_2O_2 , deben mantenerse los niveles de GSH, para esto GSSG (glutación disulfuro, forma oxidada de GSH), es de nuevo reducido por glutación reductasa (GR):



Se ha descrito que el sistema antioxidante de alto peso molecular solo puede llevar a cabo la eliminación de O_2^{\bullet} y H_2O_2 , pero no la de $\bullet OH$. Actualmente no se conoce alguna vía del sistema antioxidante para la eliminación del $\bullet OH$; siendo la prevención de la formación como la mejor vía para proteger a los organismos vivos de los efectos deletéreos de este radical. Además, se ha propuesto la capacidad antioxidante de los polifenoles que se pueden adquirir mediante la dieta como un mecanismo adaptado para impedir la formación de $\bullet OH$ (Lushchak, 2012; 2014). Todo el sistema de defensa antioxidante, entonces, trabaja en conjunto para ajustar a niveles

óptimos la producción de ERO's (Lushchak, 2012; 2014; Ye *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando se alteran los niveles fisiológicos y se genera un desequilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes, originado por la producción excesiva de ERO's y RL, que resulta en un daño oxidante a macromoléculas y al control redox, el cual no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa, se induce un proceso conocido como EOx (Jones, 2006).

2.5. Estrés Oxidante

Los seres vivos poseen sistemas altamente regulados para mantener los niveles de ERO's en condiciones óptimas fisiológicas, sin embargo, este balance puede perderse bajo ciertas circunstancias como: incremento en los niveles de compuestos, tanto endógenos como exógenos, que al autooxidarse generan ERO's; disminución de la concentración o producción de antioxidantes de bajo peso molecular; inactivación de enzimas antioxidantes o por la combinación de dos o más de éstos procesos (Lushchak, 2012; 2014; Sertan *et al.*, 2015). El EOx produce modificaciones estructurales y funcionales de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. La degradación oxidante de lípidos conlleva a la formación de malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal e isoprostanos a partir de ácidos grasos insaturados. El daño a las proteínas ocurre por la oxidación de los grupos tiol; adición de grupos carbonilo y oxidación de las cadenas laterales; fragmentación; desnaturalización y renaturalización erróneas, con la consecuente pérdida de actividad (Pisoschi y Pop, 2015). El daño oxidante al ADN puede provocar el rompimiento de hebra sencilla o doble; modificación de bases, en donde, del total de bases nitrogenadas presentes en el ADN, la guanina es la más susceptible a oxidarse, formando, por la adición de $\cdot\text{OH}$, el aducto 8-OHdG (Wang *et al.*, 2015). La oxidación del ADN que no es reparado conlleva a consecuencias biológicas serias como: envejecimiento o muerte celular y transformaciones carcinogénicas (Olinski *et al.*, 2002; Klauning y Kamendulis, 2004). El 8-OHdG es uno de los productos mutagénicos más abundantes, varios estudios han reportado que en diferentes tipos de cáncer se presenta un incremento de los niveles de este aducto (Lee *et al.*, 2012).

Se ha relacionado al EOx con diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular induciendo gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos como: mutaciones; inestabilidad genómica; alteración en la transcripción y replicación de genes importantes para el mantenimiento redox celular; alteración de la transducción de señales; interrupción de la proliferación celular y la comunicación intercelular, ocasionados por la activación de una reacción en cadena (Medeiros, 2008). Esto induce a que se presenten diversas enfermedades, como diabetes, aterosclerosis y procesos inflamatorios; se ha relacionado también al EOx con la isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cataratas, el desarrollo de diversos tipos de cáncer, enfermedades neurológicas, cardiomiopatías, entre otros (Avello, 2006; Ramos *et al.*, 2006).

2.5.1. Estrés Oxidante Inducido por Metales

Cuando las poblaciones se exponen crónicamente a los contaminantes ambientales, con frecuencia se observa un aumento en la prevalencia de las enfermedades crónico-degenerativas (De Vizcaya, 2008). Entre los contaminantes químicos considerados como peligrosos se encuentran los metales pesados, como el cromo, cobalto, arsénico, níquel, cobre, zinc, cadmio, mercurio, titanio, selenio y plomo (EPA, 1998; Kawanishi *et al.*, 2002). De los cuales se ha descrito, pueden generar daño a los organismos, como toxicidad en las células, tejidos u órganos, así como también genotoxicidad y carcinogenicidad, debido a que son capaces de incrementar la formación de RL y generar EOx (Conte *et al.*, 1998; Kawanishi *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006). Se ha observado que la exposición a metales se da principalmente a través del suelo, agua, aire y por productos de consumo, lo cual incrementa el riesgo de exposición a nivel global. La gravedad tóxica de estos elementos se debe a la facilidad con que reaccionan con moléculas orgánicas, específicamente con sus grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El resultado de estas uniones ocasiona principalmente alteración metabólica, EOx y genotoxicidad (Navarro-Aviño *et al.*, 2007).

La toxicidad y el comportamiento oxidante de los metales pesados en las células está determinado por la reacción química de Fenton y el ciclo de Haber-Weiss, en las que participan el radical $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 en la formación del $\cdot OH$ (figura 6) (Valko *et al.*, 2005).

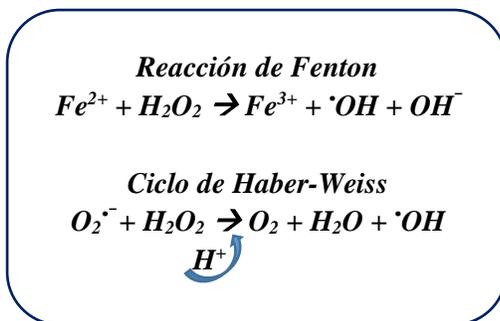


Figura 6. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss, en las que se produce $\cdot OH$.

Muchos metales como los compuestos del cromo (Cr) son conocidos por inducir daño celular, inflamación y varios tipos de cáncer (hígado, riñón, pulmón, próstata y piel). Los principales efectos biológicos del Cr están relacionados con los compuestos del Cr(III) y Cr(VI), lo cuales son producidos principalmente por actividades antropogénicas. Mientras que el Cr(III) es un micronutriente importante interviniendo en el metabolismo de azúcares y grasas el Cr(VI) presenta efectos tóxicos y carcinogénicos (Lee *et al.*, 2012).

2.6. Cromo (VI)

Los compuestos de Cr(VI) son ampliamente utilizados en procesos industriales y comerciales incluyendo galvanoplastia, acabado de metales, curtido de cuero, procesamiento de minerales, refinación de petróleo, manufactura de textiles, preservación de la madera, elaboración de pulpa y fabricación de productos químicos inorgánicos y orgánicos (Thacher *et al.*, 2015). La exposición a este metal se presenta de manera ocupacional o ambiental, principalmente por las emisiones de los automóviles, humo de cigarro, agua y alimentos

contaminados (O'Brien *et al.*, 2003; Flora, 2014). Alrededor del mundo los niveles de Cr(VI) están concentrados solo en algunas regiones. De las 16,400,000 toneladas de Cr(VI) producidas mundialmente, 16,376,000 toneladas son producidas solo por siete países: Sudafrica, India, Kasajastan, Zimbabue, Finlandia, Brasil y Turquía (Myers *et al.*, 2010; Nickens *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Alimba *et al.*, 2016). En general, las poblaciones están expuestas por inhalación del aire, los alimentos y agua contaminados, mientras que la exposición dérmica puede ocurrir a través del contacto con ciertos productos o suelos. Se ha considerado que las principales rutas de exposición a Cr(VI) se presentan por inhalación de aire y por consumo de alimentos, en donde el contenido de este metal varía ampliamente y va a depender del procesamiento y preparación. Se ha reportado que los alimentos frescos típicos, contienen niveles de cromo en un intervalo de 10 a 1300 µg/kg (Nickens *et al.*, 2010). Mientras que, los trabajadores de la industria relacionada con compuestos de Cr(VI) pueden estar expuestos a concentraciones 2 órdenes de magnitud más elevados que la población general. La exposición por inhalación genera irritación del tracto respiratorio, perforación del septum nasal, bronquitis crónica, decremento de la función pulmonar, neumonía, así como también efectos carcinógenos (O'Brien *et al.*, 2003; Jomova y Valko, 2011).

El Cr(VI) ha sido categorizado, por varios años, dentro de los principales carcinógenos para el ser humano, como consecuencia de su bioquímica compleja que contribuye a su reactividad en los sistemas biológicos (Flora, 2014). Los compuestos de Cr(VI) son los más tóxicos debido a su reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) que genera ERO's, esta reducción es considerada el mecanismo más importante de la toxicidad del Cr(VI) (Wu *et al.*, 2000; Jomova y Valko, 2011; Flora, 2014). En los sistemas biológicos el Cr(VI) es encontrado en forma de anión cromato, el cual es similar a los sulfatos y fosfatos, lo que favorece ser rápidamente transportado mediante canales aniónicos al medio celular (figura 7) (Bridges y Zalapus, 2005; Wise y Wise, 2012). Dentro de la célula el Cr(VI) puede ser reducido por moléculas como NADPH, GSH, citocromo p450 o aldehído oxidasa; esta reducción puede llevarse a cabo en el retículo endoplasmático, la mitocondria, la membrana plasmática o el núcleo celular (Norseth, 1981; De Flora *et al.*,

1985, O'Brien *et al.*, 2003). El Cr(VI) al ser reducido produce reactivos intermedios como el Cr(V), Cr(IV) y finalmente Cr(III) (Mertz, 1969; O'Brien *et al.*, 2003; Jomova y Valko, 2011).

El Cr(VI) no interacciona directamente con el ADN, pero puede dañar esta molécula al generar ERO's durante su reducción, las cuales pueden desencadenar reacciones con el $\cdot\text{OH}$ y consecuentemente ocasionar daño oxidante a diferentes biomoléculas (Wise y Wise, 2012). Se ha descrito que la generación de $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ y H_2O_2 se lleva cabo tanto por la vía Haber-Weiss como por la reacción de Fenton (figura 6) (Lee *et al.*, 2012).

El Cr(III) originado durante la reducción del Cr(VI), tiene una gran afinidad por las bases y fosfatos del ADN y puede producir aductos ADN-Cr, generación de bases oxidadas, ruptura de las cadenas de ADN, formación de complejos por uniones ADN-ADN y de sitiosapurínicos/apirimídicos, así como inducción de enlaces cruzados o interacciones del ADN con proteínas (Hanahan y Weinber, 2000; Kawanishi *et al.*, 2002; Jomova y Valko, 2011).

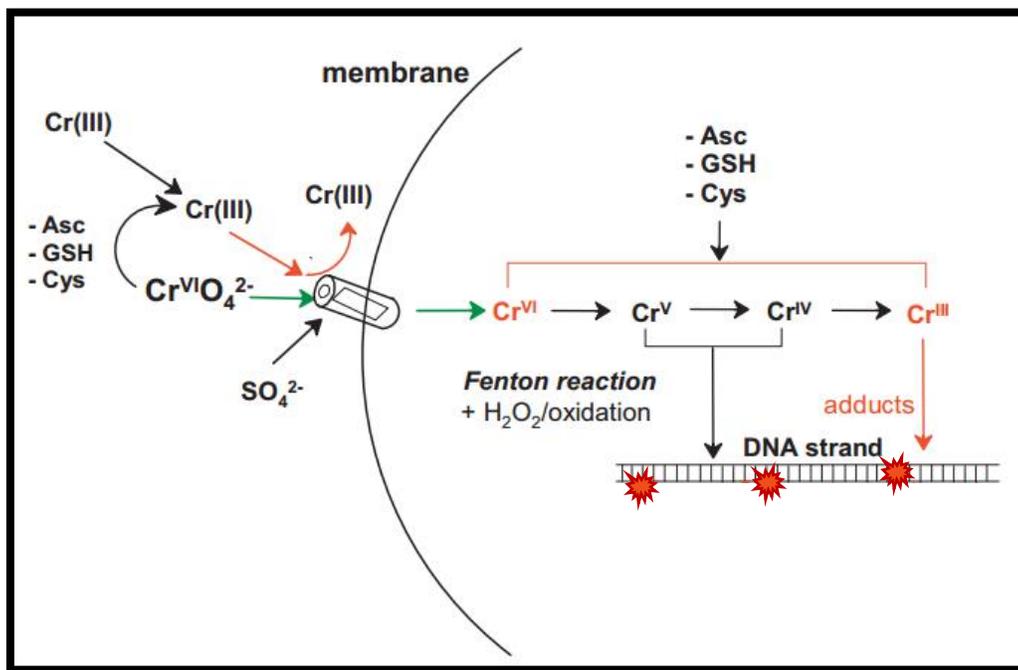


Figura 7. Metabolismo del Cr(VI) y su genotoxicidad (Modificada de Jomova y Valko, 2011).

2.7. Evaluación de Daño Genotóxico

La inducción de daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varias etapas. Primeramente, ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas celulares. Una vez dentro de la célula puede ser reactivo por sí mismo (de acción directa) o bien puede ser activado por enzimas metabólicas (de acción indirecta). Se da entonces la interacción con el ADN produciendo daño, el cual puede ser reparado eficiente o ineficientemente (Ames, 1983).

La evaluación de daño genotóxico se realiza para identificar agentes contaminantes que representan un riesgo para la estabilidad del material genético, así como compuestos propuestos para uso terapéutico y sustancias que podrían ser capaces de regular o reducir los efectos mutagénicos de algunos productos químicos (Sloczyńska *et al.*, 2014). En términos generales, los ensayos de prueba para la detección de daño genotóxico, se agrupan dependiendo del tipo de alteración que detectan y pueden ser:

- a) Mutaciones génicas; entendidas como sustituciones de pares de bases, adiciones o supresiones. Estas modificaciones pueden llegar a inactivar un gen, aunque normalmente permiten al individuo sobrevivir y reproducirse, con lo cual las mutaciones génicas se pueden establecer y heredar a las siguientes generaciones. Se detectan mediante procesos de secuenciación de muestras de ADN (Cole y Skopek, 1994).
- b) Alteraciones en la integridad del ADN; son lesiones premutagénicas, como la formación de aductos, ligamientos cruzados intra e interbanda y rompimientos de una o dos hebras. Estas alteraciones pueden ser reparadas enzimáticamente, por lo que si esto ocurre no constituyen mutaciones heredables. Algunas de las pruebas que las detectan son la determinación de aductos en el ADN y la electroforesis unicelular alcalina (Hemmink *et al.*, 1994).
- c) Aberraciones cromosómicas (AC); que se subdividen a su vez en estructurales y numéricas. Aberraciones estructurales; consisten en deleciones, duplicaciones, inversiones y

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

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

2.7.1. Micronúcleos

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

La técnica de MN fue desarrollada por Boller y Schmid en 1970. Detecta efecto citogenético asociado con la frecuencia de AC, evalúa el daño en cromosomas enteros o en fragmentos y también puede identificar citotoxicidad (Schmid y Ledebur, 1973; Krishna y Hayashi, 2000). Un MN es un pequeño cuerpo de cromatina, formado por fragmentos de cromosomas o por cromosomas completos que durante anafase de la mitosis no se incorporaron dentro del núcleo de las células hijas, consecuentemente el MN que se forma se incluye en el citoplasma (figura 8) (Schmid y Ledebur, 1973).

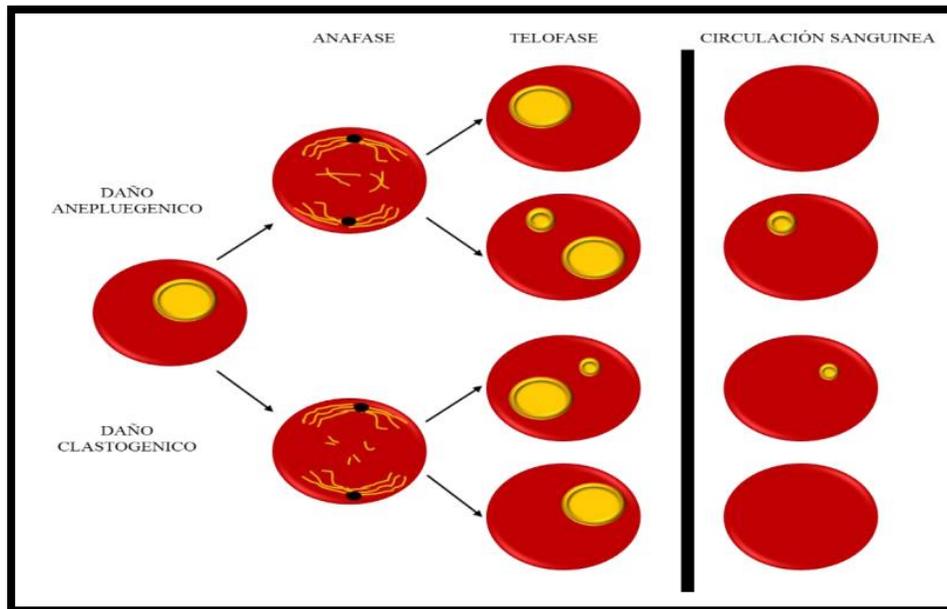


Figura 8. Formación de un Micronúcleo (Tomado Ramos-León, 2015).

Los MN pueden ser evaluados en diferentes tipos celulares como: mieloblastos, mielocitos, medula ósea de ratón (eritrocitos) o en eritrocitos de sangre periférica, células binucleadas (linfocitos) inducidas mediante citocalacina B, así como también células uroteliales y exfoliadas de la mucosa bucal y nasal (Schmid y Ledebur, 1973; Heddle *et al.*, 1983). Los MN pueden ser fácilmente detectados, ya que son de forma redonda con un diámetro de alrededor de 1/20 a 1/5 de un eritrocito. Un incremento en la frecuencia de MN en animales tratados con agentes químicos, indica que éstos son inductores de daño cromosómico (Krishna y Hayashi, 2000; Fenech *et al.*, 2016).

La visualización de los MN en células eritroides es fácil, ya que éstas células carecen de un núcleo principal. Entre estas células se distinguen claramente a los eritrocitos policromáticos (EPC, eritrocito joven) que aún conservan el ARN ribosómico y a los eritrocitos normocromáticos (ENC, eritrocito maduro) que ya perdieron el ARN ribosómico y retienen altas concentraciones de hemoglobina. Los eritrocitos se pueden diferenciar entre ENC y EPC utilizando diferentes colorantes como May-Gruenwald, Giemsa y naranja de acridina (NA) (Schmid y Ledebur, 1973; Hayashi *et al.*, 1990). Utilizando la técnica de tinción con NA, los MN,

EPC y ENC se pueden distinguir utilizando un microscopio de fluorescencia. Los EPC presentan color rojo por el ARN que aún contienen, a diferencia de los ENC que no se tiñen (ya perdieron el ARN), y los MN se tiñen de color verde fluorescente por la presencia de ADN (figura 9) (Hayashi *et al.*, 1990).

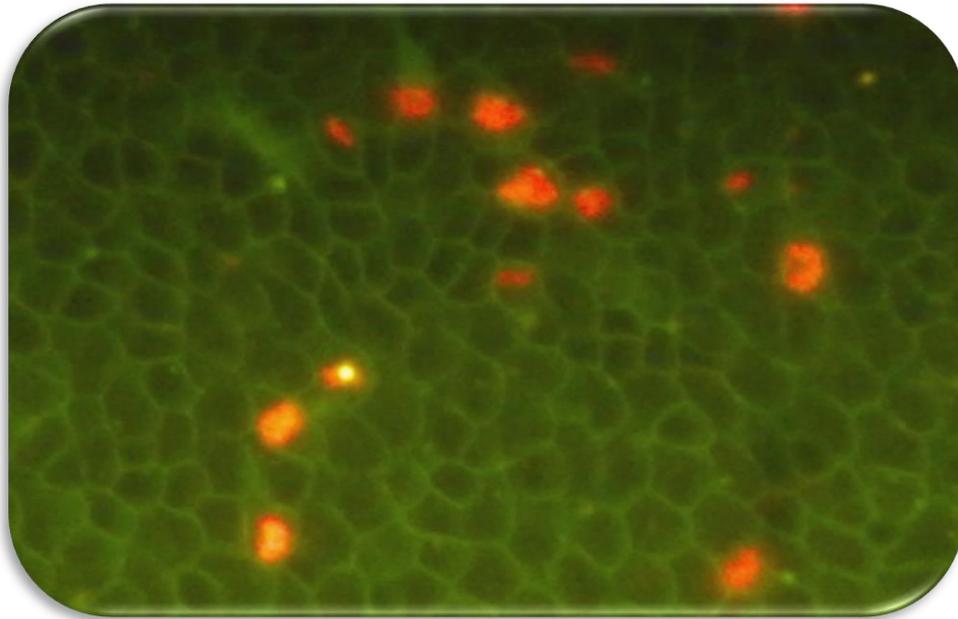


Figura 9. Tinción con NA. EPC en un color rojo y MN en un color amarillo.

2.7.2. 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina

El ADN celular es constantemente modificado por varios factores genotóxicos, tanto endógenos como exógenos, que inevitablemente dañan esta molécula mediante modificaciones químicas y/o estructurales. La generación de ERO's mediante la respiración celular es el mayor mecanismo endógeno de daño al ADN, mientras que el mecanismo exógeno está dado por la exposición a agentes que originan ERO's (Boiteux *et al.*, 2016). En este sentido, se ha descrito que ciertos iones metálicos pueden ser carcinógenos para los seres humanos, debido a que pueden inducir genotoxicidad mediante la generación de EOx y la inactivación de

los sistemas de reparación (Wu *et al.*, 2015). Se han descrito cerca de 80 tipos de lesiones tanto a bases nitrogenadas como a la desoxirribosa por la actividad de los RL, los cuales son capaces de generar daño genético ya sea de manera directa o indirecta, induciendo rompimientos de una o dos hebras, modificaciones de bases o sitios abásicos; estos tipos de daño se han involucrado en el proceso de envejecimiento y carcinogénesis (Pilger y Rüdiger, 2006; Talhaoui *et al.*, 2016).

Se ha observado que el $\cdot\text{OH}$ preferentemente reacciona con los átomos C8 de las purinas del ADN, ocasionando la oxidación de nucleosidos en el ADN e induciendo la formación de aductos como el 8-OHdG (representado también como 8-oxodG) y provocando que consecuentemente ocurran transversiones del nucleótido guanina por timina durante la replicación (Evans *et al.*, 2004; Pilger y Rüdiger, 2006). El 8-OHdG es una de las lesiones que ha llamado más la atención debido a que tienen un papel importante en la mutagénesis y carcinogénesis, lo que lo convierte en un biomarcador relevante para el estudio del daño oxidante al ADN, carcinogénesis y genotoxicidad (Hollstein *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007; Flora, 2014; Talhaoui *et al.*, 2016).

Cuando el ADN es atacado por RL una de las bases más susceptibles a daño oxidante es la guanina, la cual puede ser transformada a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG). Se han detectado diferentes formas estructurales de esta lesión, que consisten en la propia nucleobase (8-oxoG), ribonucleósido (8-oxoG) y nucleósido (8-OHdG). Las nucleobases como 8-oxoG son menos comunes, pero actúan como trampas para radicales catiónicos, ya que tienen un potencial de oxidación mucho menor que la guanina (Kanvah y Schuster, 2006; Prabhulkar y Li, 2010). El aducto 8-OHdG puede ser eliminado mediante reparación por escisión de bases (BER) por la 8-oxo-guanina glucosilasa (OGG1), o por el mecanismo de reparación por escisión de nucleotido (NER) (Floyd *et al.*, 1986; Cheng *et al.*, 1991; Hollstein *et al.*, 1991). De este modo, el monitoreo de 8-OHdG extracelular también proporciona información sobre los mecanismos de reparación del ADN (Prabhulkar y Li, 2010). En este sentido, se ha descrito que la inhibición de los mecanismos de reparación del ADN es uno de

los mayores inductores de genotoxicidad, en donde el daño al ADN, no reparado, es considerado esencial para la iniciación de carcinogénesis en respuesta a sustancias endógenas o exógenas (Bach *et al.*, 2015). El producto de oxidación de la nucleobase, 8-OHdG, es de particular interés y relevancia debido a su importancia biológica, como una lesión mutagénica replicativa y transcripcional (Evans *et al.*, 2016).

Cabe mencionar que 8-oxodG y 8-OHdG son moléculas tautoméricas, es decir, se diferencian solo en la posición de grupos funcionales, pero guardan un equilibrio químico. Inicialmente, la reacción de la adición de $\cdot\text{OH}$ conduce a la generación de aductos radicales, luego por una abstracción electrónica, se forma 8-OHdG (figura 10). El 8-OHdG sufre tautomerismo ceto-enol, lo que favorece el producto oxidado 8-oxodG. Sin embargo, en la literatura científica se utilizan 8-OHdG y 8-oxodG para el mismo compuesto (Valavanidis *et al.*, 2009).

Dado que 8-OHdG, a diferencia de cualquier otra especie que contiene guanina oxidada, es soluble en agua y permeable a la membrana, se secreta al espacio extracelular después de ser removido y eliminado de la hélice del ADN por los mecanismos de reparación, posteriormente puede detectarse y medirse en orina, saliva o plasma, por lo que es utilizada y reconocida como biomarcador del daño oxidante (Evans *et al.*, 2004; Pilger y Rüdiger, 2006; Ock *et al.*, 2011). La preferencia por medir 8-OHdG deriva de un estudio inicial que sugiere que los niveles de 8-oxoG están significativamente influenciados por la dieta, no así los niveles de 8-OHdG (Evans *et al.*, 2016).

Existen diferentes técnicas para llevar a cabo la medición de 8-OHdG, uno de los más utilizados es el ensayo inmuno-enzimático ELISA (Asami *et al.*, 1998), el cual consiste en utilizar un anticuerpo anti-8-OHdG monoclonal, un anticuerpo secundario conjugado con HRP, y un sustrato colorimétrico de detección. El anticuerpo monoclonal 8-OHdG se une competitivamente al 8-OHdG inmovilizado en pozos pre-revestidos y en solución. El anticuerpo unido al 8-OHdG en la muestra es eliminado por lavado, mientras que se retiene al anticuerpo unido al 8-OHdG adjunto al pozo. La detección del anticuerpo retenido se realiza

usando un conjugado de HRP y sustrato colorimétrico. Una de las ventajas de utilizar esta técnica es que puede ser realizada fácilmente (Pilger y Rüdiger, 2006).

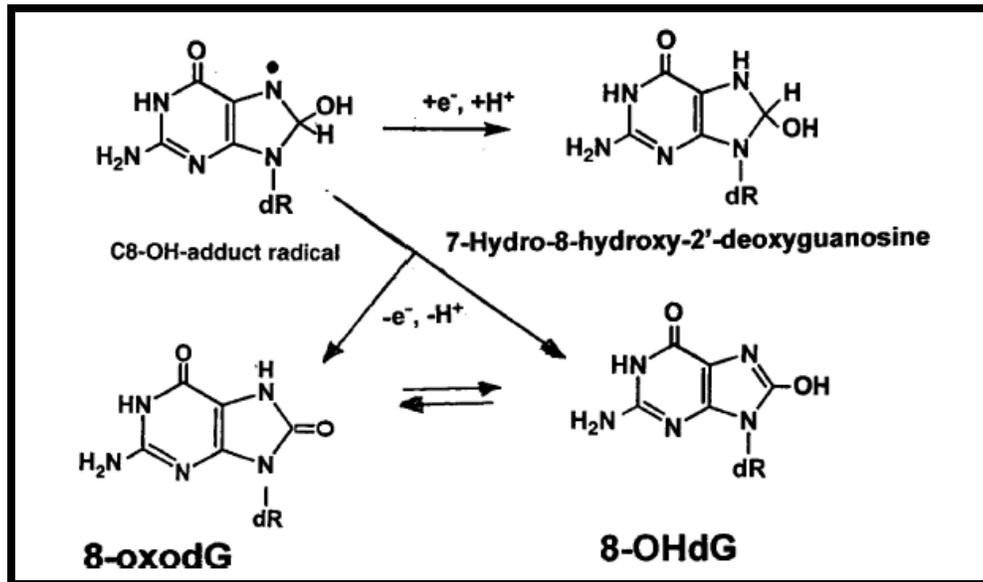


Figura 10. Formación del aducto 8-OHdG y su tautómero 8-oxodG (Tomada de Valavanidis et al., 2009).

2.7.3. Apoptosis y Viabilidad Celular

La muerte celular programada es un proceso celular fundamental y esencial para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, con el objetivo de eliminar las células dañadas, infectadas o transformadas (Norbury y Hickson, 2001; Cascales, 2003). La apoptosis comienza por la activación de un programa intrínseco o extrínseco y se caracteriza por el mantenimiento de las membranas celulares intactas permitiendo así su eliminación por fagocitosis; se considera un proceso en el cual la muerte celular es iniciada y completada de una manera ordenada mediante una serie de cambios bioquímicos y morfológicos, incluyendo el incremento de ERO's, activación de caspasas, encogimiento celular, condensación de la cromatina y degradación nucleosomal (Cascales, 2003; Tait y Green, 2012; Forbes-Hernández

et al., 2014). Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye condensación citoplasmática y nuclear, el rompimiento específico de proteínas celulares, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, y el rompimiento endolítico del ADN en fragmentos oligonucleosómicos que posteriormente son fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas (figura 11) (Ramírez y Rojas, 2010; Tait y Green, 2012).

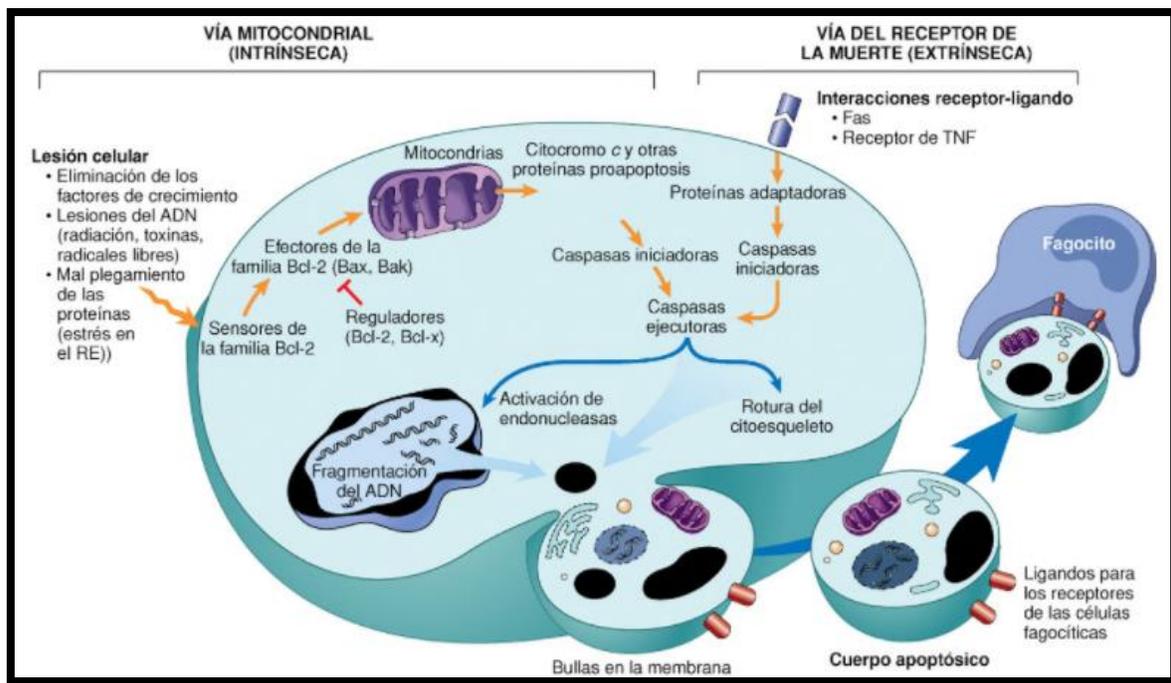


Figura 11. Cambios morfológicos característicos de la apoptosis (Tomada de Robbins y Cotran, 2010).

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir las de muerte. Estas últimas son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión del ADN por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos (Cascales, 2003). Siendo la apoptosis un proceso activo y estrictamente regulado, existen diversos activadores

(citocromo c, smac/diablo, AIF, BIR3) y reguladores negativos (IAP, Hsp, Bcl-2 y BclXL, etc.) (Cascales, 2003; Forbes-Hernández *et al.*, 2014).

Por otra parte, se ha observado que el proceso de apoptosis puede ser desencadenado como un mecanismo de respuesta por agentes quimiopreventivos para suprimir el proceso de carcinogénesis (Taraphdar *et al.*, 2001). El análisis de la muerte celular puede ser llevado a cabo tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*. En este sentido, se han reportado diversos métodos que permiten la adecuada distinción entre la apoptosis y necrosis (Allen *et al.*, 1997). Tal como el método por tinción diferencial con fluorocromos, utilizando una mezcla de los colorantes NA y bromuro de etido (Br-Et). En donde el 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); mientras que el Br-Et 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 (figura 12) (Baskic *et al.*, 2006).

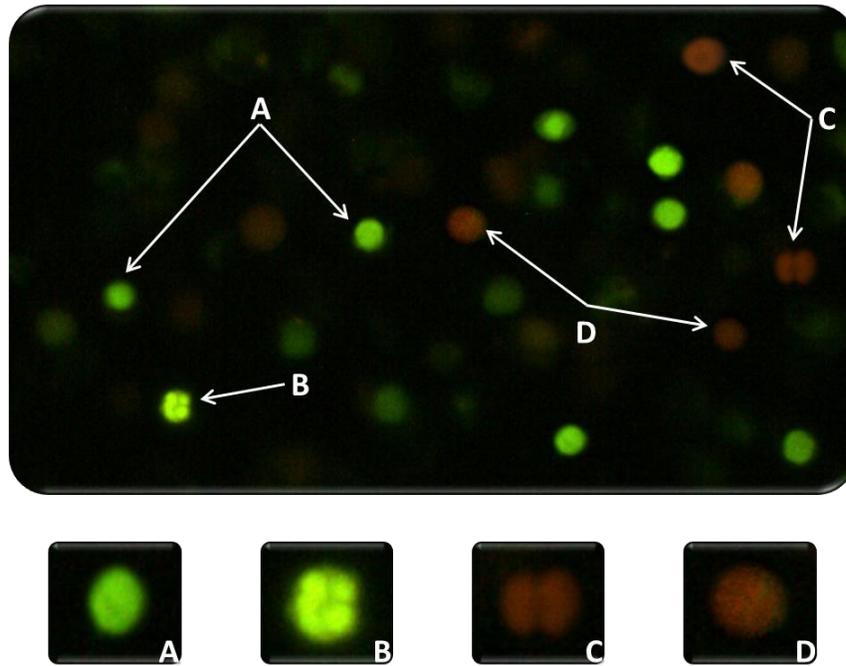


Figura 12. Tinción con fluorocromos NA/Br-Et. Células viables (A). Células apoptóticas tempranas (B). Células apoptóticas tardías (C). Células no viables o necróticas (D) (Tomada de García-Rodríguez et al., 2016).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La exposición de las poblaciones humanas a agentes genotóxicos como los compuestos de Cr(VI) se ha relacionado con el desarrollo de algunos tipos de cáncer y se ha propuesto como uno de sus principales mecanismos de daño al EOx generado durante su reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III).

En contraparte, se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* con diferentes sistemas de prueba que los compuestos polifenólicos como la (+)-catequina y el resveratrol muestran una elevada capacidad antioxidante. Por lo que, es de interés estudiar el efecto de los antioxidantes polifenólicos presentes en la dieta humana sobre los efectos de agentes carcinogénicos relacionados con el daño genotóxico y el EOx. Particularmente los efectos de la (+)-catequina y el resveratrol no han sido estudiados *in vivo*, sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por sustancias con potencial carcinogénico que generan EOx como los compuestos de Cr(VI). De ahí que, la pregunta a resolver del presente estudio es:

¿Qué efecto presentan los polifenoles (+)-catequina y resveratrol sobre la apoptosis, viabilidad celular, los niveles de 8-OHdG, la frecuencia de micronúcleos y los niveles de antioxidantes endógenos en ratones Hsd:ICR tratados con cromo hexavalente?

IV. HIPÓTESIS

Si los polifenoles como la (+)-catequina y el resveratrol poseen propiedades antioxidantes y se ha propuesto que los compuestos de Cr(VI) pueden inducir daño genotóxico y citotóxico mediante la generación EOx durante su reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III), entonces se espera que la administración *in vivo* de (+)-catequina y resveratrol a ratones tratados con CrO₃ disminuyan las frecuencias de MN, incrementen la apoptosis, restablezcan los niveles de 8-OHdG, antioxidantes totales y GSH, así como la actividad de la SOD.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de la (+)-catequina y el resveratrol sobre la apoptosis, viabilidad celular, los niveles de 8-OHdG, la frecuencia de micronúcleos y los niveles de antioxidantes endógenos en ratones Hsd:ICR tratados con compuestos de cromo hexavalente.

5.2. Objetivos Particulares

- I. Determinar las dosis no genotóxicas ni citotóxicas de la (+)-catequina y el resveratrol mediante la evaluación de inducción de MN, apoptosis, niveles de 8-OHdG, frecuencias de EPC con relación a los ENC y viabilidad celular en ratones Hsd:ICR.
- II. Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico del Cr(VI) mediante la cinética de inducción de MN, apoptosis, niveles de 8-OHdG, frecuencia de EPC con relación a los ENC y viabilidad celular en ratones Hsd:ICR tratados con CrO₃.
- III. Evaluar el efecto de la (+)-catequina y el resveratrol sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por Cr(VI) mediante la cinética de inducción de MN, apoptosis, niveles de 8-OHdG, frecuencias de EPC con relación a los ENC y viabilidad celular en ratones Hsd:ICR tratados con CrO₃.
- IV. Evaluar el efecto del Cr(VI), la (+)-catequina y el resveratrol sobre la actividad de la SOD, así como los niveles de antioxidantes totales y de GSH en ratones Hsd:ICR; mediante el método del ABTS, reciclaje enzimático de Griffith y la reducción de NBT.
- V. Evaluar el efecto de la (+)-catequina y el resveratrol sobre la actividad de la SOD, así como los niveles de antioxidantes totales y de GSH en ratones Hsd:ICR tratados con CrO₃; mediante el método del ABTS, reciclaje enzimático de Griffith y la reducción de NBT.

VI. Material y Método

6.1. Animales

Se emplearon ratones macho de la cepa Hsd:ICR, de entre 45 y 60 días de edad con un peso variable de 28 a 35 g obtenidos del laboratorio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. A los organismos se les permitió el libre acceso al agua y alimento (nutricubos Purina®), y se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, así como de períodos luz-obscuridad 12-12 horas. Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo fueron establecidos con base en los lineamientos de la GENOTOX, la EPA, la ECETOC y la FDA (Heddle, 1983; FDA 2000). También los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la FES-Z, UNAM.

6.2. Reactivos

Los reactivos empleados en el estudio se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Colorante NA [CAS No 10127-02-3]; Bromuro de Etidio (Br-Et) [CAS No 1239-45-8]; Resveratrol [CAS No 501-36-0]; (+)-catechin.H₂O [CAS No 154-23-4] y CrO₃ [CAS No. 133-82-0]. Para la evaluación de concentración de 8-OHdG se empleó el “kit” comercial II 8-oxo-dG ELISA Trevigen [No. 4380-192-K]; para la determinación de antioxidantes totales se utilizó el “kit” para Antioxidantes de Cayman [No. 709001]; para medir la concentración de GSH se empleó el “kit” HT glutatión de Trevigen [No. 7511-100-K] y para medir la actividad de SOD se utilizó el “kit” Superóxido Dismutasa de Trevigen [No. 7501-500-K].

6.3. Tratamientos

El CrO₃ se administró en una dosis de 20 mg/kg de peso por vía intraperitoneal, con base en los resultados de estudios previos en los que se ha observado daño genotóxico (García-Rodríguez *et al.*, 2001; O’Brien *et al.*, 2003); mientras que los polifenoles se administraron por vía oral (sonda intragástrica) por ser la vía común por la que ingresan a nuestro organismo. Los tratamientos se prepararon en solución a partir de su disolución en agua estéril o etanol al 30

%. Una vez preparados los reactivos, se administraron inmediatamente en un volumen aproximado de 0.25 mL por ratón.

Los grupos experimentales fueron conformados con cinco ratones y fueron tratados de acuerdo al protocolo 1 (figura 13) y protocolo 2 (figura 14).

Protocolo 1

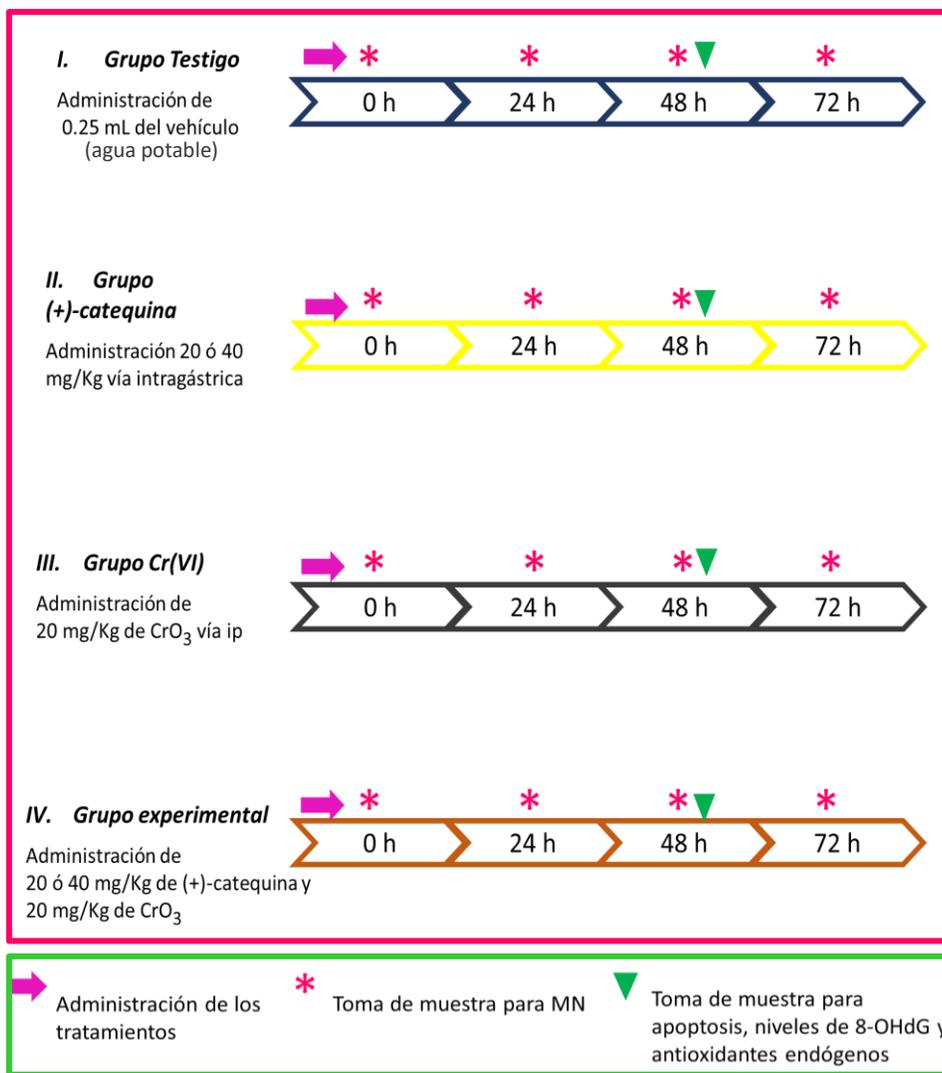


Figura 13. Protocolo para la administración de los tratamientos: (+)-catequina vía i.g. y CrO₃ vía i.p. (20 mg/kg). Testigo: tratados únicamente con agua potable via oral; **(+)-catequina:** 20 ó 40 mg/kg por vía intragástrica; **CrO₃:** 20 mg/kg vía i.p; **(+)-catequina-CrO₃:** combinación de ambos tratamientos. La administración del polifenol se realizó 4 horas antes del CrO₃.

Protocolo 2

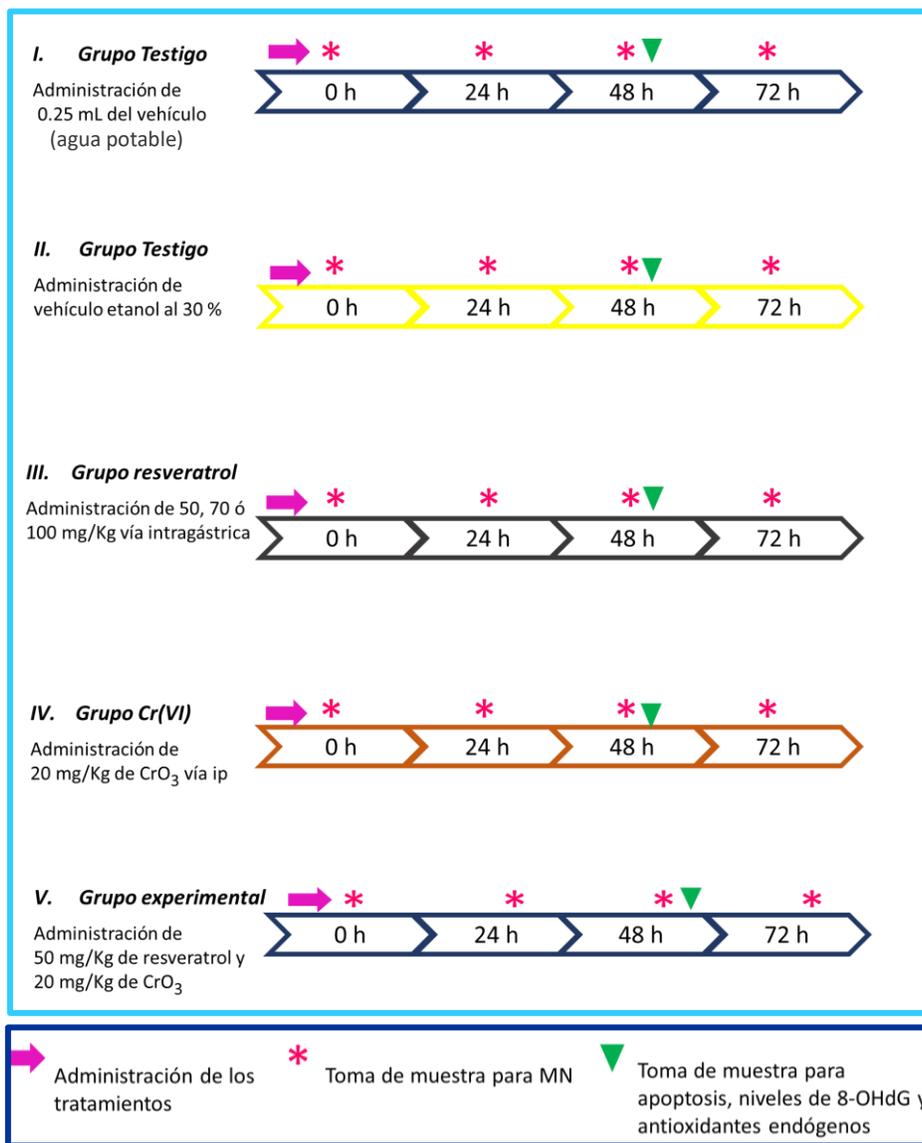


Figura 14. Protocolo para la administración de los tratamientos: Resveratrol vía i.g. y CrO₃ vía i.p. (20 mg/kg). Testigos: tratados únicamente con agua potable o etanol al 30 % vía oral; Resveratrol: 50 mg/kg por vía intragástrica; CrO₃: 20 mg/kg vía i.p; Resveratrol-CrO₃: combinación de ambos tratamientos. La administración del polifenol se realizó 4 horas antes del CrO₃.

6.4. Ensayo de Micronúcleos y Relación de Eritrocitos Policromáticos/Eritrocitos Normocromáticos

Las evaluaciones de MN y la relación de EPC/ENC se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Hayashi *et al.* (1990). Se tomaron muestras de sangre periférica de ratón, y fueron colocadas en laminillas previamente tratadas con NA, posteriormente se observaron en un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS CX31RBSFA) 24 horas después de su preparación. La tinción de los eritrocitos con NA permite diferenciar a los EPC de los ENC y a los MN. Para la evaluación de daño genotóxico se cuantificaron los MN presentes en 4000 EPC (EPC-MN) por ratón y para la evaluación de daño citotóxico la frecuencia de EPC en 2000 eritrocitos totales (EPC + ENC). Se calculó también la Frecuencia de Inducción Neta (NIF, por sus siglas en inglés) y la Frecuencia de Inducción Diferencial (DIF, por sus siglas en inglés) (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

6.5. Determinación de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

Para la determinación de 8-OHdG en plasma se utilizó el ensayo inmuno-enzimático ELISA (Kit II Trevigen 4380-192-K) de acuerdo a Asami *et al.* (1998). El 8-OHdG, se elimina del ADN y posteriormente es transportado a la saliva, orina y plasma donde puede ser detectado. Se emplearon placas de 96 pozos previamente recubiertas con 8-OHdG, un anticuerpo anti-8-OHdG monoclonal de ratón, un anticuerpo secundario conjugado con HRP, y el sustrato colorimétrico de detección. El anticuerpo monoclonal 8-OHdG se une competitivamente a 8-OHdG inmovilizado en pozos de pre-revestidos y en solución. El anticuerpo unido a la 8-OHdG en la muestra se elimina por lavado, mientras que el anticuerpo unido a la 8-OHdG en la placa permanece en el pozo. La detección del anticuerpo retenido se realizó usando un conjugado de HRP y el sustrato colorimétrico. La absorbancia se midió a 450 nm.

6.6. Evaluación de Apoptosis y Viabilidad Celular

Las evaluaciones de apoptosis y viabilidad celular se realizaron de acuerdo a la técnica modificada por García-Rodríguez *et al.* (2013) de McGahon *et al.* (1995). Las muestras

obtenidas de sangre periférica de ratón (50 μ L) se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm, se retiró el sobrenadante e inmediatamente después se resuspendió el botón celular con la mezcla de colorantes (NA/Br-Et). Las muestras fueron colocadas en portaobjetos y posteriormente evaluadas bajo un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS CX31RBSFA) con una emisión de luz azul (480 nm) y un filtro de luz amarilla (515-530 nm). Se evaluaron 300 células por ratón, entre las que se cuantificó el número de células viables, células apoptóticas y células necróticas. Posteriormente, se calcularon los valores porcentuales del índice apoptótico y viabilidad celular en cada grupo experimental.

6.7. Determinación de la Capacidad Antioxidante Total

La determinación de antioxidantes totales se realizó en muestras de plasma mediante un “kit” comercial (kit Cayman 709001) basado en el método ABTS propuesto por Miller *et al.* (1993). En este ensayo, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato) (ABTS) se incubó con metamioglobina y H_2O_2 para producir $ABTS^{*+}$, el cual se observó de color azul-verde y pudo ser medido en un espectrofotómetro a 450 nm. Los antioxidantes presentes en la muestra disminuyen la concentración de $ABTS^{*+}$, lo cual implica una reducción en la absorción proporcional a su concentración. La curva estándar de calibración se construyó con trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un análogo de la vitamina E. El valor de los antioxidantes totales de las muestras analizadas se expresó como un equivalente de la concentración milimolar de solución trolox.

6.8. Determinación de la Concentración Intracelular de GSH

El nivel de glutatión se determinó en eritrocitos de sangre periférica utilizando un “kit” comercial (Kit Trevigen No. 7511-100-K) mediante el método de reciclaje enzimático de Griffith (1980), en el cual el GSH es oxidado por 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, reactivo de Ellman) y reducido por NADPH en presencia de glutatión reductasa (GR). La formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) se monitoreó a 412 nm. El contenido de glutatión de la muestra se

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

6.9. Determinación de la Concentración Intracelular de Superóxido Dismutasa

La determinación de SOD se realizó en eritrocitos de sangre periférica, utilizando un “kit” comercial (Kit Trevigen No. 7500-100-K). El ensayo consiste en que los iones generados a partir de la conversión de la xantina en ácido úrico, y H_2O_2 por la xantina oxidasa (XOD), convierten a NBT en NBT-diformazano el cual absorbe la luz a 450 nm. La SOD puede reducir las concentraciones de $O_2^{\bullet-}$ y por lo tanto disminuir la tasa de formación de NBT-diformazano. La reducción en la aparición de NBT-diformazano es una medida de la actividad de SOD presente en las muestras experimentales (McCord y Fridovich, 1969).

6.10. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de MN, NIF, apoptosis, viabilidad celular y la relación de EPC/ENC se presentan en gráficas y se analizaron con la prueba estadística chi-cuadrada o Kruskal-Wallis. Los niveles de 8-OHdG, antioxidantes totales, GSH y SOD se presentan en promedios con su desviación estándar (media \pm d.e.) y se les aplicó análisis de varianzas, seguido de una prueba Tukey. Se empleó GraphPad Prism versión 5.0 (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001). Para todos los casos, se consideró una $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

7.1. *Determinación de las Dosis no Genotóxicas ni Citotóxicas de (+)-catequina y Resveratrol*

7.1.1. *(+)-catequina*

Con base en los objetivos establecidos lo primero que se realizó fue determinar la dosis no genotóxica ni citotóxica de la (+)-catequina. Se realizó la administración de 20 ó 40 mg/kg de (+)-catequina por vía i.g. Como se puede observar en el Anexo 1 ninguna de las dosis modificó los MN de manera significativa, así como tampoco se presentaron efectos significativos sobre la apoptosis y la viabilidad celular (Anexo 2).

7.1.2. *Resveratrol*

En el Anexo 3 se presentan las gráficas de los MN evaluados de las 0 a las 72 horas cuando se administraron diferentes dosis de resveratrol (50, 70 y 100 mg/kg) por vía i.g. El tratamiento con 50 mg/kg no modificó de manera significativa los MN en ninguna de las horas evaluadas. Cuando se realizó la administración de 70 mg/kg se observó una disminución significativa a las 72 horas. Mientras que no se presentaron modificaciones de los MN con la administración de 100 mg/kg. Por otra parte, ninguna de las dosis aplicadas modificó de manera significativa los porcentajes de las células apoptóticas, así como tampoco la viabilidad celular (Anexo 4). Cabe mencionar que con el tratamiento de 70 y 100 mg/kg hubo muerte de organismos durante las evaluaciones.

7.2. Efecto de la Administración de 20 y 40 mg/kg de (+)-catequina Sobre el Daño Genotóxico Inducido por CrO₃

7.2.1. Micronúcleos

Debido a la variabilidad observada a las 0 horas de cada grupo (Anexos 5 y 6) se realizó el cálculo del NIF, partiendo de la premisa de que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que se les restaron los MN evaluados en la hora 0 a los valores obtenidos en las siguientes horas (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

$$\text{NIF} = \text{MN}_{a \ x_i} - \text{MN}_{a \ x_0}$$

Donde:

a= grupo

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

x₀= tiempo 0

En la figura 15 se muestra el análisis del NIF por tiempo y por grupo, calculado para 20,000 EPC, cuando se administraron los tratamientos de (+)-catequina (20 mg/kg), CrO₃ y (+)-catequina-CrO₃. Se puede observar que en el grupo (+)-catequina no hay modificación de las frecuencias de MN. El tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ incrementó de manera significativa las frecuencias de MN a las 24, 48 y 72 horas al comparar con el grupo testigo y con el grupo combinado (72 horas). Por otra parte, cuando se administró el tratamiento (+)-catequina-CrO₃ se presentó una disminución a las 72 horas del 70 % de las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado con CrO₃. Sin embargo, para la hora 24 y 48 se puede observar un incremento de las frecuencias de MN, que resultó significativo al compararse con el grupo testigo.

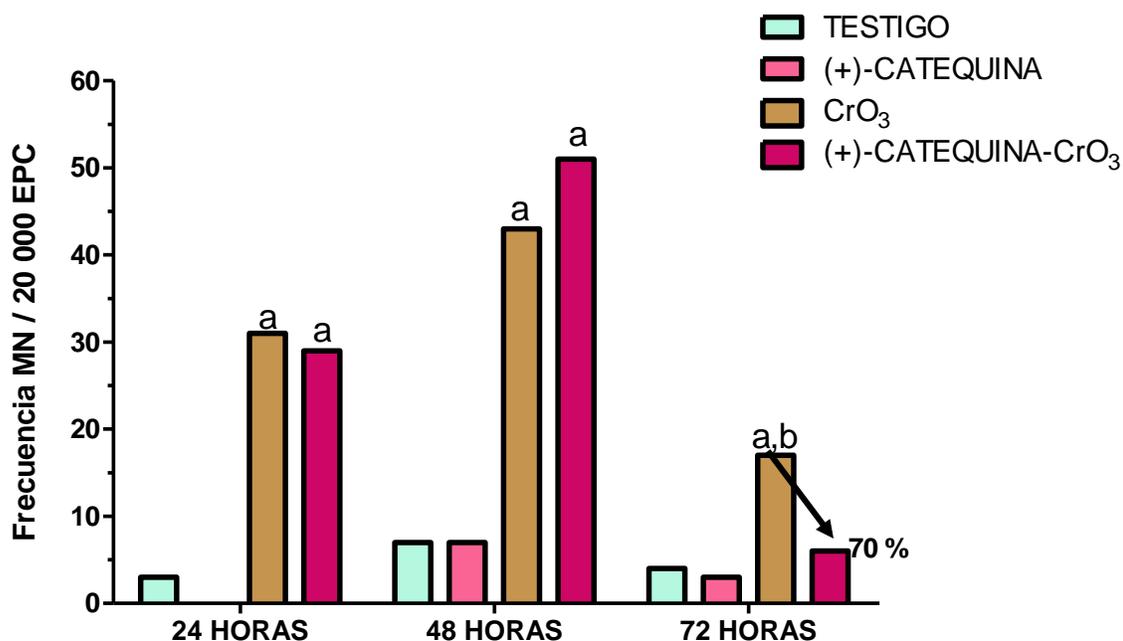


Figura 15. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN calculado para 20,000 EPC cuando se administró una dosis de 20 mg/kg de (+)-catequina por vía i.g. $p < 0.05$: ^avs testigo; ^bvs (+)-catequina-CrO₃. Analizados mediante la prueba estadística chi-cuadrada.

Dado que la administración de 20 mg/kg de (+)-catequina disminuyó las frecuencias de MN inducidas por el CrO₃ únicamente a las 72 horas se decidió administrar una dosis mayor (40 mg/kg) con la finalidad de buscar una protección más consistente en todas las horas evaluadas. En la figura 16 se presenta el análisis del NIF calculado para las frecuencias de MN evaluados en los grupos tratados con (+)-catequina (40 mg/kg), CrO₃ y (+)-catequina-CrO₃. Puede observarse que, aunque en el grupo combinado hay una disminución de las frecuencias de MN del 16 % a las 48 horas no resultó significativo al compararse contra el grupo CrO₃. Para las horas 24 y 72 no se presentó modificación de las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO₃, sin embargo, fueron significativos al compararse con el grupo testigo. Esto indica que la administración de (+)-catequina en una dosis de 40 mg/kg no protege contra

el daño genotóxico inducido por el CrO_3 . Cabe mencionar que se presentó la muerte de un organismo en el grupo combinado.

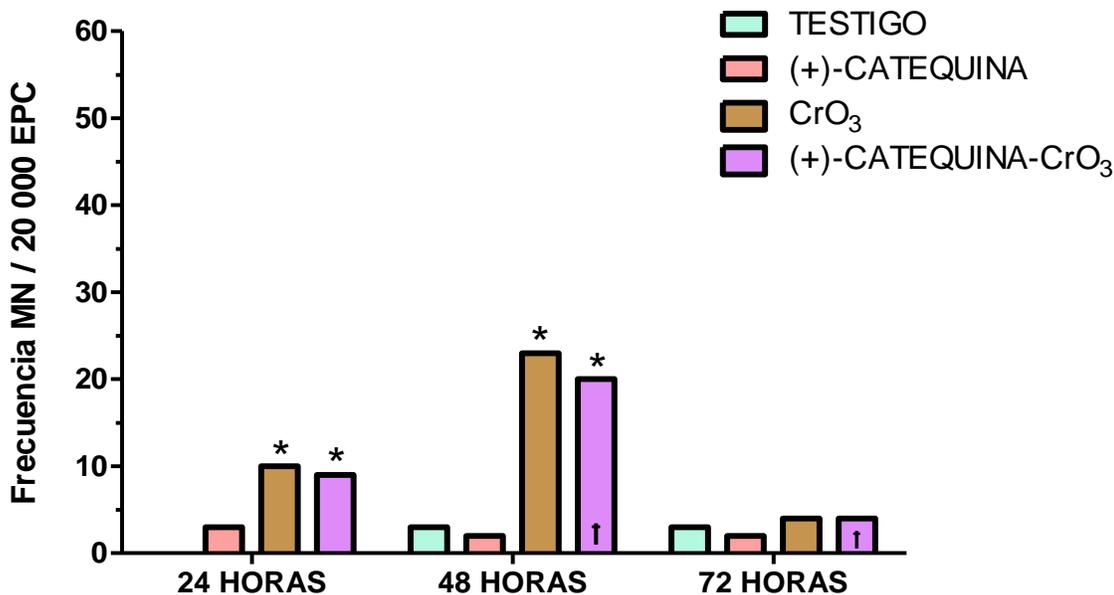


Figura 16. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 20,000 EPC cuando se administró una dosis de 40 mg/kg de (+)-catequina por vía i.g. $p < 0.05$: *vs testigo. Analizados mediante la prueba estadística chi-cuadrada. ¹ muerte de 1 organismo.

7.2.2. Apoptosis

En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos al realizar el análisis de la apoptosis cuando se administraron los tratamientos de (+)-catequina (20 mg/kg), CrO_3 y (+)-catequina- CrO_3 . La dosis sola de (+)-catequina no modificó las células sanas y apoptóticas. Por otra parte, el tratamiento con CrO_3 disminuyó de manera significativa las células sanas, mientras que incrementó el porcentaje de células apoptóticas, resultando significativo cuando se comparó contra el grupo testigo y combinado. Cuando se administró el tratamiento (+)-catequina- CrO_3 hubo una reducción en el porcentaje de células apoptóticas en comparación con el grupo tratado solo con CrO_3 , sin embargo, aún resultó significativo al compararlo contra el grupo testigo. Por otra parte, ninguno de los tratamientos modificó las células necróticas.

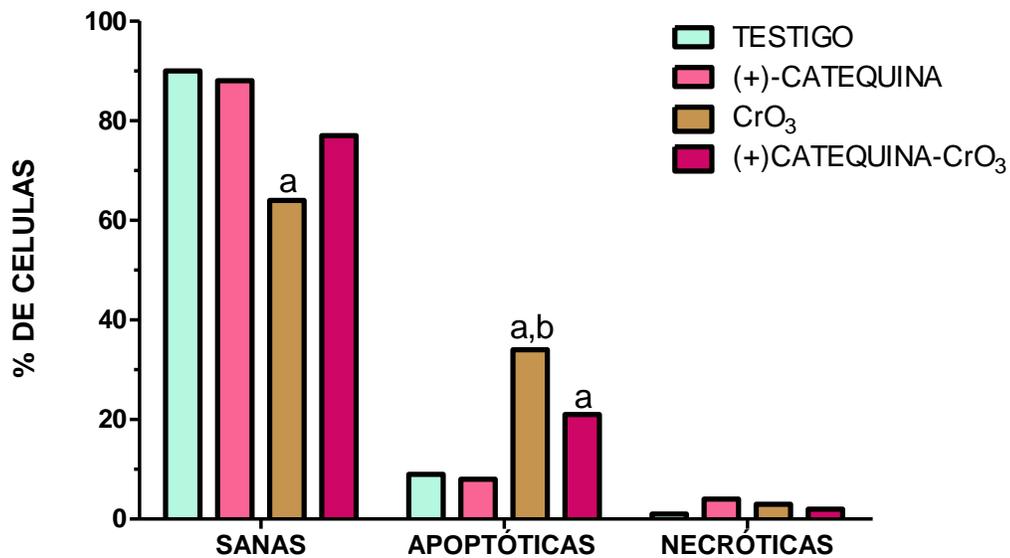


Figura 17. Porcentaje de células sanas, apoptóticas y necróticas, evaluadas en células nucleadas de sangre periférica de ratones tratados con 20 mg/kg de (+)-catequina. $p < 0.05$: ^avs testigo; ^bvs (+)-catequina-CrO₃. Analizados mediante la prueba estadística chi-cuadrada. Se evaluaron 300 células por ratón.

En la figura 18 se presentan los resultados obtenidos cuando se administraron los tratamientos de (+)-catequina (40 mg/kg), CrO₃ y (+)-catequina-CrO₃. Se observó un incremento significativo de las células apoptóticas únicamente en el grupo tratado solo con CrO₃. En cuanto a las células sanas y necróticas, ninguno de los tratamientos modificó estos parámetros de manera significativa.

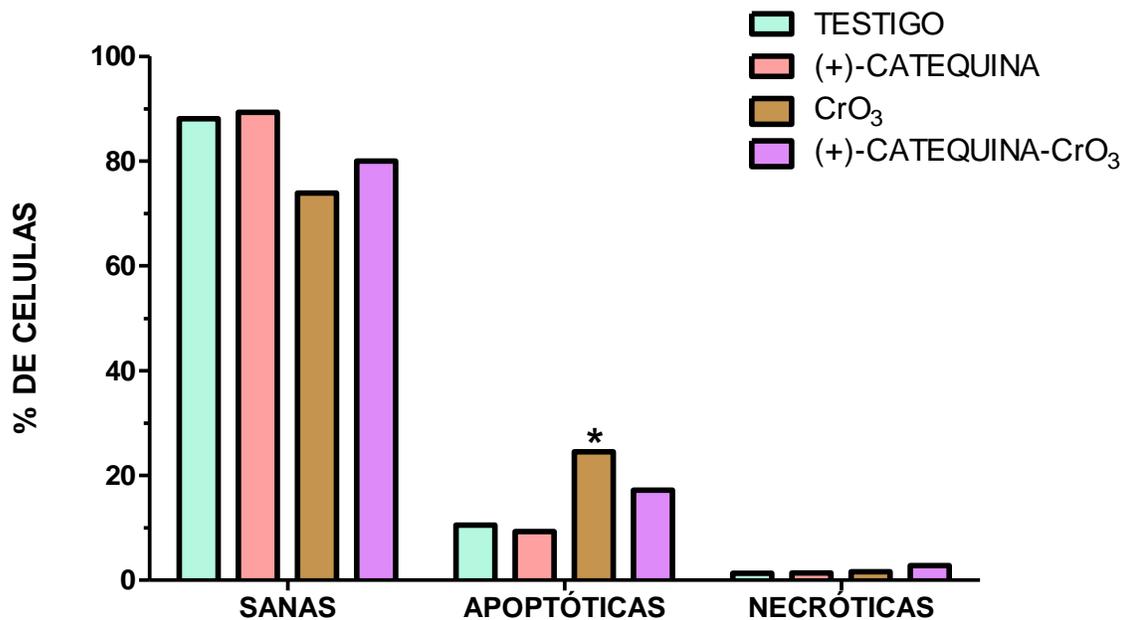


Figura 18. Porcentaje de células sanas, apoptóticas y necróticas, evaluadas en células nucleadas de sangre periférica de ratones tratados con 40 mg/kg de (+)-catequina. $p < 0.05$: *vs testigo. Analizados mediante la prueba estadística chi-cuadrada. Se evaluaron 300 células por ratón.

7.3. Efecto de la Administración de 50 mg/kg de Resveratrol Sobre el Daño Genotóxico Inducido por CrO₃

7.3.1. Micronúcleos

Con base en los resultados obtenidos de las evaluaciones realizadas de las diferentes dosis de resveratrol se decidió evaluar el efecto de la administración de 50 mg/kg de resveratrol sobre el daño genotóxico inducido por el CrO₃. En la figura 19 se presenta el análisis del NIF de los MN cuando se administraron los tratamientos de resveratrol, CrO₃ y resveratrol-CrO₃. Puede observarse que la administración sola de resveratrol no modificó las frecuencias de MN de manera significativa en ninguna de las horas evaluadas. El tratamiento de CrO₃ mostro un incremento de la frecuencia de MN que resultó significativo al compararlos con su testigo y con el grupo combinado. Por otra parte, cuando se administró el tratamiento resveratrol-CrO₃

se observó que, aunque las frecuencias de MN resultaron estadísticamente significativas para las 48 y 72 horas, hay un porcentaje de disminución con respecto al grupo tratado con CrO₃ en un 78, 59 y 67 % para las 24, 48 y 72 horas, respectivamente.

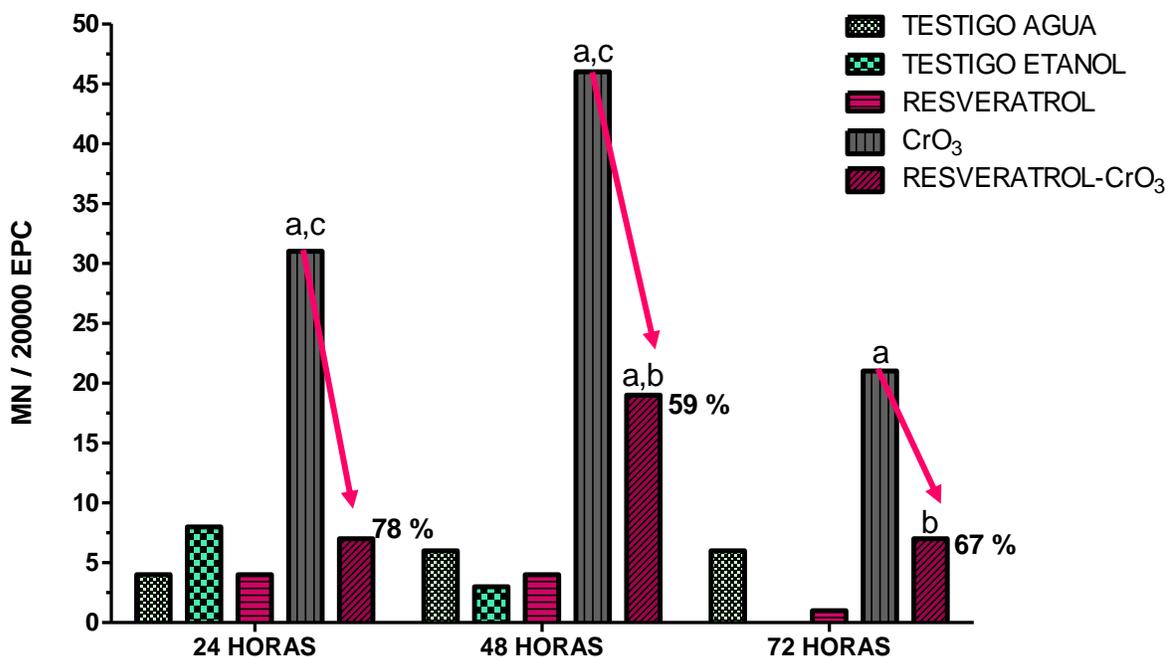


Figura 19. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN, calculado para 20,000 EPC cuando se administró una dosis de 50 mg/kg de resveratrol y 20 mg/kg de CrO₃. $p < 0.05$; ^avs testigo agua; ^bvs testigo etanol; ^cvs resveratrol-CrO₃. Analizados mediante la prueba estadística chi-cuadrada.

7.3.2. 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

Los niveles de 8-OHdG se evaluaron, además de las frecuencias de MN, como un parámetro específico de daño oxidante en el ADN. En la Tabla 1 se muestran los niveles de 8-OHdG evaluados a las 48 horas, en el cual se puede observar que el grupo tratado únicamente con resveratrol presentó un aumento en la concentración de 8-OHdG comparado con lo obtenido en el grupo testigo, sin embargo, este incremento no resultó significativo. Por el contrario, el

grupo tratado con CrO₃ mostró una disminución que resultó estadísticamente significativa al compararlo contra el grupo combinado. Cuando se administró el tratamiento de resveratrol-CrO₃ la concentración de 8-OHdG aumentó con respecto al grupo CrO₃ y con los grupos testigo, sin embargo, no es significativo.

Tabla 1. Promedio de [nM] de 8-OHdG en ratones Hsd:ICR tratados con resveratrol y CrO₃ (media ± d.e.)

TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)	N	[nM] 8-OHdG (media ± d.e.)
TESTIGO AGUA	--	4	24.6 ± 7.8
TESTIGO ETANOL*	--		23.6 ± 5.0
RESVERATROL	50		27.7 ± 5.4
CrO₃	20		13.6 ± 4.1*
RESVERATROL-CrO₃	50 - 20		28.6 ± 7.5

Significancia de $p < 0.05$. *vs resveratrol-CrO₃. Valores comparados mediante ANOVA. *Dilución de testigo-etanol preparada al 30 % (59 mg/kg de etanol).

7.3.3. Apoptosis

En la figura 20 se presentan los resultados obtenidos al realizar el análisis de apoptosis cuando se administró resveratrol, CrO₃ y resveratrol-CrO₃. El tratamiento solo de resveratrol no incrementó el número de células apoptóticas. Por otro lado, hay una elevación significativa en el número de células apoptóticas con la administración de CrO₃. Cuando se administró el tratamiento combinado hubo un incremento en el número de células apoptóticas con respecto al grupo CrO₃, el cual resultó significativo al compararlo contra ambos grupos testigo. Ninguno de los tratamientos presentó efectos significativos sobre las células necróticas.

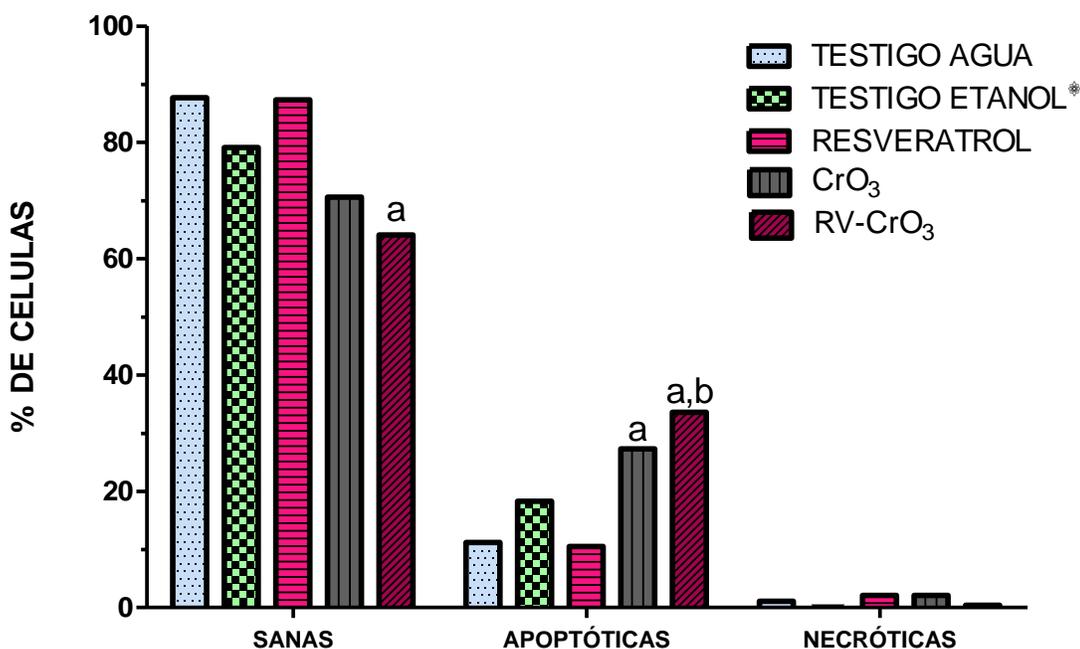


Figura 20. Porcentaje de células sanas, apoptóticas y necróticas, evaluadas en células nucleadas de sangre periférica de ratones tratados con 50 mg/kg de resveratrol. Se evaluaron 300 células por ratón. $p < 0.05$: ^avs testigo-agua; ^bvs testigo-etanol. Analizados mediante la prueba estadística chi-cuadrada. *Dilución de etanol preparada al 30 % (59 mg/kg de etanol).

7.4. Efecto de la Administración de (+)-catequina (20 ó 40 mg/kg) Sobre el Daño Citotóxico Inducido por CrO₃

7.4.1. Relación de Eritrocitos Policromáticos/Eritrocitos Normocromáticos

En los Anexos 8 y 9 se muestran los diagramas de cajas con bigote de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, evaluados de las 0 a las 72 horas de los grupos tratados con (+)-catequina (20 y 40 mg/kg), CrO₃ y la combinación de los tratamientos. Se observó que la administración de sola de 20 ó 40 mg/kg de (+)-catequina no modificó los promedios de EPC de manera significativa (Anexo 8 y 9). El CrO₃ disminuyó significativamente los EPC. Por otro

lado, la administración del tratamiento combinado de (+)-catequina (20 mg/kg) y CrO₃ no modificó los EPC de manera significativa (*Anexo 8*); mientras que la administración de (+)-catequina (40 mg/kg) y CrO₃ disminuyó significativamente los promedios de EPC a las 24 horas (*Anexo 9*) al compararlo contra el grupo testigo. La disminución de los promedios de EPC en los diferentes grupos, con respecto al grupo testigo, puede ser un indicio de citotoxicidad, aunando la muerte de organismos en el grupo combinado (40 mg/kg de (+)-catequina-CrO₃). Para corroborar un posible efecto citotóxico se realizaron evaluaciones de viabilidad celular mediante la técnica descrita por García-Rodríguez *et al.* (2013).

7.4.2. Viabilidad Celular

Los resultados obtenidos de la evaluación de EPC con respecto a los ENC mostraron una alta variabilidad en los datos, por lo cual se realizó la determinación del daño citotóxico mediante la técnica descrita por García-Rodríguez *et al.* (2013), para viabilidad celular. En la figura 21 se puede observar que ninguno de los tratamientos modificó de manera significativa la viabilidad celular.

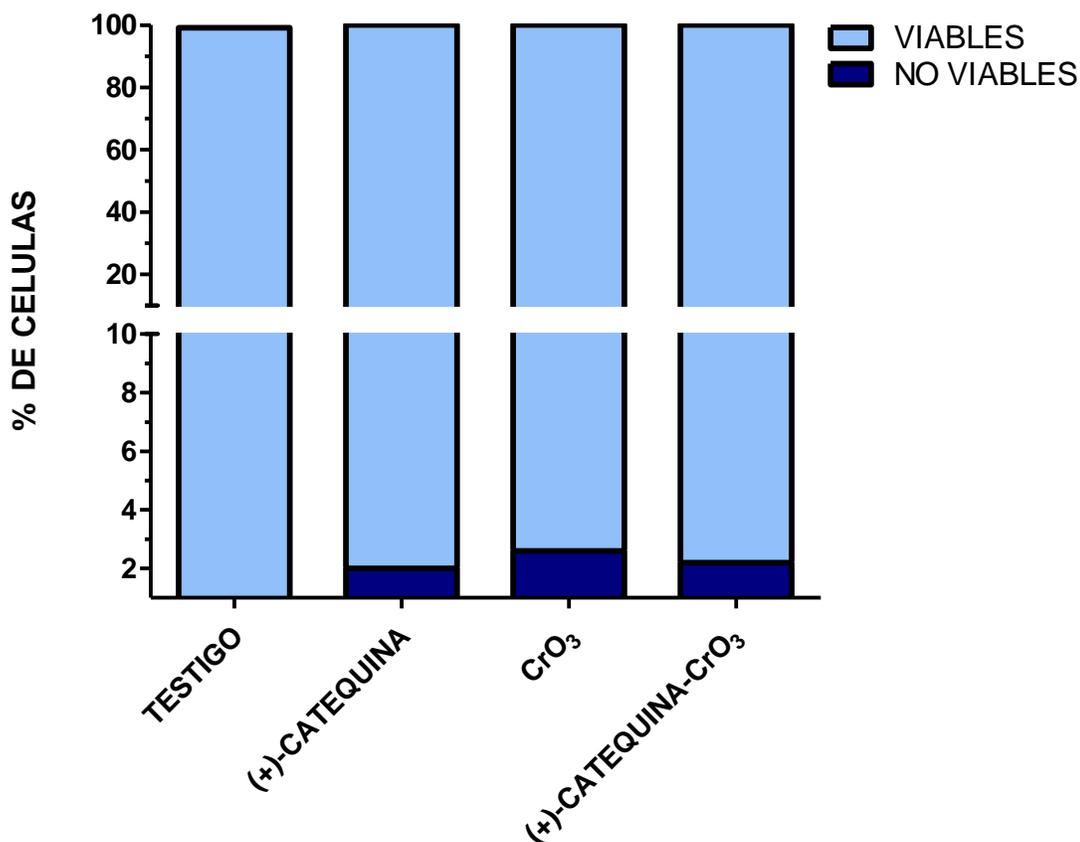


Figura 21. Porcentaje de células viables y no viables, evaluadas en células nucleadas de sangre periférica de ratones tratados con 20 mg/kg de (+)-catequina y CrO₃. Analizados mediante la prueba estadística chi-cuadrada. Se evaluaron 300 células nucleadas por ratón.

En la figura 22 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de los grupos (+)-catequina (40 mg/kg), CrO₃ y (+)-catequina-CrO₃. La administración sola de (+)-catequina no modificó la viabilidad celular. Por su parte el grupo tratado con CrO₃, mostró un decremento de las células viables y un incremento de células no viables, sin embargo, no resultarán significativos. Cuando se realizó la combinación de los tratamientos, se observó una disminución de las células viables y un mayor incremento de las células no viables que lo observado en el grupo CrO₃, sin embargo, no resultaron significativos.

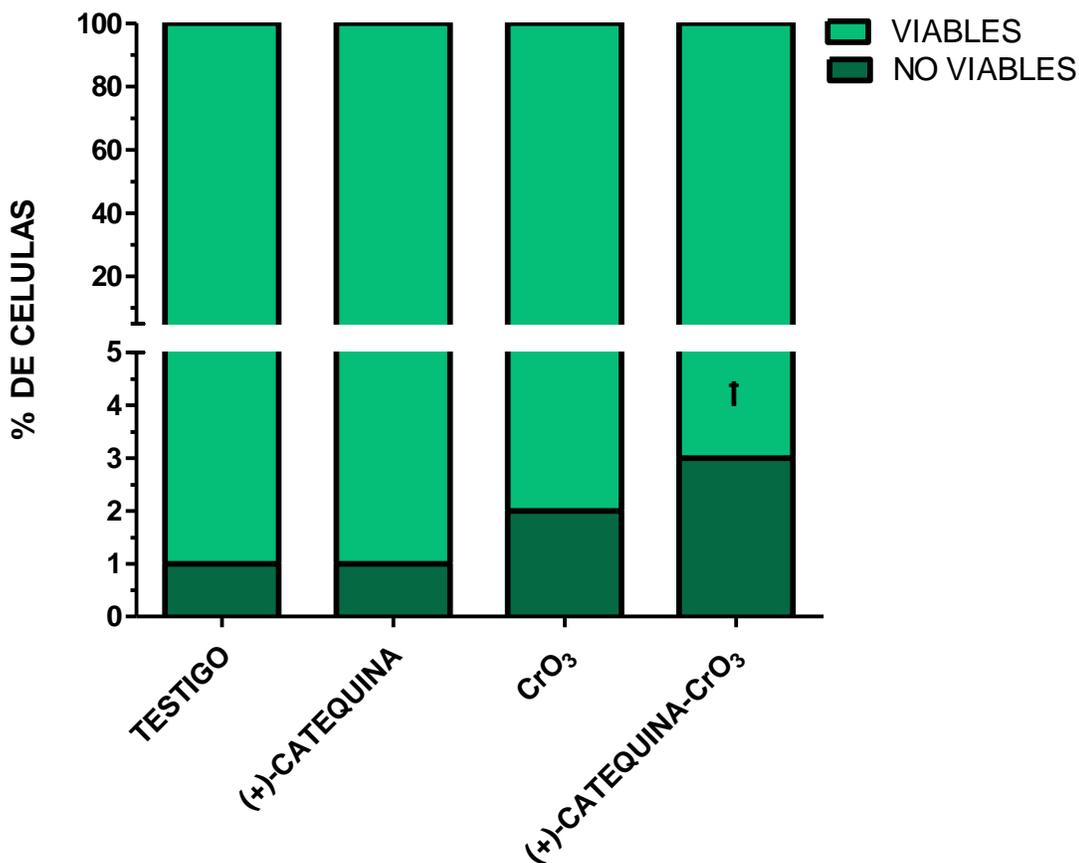


Figura 22. Porcentaje de células viables y no viables, evaluadas en células nucleadas en sangre periférica de ratones tratados con 40 mg/kg de (+)-catequina y CrO₃. Analizados mediante la prueba estadística chi-cuadrada. Se evaluaron 300 células por ratón. ¹muerte de un organismo.

7.5. Efecto de la Administración de 50 mg/kg de Resveratrol Sobre el Daño Citotóxico Inducido por CrO₃

7.5.1. Relación de Eritrocitos Policromáticos/Eritrocitos Normocromáticos

En el Anexo 10 se presentan los diagramas de cajas con bigote de las frecuencias de EPC con respecto a las frecuencias de ENC evaluados de las 0 a las 72 horas en los grupos tratados con resveratrol, CrO₃ y la combinación de los tratamientos. No hubo modificaciones significativas de los promedios de EPC cuando se administró resveratrol o CrO₃. En el grupo combinado se

observó un incremento significativo de las frecuencias de EPC a las 72 horas al compararlo contra el grupo testigo (agua). Para corroborar un posible efecto citotóxico, se realizaron evaluaciones de viabilidad mediante la técnica descrita por García-Rodríguez *et al.* (2013).

7.5.2. Viabilidad Celular

En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos del análisis de la viabilidad celular de los grupos tratados con resveratrol, CrO_3 y resveratrol- CrO_3 . Se observó que la administración de los tratamientos no modificó de manera significativa la viabilidad celular.

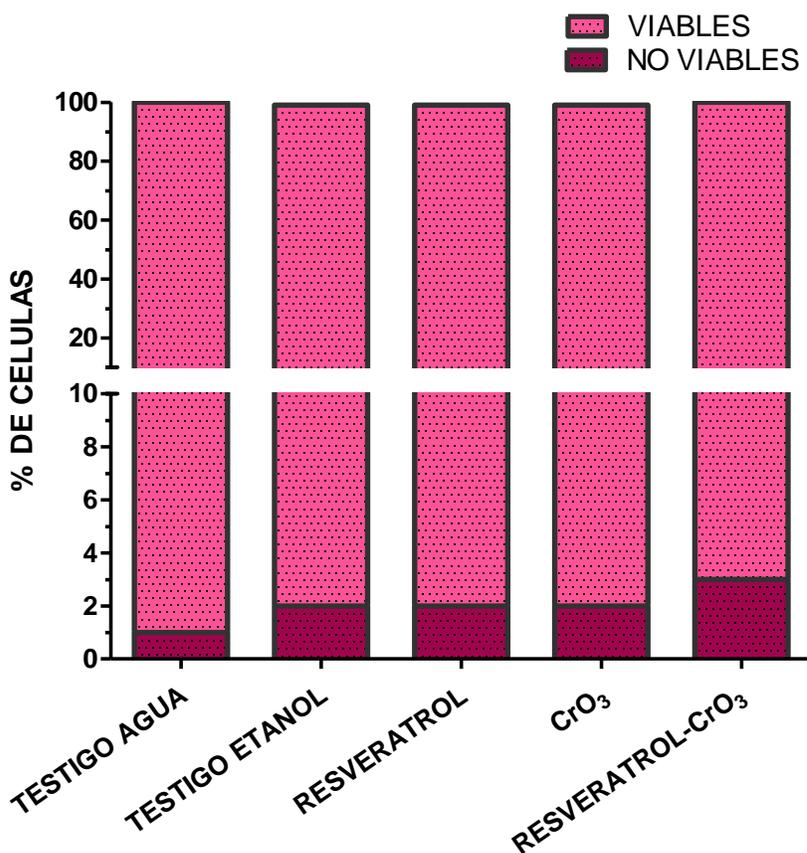


Figura 23. Porcentaje de células viables y no viables, evaluadas en células nucleadas de sangre periférica de ratones tratados con resveratrol y CrO_3 . Analizados mediante la prueba estadística chi-cuadrada. Se evaluaron 300 células nucleadas por ratón. Dilución de etanol preparada al 30 % (59 mg/Kg de etanol).

7.6. Efecto de la Administración de Resveratrol (50 mg/kg) y CrO₃ Sobre el Sistema Antioxidante

7.6.1. Capacidad Antioxidante Total

En la Tabla 2 se muestran las concentraciones de antioxidantes totales evaluadas a las 48 horas después de la administración de los tratamientos, en el cual se observó que, aunque el tratamiento solo de resveratrol incrementó los niveles de antioxidantes totales, éste no resultó significativo. Mientras que en los grupos CrO₃ y combinado no se observaron cambios significativos. Por lo anterior se decidió evaluar el efecto de los tratamientos directamente sobre los dos principales antioxidantes celulares, GSH y SOD.

Tabla 2. Promedio de las concentraciones en plasma de antioxidantes totales en ratones Hsd:ICR tratados con resveratrol y CrO₃ (media ± d.e.)

TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)	N	[mM] ANTIOXIDANTES TOTALES (media ± d.e.)
TESTIGO AGUA	--	4	0.3 ± 0.2
TESTIGO ETANOL*	--		0.4 ± 0.1
RESVERATROL	50		1.3 ± 0.9
CrO₃	20		0.3 ± 0.3
RESVERATROL-CrO₃	50 – 20		0.4 ± 0.2

Valores comparados mediante ANOVA. *Dilución de testigo-etanol preparada al 30 % (59 mg/kg de etanol).

7.6.2. Concentración de Glutación

En la Tabla 3 se muestran las concentraciones de GSH evaluadas a las 48 horas después de la administración de los tratamientos. Se observó que, en el grupo resveratrol, la concentración de GSH disminuyó ligeramente en comparación con el grupo testigo; mientras que en el grupo tratado únicamente con CrO_3 , la concentración de GSH, disminuyó ligeramente en comparación con el grupo testigo. Por otro lado, cuando se realizó la administración de resveratrol- CrO_3 se presentó una disminución de la concentración de GSH que resultó significativa cuando se comparó contra los grupos testigo y con el grupo CrO_3 .

Tabla 3. Promedio de las concentraciones en plasma de GSH en ratones Hsd:ICR tratados con Resveratrol y CrO_3 (media \pm d.e.)

TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)	N	[pmol]GSH (media \pm d.e.)
TESTIGO AGUA	--	4	20.0 \pm 1.8
TESTIGO ETANOL*	--		18.6 \pm 3.8
RESVERATROL	50		16.1 \pm 1.5
CrO_3	20		18.9 \pm 2.0
RESVERATROL-CrO_3	50 – 20		5.7 \pm 1.9 ^{a, b, c}

Significancia de $p < 0.05$; ^avs testigo agua; ^bvs testigo etanol; ^cvs CrO_3 . Valores comparados mediante ANOVA. *Dilución de etanol preparada al 30 % (59 mg/kg de etanol).

7.6.3. Actividad de Superóxido Dismutasa

En la Tabla 4 se presentan los promedios de la actividad de SOD evaluados a las 48 horas después de la administración de los tratamientos. En el grupo tratado solo con resveratrol se presentó un incremento de la actividad de SOD, el cual resultó significativo cuando se comparó contra el grupo testigo (etanol 30 %). Por el contrario, en el grupo CrO₃ se observó una disminución significativa de la actividad de SOD cuando se comparó contra el grupo testigo (agua) y con el grupo combinado. Cuando se administró el tratamiento resveratrol-CrO₃, hubo un incremento de la actividad de SOD en comparación con lo obtenido en el grupo CrO₃, sin embargo, aún resultó ser significativo cuando se comparó contra los grupos testigo.

Tabla 4. Promedio de la actividad en plasma de SOD en ratones Hsd:ICR tratados con Resveratrol y CrO₃ (media ± d.e.)

TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)	N	ACTIVIDAD DE SOD (U/mL) (media ± d.e.)
TESTIGO AGUA	--	4	66.0 ± 8.4
TESTIGO ETANOL*	--		51.5 ± 3.3
RESVERATROL	50		79.2 ± 6.8 ^b
CrO ₃	20		5.7 ± 3.1 ^{a, c}
RESVERATROL-CrO ₃	50 - 20		20.4 ± 1.9 ^{a, b}

Significancia de $p < 0.05$; ^avs testigo agua; ^bvs testigo etanol; ^cvs resveratrol-CrO₃. Valores comparados mediante ANOVA. * Dilución de etanol preparada al 30 % (59 mg/kg de etanol).

**Tabla Comparativa de los Parámetros Evaluados en Ratones Hsd:ICR
Tratados con Resveratrol y CrO₃ (media ± d.e.)**

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	N	8-OHdG [nM] (media ± d.e.)	Antioxidantes Totales [mM] (media ± d.e.)	[pmol]GSH (media ± d.e.)	Actividad de SOD (U/mL) (media ± d.e.)
Testigo-Agua	--	5	24.6 ± 7.8	0.3 ± 0.2	20.0 ± 1.8	66.0 ± 8.4
Testigo-Etanol [*]	--		23.6 ± 5.0	0.4 ± 0.1	18.6 ± 3.8	51.5 ± 3.3
Resveratrol	50		27.7 ± 5.4	1.3 ± 0.9	16.1 ± 1.5	79.2 ± 6.8 ^b
CrO ₃	20		13.6 ± 4.1 ^a	0.3 ± 0.3	18.9 ± 2.0	5.7 ± 3.1 ^{a, c}
Resveratrol-CrO ₃	50 - 20		28.6 ± 7.5	0.4 ± 0.2	5.7 ± 1.9 ^{a, b, c}	20.4 ± 1.9 ^{a, b}

Significancia de $p < 0.05$; ^avs testigo agua; ^bvs testigo etanol; ^cvs resveratrol-CrO₃. Valores comparados mediante ANOVA. ^{*}Dilución de etanol preparada al 30 % (59 mg/kg de etanol).

VIII. DISCUSIÓN

La exposición ocupacional o ambiental a metales es considerado un factor crítico para el desarrollo de muchos tipos de enfermedades (Lee *et al.*, 2012). Entre los metales a los que se está potencialmente expuesto, se encuentran los compuestos de Cr(VI), los cuales han sido reconocidos como genotóxicos y cancerígenos para el ser humano (Myers *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha observado que compuestos polifenólicos como la (+)-catequina y el resveratrol poseen propiedades antioxidantes y se les ha relacionado con la disminución de enfermedades crónico-degenerativas. De ahí que en el presente estudio se evaluó el efecto de (+)-catequina y resveratrol, sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por compuestos de Cr(VI) y su relación con la actividad apoptótica, así como con los niveles de antioxidantes totales, GSH y SOD en ratones de la cepa Hsd:ICR *in vivo*.

Al realizar la administración sola de 20 ó 40 mg/kg de (+)-catequina, como se esperaba, ninguna de las dosis incrementó las frecuencias de MN de manera significativa, al ser un compuesto presente en el té verde, el cual se ha asociado con efectos benéficos para la salud y se le han atribuido propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas (Oikawa *et al.*, 2003; Chengelis *et al.*, 2008). En estudios previos en nuestro laboratorio la administración de té verde a ratones no induce daño genotóxico (García Rodríguez *et al.*, 2012, 2013). Por otra parte, investigaciones *in vitro* han reportado que diferentes dosis utilizadas de (+)-catequina no inducen daño genotóxico al no encontrar fragmentación de ADN (Alshatwi *et al.*, 2014). La administración de (+)-catequina (20 mg/kg) previo al CrO₃ presentó un efecto dual, debido a que se observó una disminución del 70 % de las frecuencias de MN a las 72 horas, sin embargo, a las 48 horas se incrementan ligeramente las frecuencias de MN al compararse con el grupo CrO₃. Las catequinas son componentes fenólicos con una gran variedad de actividades, en diferentes estudios se ha corroborado su gran actividad antioxidante. Sin embargo, se ha observado también, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, que la administración de (+)-catequina, presenta efectos tanto antioxidantes como pro-oxidantes, atribuyendo estos efectos a la dosis administrada, a la actividad sinérgica con el compuesto tóxico, bioabilidad e interacción de este polifenol con

diferentes metales de transición, como el Cu(II) y el hierro (II) y (III) (Fe(II) y Fe(III)) (Lambert *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2013; Tao y Lambert, 2014; Shahid *et al.*, 2016).

En estudios previos se ha mostrado que la (+)-catequina es capaz de catalizar la reducción de Cu(II) a Cu(I) mediante la formación del complejo ternario ADN-(+)-catequina-Cu(II), cuando el ion metálico se encuentra en altas concentraciones, lo cual es acompañado de la producción de productos oxidados de (+)-catequina y el incremento de ERO's. Se ha observado también, que el complejo formado de (+)-catequina-Cu(II) puede causar el rompimiento de cadenas de ADN con la consecuente acción pro-oxidante de este polifenol (Sohail *et al.*, 2005; Kaku y Nakagawa, 2009; Yar *et al.*, 2012). De ahí que se sugiere que el el ligero incremento observado en las frecuencias de MN a las 24 y 48 horas en el grupo (+)-catequina-Cr(VI) pudiera ser por este mismo efecto.

Por otra parte, se obtuvo una disminución de la frecuencia de MN a las 72 horas, esto sugiere un efecto protector de la (+)-catequina a este tiempo. Dicha protección puede deberse a que a esta hora de evaluación la presencia de CrO₃ en el organismo había disminuido, ya que se ha reportado que su tiempo de vida media es de 48 horas y es eliminado mediante la orina y las heces, por lo tanto, la reacción de reducción y la presencia de sus iones metálicos intermediarios es menor. En diversos estudios se ha observado que el efecto dual de algunos polifenoles como la (+)-catequina depende del ciclo redox del metal presente (Ahmad *et al.*, 1992). La reducción de la formación de reactivos intermediarios del CrO₃ pudo favorecer la actividad antioxidante de la (+)-catequina permitiendo la eliminación de RL y con ello la disminución de daño al ADN (Ahmad *et al.*, 1992; Yar *et al.*, 2012). La (+)-catequina además de la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), (-)-epicatequina-3-galato (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina (EC), (+)-galocatequina (GC) conforman aproximadamente el 30 % del peso seco de las hojas de *Camellia sinensis* la cual es la principal planta con la que se elabora el té verde (Dufresne, 2001; Srinivasan *et al.*, 2008; Chandra, 2010). Se ha descrito que esta bebida posee propiedades antioxidantes atribuidas principalmente a la presencia de catequinas. Diversos estudios *in vivo* han indicado que la administración de té verde puede proteger contra el daño genotóxico inducido por compuestos de Cr(VI) (García-Rodríguez *et al.*, 2012; 2013).

Se ha observado que pueden inhibir la formación de tumores inducidos por diversos agentes químicos, así como también la iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis en piel, pulmón, esófago, estómago, hígado, intestino delgado, páncreas, colon y glándulas mamarias. En otras investigaciones *in vivo* se ha indicado que la administración de los polifenoles extraídos del té verde disminuye el daño oxidante al ADN el cual es inducido por compuestos metálicos (Lambert, 2003; García-Rodríguez *et al.*, 2013).

Al realizar la administración de 40 mg/kg de (+)-catequina previo al CrO₃ se presentó un comportamiento similar al grupo tratado solo con CrO₃ en todas las horas evaluadas, por lo que esta dosis de (+)-catequina no protege contra el daño genotóxico inducido por el tratamiento con CrO₃, atribuyendo este resultado a que posiblemente al aumentar la dosis de (+)-catequina pudo haber acentuado la muerte celular y como consecuencia observar menos células con daño al ADN (MN). En estudios *in vitro* se ha observado que al incrementar la dosis administrada de (+)-catequina se intensifica el daño genotóxico al elevarse los niveles de 8-oxodG y de ERO's, en presencia de Cu(II) (Oikawa *et al.*, 2003; Kawanishi *et al.*, 2005). Otros autores han descrito que muchos de los polifenoles consumidos en la dieta, en altas concentraciones, pueden presentar un efecto genotóxico en presencia de metales de transición, debido a que participan en la reducción del ion metálico, generando así, rompimiento de doble cadena del ADN, las cuales, al no ser rápidamente reparadas y ser retenidas por un tiempo más largo, llevan a la muerte de la célula (Bhat y Hadi, 1992; 1994).

Otro de los criterios de evaluación, para determinar el efecto de los tratamientos sobre el material genético, fue la actividad apoptótica. Este tipo de muerte celular es un proceso normal en los organismos, que puede ser activada como un mecanismo para eliminar las células con daño en su material genético y cuando se excede la capacidad de reparación celular, por lo cual al ser una de las respuestas celulares frente al daño al ADN puede ser considerada como un marcador de daño genotóxico (Hayashi *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 2012; García-Rodríguez *et al.*, 2013). Al realizar la administración de 20 ó 40 mg/kg de (+)-catequina se observó que ninguna de las dosis modificó los porcentajes de células sanas y

células apoptóticas. Al relacionar este resultado con las frecuencias de MN, se puede sugerir que la administración sola de (+)-catequina en ambas dosis no induce daño genotóxico, ya que se ha descrito que una de las respuestas al haber daño al ADN es la inducción de apoptosis a través de señales intrínsecas (Chakraborti *et al.*, 2017).

Cuando se administró (+)-catequina (20 mg/kg) previo al CrO₃ se observó que hay una disminución en el número de células apoptóticas comparado con el grupo tratado solo con CrO₃; este resultado puede estar relacionado con la activación de la expresión de genes antiapoptóticos como el Bcl-2 que suprimen la apoptosis a pesar de haber daño en el ADN. En este sentido, se ha reportado que la administración de diferentes dosis de (+)-catequina incrementa la expresión de Bcl-2, en ratones tratados con benzo[a]pireno (Shahid *et al.*, 2016). Al realizar la administración de 40 mg/kg de (+)-catequina previo al tratamiento de CrO₃ se observó, de igual manera, una disminución en el número de células apoptóticas comparado con lo observado en el grupo CrO₃, lo cual puede estar relacionado con el mecanismo anteriormente descrito.

Cuando se evaluó la citotoxicidad con la relación EPC con respecto a los ENC, se observaron variaciones significativas en los promedios de los diferentes grupos. Si bien la OECD (1997) indica que al realizar la prueba de MN se determine también la frecuencia de EPC/ENC, este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (Krishna *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 2000). Para corroborar un posible efecto citotóxico se realizó la evaluación de la viabilidad celular mediante la técnica de NA/Br-Et modificada por García-Rodríguez *et al.* (2013). La administración sola de las dosis de 20 ó 40 mg/kg de (+)-catequina no modificó el porcentaje de células viables, lo que sugiere que estas dosis no inducen daño citotóxico. En estudios previos realizados *in vitro* observaron que el tratamiento con (+)-catequina no disminuye la viabilidad celular (Alshatwi *et al.*, 2014).

Cuando se administró el tratamiento de (+)-catequina (20 mg/kg) previo al CrO₃ no se presentaron modificaciones sobre la viabilidad celular. En el grupo de (+)-catequina (40

mg/kg) previo al CrO₃ hubo una disminución en el porcentaje de células viables comparado con lo obtenido en el grupo CrO₃, con lo que se puede sugerir que, aunque no resultó significativo, se presentó un efecto citotóxico. Estudios previos *in vitro* obtuvieron que la (+)-catequina incrementa la citotoxicidad al interactuar sinérgicamente con iones metálicos y consecuentemente, aumentar el daño al ADN e inducir muerte celular apoptótica o incluso necrosis (Ahmad *et al.*, 1992; Sohail *et al.*, 2006; Yasuda *et al.*, 2012). Otro factor observado como signo de citotoxicidad fue la muerte de un organismo en el grupo combinado (40 mg/kg de (+)-catequina-CrO₃), con lo cual es posible sugerir que el efecto citotóxico se presenta en una manera dosis dependiente, bajo las condiciones experimentales de este trabajo. En estudios *in vivo* en los cuales se administraron diferentes dosis de catequinas por un periodo de 28 días se observó que conforme se incrementaba la dosis aumentaban también los efectos citotóxicos (Chengelis *et al.*, 2008).

Debido a la baja protección del daño genotóxico obtenida con la administración de ambas dosis de (+)-catequina y CrO₃ se decidió evaluar el efecto del resveratrol sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃. Tras realizar evaluaciones de genotoxicidad y citotoxicidad de diferentes dosis de resveratrol (50, 70 y 100 mg/kg) se decidió trabajar con la dosis de 50 mg/kg, debido a que las dosis de 70 y 100 mg/kg presentaron signos de citotoxicidad. Diferentes estudios clínicos indican una tolerancia de hasta 5 g/día de resveratrol, sin embargo, resultados concretos acerca de su toxicidad, aún son escasos (Kuršvietiene *et al.*, 2016).

El tratamiento de resveratrol no modificó las frecuencias de MN, lo que sugiere que la administración de este polifenol no induce daño genotóxico. El resveratrol, en su forma isomérica *trans* es reconocido por tener una gran actividad biológica. Se ha descrito que el estudio de este polifenol comenzó desde las investigaciones relacionadas del consumo de vino tinto y la relación directa entre la baja incidencia de enfermedades coronarias en la población europea, mejor conocido como *paradoja francesa* (Kopp, 1998; Hengst y Yun, 2012; Singh *et al.*, 2013). Asimismo, en nuestro grupo de trabajo se observó que la administración de vino tinto a ratones no induce daño genotóxico (García-Rodríguez *et al.*, 2015).

Esta molécula ha recibido considerable atención debido a sus diversas propiedades como son: anti-inflamatorias, antiapoptóticas, antioxidantes, antidiabéticas, antivirales y cardioprotectoras (Singh *et al.*, 2013). Estudios previos de genotoxicidad han demostrado que el resveratrol presenta efectos anticarcinogénicos asociado principalmente a su actividad antioxidante (Athar *et al.*, 2007). Basso *et al.* (2016), observaron que el tratamiento a linfocitos con 20 y 40 μg de resveratrol no induce daño genético mediante la evaluación de MN, AC y ensayo cometa.

Al realizar la administración de CrO_3 se observó un incremento en las frecuencias de MN, lo cual corrobora el daño genotóxico previamente reportado para los compuestos de Cr(VI) (O'Brien *et al.*, 2003; Henkler *et al.*, 2010) y en particular para el CrO_3 (García-Rodríguez *et al.*, 2001). En este estudio se observó que el mayor efecto sobre la inducción de MN se presentó a las 48 horas, esto se puede atribuir a que en general la mayor distribución y biotransformación de este metal se presenta a esta hora después de su administración (Heddle *et al.*, 1983; Hayashi *et al.*, 1990). El mecanismo de daño genotóxico de los compuestos de Cr(VI), se ha planteado con base en que éstos tienen la capacidad de ingresar a la célula mediante canales transportadores de aniones. Dentro de la célula, el Cr(VI) es reducido por reductantes celulares como el GSH, el ascorbato y el NADPH a Cr(V), Cr(IV) y Cr(III); estos intermediarios son altamente reactivos y participan en la producción de ERO's además de interactuar directamente con las bases nitrogenadas y fosfatos del ADN, ocasionando así un significativo daño oxidante al ADN como modificación de bases; rupturas; entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas; formación de aductos; cambios oxidantes de nucleótidos y AC, lo cual induce daño mutagénico y cancerígeno (Shi *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 1999; Ding y Shi 2002; Wang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012).

El tratamiento previo de resveratrol redujo las frecuencias de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 en un 78, 59 y 67 % a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente, estos resultados se esperaban debido a que en estudios previos se ha observado que la administración de vino tinto a ratones, puede disminuir el daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (García-Rodríguez *et al.*, 2015). El efecto protector obtenido en el presente estudio puede deberse a la estructura del resveratrol, que lo caracteriza como un

compuesto polifenólico similar al dietil-estilbeno, un estrógeno sintético. Se ha descrito que al poseer esta característica puede incrementar la expresión de factores de transcripción del balance redox, nucleares e inflamatorios (Abdel-Wahab y Abdel-Wahab, 2016). En estudios *in vivo* se ha observado que el tratamiento con resveratrol protege contra daños oxidantes inducidos por glutamato mediante la eliminación de RL y la inducción de la expresión de antioxidantes endógenos (Fukui *et al.*, 2010). La propiedad antioxidante del resveratrol ha sido reportada con implicaciones protectoras contra los mecanismos pro-oxidantes de sustancias genotóxicas, así como también de drogas quimioterapéuticas (Sinha *et al.*, 2016). Se ha descrito que el resveratrol posee una acción fisiológica compleja debido a su capacidad de modular diferentes vías celulares (Pirola y Frojdo, 2008; Kuršvietiene *et al.*, 2016). Ahmad *et al.* (2003) observaron que la administración de bajas concentraciones de resveratrol en cultivos celulares inhibe la fragmentación del ADN inducido por H₂O₂. El efecto antioxidante de este compuesto polifenólico se ha obtenido en diversos estudios *in vitro* en donde ha sido capaz de eliminar el [•]OH, O[•], así como otros RL, previniendo así lesiones al ADN (Losa, 2003; Goswami y Das, 2009; Kuršvietiene *et al.*, 2016). Con base en los resultados obtenidos en trabajos previos, se propone que el efecto protector sobre el daño genotóxico, puede deberse a su capacidad de eliminar los RL producidos por la reducción del CrO₃ y a su capacidad de interactuar con el sistema antioxidante endógeno. Las propiedades quimiopreventivas del resveratrol han sido reflejadas por su capacidad para bloquear la activación de varios carcinógenos y/o estimular su eliminación para prevenir el daño oxidante al ADN (Kundu y Surh *et al.*, 2008).

El aducto 8-OHdG es una de las lesiones oxidantes más frecuentes en el ADN, además de que es altamente mutagénico. Sin embargo, la mayoría de estos aductos son eliminados mediante mecanismos de reparación. Después de que el 8-OHdG es reparado, puede ser transportado por la sangre, saliva u orina para su excreción, y es aquí donde puede ser detectado y cuantificado (Cheng *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2004; Hsien-Wen *et al.*, 2007; Chan-Young *et al.*, 2012). Cuando se determinó la concentración de 8-OHdG en plasma sanguíneo se obtuvo un ligero incremento con la administración única de 50 mg/kg de resveratrol que no resultó significativo. En diversos estudios *in vitro* con células senescentes, se ha

observado que el tratamiento con resveratrol incrementa los niveles de 8-OHdG, así como también la actividad de OGG1 (Mikuła-Pietrasik *et al.*, 2012). En otros trabajos se ha mencionado también que el tratamiento con resveratrol en modelos *in vitro* puede incrementar la función de endonucleasas involucradas en los mecanismos de reparación del ADN (Goswami y Das, 2009). Abdel-Wahab y Abdel-Wahab (2016), mostraron que el resveratrol es capaz de inducir el aumento de la función de las maquinarias de reparación del ADN, al activar las vías de señalización de SIRT1. Por su parte, el tratamiento de CrO₃ disminuyó los niveles del 8-OHdG con relación al grupo testigo y al grupo resveratrol-CrO₃, resultando significativo para este último. Se ha propuesto que el Cr(VI) puede inhibir los mecanismos de reparación del ADN. Maeng *et al.* (2003) observaron *in vivo* una disminución en la actividad de enzimas de reparación en ratas expuestas a cromato de sodio (VI). En estudios *in vitro*, se observó que el Cr(VI) reduce la expresión de OGG1 que es una de las enzimas implicadas en la reparación del aducto 8-OHdG (Hodges *et al.*, 2002). La disminución en la concentración de 8-OHdG obtenida con el tratamiento de CrO₃ podría estar relacionado con lo descrito anteriormente. Cuando se administraron ambos tratamientos, resveratrol-CrO₃, se observó una recuperación de los niveles de 8-OHdG al compararse con el grupo CrO₃ e incluso se observa un ligero incremento en comparación con los grupos testigo. Este resultado permite sugerir que el resveratrol es capaz de recuperar la actividad de los mecanismos de reparación inhibidos por el CrO₃.

Al realizar el análisis de apoptosis se observó que la administración sola de resveratrol no aumenta el número de células apoptóticas, con lo cual se corrobora que el resveratrol no induce daño genotóxico, también se sugiere que al no haber células dañadas genéticamente no hay inducción de apoptosis; ya que diversos autores describen que uno de los mecanismos antígenotóxicos del resveratrol es mandar a apoptosis células con daño al ADN (Kundu y Surh, 2008; Athar *et al.*, 2009; Goswami y Das, 2009).

Por otra parte, se presentó un incremento en el número de células apoptóticas cuando se administró CrO₃, este resultado confirma observaciones previas *in vitro* e *in vivo* (Hayashi *et al.*, 2004; García-Rodríguez *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2015). El daño al ADN y la alteración de los estados oxidantes, tiene el potencial para desencadenar o sensibilizar una célula a

apoptosis. Por lo tanto, las ERO's generadas a partir de la reducción del Cr(VI) juegan un papel importante en la vía de señalización de apoptosis (Hayashi *et al.*, 2004; García-Rodríguez *et al.*, 2013). Si bien la apoptosis es un mecanismo relevante para el mantenimiento de una población de células funcionales y sanas, hay un margen de actividad apoptótica que si se rebasa puede conducir a errores que permiten a las células dañadas escapar de la muerte celular y proliferar, lo cual podría ser un factor importante en la carcinogénesis que se ha observado en personas expuestas a cromo (Das *et al.*, 2015).

La administración previa de resveratrol al CrO₃ incrementó el número de células apoptóticas en comparación con el grupo tratado solo con Cr(VI), éste aumento es estadísticamente significativo al compararse con los grupos testigo. Al correlacionar este resultado con la disminución en la frecuencia de MN se puede sugerir que, bajo las condiciones experimentales de este trabajo, la inducción de apoptosis por el tratamiento de resveratrol puede establecerse como uno de sus mecanismos de eliminación de las células con daño en su ADN. Se ha descrito en diversos estudios que el resveratrol es capaz de inducir apoptosis debido a que puede activar ciertas vías pro-apoptóticas. Gao *et al.* (2002) mostraron que el tratamiento de resveratrol en líneas celulares leucémicas presenta actividades pro-apoptóticas. En otro estudio en el cual se utilizó una línea diferente de células leucémicas, las cuales son resistentes a apoptosis mediante la vía de señalización CD95, se observó que el resveratrol fue capaz de inducir apoptosis mediante la activación de la caspasa-9 (Dorrie *et al.*, 2001). También se ha mencionado que el resveratrol es capaz de inhibir la activación de proteínas anti-apoptóticas, iNOS y Bcl-2, en células B leucémicas (Roman *et al.*, 2002). Athar *et al.* (2009) y Mitrut *et al.* (2009), mencionan que el efecto pro-apoptótico del resveratrol está mediado por la regulación de la vía dependiente e independiente de p53. Asimismo, se ha reportado que el resveratrol puede inducir apoptosis mediante la activación de ciertas MAPK en diferentes líneas celulares cancerígenas (Kundu y Surh, 2008).

Como se mencionó anteriormente, se evaluó la citotoxicidad con la relación EPC con respecto a los ENC, con esta evaluación, se observaron variaciones significativas en los promedios de los diferentes grupos administrados. De igual manera se corroboró la

citotoxicidad mediante la evaluación de la viabilidad celular con la técnica de NA/Br-Et modificada por García-Rodríguez *et al.* (2013). La administración sola de resveratrol no modifica la viabilidad celular, lo que se sugiere que no induce daño citotóxico. En estudios *in vitro* se ha observado que el tratamiento con resveratrol no induce citotoxicidad cuando lo administran en concentraciones de 1-100 μM (Zielińska-Przyjemska *et al.*, 2015). En otro trabajo realizado para evaluar derivados de resveratrol obtuvieron un incremento de la viabilidad celular (Mulakayala *et al.*, 2013). Por otra parte, el tratamiento con resveratrol- CrO_3 no modificó el porcentaje de células viables, por lo que no presentó efectos citotóxicos como se ha reportado previamente (Mitrut *et al.*, 2009; Mulakayala *et al.*, 2013; Zielińska-Przyjemska *et al.*, 2015).

No se observaron modificaciones significativas en los niveles de antioxidantes totales presentes en plasma mediante el método del ABTS. Esto puede deberse a que la homeostasis redox se mantiene por un sistema complejo donde el cambio en la concentración de un antioxidante puede ser compensado por otro (Benzie y Strain, 1999; Marim *et al.*, 2015). Sin embargo, al evaluar la concentración de GSH, se observó una ligera disminución con el tratamiento de resveratrol, que puede deberse a un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes, GPx y GST, que utilizan como cofactor al GSH (Kundu y Surh, 2008; Banu *et al.*, 2016). Gow-Chin *et al.* (2002) observaron, en cultivos de linfocitos, que el resveratrol es capaz de incrementar la actividad de enzimas antioxidantes como GPx, GST y GR. En el grupo CrO_3 se observó una concentración similar al grupo testigo (agua), con este resultado se puede sugerir que la reducción de Cr(VI) pudo realizarse mediante la vía NADPH y no por la vía GSH, que previamente se ha reportado. Al combinar los tratamientos se observó una disminución significativa de la concentración de GSH. En diversas investigaciones se ha observado que la administración de resveratrol en líneas celulares disminuye la concentración de GSH (Kumar *et al.*, 2015; Zielińska-Przyjemska *et al.*, 2015). En otros estudios se ha explicado que la disminución de los niveles de GSH con el tratamiento de resveratrol, es debido a la inducción del incremento de la actividad enzimática de GST, la cual utiliza la formación de conjugados xenobiótico-GSH como uno de sus mecanismos cito-protectores (Banu *et al.*, 2016). Se ha observado también que el

resveratrol regula o activa la expresión de GPx, la cual utiliza como sustrato para su función al GSH, al incrementar la actividad de GPx podría explicarse la disminución del sustrato (GSH) (Kundu y Surh, 2008). Un incremento en la actividad de GST y GPx podría explicar también la disminución de la concentración de GSH en el grupo combinado. El GSH participa en la desintoxicación de xenobióticos mediante la actividad enzimática de GST y puede presentar actividades sinérgicas con otros antioxidantes. Banu *et al.* (2016), mostraron que el tratamiento con Cr(VI) disminuye la actividad de diferentes tipos de GST (Gstm1, Gstm2 y Gsta4), las cuales desempeñan una función importante en la desintoxicación celular a través de la formación de conjugados con GSH, mientras que el tratamiento de resveratrol logra mitigar los efectos del Cr(VI).

Al realizar las evaluaciones de la actividad de SOD se observó que la administración sola de resveratrol incrementa significativamente la actividad de esta enzima con respecto al grupo testigo (etanol 30 %). Mikuła-Pietrasik *et al.* (2012), también observaron que el tratamiento con diferentes concentraciones de resveratrol (0.5 y 10 μ M), a células de mesotelio peritoneal, incrementa la actividad de SOD. Por otra parte, se observó que la administración de CrO₃ disminuye significativamente la actividad de SOD. En estudios *in vivo* en donde se analizó la actividad de SOD a trabajadores expuestos a Cr(VI), se observó que la actividad enzimática disminuye significativamente (Wu *et al.*, 2001). Asatiani *et al.* (2004), obtuvieron en cultivos celulares (L-41) que el tratamiento de 20 μ M de Cr(VI) reduce significativamente la actividad de SOD. Al ser la SOD parte del primer y uno de los más importantes mecanismos de defensa antioxidante al catalizar la dismutación del radical O₂[•] en H₂O₂ y O₂, se plantea que la disminución de SOD en el grupo Cr(VI) puede deberse a su agotamiento durante la neutralización del O₂[•], que se genera durante la reducción de Cr(VI). Por otra parte, cuando se administraron los tratamientos combinados, resveratrol-CrO₃, se observó una recuperación de la actividad de SOD. Se ha observado en estudios *in vivo* que la administración de resveratrol en una dosis de 10 mg/kg restaura la actividad de SOD, la cual fue disminuida por la administración de Cr(VI) (Banu *et al.*, 2016). Se ha descrito que uno de los efectos cito-protectores del resveratrol es debido a su capacidad de activar vías de señalización específicas que promueven el sistema de defensa antioxidante endógeno

(Duarte *et al.*, 2010). En este sentido, se ha observado que el resveratrol posee la capacidad de poder mantener y/o restaurar la concentración intracelular de antioxidantes endógenos entre las cuales se encuentra la SOD (de la Lastra y Villegas, 2007; Vipin *et al.*, 2014).

La acumulación excesiva de ERO's puede inducir modificaciones oxidantes a macromoléculas celulares (lípidos, proteínas y Ácidos nucleicos). El daño al ADN ha sido implicado en la mutagénesis, oncogénesis y envejecimiento. Las lesiones al ADN incluyen modificación de bases, daño a la desoxirribosa, rompimiento de hebras y sitios abásicos. Por otro lado, la transcripción de genes puede ser regulada por oxidantes, antioxidantes y otros determinantes del estado redox celular, las ERO's pueden producir también daño a proteínas induciendo otros tipos de mutaciones. En contra parte, el resveratrol es un potente antioxidante y eliminador de RL debido a su habilidad de promover la actividad de una variedad de enzimas antioxidantes. La habilidad de este compuesto polifenólico para actuar como un antioxidante depende de sus propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos, del potencial para la deslocalización de electrones a través de su estructura química, mediante el incremento de enzimas antioxidantes, el cual es considerado como una estrategia fundamental, y mediante su efecto en el sistema redox celular (Kundu y Surh *et al.*, 2008; Goswami y Das, 2009; Vipin *et al.*, 2014). La producción excesiva de ERO's a través de reacciones tanto enzimáticas como no enzimáticas, que contribuye a la actividad carcinogénica y genotóxica del CrO₃, corroborada por el incremento en la frecuencia de MN, la inducción de apoptosis y la disminución de los niveles de 8-OHdG, pudo ser disminuida por la administración previa del resveratrol.

IX. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

- ❖ La administración sola de 20 ó 40 mg/kg de (+)-catequina y 50 mg/kg de resveratrol no inducen daño genotóxico ni citotóxico ya que no incrementan las frecuencias de MN, células apoptóticas ni modifican la viabilidad celular.
- ❖ Se corroboró el daño genotóxico del CrO₃ ya que incrementó las frecuencias de MN y de las células apoptóticas.
- ❖ La administración de 20 mg/kg de (+)-catequina previo al tratamiento con CrO₃ presentó una disminución de la frecuencia de MN a las 72 horas (posible efecto antioxidante), pero a las 48 horas incrementa los MN (posible efecto pro-oxidante).
- ❖ La administración de 50 mg/kg de resveratrol protege contra el daño genotóxico inducido por el CrO₃, ya que se presentó una disminución de las frecuencias de MN.
- ❖ La administración de 50 mg/kg de resveratrol incrementa las células apoptóticas, que podría estar relacionado con la eliminación de las células con daño al ADN (MN).
- ❖ La administración de 20 mg/kg de CrO₃ disminuye los niveles de 8-OHdG en plasma de sangre periférica, lo cual podría estar relacionado con la inactivación de los mecanismos de reparación del ADN.
- ❖ La administración de 50 mg/kg de resveratrol solo y previo al tratamiento de CrO₃ incrementa los niveles de 8-OHdG, lo que sugiere que este polifenol podría reactivar los mecanismos de reparación del ADN.
- ❖ Ninguno de los tratamientos mostró efectos significativos sobre los niveles de antioxidantes totales. El grupo resveratrol y el tratado con resveratrol-CrO₃ presentaron una disminución de los niveles de GSH, posiblemente por el incremento en la actividad de GST y GPx. En el grupo resveratrol-CrO₃ se recuperó la actividad de SOD, la cual se disminuyó en el grupo tratado solo con CrO₃.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Wahab BA, Abdel-Wahab MM. Protective effect of resveratrol against chronic intermittent hypoxia-induced spatial memory deficits, hippocampal oxidative DNA damage and increased p47Phox NADPH oxidase expression in young rats. *Behav Brain Res*. 2016; 305: 65-75.
- Adler ID, Bootman J, Favor J, Hook G, Schriever G, Welzl G, Whorton E, Yoshimura I, Hayashi M. Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat Res*. 1998; 417: 19-30.
- Ahmad A, Syed FA, Sing S, Hadi SM. Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicol Lett*. 2005; 159: 1-12.
- Ahmad KA, Clement MV, Pervaiz S. "Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis". *Ann N.Y. Acad Sci*. 2003; 1010: 365-373.
- Ahmad MS, Fazal F, Rahman A, Hadi SM, Parish JH. Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II): correlation with generation of active oxygen species. *Carcinogenesis*. 1992; 13: 605-8.
- Alarcón de la Lastra C, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Transaction*. 2007; 35: 1156-1160.
- Alimba CG, Dhillon V, Bakare AA, Fenech M. Genotoxicity and cytotoxicity of chromium, copper, manganese and lead, and their mixture in WIL2-NS human B lymphoblastoid cells is enhanced by folate depletion. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016; 799: 35-47.
- Allen RT, Hunter WJ III, Agrawal DK. Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis. *J Pharmacol Toxicol*. 1997; 37: 215-228.
- Alshatwi AA, Hasan TN, Alqahtani AM, Syed NA, Shafi G, Al-Assaf AH, Al-Khalifa AS. Delineating the anti-cytotoxic and anti-genotoxic potentials of catechin hydrate against cadmium toxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014; 38: 653-62.
- Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*. 1983; 224: 1256-1262.
- Andersen PM1, Forsgren L, Binzer M, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keränen ML, Bergmark L, Saarinen A, Haltia T, Tarvainen I, Kinnunen E, Udd B, Marklund SL. Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain*. 1996; 119: 1153-72.
- Angosto MC. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal Real Acad Natl*. 2003; 69: 36-64.
- Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tsurudome Y, Itoh H, Kasai H. Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 243: 678-82.
- Asatiani N, Sapojnikova N, Abuladze M, Kartvelishvili T, Kulikova N, Kiziria E, Namchevadze E, Holman HY. Effects of Cr(VI) long-term and low dose action on mammalian antioxidant enzymes (an in vitro study). *J Inorg Biochem*. 2004; 98: 490-496.
- Athar M, Ho J, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Arch Biochem Biophys*. 2009; 486: 95-102.
- Athar M, Ho J, Tang X, Ho K, Kopelovich L, Bickers DR, et al. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007; 224: 274-83.
- Attia SM. Influence of resveratrol on oxidative damage in genomic DNA and apoptosis

- induced by cisplatin. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2012; 741: 22–31.
- Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. 2006; 494: 161-172.
- Azmi AS, Bhat SH, Hadi SM. Resveratrol-Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: Implications for anticancer properties. *FEBS Letters*. 2005; 579: 3131-3135.
- Bach J, Peremartí J, Annangi B, Marcos R. Reduced cellular DNA repair capacity after environmentally relevant arsenic exposure. Influence of Ogg1 deficiency. *Mutat Res/Fund and Mol Mechan of Mutat*. 2015; 779: 144–51.
- Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassaoun E, Tran MN, Tangs L, Stosh. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate (Chromium VI) and Cadmium Chloride (CadmiumII) to rats. *Free Rad Biol and Med*. 1997; 3: 471-478.
- Banu KS, Stanley JA, Sivakumar KK, Arosh AJ, Burghardt CR. Resveratrol protects the ovary against chromium-toxicity by enhancing endogenous antioxidant enzymes and inhibiting metabolic clearance of estradiol. *Toxicol and Applied Pharmacol*. 2016; 303: 65-78.
- Baskic D, Popovic S, Ristic P, Arsenijevic NN. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int*. 2006; 30: 924-932.
- Basso E, Regazzo G, Fiore M, Palma V, Traversi G, Testa A, Degrassi F, Cozzi R. Resveratrol affects DNA damage induced by ionizing radiation in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016; 806: 40–6.
- Bender, M. Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production. *Basic Life Sci*. 1980; 15: 245-265.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996; 239: 70-76.
- Bhat R, Hadi SM. DNA breakage by tannic acid and Cu(II): sequence specificity of the reaction and involvement of active oxygen species. *Mutat Res*. 1994; 313: 39-48.
- Bhat R, Hadi SM. Photoinduction of strand scissions in DNA by kojic acid: role of transition metal ions and oxygen free radical intermediates in the reaction. *Mutat*. 1992; 7: 119-24.
- Bianchi V, Dal TR, Debetto P, Gino LA, Luciani S, Majone F, Tamino G. Mechanism of Chromium Toxicity in mammalian cell cultures. *Toxicol*. 1980; 17: 219-224.
- Boiteux S, Coste F, Castaing B. Repair of 8-oxo-7, 8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. *Free Rad Biol and Med* 2017; 107: 179-201.
- Boller K, Schmid W. Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon. *Humangenetik*. 1970; 1: 35-54.
- Bravo L, Sources D, Significance N. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998; 56: 317-33.
- Bridges CC, Zalups RK. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 3: 274-308.
- Calderón-Garcidueñas L, Wen-Wang L, Zhang YJ, Rodríguez-Alcaraz A, Osnaya N, Villarreal-Calderón A, Santella RM. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ Health Perspect*. 1999; 107: 469-74.
- Chakraborti S, Chakraborty S, Saha S, Manna A, Banerjee S, Adhikary A, Sarwar S, Hazra TK, Das T, Chakraborti P. PEG-functionalized zinc oxide nanoparticles induce apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen

- species-dependent impairment of DNA damage repair enzyme NEIL2. *Free Radic Biol Med.* 2017; 103: 35-47
- Chandra KA, De N. Goitrogenic/antithyroidal potential of green tea extract in relation to catechin in rats. *Food and Chem Toxicol.* 2010; 48: 2304-2311.
- Chen S, Zhou N, Zhang Z, Li W, Zhu W. Resveratrol induces cell apoptosis in adipocytes via AMPK activation. *Biochem and Biophys Res Communications.* 2015; 457: 608-13.
- Cheng YT, Wu CH, Ho CY, Yen GC. Catechin protects against ketoprofen-induced oxidative damage of the gastric mucosa by up-regulating Nrf2 in vitro and in vivo. *J Nutr Biochem.* 2013; 24: 475-83.
- Chengelis CP, Kirkpatrick JB, Regan KS, Radvosky AE, Beck MJ, Morita O, Tamaki Y, Suzuki H. 28-Day oral (gavage) toxicity studies of green tea catechins prepared for beverages in rats. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 978-89.
- Chengs KC, Cahills DS, Kasais H, Nishimuras S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem.* 1992; 267: 166-172.
- Clifford MN. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.* 2004; 70: 1103-1114.
- Cole J, Skoper T. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogenesis, working paper 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutation Res.* 1994; 304: 33-106.
- Conte C, Mutti I, Puglisi P, Ferrarin A, Regina G, Maestri E, Marmiroli N. DNA fingerprinting analysis by a pcr based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere.* 1998; 37: 2739-2749.
- Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C, Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 618-621.
- Das J, Sarkar A, Sil PC. Hexavalent chromium induces apoptosis in human liver (HepG2) cells via redox imbalance. *Toxicol Reports.* 2015; 2: 600-8.
- De Flora S, Bennicelli C, Camoirano A, Serra D, Romano M, Rossi GA, Morelli A, De Flora A. In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis.* 1985; 6: 1735-1745.
- de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35: 1156-1160.
- De Martinis BS, Bianchi MD. Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. *Pharmacol Res.* 2001; 44: 317-20.
- De Vizcaya Ruiz Andrea MG, Del Razo M L. Daño oxidativo y enfermedades crónico-degenerativas asociadas a la contaminación ambiental. *En Radicales libres y estrés oxidativo, Fainstein Mina Konigsberg. México, Manual Moderno.* 2008; 459-474.
- Demir F, Uzun FG, Durak D, Kalender Y. Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin. *Pestic Biochem Physiol.* 2011; 99: 77-81.
- Deng Z, Zhao M, Liu H, Wang Y, Li D. Molecular cloning, expression profiles and characterization of a glutathione reductase in *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol and Biochem.* 2015; 96: 53-63.
- Díaz SR. Polifenoles. *Radicales libres y estrés oxidativo, de Fainstein Mina Konigsberg. México, Manual Moderno.* 2008; 303-315.
- Ding M, Shi X. Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis. *Mol Cell Biochem.* 2002; 234: 293-300.
- Doo T, Maskarinek G. Polyphenols and Breast Cancer Prevention. A Summary of the Epidemiologic Evidence. *Polyphenols in Human Health and Disease.* 2014; 100: 1331-1340.

- Dorrie J, Gerauer H, Wachter Y, Zunino SJ. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 4731–4739.
- Du G, Sun L, Zhao R, Du L, Song J, Zhang L, et al. Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacol & Therap.* 2016; 162: 23–34.
- Duarte Venturini C, Merlo S, Arigony Souto A, da Cruz Fernandes M, Gomez R, Ramos Rhoden C. Resveratrol and red wine function as antioxidants in the central nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes. *Oxidative Med and Cell Long.* 2010; 3: 434-441
- Dufresne J Christiane, Farnworth R. Edward. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J of Nutritional Biochem.* 2001; 12: 404-421.
- EPA, Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) on Chromium VI. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC. 1998.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Res.* 2004; 567: 1-6.
- Evans MD, Mistry V, Singh R, Gackowski D, Róźalski R, Siomek-Gorecka A, Phillips DH, Zuo J, Mullenders L, Pines A, Nakabeppu Y, Sakumi K, Sekiguchi M, Tsuzuki T, Bignami M, Oliński R, Cooke MS. Nucleotide excision repair of oxidised genomic DNA is not a source of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Free Radic Biol and Med.* 2016; 99: 385-91.
- Fang-Yang W, Fuu-Jen T, Hsien-Wen K, Chang-Hai T, Wu-Yui W, Ruey-Yun W, Jim-Shoung L. Cytogenetic study of workers exposed to chromium compounds. *Mutation Res.* 2000; 464: 289-296.
- Farhan M, Zafar A, Chibber S, Khan HY, Arif H, Hadi SM. Mobilization of copper ions in human peripheral lymphocytes by catechins leading to oxidative DNA breakage: A structure activity study. *Arch Biochem Biophys.* 2015; 580: 31-40.
- FDA, Redbook. IV.C.1.d. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. 2000; pp. 1-6.
- Ferguson L. R, Philpott M, Karunasinghe N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicol.* 2004; 198: 147-59.
- Flora SJS. Metals. R. Gupta (Ed): *Biomarkers in Toxicol Elsevier Inc.* 2014; Chapter 19. 485-519.
- Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radic Res.* 1986; 1: 163-172.
- Forbes-Hernández TY, Giampieri F, Gasparrini M, Mazzoni L, Quiles JL, Alvarez-Suarez JM, Battino M. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 2014; 68: 154-82.
- Foulkes EC. Biological effects of heavy metals. *CRC Press.* 1990; 36-44.
- Gao X, Xu YX, Divine G, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC. Disparate in vitro and in vivo antileukemic effects of resveratrol, a natural polyphenolic compound found in grapes. *J Nutr.* 2002; 132: 2076-2081.
- García-Rodríguez M del C, Carvente-Juárez MM, Altamirano-Lozano MA. 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.* 2013;486419.
- García-Rodríguez M del C, Hernández-Cortés LM, Altamirano-Lozano MA. In Vivo Effects of Vanadium Pentoxide and Antioxidants (Ascorbic Acid and Alpha-Tocopherol) on Apoptotic, Cytotoxic, and Genotoxic Damage in Peripheral Blood of Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 1-11.

- García-Rodríguez M del C, Mateos Nava RA, Altamirano Lozano M. Efecto in vivo del vino tinto sin diluir, diluido (75 %) y sin alcohol sobre el daño genotóxico inducido por metales pesados con potencial cancerígeno: Cromo [VI]. *Nutr Hosp*. 2015; 32: 1645–52.
- García-Rodríguez MC y Altamirano-Lozano M. A. La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón in vivo. *Bioquímica*. 2007; 32: 15-24.
- García-Rodríguez MC, Nicolás-Méndez T, Montañero-Rodríguez AR, Altamirano-Lozano MA. Antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), quercetin, and rutin on chromium trioxide-induced micronuclei in the polychromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *J Toxicol Environ Health A*. 2014; 77:324–36.
- García-Rodríguez MC, Vilches-Larrea RE, Nicolás-Mendez T, Altamirano-Lozano MA. Green tea and its role on chemoprevention in vivo of genotoxic damage induced by carcinogenic metals (chromium [VI])/El té verde en la quimiopreención in vivo del daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (cromo [VI]). *Nutr Hosp*. 2012; 27.
- García-Rodríguez, MC y Altamirano-Lozano, M. Sales de sodio y cobre de la clorofila; usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígena. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas*. 2001; 4: 77-86.
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29: 1106-14.
- Glasauer, A., Chandel, N. S. ROS. *Current Biology*. 2013; 23: 100-102.
- Godic A, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:1-6
- Gokce F, Demir F, Kalender S, Bas H, Kalender Y. Protective effect of catechin and quercetin on chlorpyrifos-induced lung toxicity in male rats. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48: 1714-1720.
- González-Torres M, Betancourt M y Ortiz R. Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*. 2000; 25: 3-9.
- Goswami SK, Das DK. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Lett*. 2009; 284: 1-6.
- Gracia-Nava MA. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. 2006.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*. 1999. 3rd ed.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- Hansberg Torres Wilhelm. El dioxígeno y sus especies reactivas. *En Radicales libres y estrés oxidativo, de Fainstein Mina Konigsberg*. México, Manual Moderno. 2008; 25-46.
- Harikumar, K.B., Aggarwal, B.B. Resveratrol A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell cycle. Landes bioscience*. 2008; 7: 1020-1035.
- Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, Herzer U, Kostelac D, Pelzer A, Schwerdtle T, Burkle A. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ Health Perspect*. 2002; 110: 797–799.
- Hayashi M, Mac Gregor J, Gatehouse D, Adler I, Blaker D, Dertinger S, Krishna G, Morita T, Ruso A, Suto S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatment, integration whit toxicity testing, and automated scoring. *Env Mol Mutagen*. 2000; 35: 234-252
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res*. 1990; 245-249.
- Hayashi Y, Kondo T, Zhao Q-Li, Ogawa R, Cui Zheng-Guo, Loreto B-FJr, Teranishi H, Kasuta M. "Signal transduction of p53-independent

- apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells". *Toxicol and Applied Pharmacol.* 2004; 197: 96–106.
- Heddle AJ, Hite M, Kirkhart MK, Salamone FM. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Ed. Else Science Pub.* 1983; 123: 165-1110.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002; 13: 572-84.
- Hemmink K, Dipple A, Shuker D, Fadlubar F, Segerback D, Bartsch H. Adducts identification and biological significance. International Agency for Research on Cancer Lyons. *IARC Scientific Public.* 1994; 125: 478.
- Hengst JA, Yun JK. Sphingosine kinase: A key to solving the 'French Paradox'? *Br. J. Pharmacol.* 2012; 166: 1603–1604.
- Henkler F, Brinkmann J, Luch A. The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis Induced by Metals and Xenobiotics Cancers. *Cancers (Basel).* 2010; 2: 376-396.
- Hertog MG, Hollman PC, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agricon Food Chem.* 1992; 40: 2379-2383.
- Hodges NJ, Chipman JK. Down-regulation of the DNA-repair endonuclease 8-oxo-guanine NA glycosylase 1 (hOGG1) by sodium dichromate in cultured human A549 lung carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 55-60.
- Hollstein M, Shomer B, Greenblat M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24: 141-146.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancer. *Science.* 1991; 253: 49–53.
- Huang X, Chen S, Xu L, Liu Y, Deb DK, Plataniias LC, Bergan RC. Genistein inhibits p38 map kinase activation, matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 3470-3478.
- Jang M, Cai L, Udeani GO. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 1997; 275: 218–220.
- Ježek P, Hlavatá L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 2478-2503.
- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol.* 2011; 283: 65-87.
- Jones D. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2006; 8: 1865-1879.
- Kaku M, Nakagawa K. (+)-Catechin with Cu²⁺ Induces Protein Modifications via Reactive Oxygen Species-independent Pathway. *J of Health Science.* 2009; 55: 441-446.
- Kanvah S, Schuster GB. Oxidative damage to DNA: Inhibition of guanine damage. *Pure Appl Chem.* 2006; 78: 2297-2304.
- Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *Inter J of Food Science and technology.* 2001; 36: 703-725.
- Kawanishi S, Oikawa S, Murata M. Evaluation for safety of antioxidant chemopreventive agents. *Antiox Redox Signal.* 2005; 7: 1728-1739.
- Khan HY, Zubair H, Ullah MF, Ahmad A, Hadi SM. A Prooxidant Mechanism for the Anticancer and Chemopreventive Properties of Plant Polyphenols. *Curr Drug Targets.* 2012; 13: 1738–1749.
- Kimira M, Arai Y, Shimoi K, Watanabe S. Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J Epidemiol.* 1998; 8: 168-175.
- Klauning J, Kamendulis L. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 239-267.
- Kondo K, Kurihara M, Fukuhara K. Mechanism of antioxidant effect of catechins. *Methods Enzymol.* 2001; 335: 203-217.
- Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the French paradox? *Eur J Endocrinol.* 1998; 138: 619-620.

- Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 2000; 455: 155-166.
- Krishna G, Nath J, Ong T. Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C Inhibition. *Cancer Res.* 1986; 46: 2670-2674.
- Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976; 24: 117-191.
- Kumar B, Iqbal MA, Singh RK, Bamezai RNK. Biochimie Resveratrol inhibits TIGAR to promote ROS induced apoptosis and autophagy. *Biochimie.* 2015; 118: 26-35.
- Kundu JK, Surh YJ. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett.* 2008; 269: 243-261.
- Kuo H, Chou S, Hu T, Wu F, Chen D. Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutat Res.* 2007; 631: 62-68.
- Kuršvietienė L, Stanevičienė I, Mongirdienė A, Bernatoniene J. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Kaunas).* 2016; 52: 148-155.
- Lambert JD, Sang S, Yang CS. Possible Controversy over Dietary Polyphenols: Benefits vs Risks. *Chem Res Toxicol.* 2007; 20: 583-585.
- Lambert JD, Yang CS. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutation Res.* 2003; 523-524: 201-208.
- Lee J, Son Y, Pratheeshkumar P, Shi X. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Biol and Med.* 2012; 53: 742-757.
- Lee Jin-Ku, Ko Seong-Hee, Ye Sang-Kyu, Chung Myung-Hee. 8-Oxo-20-deoxyguanosine ameliorates UVB-induced skin damage in hairless mice by scavenging reactive oxygen species and inhibiting MMP expression. *J of Dermatol Science.* 2013; 70: 49-57.
- Lee MJ, Wang ZY, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S, Balentine DA, Yang CS. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1995; 4: 393-399.
- Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 309: 1017-1026.
- Liang W, He L, Ning P, Lin J, Li H, Lin Z, Kang K, Zhang Y (+)-Catechin inhibition of transmissible gastroenteritis coronavirus in swine testicular cells is involved its antioxidation. *Res Vet Sci.* 2015; 103: 28-33.
- Liochev SI, Fridovich I. Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life.* 1999; 48: 157-161.
- Liu S, Dixon K. induction of mutagenic DNA by chromium (VI) and Glutathione. *Envir and Mol Mut.* 1969; 28: 71-79.
- Liu Y, Wang P, Chen F, Yuan Y, Zhu Y, Hu X. Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. *Food Chem.* 2015; 186: 46-53.
- López-alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta.* 2013; 763: 1-10.
- Losa GA. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33: 818-823.
- Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014; 224: 164-175.
- Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids.* 2012; 2012: 1-26.
- Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids.* 2012; 2012: 1-26.
- Maeng SH, Chung HW, Yu IJ, Kim HY, Lim CH, Kim KJ, Kim SJ, Ootsuyama Y, Kasai H. Changes of 8-OH-dG levels in DNA and its base excision repair activity in rat lungs after inhalation exposure to hexavalent chromium. *Mutat Res*

- *Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2003; 539: 109-116.
- Małgorzata Zielinska-Przyjemska, Ewa Ignatowicz, Violetta Krajka-Kuzniak, Wanda Baer-Dubowska. Effect of tannic acid, resveratrol and its derivatives, on oxidative damage and apoptosis in human neutrophils. *Food and Chem Toxicol*. 2015; 84: 37-46.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79: 727-747.
- Marim RG, de Gusmão AS, Castanho RE, Deminice R, Therezo AL, Jordão Júnior AA, de Assis MR, Taipeiro Ede F, Martins LP. Effects of vitamin c supplementation on the chronic phase of chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015; 57: 245-250.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón JM. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 2002; 6: 271-278.
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. *A report of the U. S. Environ Protec Agency Gene-Tox Program. Mutation Res*. 1990; 239: 29-80.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 244: 6049-6055.
- McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in vitro. *Methods in Cell Biology*. 1995; 46: 153-185.
- Medeiros GHM. Daño al DNA. *En Radicales libres y estrés oxidativo, de Fainstein Mina Konigsberg. México, Manual Moderno*. 2008; 119-134.
- Mertz W. Chromium Occurrence and Function in Biological Systems. *Physiological. Reviews*. 1969; 49: 163-239.
- Mikuła-Pietrasik J, Kuczmarzka A, Rubiś B, Filas V, Murias M, Zieliński P, Piwocka K, Książek K. Resveratrol delays replicative senescence of human mesothelial cells via mobilization of antioxidative and DNA repair mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52: 2234-2245.
- Mitruț P, Burada F, Enescu A, Scorei R, Badea D, Genunche-Dumitrescu A, Rogoz I, Manea M. The genotoxicity study of resveratrol in primary gastric adenocarcinoma cell cultures. *Rom J Morphol Embryol*. 2009; 50: 429-433.
- Molina QDMA. Contenido de compuestos fitoquímicos y su relación con la capacidad antioxidante de extractos de pimientos (*Capsicum annum L.*) cultivados en el noroeste de México. Tesis de maestría. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. 2009
- Monteith DK. Catechin inhibition of mutagenesis and alteration of DNA binding of 2-acetylaminofluorene in rat hepatocytes. *Mutat Res*. 1990; 240: 151-8.
- Mulakayala C, Babajan B, Madhusudana P, Anuradha CM, Rao RM, Nune RP, Manna SK, Mulakayala N, Kumar CS. Synthesis and evaluation of resveratrol derivatives as new chemical entities for cancer. *J Mol Graph Model*. 2013; 41: 43-54.
- Müller L, Kikuchi Y, Probst GSL, Shimada H, Sofuni T, Tweats D. ICH Harmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasons and impact. *Mutation Res*. 1999; 436: 195-225.
- Myers CR, Antholine WE, Myers JM. The prooxidant chromium (VI) inhibits mitochondrial complex I, complex II, and aconitase in the bronchial epithelium: EPR markers for Fe-S proteins. *Free Radical Biology & Medicine*. 2010; 49: 1903-1915.
- Nakata R, Takahashi S, Inoue H. Recent Advances in the Study on Resveratrol. *Biol Pharm Bull*. 2012; 35: 273-279.
- Navarro-Aviño J, Aguilar I, López-Moya J. Aspectos bioquímicos y genéticos de la acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*. 2007; 16: 10-25
- Nickel A, Kohlhaas M, Maack C. Mitochondrial reactive oxygen species production and

- elimination. *J Molecular and Cellular Cardiology*. 2014; 73: 26-33.
- Norbury CJ, Hickson ID. Cellular Responses to DNA Damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41: 367-401.
- Norseth T. The carcinogenicity of Chromium *Br J Ind Med*. 1986; 43: 649-651.
- O'Brien TJ, Fornisaglio JL, Ceryak S, Patierno SR. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Res*. 2003; 533: 3-36.
- Ock CY, Hong KS, Choi KS, Chung MH, Kim Ys, Kim JH, Hahm KB. A novel approach for stress-induced gastritis based on paradoxical anti-oxidative and anti-inflammatory action of exogenous 8-hydroxydeoxyguanosine. *Biochem Pharmacol*. 2011; 81: 111-122.
- Ock CY, Kim EH, Choi DJ, Lee HJ, Hahm KB, Chung MH. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol*. 2012; 18: 302-308.
- OECD, Guideline for Testing of Chemicals. No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 1997.
- Oikawa S, Furukawaa A, Asada H, Hirakawa K, and Kawanishi S. Catechins induce oxidative damage to cellular and isolated DNA through the generation of reactive oxygen species. *Free Radic Res*. 2003; 37: 881-890.
- Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K, Jaruga P. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, arteriosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radicals Biol*. 2002; 33: 192-200.
- Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan MB. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr*. 2003; 133: 1806-1814.
- Olthof MR, Hollman PC, Vree TB, Katan MB. Bioavailabilities of quercetin-3 glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr*. 2000; 130: 1200-1203.
- Page MM, Robb EL, Salway KD, Stuart JA. Mitochondrial redox metabolism: Aging, longevity and dietary effects. *Mech Ageing Dev*. 2010; 131: 242-252.
- Pedras MSC, Ahiahonu PWK. Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogues by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry*. 2005; 66: 391-411.
- Pilger A, Rüdiger W. 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Environ Health*. 2006; 80: 1-15.
- Pineda Alonso Daymy, Salucci Mónica, Lázaro Regina, Maiani Giuseppe, Ferro-Luzzi Ana. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev Cubana Alimentación Nutrición*. 1999; 2: 104-111.
- Pirola L, Fröjdö S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life*. 2008; 60: 323-332.
- Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett*. 1999; 447: 287-291.
- Pisoschi AM, Pop A. European Journal of Medicinal Chemistry The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress. *Eur J Med Chem*. 2015; 97: 55-74.
- Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 1-11.
- Prabhulkar S, Li CZ. Assessment of oxidative DNA damage and repair at single cellular level via real-time monitoring of 8-OHdG biomarker. *Biosens Bioelectron*. 2010; 26: 1743-1749.
- Ramírez AME, Rojas LM. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Latreia*. 2010; 23: 166-177.
- Ramos Ibarra ML, Batista González CM, Gómez Meda BC, Zamora Pérez AN. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en salud*. 2006; 001: 7-15.

- Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52: 507-526.
- Ramos-León Javier. Efecto de los flavonoides de *Camellia sinensis* (miricetina, quercetina y rutina) sobre la inducción de micronúcleos y apoptosis en ratones tratados con trióxido de cromo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 2015
- Rijken Philip J, Wiseman Sheila A, Weisgerber Ute M, van Mierlo CAJ, Quinlan Paul T, van de Put F. Antioxidant and Other Properties of Green and Black Tea. *Handbook of antioxidants*. Second Edition, Revised and Expanded. *Taylor & Francis Group, LLC*. 2002; p29.
- Rizzo AM, Berselli P, Zava S, Montorfano G, Negroni M, Corsetto P, Berra B. Endogenous antioxidants and radical scavengers. *B Adv Exp Med Biol*. 2010; 698: 52-67.
- Robert JW, Jeremy PE Spencer, Catherine Rice-Evans. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Rad Biol & Med*. 2004; 36: 838-849.
- Roleira FMF, Tavares-da-silva EJ, Varela CL, Costa SC, Silva T, Garrido J, Borges F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chem*. 2015; 183: 235-258.
- Roman V, Billard C, Kern C, Ferry-Dumazet H, Izard JC, Mohammad R, Mossalayi DM, Kolb JP. Analysis of resveratrol-induced apoptosis in human B-cell chronic leukaemia. *Br. J Haematol*. 2002; 117: 842-851.
- Samanta A, Chanda S, Bandyopadhyay B, Das N. Establishment of drug delivery system nanocapsulated with an antioxidant (+)-catechin hydrate and sodium meta borate chelator against sodium fluoride induced oxidative stress in rats. *J Trace Elem Med Biol*. 2016; 33: 54-67.
- Schmid W, Ledebur MV. The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Res*. 1973; 19: 109-117.
- Sertan CU, Virit O, Hanifi KM, Orkmez M, Bulbul F, Binnur EA, Semiz M, Alpak G, Unal A, Ari M, Savas HA. Increased oxidative stress and oxidative DNA damage in non-remission schizophrenia patients. *Psychiatry Res*. 2015; 229: 200-205.
- Sgambato A, Ardito R, Faraglia B, Boninsegna A, Wolf FI, Cittadini A. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat Res*. 2001; 496: 171-180.
- Shahid A, Ali R, Ali N, Hasan SK, Bernwal P, Afzal SM, et al. Modulatory effects of catechin hydrate against genotoxicity, oxidative stress, in inflammation and apoptosis induced by benzo(a)pyrene in mice. *Food Chem Toxicol*. 2016; 92: 64-74.
- Shi XL, Dalal NS. One-electron reduction of chromate by NADPH dependent glutathione reductase. *J Inorg Biochem*. 1990; 40:1-12.
- Shi XL, Dalal NS. The role of superoxide radical in the chromium (VI)-generated hydroxyl radical: The Cr(VI) Haber-Weiss cycle. *Biochem and Biophysics*. 1992; 292: 323-327.
- Shi XL. Reduction of Chromium (VI) and its Relationship to Carcinogenesis. *J Toxicol and Environ Health, Part B: Critical Reviews*. 1999; 2: 87-104.
- Si H, Liu D. Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. *J Nutr Biochem*. 2014; 25: 581-591.
- Singh S, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Kumar D, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol Biochem*. 2013; 70: 204-12.
- Sinha D, Sarkar N, Biswas J, Bishayee A. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Seminars in Cancer Biology*. 2016; 41: 209-232.
- Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular in inflammation in cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol*. 2015; 71: 40-56.
- Skulachev VP. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-

- related brain diseases. *J Alzheimers Dis.* 2012; 28: 283-289.
- Soleas GJ, Yan J, Goldberg DM. Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection. *J of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 2001; 757: 161-172.
- Srinivasan P, Suchalatha S, Babu PVA, Devi RS, Narayan SSKE, Devi CSS. Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 2008; 172: 224-234.
- Srinivasan VS. Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. *J Nutr.* 2001; 131: 1349S-1350S.
- Surh YJ, Ferguson LR. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential-highlights of a symposium. *Mutat Res.* 2003; 523-524: 1-8.
- T MS, Morand C, Manach C, Scalbert A, Remesy C. Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism. *Life Sci.* 2005 ;77: 3156-3167.
- Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci.* 2012; 125: 807-815.
- Talhaoui I, Matkarimov BT, Tchenio T, Zharkov DO. Aberrant base excision repair pathway of oxidatively damaged DNA: Implications for degenerative diseases. *Free Radic Biol & Med.* 2016; 107: 266-277.
- Tamino G, Peretta L, Levis AG. Effects of trivalent and hexavalent chromium on the physicochemicals properties of mammalian cell nucleic acids and synthetic polynucleotides. *Chem Biol interactions.* 1981; 37: 309-319.
- Tao L, Lambert JD. Antioxidant and Pro-Oxidant Activities of Green Tea Polyphenols in Cancer Prevention. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 20: 1191-1198.
- Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK. Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. *Curr Sci.* 2001; 80: 1387-1396.
- Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Silva Vaz MF, Silveira TR, Marroni CA, Marroni NP, Henriques JA, Picada JN. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chem Toxicol.* 2007; 45: 1140-1146.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552: 335-344.
- Udenigwe CC, Ramprasath VR, Aluko RE, Jones PJH. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutr Rev.* 2008; 66: 445-454.
- Uzun Gokce Fatma, Demir Filiz, Kalender Suna, Bas Hatice, Kalender Yusuf. Protective effect of catechin and quercetin on chlorpyrifos-induced lung toxicity in male rats. *Food and Chem Toxicol.* 2010; 48: 1714-1720.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J Environ Sci Heal Part C.* 2009; 27: 120-39.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 1161-1208.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160: 1-40.
- Vega GS, Reynaga O. Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. *Ed. Limusa. México, D. F.* 1990; p727.
- Venturini CD, Merlo S, Souto AA, Fernandes M da C, Gomez R, Rhoden CR. Resveratrol and red

- wine function as antioxidants in the nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010; 3: 434-441.
- Vipin Arora, Anand Kamal Sachdeva, Prathistha Singh, Ankita Baveja, Kanwaljit Chopra, Anurag Kuhad. Resveratrol and Lycopene in the Diet and Cancer Prevention. *Antioxidants and Cancer*. Elsevier Inc. 2014. Chapter 12.
- Wachtel-Galor S, Siu PM, Benzie IFF. Antioxidants, Vegetarian Diets and Aging. *Aging Oxidative Stress Diet Antioxidants*. Elsevier Inc. All rights reserved. 2014; 81-91.
- Wang J, Schipper HM, Velly AM, Mohit S, Gornitsky M. Salivary biomarkers of oxidative stress: A critical review. *Toxicol Sci*. 2015; 85: 95-104.
- Wang X, Son YO, Chang Q, Sun L, Hitron JA, Budhraj A, Zhang Z, Ke Z, Chen F, Luo J, Shi X. NADPH oxidase activation is required in reactive oxygen species generation and cell transformation induced by hexavalent chromium. *Toxicol Sci*. 2011; 123: 399-410.
- White E. Life, death and pursuit of apoptosis. *Genes and Development*. 1996; 10: 1-5.
- Wise SS, Pierce J, Sr W. Mechanisms of Mutagenesis Chromium and genomic stability. *Mutat Res/Fundam and Mol*. 2012; 733: 78-82.
- Wu F, Sun H, Kluz T, Hailey AC, Kiok K, Costa M. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity in vitro. *Toxicol and Applied Pharmacol*. 2012; 258: 166-175.
- Wu F, Wu W, Kuo H, Liu C. Effect of genotoxic exposure to chromium among electroplating workers in Taiwan. *Sci Total Environ*. 2001; 279: 21-28.
- Wu Fang-Yang, Tsai Fuu-Jen, Kuo Hsien-Wen, Tsai Chang-Hai, Wu Wu-Yui, Wang Ruey-Yun, Lai Jim-Shoung. Cytogenetic study of workers exposed to chromium compounds. *Mutation Res*. 2000; 464: 289-296.
- Wu LL, Chiou C, Chang P, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*. 2004;339: 1-9.
- Wu Y, Yang X, Zhang B, Guo L. An electrochemiluminescence biosensor for 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine quantification and DNA repair enzyme activity analysis using a novel bifunctional probe. *Biosensors & Bioelectronics*. 2015; 69: 235-240.
- Yasuda M, Matsuda C, Ohshiro A, Inouye K, Tabata M. Effects of metal ions (Cu²⁺, Fe²⁺ and Fe³⁺) on HPLC analysis of catechins. *Food Chamestry*. 2012; 133: 518-525.
- Ye Z, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015; 1850: 1607-1621.
- Yen GC, Duh PD, Lin CW. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Res*. 2003; 37: 509-514.

XI. ANEXOS

ANEXO 1

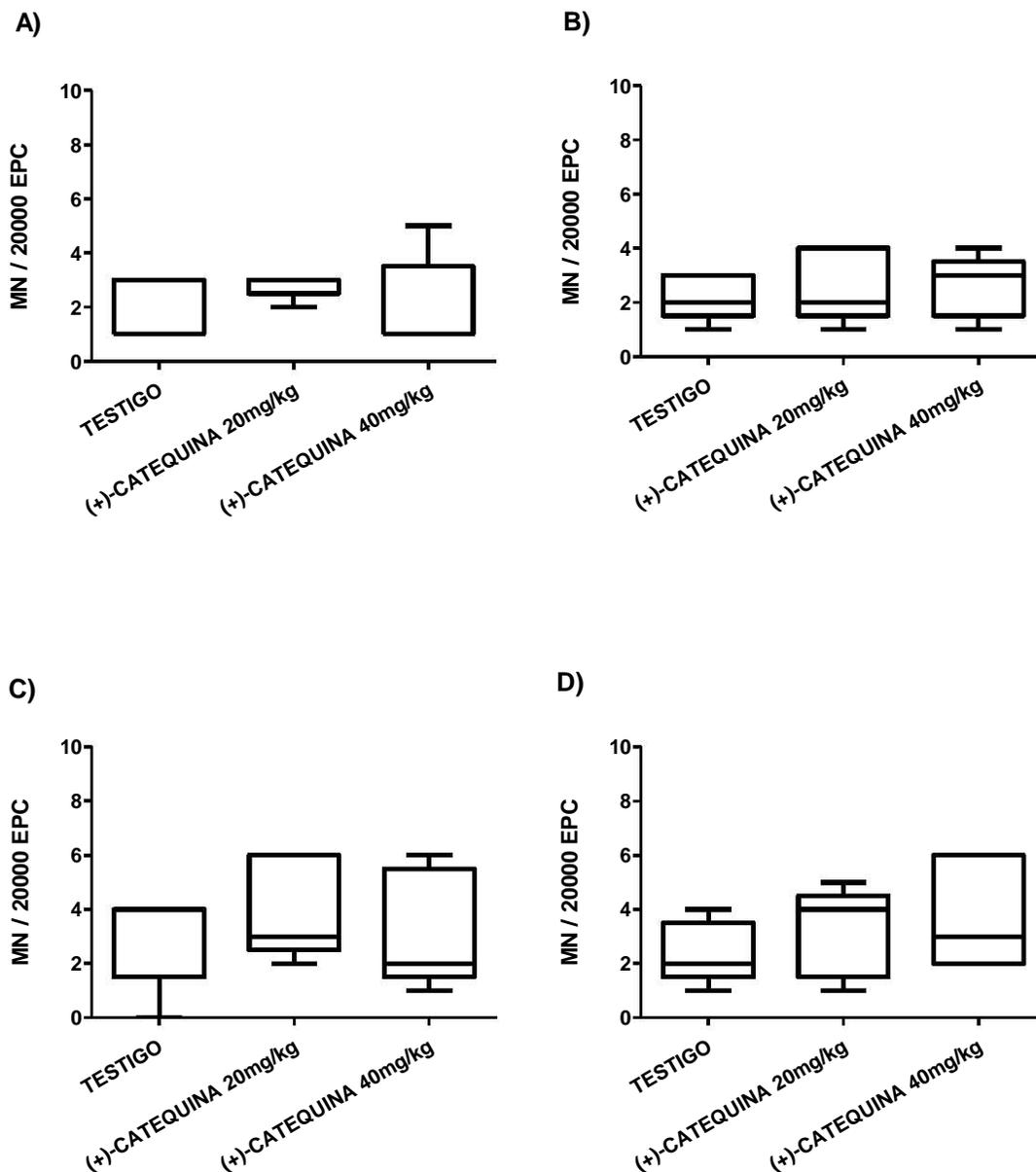
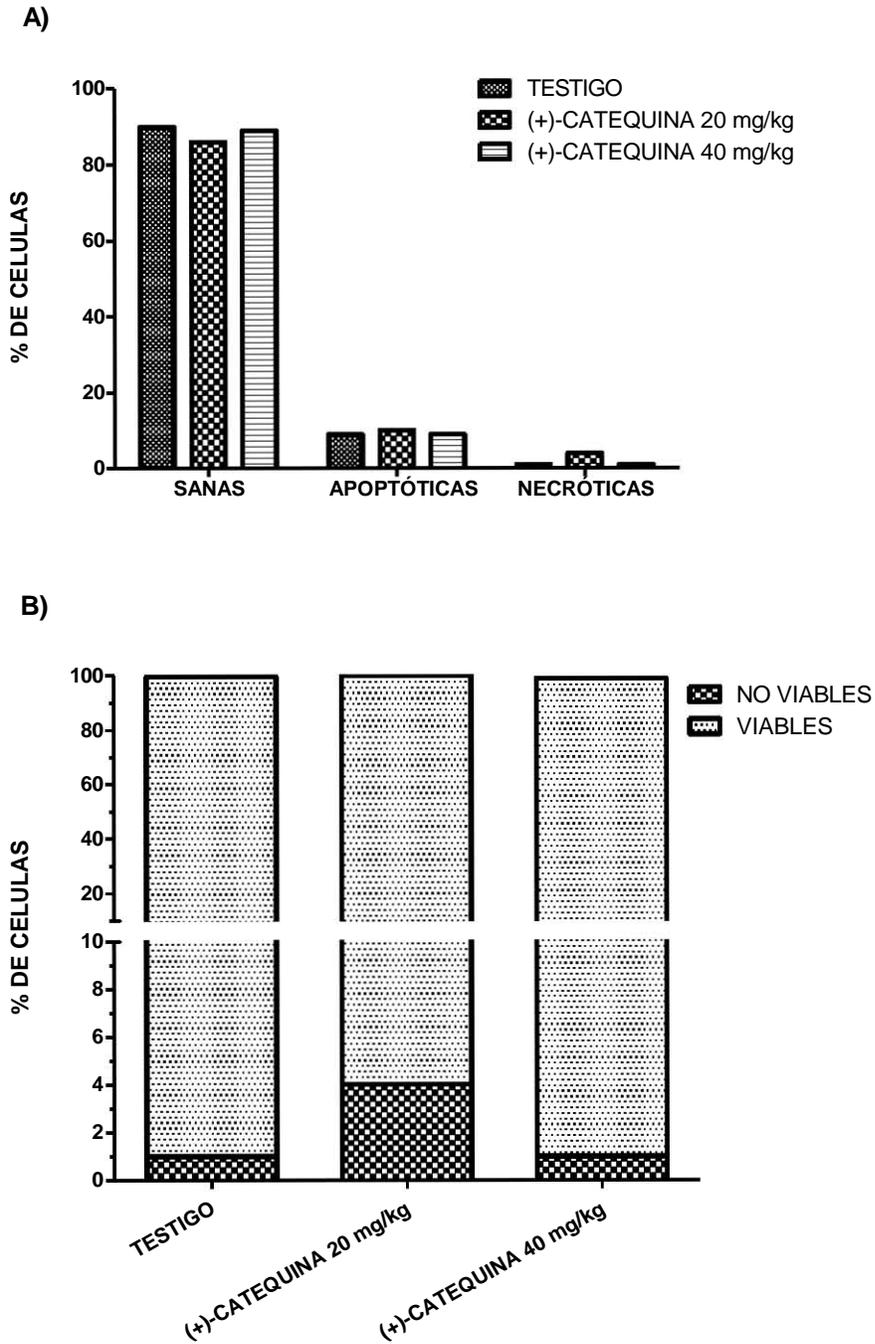


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de MN evaluados en 20,000 EPC cuando se administraron 20 ó 40 mg/kg de (+)-catequina. A) distribución de MN a las 0 horas; B) distribución de MN a las 24 horas; C) distribución de MN a las 48 horas; D) distribución de MN a las 72 horas.

ANEXO 2



Porcentaje de células sanas, apoptóticas y necróticas (A). Porcentaje de células viables y no viables (B). Se evaluaron 300 células nucleadas de sangre periférica de ratones tratados con 20 ó 40 mg/kg de (+)-catequina.

ANEXO 3

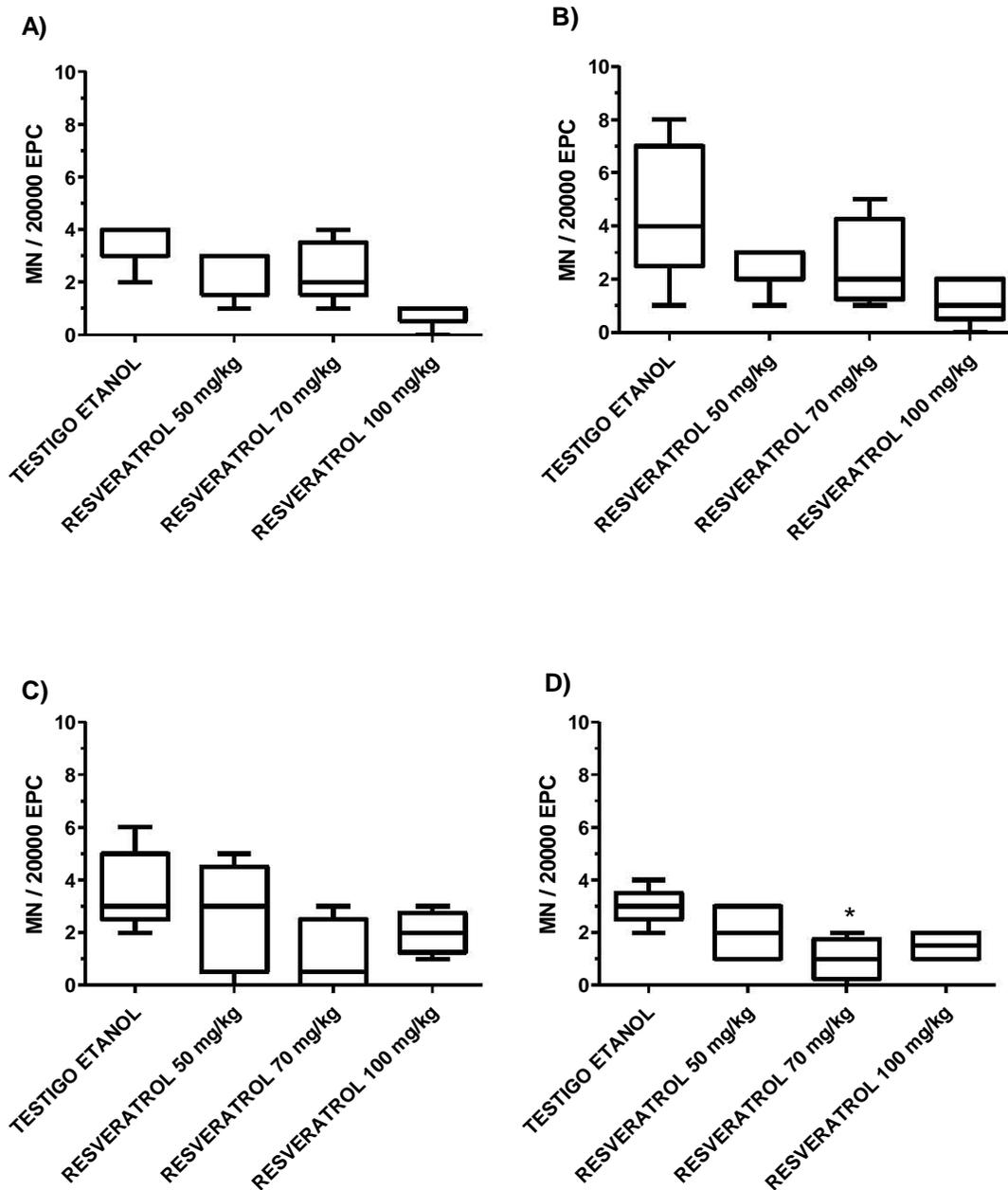
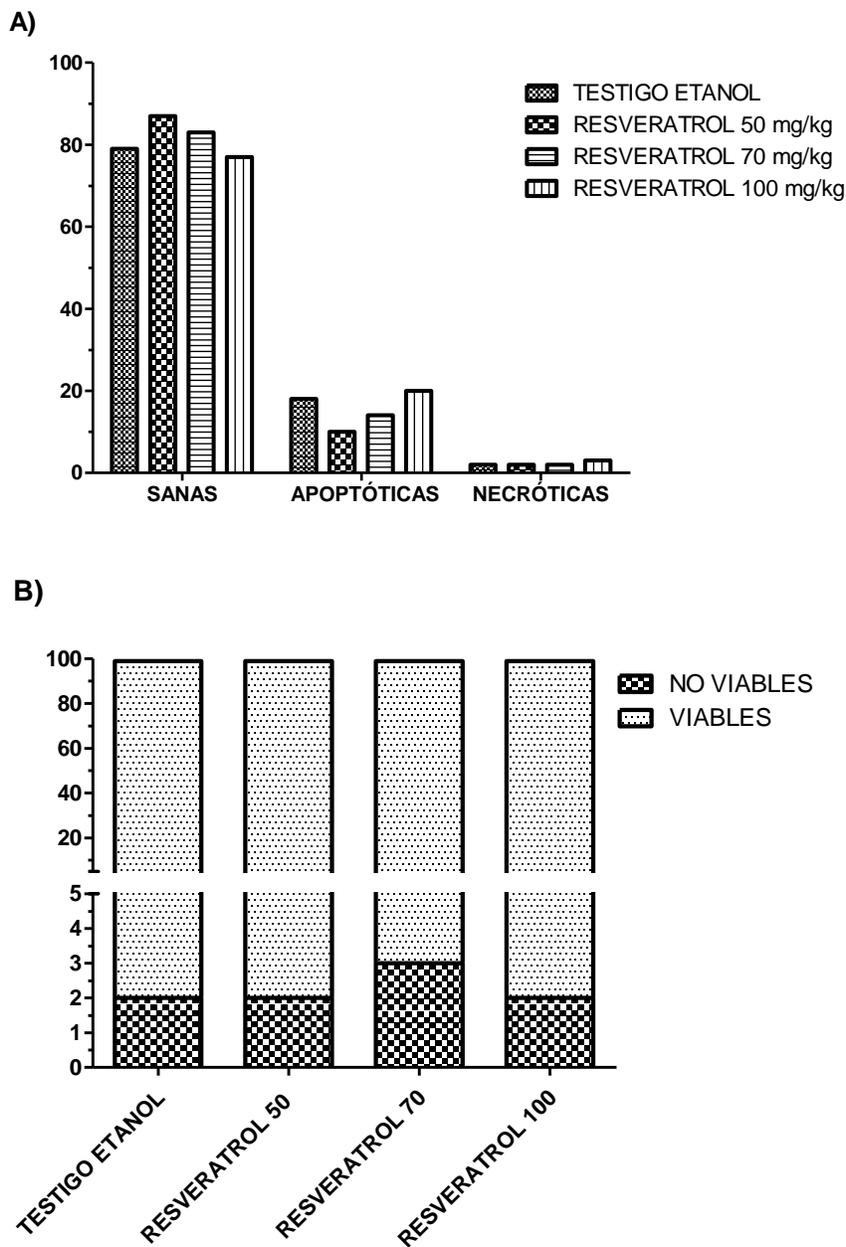


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de MN evaluados en 20,000 EPC cuando se administraron 50, 70 ó 100 mg/kg de resveratrol. A) distribución de MN a las 0 horas; B) distribución de MN a las 24 horas; C) distribución de MN a las 48 horas; D) distribución de MN a las 72 horas.

p<0.05; *vs testigo. Análisis realizado mediante Kruskal-Wallis.

ANEXO 4



Porcentaje de células sanas, apoptóticas y necróticas (A). Porcentaje de células viables y no viables (B). Se evaluaron 300 células nucleadas de sangre periférica de ratones tratados con 50, 70 ó 100 mg/kg de resveratrol.

ANEXO 5

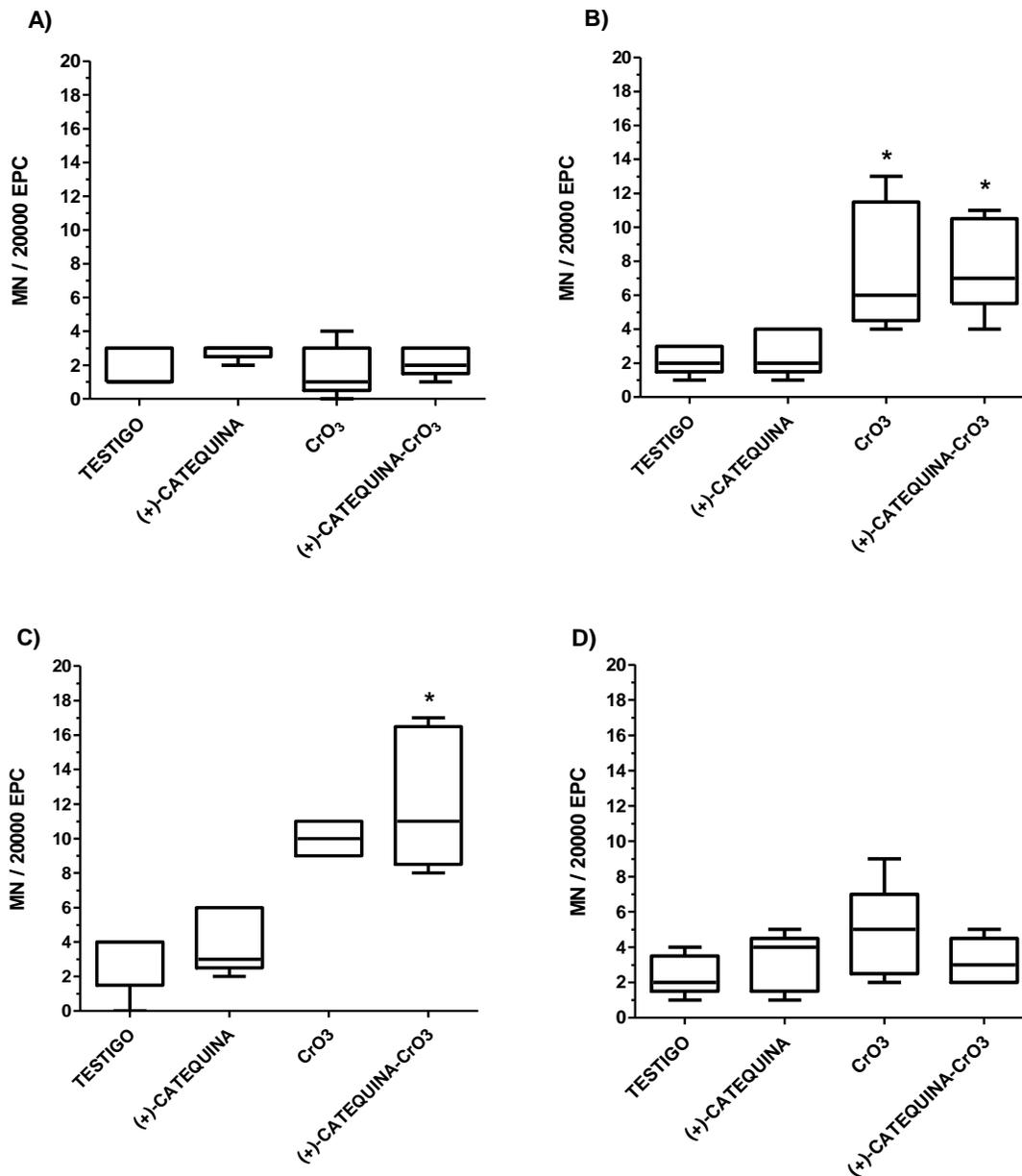


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de MN evaluados en 20,000 EPC cuando se administraron 20 mg/kg de (+)-catequina y CrO₃. A) distribución de MN a las 0 horas; B) distribución de MN a las 24 horas; C) distribución de MN a las 48 horas; D) distribución de MN a las 72 horas.

p < 0.05; * vs testigo. Análisis realizado mediante Kruskal-Wallis.

ANEXO 6

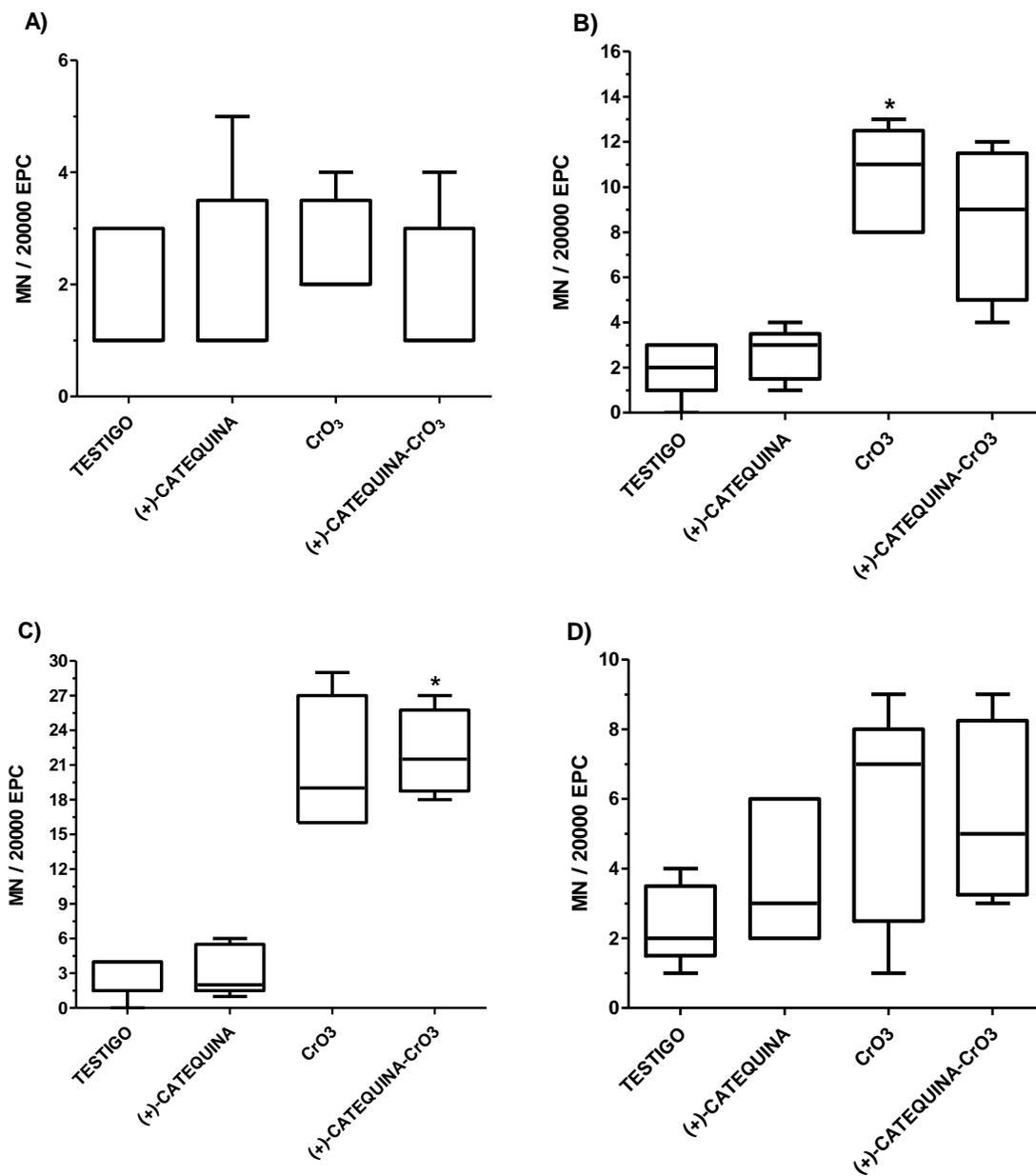


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de MN evaluados en 20,000 EPC cuando se administraron 40 mg/kg de (+)-catequina y CrO₃. A) distribución de MN a las 0 horas; B) distribución de MN a las 24 horas; C) distribución de MN a las 48 horas; D) distribución de MN a las 72 horas. p<0.05; *vs testigo. Análisis realizado mediante Kruskal-Wallis.

ANEXO 7

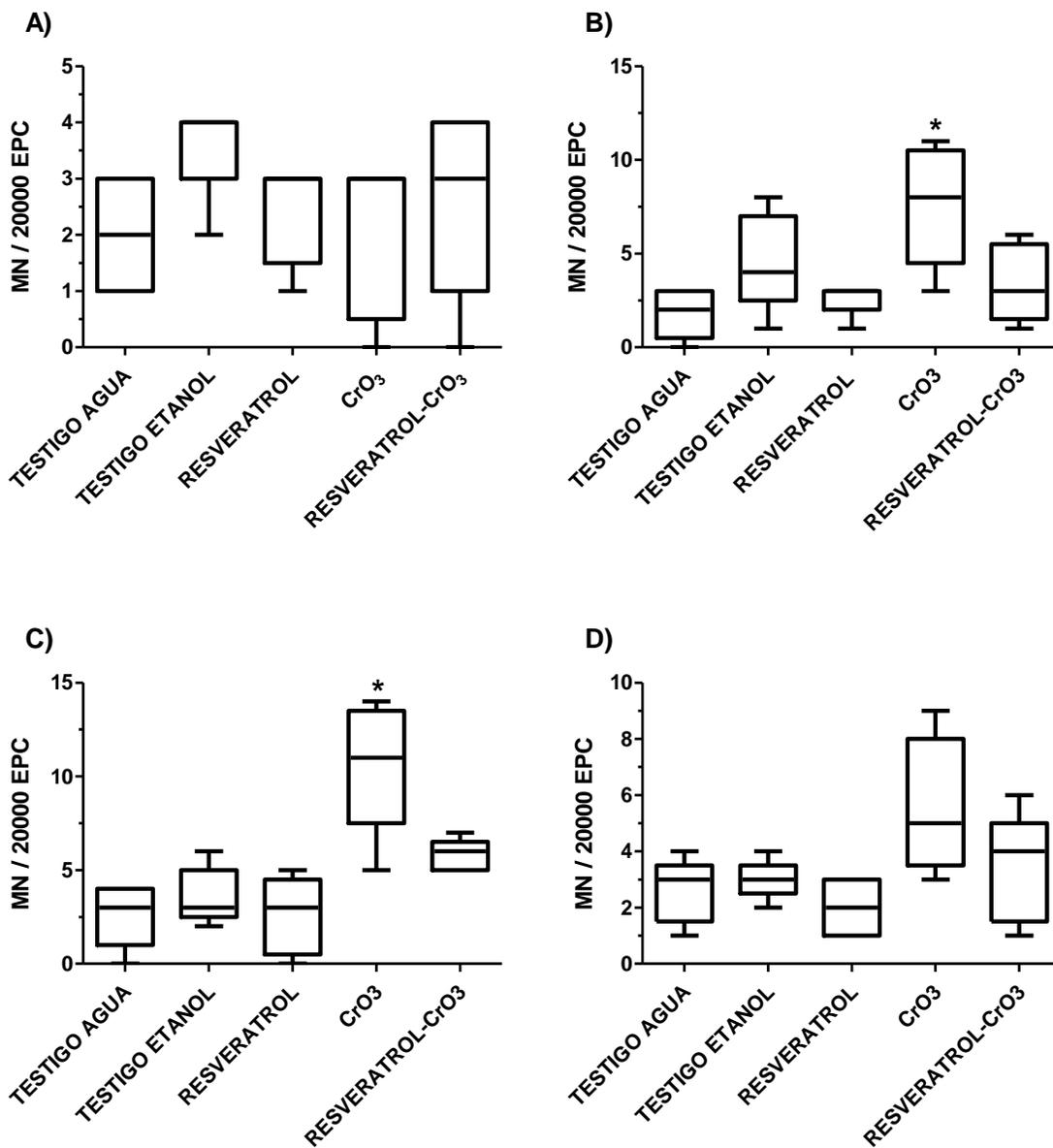


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de MN evaluados en 20,000 EPC cuando se administraron 50 mg/kg de resveratrol y CrO₃. A) distribución de MN a las 0 horas; B) distribución de MN a las 24 horas; C) distribución de MN a las 48 horas; D) distribución de MN a las 72 horas.

p<0.05; *vs testigo agua. Análisis realizado mediante Kruskal-Wallis.

ANEXO 8

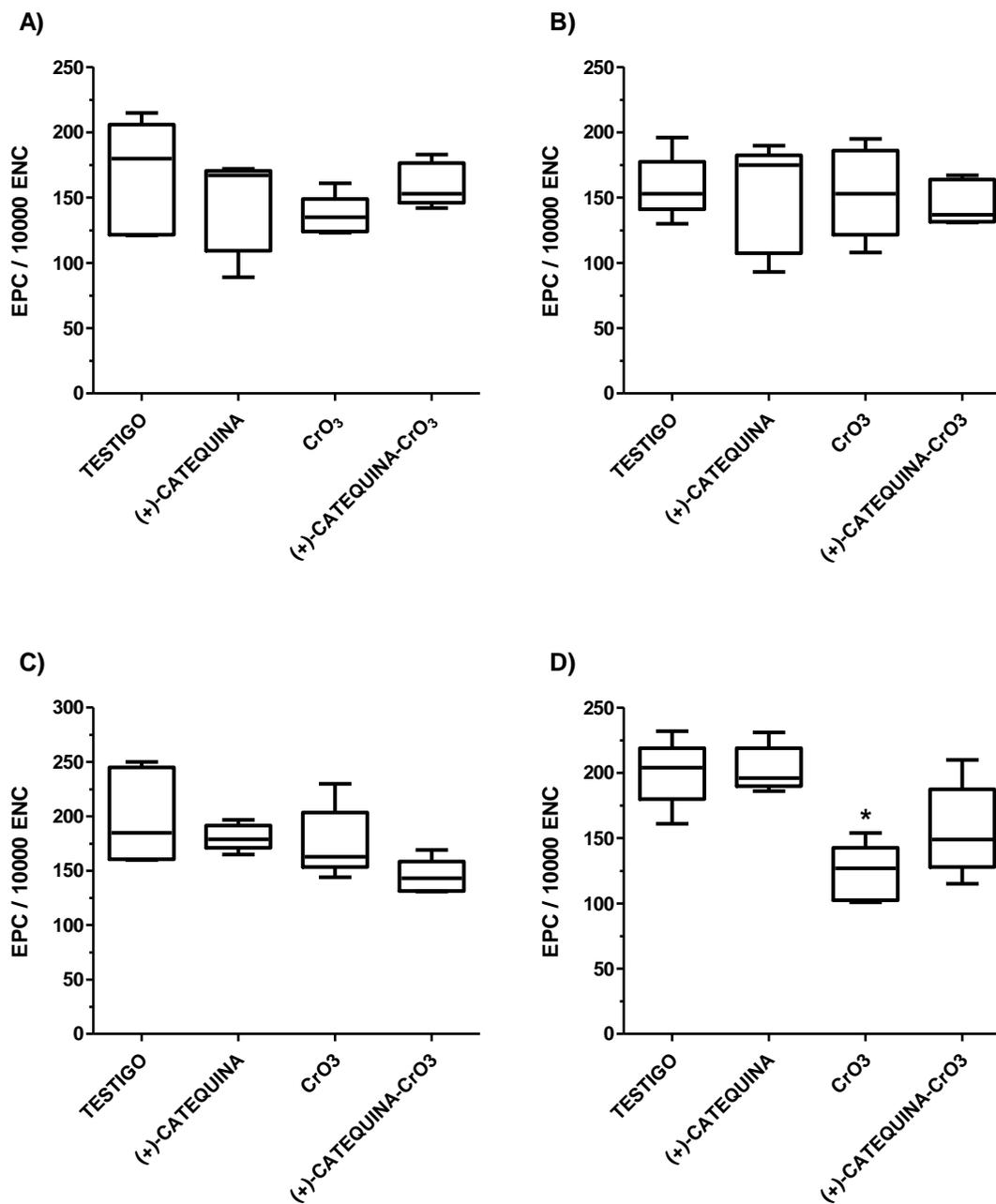


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos EPC evaluados en 10,000 eritrocitos totales, cuando se administraron 20 mg/kg de (+)-catequina y CrO₃. A) distribución de EPC/ENC a las 0 horas; B) distribución de EPC/ENC a las 24 horas; C) distribución de EPC/ENC a las 48 horas; D) distribución de EPC/ENC a las 72 horas. $p < 0.05$; *vs testigo. Análisis realizado mediante Kruskal-Wallis.

ANEXO 9

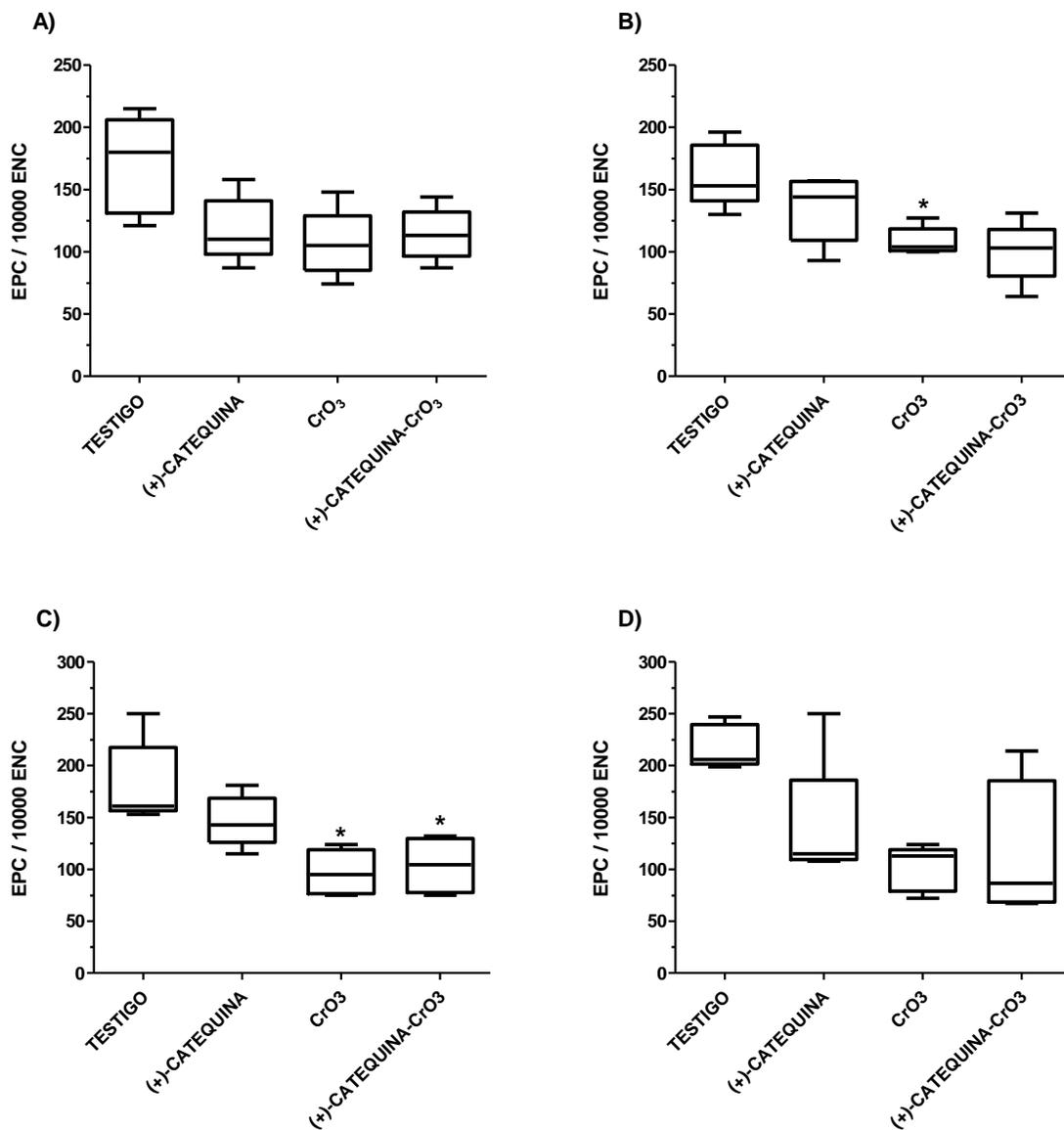


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de EPC evaluados en 10,000 eritrocitos totales, cuando se administraron 40 mg/kg de (+)-catequina y CrO₃. A) distribución de EPC/ENC a las 0 horas; B) distribución de EPC/ENC a las 24 horas; C) distribución de EPC/ENC a las 48 horas; D) distribución de EPC/ENC a las 72 horas. $p < 0.05$; *vs testigo. Análisis realizado mediante Kruskal-Wallis.

ANEXO 10

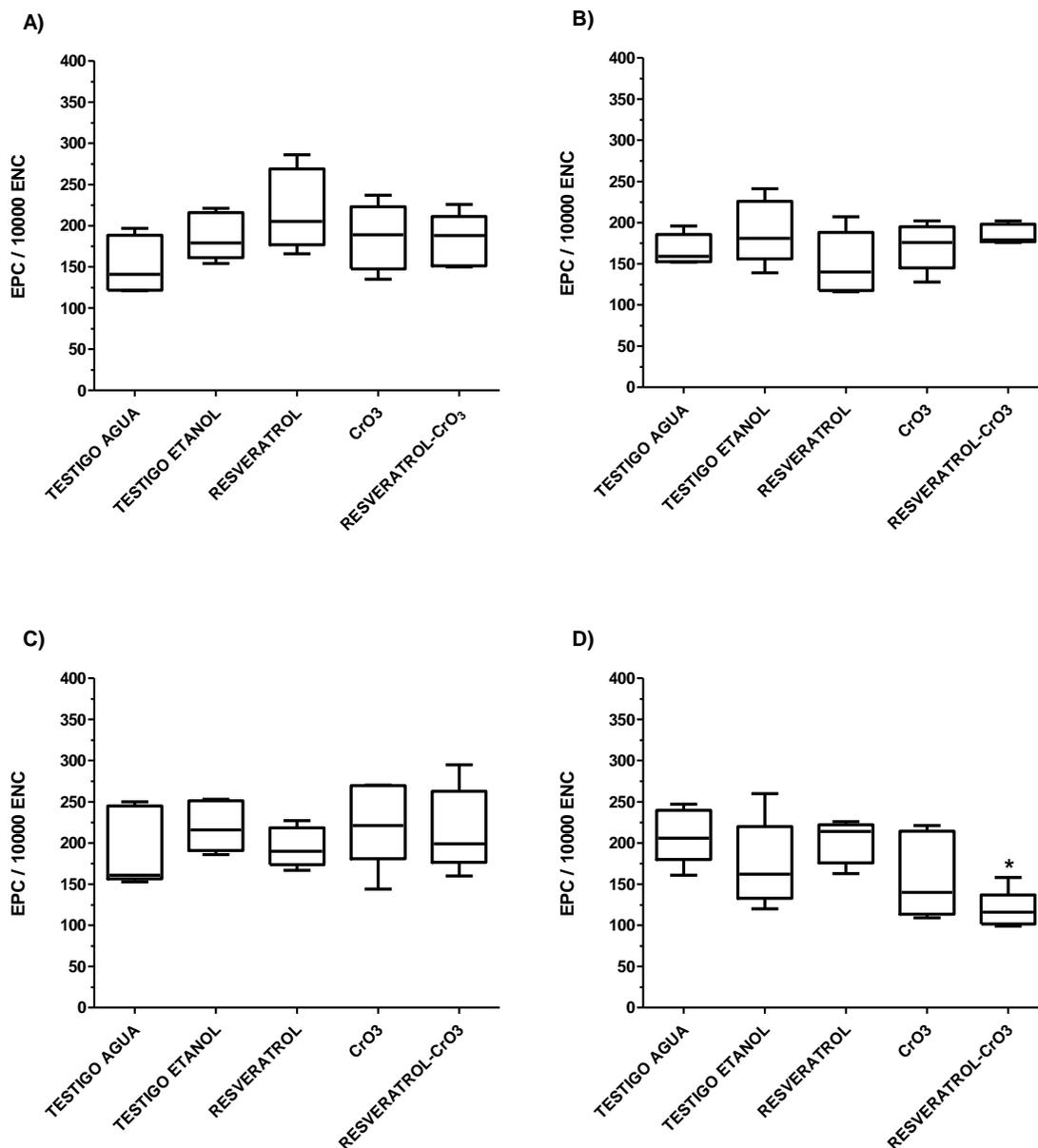


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de EPC evaluados en 10,000 eritrocitos totales cuando se administraron 50 mg/kg de resveratrol y CrO₃. A) distribución de EPC/ENC a las 0 horas; B) distribución de EPC/ENC a las 24 horas; C) distribución de EPC/ENC a las 48 horas; D) distribución de EPC/ENC a las 72 horas. $p < 0.05$; *vs testigo. Análisis realizado mediante Kruskal-Wallis.

ANEXO 11

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

Evento: XVI Reunión Internacional de Ciencias Médicas.

Título de la ponencia: EFECTO DE LOS FLAVONOIDES DEL TÉ VERDE ((+)-CATEQUINA) SOBRE LA APOPTOSIS, VIABILIDAD CELULAR Y LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATONES Hsd:ICR EXPUESTOS A CROMO HEXAVALENTE.

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

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

Lugar y Fecha: Universidad de Guanajuato. Campus León. León Guanajuato. Del 27 al 29 de abril de 2016.

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

Título de la ponencia: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE RATONES Hsd:ICR A METALES PESADOS (PENTÓXIDO DE VANADIO Y TRIÓXIDO DE CROMO): MICRONÚCLEOS, APOPTOSIS Y VIABILIDAD CELULAR.

Autores: Nicolás-Méndez Tonancy, Hernández-Cortés Lourdes Montserrat, Altamirano-Lozano Mario Agustín, García-Rodríguez María del Carmen.

Organizador: Departamento de Ciencias de la Salud. UAM Iztapala.

Lugar y Fecha: Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México, Ciudad de México. Del 17 al 21 de octubre de 2016.

Evento: 23rd Annual Meeting of de Society for Redox Biology and Medicine (SFRBM).

Titulo de la ponencia: SIMULTANEOUS EVALUATIONS OF GSH LEVELS, SOD ACTIVITY AND HE GENOTOXIC DAMAGE IN MICE TREATED WITH CHROMIUM (VI) AND CATECHINS OF GREEN TEA [(+)-CATEQUIN AND (-)-EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE].

Autores: María del Carmen García-Rodríguez, **Tonancy Nicolás-Méndez**, Gabriela Serrano-Reyes, Mario Altamirano-Lozano.

Organizador: Society for Redox Biology and Medicine's en conjunto con la Society for Free Radical Research International (SFRBM/SFRRRI 2016).

Lugar y Fecha: Hyatt Regeancy, San Francisco. California. Estados Unidos. Del 16 al 19 de noviembre de 2016.

Evento: 56th Annual Meeting and ToxExpo.

Titulo de la ponencia: EVALUATION OF APOPTOTIC ACTIVITY, MICRONUCLEUS INDUCTION AND LEVELS OF 8-HIDROXYDEOXYGUANINE IN PERIPHERAL BLOOD OF Hsd:ICR MICE EXPOSED TO HEXAVALENT CHROMIUM COMPOUNDS.

Autores: **T. Nicolás-Méndez**, G. Serrano-Reyes, M. Pacheco-Martinez. M. Altamirano-Lozano, M.C. García-Rodríguez.

Organizador: Society of Toxicology.

Lugar y Fecha: Baltimore Convention Center. Baltimore, Maryland. Estados Unidos. Del 12 al 16 de marzo de 2017.

Evento: XVII Reunión Internacional de Ciencias Médicas

Titulo de la ponencia: ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS FITOQUÍMICOS ANTIOXIDANTES (RESVERATROL) Y NUEVO FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE MALARIA Y LEISHMANIA SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS Y LA ACTIVIDAD APOTÓTICA EN RATONES Hsd:ICR.

Autores: Hernández-Cruz Estefani Yaquelin, **Nicolás-Méndez Tonancy**, Hernández-Luis Francisco, Lopez-Sanchez Alejandra, García-Rodríguez María del Carmen.

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

Lugar y Fecha: Universidad de Guanajuato. Campus León. León Guanajuato. Del 26 al 28 de abril de 2017.

Evento: 11th World Congress on Polyphenols Applications.

Título de la ponencia: EVALUATION OF APOPTOTIC ACTIVITY, MICRONUCLEUS INDUCTION AND LEVELS OF 8-HIDROXYDEOXYGUANINE IN PERIPHERAL BLOOD OF Hsd:ICR MICE EXPOSED TO HEXAVALENT CHROMIUM COMPOUNDS.

Autores: GARCÍA-RODRÍGUEZ, María del Carmen; **NICOLÁS-MÉNDEZ, Tonancy;** RETANA-UGALDE, Raquel; ALTAMIRANO-LOZANO, Mario.

Organizador: International Society of Antioxidants in Nutrition and Health.

Lugar y Fecha: Universidad de Viena. Viena. Austria. 20 y 21 de junio de 2017.

80. Efecto de los flavonoides del té verde ((+)-catequina) sobre la apoptosis, viabilidad celular y la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratones Hsd:ICR expuestos a cromo hexavalente

Nicolás-Méndez Tonancy, Altamirano-Lozano Mario y García-Rodríguez María del Carmen*. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

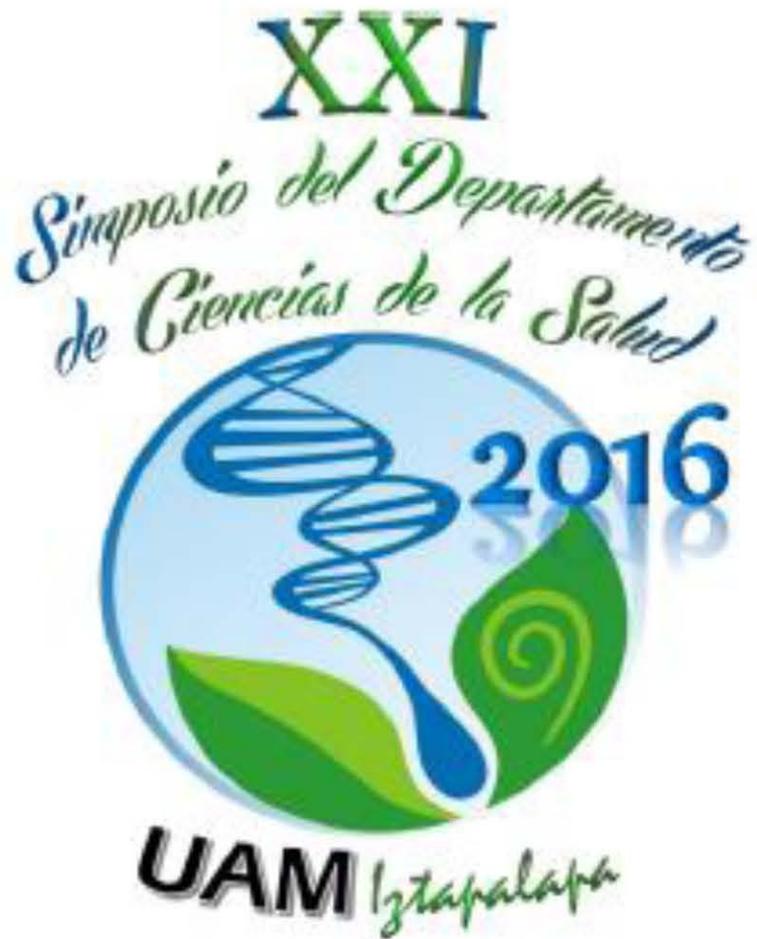
Introducción. El estudio de sustancias con propiedades protectoras o moduladoras del daño al ADN, surge como una opción complementaria a los estudios de genotoxicidad, ya que al conocer los mecanismos de protección se pueden generar alternativas para contrarrestar los efectos de los agentes genotóxicos. De ahí que, se proponga el uso de antimutágenos que se encuentran en la dieta como un procedimiento para proteger o modular el daño genotóxico. Los compuestos del cromo hexavalente pueden dañar el ADN mediante el estrés oxidante que se genera durante su reducción intracelular. En contraparte, los flavonoides como la (+)-catequina que se encuentran en el té verde, presentan un alto potencial antioxidante.

Objetivo. En este estudio se evaluó el efecto de la (+)-catequina sobre la apoptosis, viabilidad celular y la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratones Hsd:ICR expuestos a cromo hexavalente.

Métodos. Grupos de seis ratones macho fueron tratados con: a) 20 mg/kg de CrO₃ por vía intraperitoneal; b) 20 mg/kg de (+)-catequina por vía intragástrica; c) con ambos tratamientos (+)-catequina y CrO₃ (20-20 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 micronúcleos (MN) se evaluaron de acuerdo a la técnica propuesta por Hayashi et al. (1990)[1], mientras que apoptosis y viabilidad celular se realizó de acuerdo a la técnica modificada por García-Rodríguez et al., (2013)[2].

Resultados. Se observó que la administración de CrO₃ incrementa las frecuencias de MN y la apoptosis. La administración de (+)-catequina no modifica las frecuencias de MN ni la apoptosis. Cuando se combinaron los tratamientos de (+)-catequina y CrO₃ no se observaron cambios en las frecuencias de MN al comparar con el grupo tratado solo con CrO₃.

Conclusión. Los resultados sugieren que la administración de 20 mg/kg de (+)-catequina no presenta efectos sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃. Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN217712. [1]Hayashi et al., 1990. *Mutat Res*; 245:245-249. [2]García-Rodríguez et al., 2013. *Oxid Med Cell Longev*; 2013:1-9.



PROGRAMA

17 al 21 de Octubre, 2016

Sala Sandoval Vallarta

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE RATONES Hsd:ICR A METALES PESADOS (PENTÓXIDO DE VANADIO Y TRIÓXIDO DE CROMO): MICRONÚCLEOS, APOPTOSIS Y VIABILIDAD CELULAR

Nicolás-Méndez Tonancy, Hernández-Cortés Lourdes Montserrat, Altamirano-Lozano Mario Agustín,
García-Rodríguez María del Carmen*

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN).

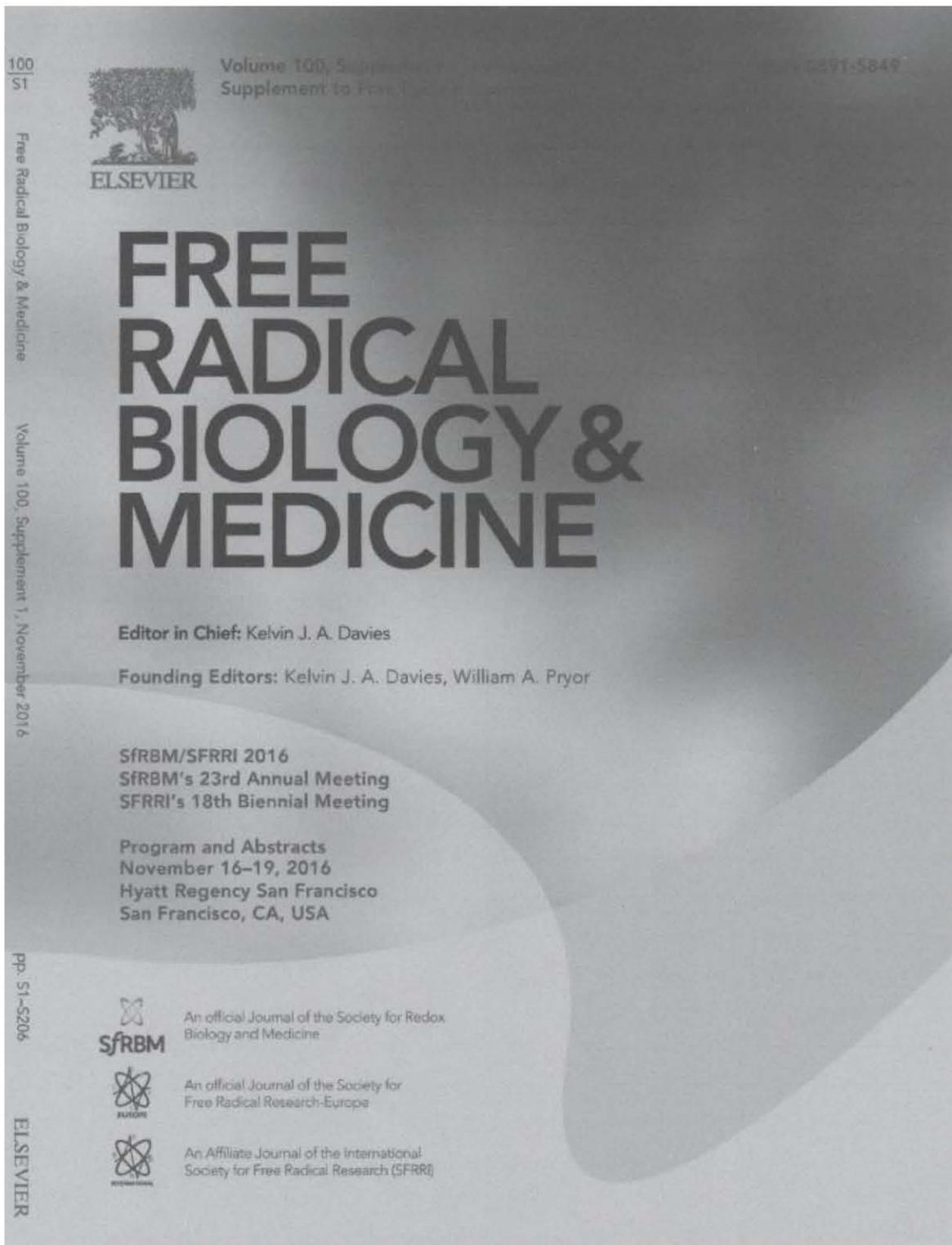
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México D.F.

*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. Aunque algunos metales son micronutrientes y se encuentran en casi todos los seres vivos, a concentraciones elevadas y/o diferentes números de oxidación pueden presentar 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 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. De ahí que, en el presente estudio se comparó el efecto de la exposición de ratones macho a V_2O_5 y trióxido de cromo (CrO_3), mediante la evaluación de la cinética de micronúcleos (MN), la inducción de apoptosis, viabilidad celular y la relación entre eritrocitos policromáticos/normocromáticos (EPC/ENC). Grupos de cinco ratones fueron tratados por vía intraperitoneal con 40 mg/kg de V_2O_5 ó 20 mg/kg de 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 que hubo mayor incremento de las frecuencias de MN con la administración de CrO_3 que la observada cuando se administró el V_2O_5 , además de que la administración del CrO_3 incrementa las frecuencias de MN en todos los tiempos evaluados después de su administración y en V_2O_5 solo presenta incrementos significativos a las 48 y 72 horas. Por otra parte, tanto el V_2O_5 como el CrO_3 incrementaron de manera significativa las células apoptóticas, siendo mayor el incremento en el grupo tratado con V_2O_5 . En cuanto a la citotoxicidad se observó que la administración de V_2O_5 modifica la relación de EPC/ENC de manera significativa en las muestras obtenidas a las 48 y 72 horas; mientras que la administración de CrO_3 modifica significativamente la relación de EPC/ENC en todos los tiempos evaluados después de las administraciones de los tratamientos. Al evaluar la viabilidad celular se observó que la administración tanto del V_2O_5 como del CrO_3 disminuyen significativamente las células viables, siendo mas significativa para el tratamiento con V_2O_5 . Con base en los resultados obtenidos hasta el momento se corrobora el daño genotóxico de los compuestos de Cr(VI) y se observa que la exposición de las poblaciones humanas a compuestos metálicos como el V_2O_5 y CrO_3 puede representar un riesgo genético y citotóxico. **Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN219216.**

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

² 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*; 1-9.



2-nonenal) modified proteins (28 and 53 kDa) in the testicle were increased significantly by DES administration. Reduced CoQ10 significantly decreased HNE-modified proteins. Conclusion: Although the reduced CoQ10 supplementation to rats did not rescue the decline of total sperm numbers induced by DES administration, it significantly reduced oxidative stress in the testis and improved sperm function. These results suggested that the systemic absorption of reduced CoQ10 might inhibit oxidative stress of the testicle and dysfunction of the sperm.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.269

229

Peroxiredoxins as Markers of Oxidative Stress in Circulating Blood Cells

Andree G Pearson¹, Stephanie M Moran¹, Masuma Zawari¹, and Mark B Hampton¹

¹Centre for Free Radical Research, University of Otago Christchurch, New Zealand

The peroxiredoxins (Prxs) are a family of thiol peroxidases that effectively reduce cellular hydroperoxides. Treatment of erythrocytes with hydrogen peroxide oxidizes their Prx 2, and we have previously shown that erythrocyte Prx 2 oxidation occurs in blood containing activated neutrophils, and in blood stored for transfusion. We hypothesize that measurement of the redox status of Prxs in blood cells will be a marker of oxidative stress, either due to increased generation of endogenous hydroperoxides or impairment of cellular reductive mechanisms. In order to determine baseline parameters, blood samples were obtained from a healthy human population. The redox status of cytoplasmic Prx 2 and mitochondrial Prx 3 was measured in platelets, lymphocytes and monocytes, and compared with Prx 2 in erythrocytes. We also treated isolated cells with hydrogen peroxide and compared the sensitivity of their Prxs to oxidation with inhibition of mitochondrial metabolic activity using a Seahorse XF Analyser. Lymphocyte mitochondrial activity was most sensitive to hydrogen peroxide, while platelets displayed significant resilience. This coincided with Prx 3 in platelets being relatively resistant to oxidation by hydrogen peroxide, despite Prx 2 being completely oxidized under these conditions. We conclude that the redox status of Prxs varies between different blood cell types and between cytoplasm and mitochondria of the same cells. These parameters warrant further investigation in disease populations.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.270

230

Simultaneous Evaluations of GSH Levels, SOD Activity and the Genotoxic Damage in Mice Treated with Chromium(VI) and Catechins of Green Tea [(+)-Catechin and (-)-Epigallocatechin-3-Gallate]

María del Carmen García-Rodríguez¹, Yanancy Nicolás-Méndez¹, Gabriela Serrano-Reyes¹, and Mario Altamirano-Lozano¹

¹Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

The compounds of Cr(VI) generates reactive oxygen species (ROS) during its reduction to Cr(III) leading to DNA damage. The

green tea polyphenols can protect against the genotoxic damage induced by Cr(VI) by reducing frequencies of micronucleus MN^[1]. In this study, the effect of catechins of green tea [(+)-catechin and epigallocatechin-3-gallate (EGCG)] on glutathione (GSH) levels and superoxidodismutasa (SOD) activity was evaluated simultaneously with the analysis of MN and apoptosis. Groups of five Hsd-ICR mice were divided and treated as follows: i) only vehicle; ii) (+)-catechin (20 and 40 mg/kg) or EGCG (10 mg/kg) by gavage; iii) CrO₃ (20 mg/kg) intraperitoneally; and iv) (+)-catechin or EGCG in addition to CrO₃. Evaluations were performed at 0, 24, 48 and 72 h after treatments. No significant changes in MN frequencies were observed when the catechins of green tea were administrated alone. However, the treatment with CrO₃ showed an increase in MN, apoptosis and GSH levels, but the activity of SOD decreased. The treatment with (+)-catechin prior to administration of CrO₃ showed no effects on MN and apoptosis. However, treatment with EGCG possibly presents both effects; prooxidant and antioxidant because the MN was increased at 24 h, but it was reduced at 48 h when EGCG was administrated prior to CrO₃. Additionally, GSH levels decreased and SOD activity is recovered. The increase of apoptotic cells suggests that this may play a role in the elimination of micronucleated cells.

Financial support was obtained from DGAPA-UNAM PAPIIT IN219216; IN217712; PAEP-2016; CONACYT 703847/584686.

Reference:

[1] María del Carmen García-Rodríguez, et al. 2013. *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2013, Article ID 486419, 9 pag. doi:10.1155/2013/486419.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.271

231

Neuroblastoma Cell Response to Oxidative Stress Is Impaired by Retinoic Acid-Induced Differentiation: Role of HO-1

Mariapaula Nitti¹, Sabrina Piras¹, Anna Lisa Farfara¹, Lorenzo Brondolo¹, Umberto Maria Marimari¹, and Maria Adelaide Prossato¹

¹DIMES - University of Genoa, Genoa, Italy, ²Giannina Gaslini Institute, IRCCS, Genoa, Italy

The modulation of redox balance is able to drive different cell functions, from differentiation to proliferation. In a previous work, we showed that all-trans retinoic acid (ATRA) induced differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma (NB) cells through the generation of reactive oxygen species (ROS) [Nitti et al Cell Signal 2010]. However, ATRA-differentiated NB cells resulted more sensitive to the further unbalance of redox state in comparison with undifferentiated ones, as shown in response to glycoxydative stress [Nitti et al Neurosci Letters 2007]. Heme oxygenase 1 (HO-1), induced by the transcription factor Nrf2, plays a crucial role in cell adaptation to oxidative stress through the generation of bilirubin, ferritin and carbon monoxide with antioxidant and anti-inflammatory properties. In this work, focusing on Nrf2/HO-1 axis, we investigated the ability of undifferentiated and ATRA-differentiated NB cells to balance oxidative stress.

SH-SY5Y exposure to 100-500 μM H₂O₂ decreased cell viability significantly more in ATRA-differentiated cells than in the undifferentiated ones. The expression of GCLM and GCLC, key enzymes in the synthesis of GSH, was not modified by H₂O₂ treatment in any condition. However, after H₂O₂ treatment heme oxygenase 1 (HO-1) expression and Nrf2 binding to HO-1 promoter were significantly reduced in differentiated cells in comparison to the undifferentiated ones. In addition, exposure to bilirubin prevented cell death induced by H₂O₂ in differentiated cells.

The Toxicologist
Supplement to *Toxicological Sciences*

56th Annual Meeting and ToxExpo™
Baltimore, Maryland | March 12–16, 2017

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

ISSN 1096-6080
Volume 156, Issue 1
March 2017
www.toxsci.oxfordjournals.org

The Official Journal of
the Society of Toxicology

SOT | Society of
Toxicology
www.toxicology.org

Cellular responses to oxidative and electrophilic insults are mediated via the transcription factor Nrf2 and although it has been shown previously that DS individuals have increased levels of basal oxidative stress, there is no literature concerning the Nrf2 pathway activation and kinetics in this population. Therefore, this study aims to elucidate the dynamics and role of Nrf2 and its downstream targets in DS cell models. By using two known Nrf2 activators, the fungicide maneb and the organosulfur dietary component sulforaphane, we present data showing that DS cells respond differently than euploid controls in regards to Nrf2 activation. Specifically, we observed altered basal abundance of Nrf2-regulated proteins (GCLC, NQO1, HO-1) in DS fibroblasts. Additionally, we observed that DS fibroblasts possess elevated levels of Nrf2 in the cytoplasm compared to euploid controls. Kinetics of toxicant-mediated Nrf2 nuclear translocation and activation/DNA binding were also evaluated. Together, these data demonstrate that the Nrf2 pathway in DS is altered, which could impact a DS individual's ability to combat oxidative insults and adapt to exposures.

PS 1940 Exacerbation of Xenobiotic-Mediated Oxidation of Mitochondrial Peroxiredoxin 3 in Down Syndrome

D. Brown, S. Aivazidis, and J. Roede. University of Colorado, Aurora, CO.

Down syndrome (DS), the most common genetic form of intellectual disability, results from a triplication of chromosome 21. These individuals suffer from a broad array of comorbidities, like diabetes, seizures, and early onset Alzheimer's disease. Additionally, DS individuals display elevated markers of oxidative stress and possess dysfunctional mitochondria. A major cellular antioxidant defense and redox signaling system is the peroxiredoxin/thioredoxin/thioredoxin reductase system. Humans possess six different peroxiredoxin (Prx) isoforms that are localized in the cytoplasm (Prx1, Prx2, Prx4, Prx5, Prx6) as well as the mitochondrion (Prx3). The redox state of these proteins, particularly Prx1 and Prx3, can be investigated to assess the redox state of the cytoplasm vs. the mitochondrion. Due to these previous observations of DS-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunction, we hypothesized that the mitochondrial compartment in DS cells would be more oxidized, compared to euploid controls, and that exposure to oxidative stressors would exacerbate this oxidized environment. To test this hypothesis we utilized patient derived dermal fibroblasts and exposures to various xenobiotic agents (paraquat, auranofin, beta-lapachone) known to alter the cellular redox environment. Investigation of the basal abundance of Prx proteins in DS and euploid control cells showed DS-mediated differences Prx abundance. Upon treatment with the redox-altering compounds, DS cells displayed elevated Prx3 (mito) oxidation compared to euploid cells, while Prx1 (cyto) oxidation was similar in both DS and control cells. Together, these data show that DS mitochondria suffer greater oxidation compared to euploid controls, which indicates that DS individuals may be more sensitive to the toxic effects of xenobiotics known to alter mitochondrial function and redox balance.

PS 1941 Silencing of Long Isoforms of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 1 Primes Macrophages toward M1 Polarization

H. Wang¹, J. Zhu¹, Z. Liu¹, H. Lv¹, F. Chen¹, J. Fu¹, Y. Hou¹, R. Zhao¹, Y. Xu¹, Q. Zhang¹, and J. Ji¹. ¹China Medical University, Shenyang, China; and ²Emory University, Atlanta, GA.

Inflammation plays a significant role in many adverse health outcomes resulting from environmental perturbations. Dissecting the functions of transcription factors regulating macrophage activation is important for understanding pro- and anti-inflammatory responses. Nuclear factor erythroid 2-related factor 1 (Nrf1, also known as Nfe2l1) is a CNC-bZIP protein that preferentially heterodimerizes with small MAF proteins, AP1 transcription factors or other bZIP proteins and activates transcription through binding to the NF-E2/AP1-like ARE/EpRE site. Human and rodent *Nrf1* genes may be transcribed into alternatively spliced forms resulting in multiple protein isoforms. While the exact physiological functions of various isoforms of Nrf1 are still under investigation, accumulating evidence indicates that long isoforms of Nrf1 (L-Nrf1), also referred as TCF1) are an important regulator in the antioxidant response and proteasome homeostasis. In this study, we found that stable knockdown of L-Nrf1 mRNA (*Nrf1(L)-KD*) in RAW 264.7 macrophages resulted in augmented expression of multiple genes indicative of M1 polarization, including *Nos2*, *Cox2*, *Il6*, *Il1β*, *Tnfa* and *Ccl2*, under resting and/or LPS-challenged conditions. Compared to Scramble cells, co-exposure of *Nrf1(L)-KD* RAW macrophages to LPS plus IFN γ , a classic M1 polarization condition, also led to a dramatically elevated induction of the M1 genes. Conversely, M2 polarization induced by IL4 plus IL13 treatment was attenuated in *Nrf1(L)-KD* RAW cells which exhibited a sig-

nificant reduction in the mRNA expression of *Arg1* and *Mrc1*. Analysis of the key transcription factors involved in M1 polarization by RT-qPCR and immunoblot revealed that *Nrf1(L)-KD* cells have increased gene expression and phosphorylation of NF- κ B, STAT1 and STAT3 under resting and M1 polarization conditions. Moreover, *Nrf1(L)-KD* cells appeared to have elevated level of intracellular ROS which prime the activation of redox-sensitive inflammation regulators. These findings collectively suggest that L-Nrf1 functions as a negative regulator of M1 polarization and pro-inflammatory response in macrophages.

PS 1942 Evaluation of Apoptotic Activity, Micronucleus Induction, and Levels of 8-Hydroxydeoxyguanine and Glutathione in Peripheral Blood of Hsd:ICR Mice Exposed to Hexavalent Chromium Compounds

T. Nicolás-Méndez², G. Serrano-Reyes², M. Pacheco-Martínez¹, M. Altamirano-Lozano², and M. C. García-Rodríguez². ¹UAM Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico; and ²UNAM, Ciudad de México, Mexico.

Clinical and laboratory evidence indicates that exposure to hexavalent chromium (Cr(VI)), a highly toxic metal, can lead to oxidative DNA damage. The Cr(VI) compounds are relevant as they are widely used in the industry. According to previous studies[1], Cr-induced genomic DNA damage including 8-hydroxydeoxyguanine (8-OHdG, 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine), a form of oxidative DNA damage, DNA-DNA interstrand crosslinks, Cr-DNA adducts, single-strand breaks, and DNA-protein crosslinks. In this study we investigate the apoptotic activity, micronucleus induction (MN), as well as the levels of 8-OHdG and glutathione (GSH) in peripheral blood of Hsd:ICR mice exposed to Cr(VI). Groups of five Hsd-ICR mice were divided and treated: a) only vehicle (water distilled) and b) 20 mg/kg of trioxide of chromium (CrO₃) by intraperitoneally. The evaluations for MN were performed at 0, 24, 48 and 72 hours after treatment; while the evaluations for apoptosis, GSH and 8-OHdG levels were performed at 48 hours. The treatment with 20 mg/kg of CrO₃ showed an increase in MN and apoptotic cells frequencies. Moreover, it was observed a slight decrease in the levels of 8-OHdG and an increase of GSH levels. Our results corroborate the genotoxic and cytotoxic damage reported for Cr(VI) compounds[2]. Although the 8-OHdG has been recognized as a biomarker of oxidative DNA damage, and Cr(VI) generate reactive oxygen species (ROS) during reduction to Cr(III), the observed decrease in the levels of 8-OHdG in the group treated with CrO₃ it could be due to its effects on repair mechanisms. The genotoxic damage observed could be related with the increase of GSH levels since Cr(VI) induces DNA strand breakage in the presence of GSH. Financial support was obtained from DGAPA-UNAM, PAPIIT IN219216, PEAP-2017; CONACYT 703847/584686. [1] T. C. Tsou and J. L. Yang, "Formation of reactive oxygen species and DNA strand breakage during interaction of chromium (III) and hydrogen peroxide *in vitro*: evidence for a chromium (III)-mediated Fenton-like reaction." *Chem. Biol. Interact.*, vol. 102, no. 3, pp. 133-153, 1996. [2] ASTDR, "Agency for Toxic Substances and Disease Registry," *Toxicol. Profile Chromium*, no. September, p. 592, 2012.

PS 1943 Plasticity of the Nrf2 Antioxidant Pathway in Response to Aging and Cadmium in Glutathione-Deficient Mice

C. M. Schaupp¹, C. C. White¹, D. Botta¹, D. K. Scoville¹, and T. J. Kavanagh^{1,2}. ¹University of Washington, Seattle, WA; and ²University of Washington Interdisciplinary Center for Exposures, Diseases, Genomics, and Environment, Seattle, WA.

The Nrf2 signaling pathway is one of the most important cellular defense and survival pathways, and the importance of Nrf2 signaling in aging has been well documented. Intracellular levels of glutathione (GSH) both governs and is governed by the Nrf2 pathway through its influence on thiol redox status and the expression of genes involved in its biosynthesis, including GCLC and GCLM, the subunits of the rate-limiting enzyme in GSH production, glutamate cysteine ligase. Mice homozygous for the *Gclm* gene are severely deficient in GSH compared to wild-type (WT) controls, having approximately 10% of normal GSH levels in most tissues. To compensate for reduced GSH, *Gclm*^{-/-} mice have upregulated Nrf2-regulated genes in their livers. Here, we present data corroborating the phenotype previously described in young *Gclm*^{-/-} mice and show this phenotype persists into old age (24+ months). Aged *Gclm*^{-/-} mice maintain a hepatic GSH redox state similar to *Gclm*^{+/+} mice, while maintaining increased insulin sensitivity and glucose tolerance compared to their wild-type counterparts. *Gclm*^{-/-} mice also display a significantly lower body weight than *Gclm*^{+/+} mice. Curiously, under basal conditions, aged *Gclm*^{-/-} mice have lower percent oxidized glutathione

28. Estudio comparativo de los efectos de fitoquímicos antioxidantes (resveratrol) y nuevos fármacos para el tratamiento de malaria y leishmania sobre la frecuencia de micronúcleos y la actividad apoptótica en ratones Hsd:ICR

Hernández-Cruz Estefani Yaquelin¹, Nicolás-Méndez Tonancy¹, Hernández-Luis Francisco², Lopez-Sanchez Alejandra² García-Rodríguez María del Carmen^{*1}

¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, FES-Zaragoza, UNAM. ²Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, México D.F. *carmen.garcia@unam.mx

Introducción: Los fitoquímicos antioxidantes como el resveratrol han sido asociados con la modulación y protección de la inducción de algunos tipos de cáncer. Por otra parte, con la finalidad de potenciar las propiedades antioxidantes de algunas moléculas como lo son los compuestos quinolínicos, en la Facultad de Química de la UNAM, se han desarrollado estructuras como las 2,4,6-triaminoquinazolininas (TAQ), que han generado grandes expectativas para su uso como fitoquímicos en el tratamiento del cáncer.

Objetivo: En este trabajo se compararon los efectos del resveratrol y la TAQ-MLB02 sobre la actividad apoptótica y la inducción de micronúcleos (MN) en ratones Hsd:ICR.

Método: Los MN se evaluaron de acuerdo a la técnica propuesta por Hayashi *et al.*, (1990)¹, mientras que apoptosis y viabilidad celular mediante la técnica modificada por García-Rodríguez *et al.*, (2013)². Grupos de seis ratones macho fueron tratados con: a) testigo, solo se les administró el vehículo; b) testigo positivo, se les administraron 20 mg/kg de CrO₃ vía i.p.; c) fitoquímicos, se les administraron 100 mg/kg de resveratrol vía i.g. ó 10 mg/kg de TAQ-MLB02 vía i.p. Las evaluaciones se realizaron en muestras de sangre obtenidas de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 h después de la aplicación de los tratamientos.

Resultados: Se observó que las administraciones de ambos fitoquímicos no modifican las frecuencias de MN, sin embargo, incrementa las células apoptóticas por lo que disminuyen la viabilidad celular.

Conclusión: Estos resultados nos permiten sugerir que la TAQ-MLB02 no inducen daño genotóxico, pero sí incrementa la inducción de apoptosis, lo que nos permite sugerir que al igual que para el resveratrol esta molécula pudiera presentar la misma vía para eliminar las células dañadas genéticamente.

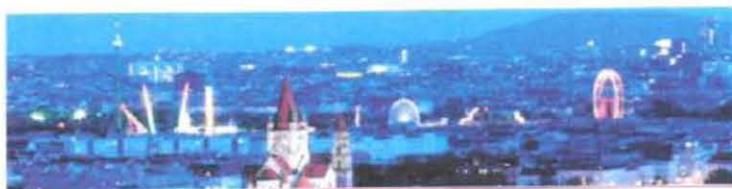
Fuentes: ¹ Hayashi, et al. (1990). *Mutat Res*; 245. 245-249. ² García-Rodríguez, et al. (2013). *Oxid Med Cell Longev*; 1-9.

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

VIENNA POLYPHENOLS 2017

International Society of Antioxidants
in Nutrition and Health

11th World Congress on
Polyphenols Applications



ABSTRACTS BOOK



University of Vienna - Austria

June 20-21, 2017



universität
wien



INTERNATIONAL SOCIETY
OF
ANTIOXIDANTS

EFFECTS OF RESVERATROL ON 8-OHDG LEVELS AND ENDOGENOUS ANTIOXIDANTS EVALUATED SIMULTANEOUSLY WITH THE MICRONUCLEUS AND APOPTOSIS FREQUENCIES IN PERIPHERAL BLOOD OF MICE TREATED WITH HEXAVALENT CHROMIUM

GARCÍA-RODRÍGUEZ, María del Carmen (1); NICOLÁS-MÉNDEZ, Tonancy (1); RETANA-UGALDE, Raquel (2);
ALTAMIRANO-LOZANO, Mario (1)

1: Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, FES-Z, UNAM, Mexico; 2: Unidad de Investigación en Gerontología, FES-Z, UNAM, Mexico

carmen.garcia@unam.mx

The compounds of Cr(VI) generate reactive oxygen species during its reduction to Cr(III) leading to DNA damage such as 8-hydroxydeoxyguanine (8-OHdG). Resveratrol is widely known for its cytoprotective actions against several diseases. The effects of resveratrol on superoxide dismutase (SOD) activity, 8-OHdG and glutathione (GSH) levels, and the micronucleus (MN) and apoptosis frequencies were evaluated simultaneously according to Hayashi[1] and Garcia-Rodriguez[2]. Groups of five animals were treated: i) only vehicle; ii) resveratrol (50mg/kg) by gavage; iii) CrO₃ (20mg/kg) intraperitoneally; and iv) resveratrol in addition to CrO₃. No significant changes in MN and apoptosis were observed in-group treated only with resveratrol, although the 8-OHdG, GSH and SOD were modified. The treatment with CrO₃ increased MN and apoptosis, and decreased SOD and 8-OHdG. The treatment with resveratrol prior to administration of CrO₃ increased the apoptotic cells and 8-OHdG levels, suggesting that these may play a role in the elimination and reduction of micronucleated cells. The decreased GSH, and the recuperation of SOD by the resveratrol could be related with its oxidative stress-suppression properties on genotoxic damage induced by CrO₃.

Financial support was obtained from DGAPA-UNAM PAPIIT IN219216.

[1] M. Hayashi et al., *Mutat. Res. Lett.* 120(1983) 241-247.

[2] M.C. Garcia-Rodriguez et al., *Oxid. Med. Cell. Longev.* ID 486419(2013) 1-9.