



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Efecto de la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre la inducción de
micronúcleos, el sistema antioxidante endógeno, la apoptosis y la
reparación del daño al ADN en ratones tratados con cromo hexavalente”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESTEFANI YAQUELIN HERNÁNDEZ CRUZ

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

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

DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CD.MX. DICIEMBRE, 2019.



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 de la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre la inducción de
micronúcleos, el sistema antioxidante endógeno, la apoptosis y la
reparación del daño al ADN en ratones tratados con cromo hexavalente”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESTEFANI YAQUELIN HERNÁNDEZ CRUZ

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

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

DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

MÉXICO, CD.MX. DICIEMBRE, 2019.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FES - ZARAGOZA

OFICIO CPCB /1229/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de (Biología Experimental y Biomedicina) del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **02 de septiembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de (**Biología Experimental**) del estudiante **HERNÁNDEZ CRUZ ESTEFANI YAQUELIN** con número de cuenta **309054157** con la tesis titulada "**Efecto de la (-)- epigallocatequina-3-galato sobre la inducción de micronúcleos, el sistema antioxidante endógeno, la apoptosis y la reparación del daño al ADN en ratones tratados con cromo hexavalente**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Vocal: DRA. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Secretario: DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ
Suplente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de noviembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO
Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

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, académicas y profesionales.

La investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN219216 y IN224719. Proyectos:

- 1. 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.*
- 2. Efecto de los polifenoles sobre la regulación del sistema antioxidante endógeno, la reparación del daño oxidativo del ADN y las vías de inducción de apoptosis en ratones Hsd:ICR expuestos a Cr(VI)*

Agradezco al CONACyT (número de becario 853816/628898) por la beca recibida para desarrollar mis estudios de maestría.

Agradezco al PAEP por el financiamiento brindado para mi participación en el “Congreso internacional 2018” que se llevó a cabo en la ciudad de San Antonio, Texas, USA.

Expreso mi más cordial agradecimiento a la Dra. María del Carmen García Rodríguez por su apoyo, confianza, y sabiduría brindada durante el trayecto de la realización de esta tesis.

Finalmente, agradezco a los miembros de mi comité tutorial, Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz, Dr. Edmundo González Bonilla y Dra. María del Carmen García Rodríguez y a los miembros del jurado Dra. Sandra Gómez Arroyo, Dr. José Pedraza Chaverri, Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano y Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez por sus valiosos comentarios y sugerencias.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A Dios: Por la sabiduría para descubrir lo correcto, la voluntad para elegir y la fuerza para que perdure.

A Mara: Por tu apoyo, cariño, consejos y por estar a mi lado siempre, en verdad, estoy muy orgullosa de la mujer que eres. Te adoro infinitamente hermana.

A Cristian: Por tu cariño y por todas esas cenas que me preparabas mientras estudiaba. Recuerda que siempre me tendrás para apoyarte. Te adoro infinitamente hermano.

A Yajaira y Santiago: Por ser mis personas favoritas es este mundo y por todo el amor tan sincero que me demuestran, son el mejor regalo que mi hermana me pudo dar. Los amo.

A mi cuñado, abuelos, tías y primos: Por el apoyo y cariño que me han brindado siempre.

A Lulú: Por ser mi compañera durante esta aventura, por las risas, por escucharme siempre y por tu valiosa amistad. Te quiero mucho amiga.

A Tona: Por tus consejos, tu apoyo, tu amistad y por motivarme a seguir adelante. Te admiro y te quiero amiga.

A Kike: Por tu apoyo, tu cariño, tu paciencia y por siempre creer en mí. Te quiero mucho.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Por la amistad y apoyo que me han brindado: Manuel, Thelma, Gris, Gaby, Víctor, Alfredito, Wow, Elieth, Wendy, Misael, Jaqueline y Ángeles.

A María del Carmen García Rodríguez: Por la amistad, la confianza y por creer en mí siempre. Espero seguir aprendiendo más de ti. Gracias

A José Pedraza Chaverri: Por el apoyo, el cariño y la confianza.

DEDICATORIA

Con toda mi gratitud y amor dedico esta tesis a...

MIS PADRES:

Porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles, y porque el orgullo que sienten por mí fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión, sus regaños y sus consejos.

Espero nunca defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

LOS AMO.

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



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Genotoxicidad y mutagénesis	3
1.2. Estrés oxidante (EOx).....	4
1.3. Especies reactivas de oxígeno (ERO's).....	5
1.4. Estrés oxidante inducido por metales pesados	5
1.5. Antioxidantes	8
1.6. Polifenoles.....	10
1.7. (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG).....	11
1.7.1. Actividad antioxidante	12
1.7.2. Actividad antimutagénica.....	13
1.7.3. Actividad antiproliferativa y apoptótica.....	13
1.8. Evaluación de genotoxicidad	14
1.9. Micronúcleos.....	15
1.10. Electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa)	17
1.11. 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina	18
1.12. Apoptosis y necrosis	20
1.13. Evaluación de citotoxicidad	23
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24

III. HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos particulares	25
V. MATERIAL Y MÉTODO	26
5.1. Animales	26
5.2. Reactivos	26
5.3. Diseño experimental	27
5.4. Micronúcleos	29
5.5. Apoptosis y viabilidad celular	29
5.6. Electroforesis alcalina de células individuales	30
5.7. Determinación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina	30
5.8. Evaluación del sistema antioxidante	31
5.9. Análisis estadístico	33
VI. RESULTADOS	34
6.1. Evaluación de MN	34
6.2. Relación EPC/ENC y viabilidad celular	37
6.3. Reparación del daño al ADN	39
6.3.1. Niveles de 8-OHdG	39
6.3.2. Ensayo cometa	40
6.4. Capacidad antioxidantes total	45
6.5. Glutación total	46
6.6. GPx	47
6.7. Catalasa	48
6.8. Evaluación de apoptosis y necrosis	49

VII. DISCUSIÓN.....	51
VIII. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES.....	61
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
X. ANEXOS.....	75
ANEXO 1.....	75
ANEXO 2.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Metabolismo del cromo y su genotoxicidad.....	7
Figura 2. Sistemas antioxidantes enzimáticos y reacciones que catalizan.....	8
Figura 3. Estructura química de la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG).....	11
Figura 4. Mecanismos de formación de MN en eritrocitos.....	16
Figura 5. Negativos de microfotografía de patrones típicos de migración del ADN.	18
Figura 6. Formación del aducto 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG).	20
Figura 7. Procesos de apoptosis.....	21
Figura 8. Proceso de necrosis.	22
Figura 9. Protocolo empleado para las evaluaciones.....	28
Figura 10. Reciclaje de GSH.....	32
Figura 11. Inducción neta de MN.....	35
Figura 12. Inducción diferencial de MN.....	36
Figura 13. Células viables y no viables.....	38
Figura 14. Niveles de 8-OHdG.....	39
Figura 15. Promedios de cometas.....	40
Figura 16. Cantidad de ADN en la cauda de cometas.....	41
Figura 17. Clasificación del nivel de daño de los cometas (Observadas a 40x).	42
Figura 18. Unidades arbitrarias de cometas por grupos.....	43
Figura 19. Unidades arbitrarias de cometas por horas.....	44
Figura 20. Capacidad antioxidante total.....	45
Figura 21. Concentración del glutatión total.....	46
Figura 22. Actividad de GPx.....	47
Figura 23. Actividad de CAT.....	48
Figura 24. Células apoptóticas.....	49
Figura 25. Células necróticas.....	50
Figura 26. Vías de protección de la EGCG contra el daño cito/ genotóxico de CrO ₃	60
Cuadro 1. Promedios de EPC/ENC.....	37

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

$\cdot\text{O}_2$	Radical superóxido.
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo.
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete.
8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina.
8-oxodG	8-oxo-deoxiguanosina.
8-oxoG	8-oxo-7,8-dihidroguanina.
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis o ácido 3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfónico.
AC	Aberraciones cromosómicas.
AChE	Conjugado de 8-OHG-acetilcolinesterasa (del inglés 8-OHG-acetylcholinesterase conjugate).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ANOVA	Análisis de varianza.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosín trifosfato (del inglés adenosine triphosphate).
BER	Reparación por escisión de bases (del inglés Base Excision Repair).
BrEt	Bromuro de etidio.
CAT	Catalasa.
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas.
Cr	Cromo.
Cr(III)	Cromo trivalente.
Cr(VI)	Cromo hexavalente.
CrO₃	Trióxido de cromo.
DMSO	Dimetilsulfóxido.

DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico.
EC	(-)-epicatequina.
ECETOX	Centro europeo de ecotoxicología y toxicología de productos químicos (del inglés European centre for ecotoxicology and toxicology of chemicals).
ECG	(-)-epicatequina-3-galato.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGC	(-)-epigalocatequina.
EGCG	(-)-epigalocatequina-3-galato.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés enzyme-linked immunosorbent assay).
ENC	Eritrocitos normocromáticos.
EOx	Estrés oxidante.
EPA	Agencia de Protección Ambiental (del inglés Enviromental Protection Agency).
EPC	Eritrocitos policromáticos.
ERO's	Especies reactivas de oxígeno.
FDA	Administración de Alimentos y Drogas (del inglés Food and Drug Administration).
GC	Galocatequina.
GPx	Glutación peroxidasa.
GR	Glutación reductasa.
GSH	Glutación reducido.
GSSG	Glutación oxidado.
GST	Glutación S-transferasa.
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno.
HCl	Ácido clorhídrico.
IgG	Inmunoglobulina G.

LD₅₀	Dosis Letal 50 %.
MN	Micronúcleos.
NA	Naranja de acridina.
NaCl	Cloruro de sodio.
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada).
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida).
NaOH	Hidróxido de sodio.
NBT	Nitroazul de tetrazolio.
NER	Reparación por escisión de nucleótido (del inglés Nucleotide Excision Repair).
Nrf2	Factor nuclear [derivado de eritroide 2].
O₂	Oxígeno molecular.
O₃	Ozono.
OECD	Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (del inglés Organization for Economic Cooperation and Development).
OGG1	8-oxo-guanina-glucosilasa.
PBS	Amortiguador de fosfato salino (del inglés Phosphate Buffer Saline).
Purpald	4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol.
RL	Radicales libres.
SOD	Superóxido dismutasa.
TNB	Ácido 2-nitro-5-tiobenzoico.
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.
UA	Unidades arbitrarias.

RESUMEN

Los compuestos de Cr(VI) pueden dañar al ADN mediante el estrés oxidante que se genera durante su reducción de Cr(VI) a Cr(III). Por otro lado, se ha asociado la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) con efectos benéficos para la salud debido a que posee propiedades antioxidantes. Se ha propuesto que los antioxidantes pueden interactuar con las especies reactivas de oxígeno (ERO's) incluyendo a los radicales libres (RL), además de presentar interacción con otros antioxidantes y efectos sobre la quelación de metales y expresión génica. En estudios recientes se ha demostrado que el tratamiento con la EGCG puede contrarrestar el daño genotóxico inducido por los compuestos de Cr(VI); sin embargo, no se han estudiado las posibles vías de protección. Por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto de la EGCG sobre la inducción de micronúcleos (MN), el sistema antioxidante endógeno, la apoptosis y la reparación del daño al ADN en ratones tratados con CrO₃. Cuatro grupos de cinco ratones macho fueron tratados de la siguiente manera: a) testigo, solo se administró el vehículo; b) EGCG, se les administraron 10 mg/kg de EGCG por vía intragástrica; c) CrO₃, se les administraron 20 mg/kg de CrO₃ por vía intraperitoneal; y d) EGCG-CrO₃, se administró la EGCG cuatro horas antes de la aplicación del CrO₃. Se realizaron evaluaciones en sangre periférica de muestras tomadas 48 h después de los tratamientos (para el ensayo cometa también se realizaron evaluaciones a las 4 h y 24 h). El daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃ se corroboró debido al aumento de los promedios de MN y células no viables. La administración de EGCG previa al tratamiento del CrO₃ disminuyó los promedios de MN y células no viables en comparación con el grupo CrO₃. Al realizar las evaluaciones del sistema antioxidante endógeno se observó que la concentración de la capacidad de antioxidantes totales aumentó con los tratamientos de EGCG y EGCG-CrO₃, lo que indica que la EGCG tiene efectos sobre el sistema antioxidante endógeno. La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y los niveles de glutatión total disminuyeron en el grupo EGCG-CrO₃ en comparación con el grupo tratado únicamente con el CrO₃. Sin embargo, la administración sola de EGCG aumento los niveles de glutatión total y disminuyo la actividad de GPx, mientras que, la actividad de catalasa (CAT) aumentó en todos los grupos tratados en comparación con el grupo testigo. Por otra parte, solo se observó un incremento significativo en los niveles del aducto 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) en el grupo tratado con CrO₃ a las 48 h. Al evaluar las rupturas de cadena de ADN se observó un incremento en los promedios de cometas tiempo/dependiente de las 4 a las 24 h en el grupo tratado con CrO₃, los cuales disminuyeron también de forma tiempo/dependiente de las 4 a las 48 h en el grupo tratado con EGCG y CrO₃. En cuanto a las evaluaciones de apoptosis y necrosis solo se observó un incremento significativo en el grupo tratado CrO₃. Estos resultados nos permiten sugerir que la EGCG protege del daño genotóxico inducido por el CrO₃ mediante la inhibición o formación del radical •OH, ya que solo se incrementaron los niveles del aducto 8-OHdG en el grupo tratado con CrO₃. La EGCG pudo capturar directamente el radical •OH o al modular el sistema antioxidante endógeno inhibió su formación. El hecho de que en el grupo tratado con la EGCG y CrO₃ no se incrementaron las células apoptóticas sugiere que la dosis de 8.5 mg/kg no indujo la eliminación de las células con daño en el ADN.



ABSTRACT

Compounds of Cr(VI) can damage DNA through the oxidative stress generated during their reduction from Cr(VI) to Cr(III). On the other hand, (-) - epigallocatechin-3-gallate (EGCG) has been associated with beneficial health effects because it possesses antioxidant properties. It has been proposed that antioxidants can interact with reactive oxygen species (ROS) including free radicals, in addition to interacting with other antioxidants and producing effects on metal chelation and gene expression. Recent studies have shown that treatment with EGCG can counteract the genotoxic damage induced by Cr(VI) compounds; however, the possible routes of protection have not been studied. Therefore, in this study the effects of EGCG on the induction of micronucleus (MN), the endogenous antioxidant system, apoptosis and ADN damage repair in mice treated with CrO₃ were evaluated. Four groups of five male mice were treated as follows: a) control, only the vehicle was administered; b) EGCG, 10 mg/kg of EGCG were administered intragastrically; c) CrO₃, 20 mg / kg of CrO₃ were administered intraperitoneally; and d) EGCG-CrO₃, EGCG was administered four hours before the application of CrO₃. The evaluations were performed in peripheral blood of samples taken 48 h after the treatments (for the comet assay, evaluations were also performed at 4 h and 24 h). The genotoxic and cytotoxic damage induced by CrO₃ was demonstrated because the MN frequencies and non-viable cells increased. The administration of EGCG prior to the CrO₃ treatment decreased the MN frequencies, and non-viable cells compared to the CrO₃ group. When evaluating the endogenous antioxidant system, it was observed that the concentration of the total antioxidant capacity increased with the EGCG and EGCG-CrO₃ treatments, indicating that the EGCG has effects on the endogenous antioxidant system. Glutathione Peroxidase (GPx) activity and total glutathione levels decreased in the EGCG-CrO₃ group compared to the group treated only with CrO₃. However, administration of EGCG alone increased levels of total glutathione, and decreased GPx activity, while catalase activity increased in all treated groups compared to the control group. On the other hand, only a significant increase in the levels of the 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct was observed in the group treated with CrO₃ at 48 h. When evaluating DNA chain ruptures, a time/dependent increase of 4 to 24 h was observed in comet averages in the CrO₃ treated group, which also decreased time/dependent of 4 to 48 h in the group treated with EGCG and CrO₃. Regarding the evaluations of apoptosis and necrosis, only a significant increase was observed in the CrO₃ treated group. These results allow us to suggest that EGCG protects against genotoxic damage induced by CrO₃ by inhibition or formation of the •OH radical, since only levels of the 8-OHdG adduct were increased in the CrO₃ treated group. EGCG was able to directly capture the •OH radical or by modulating the endogenous antioxidant system inhibited its formation. The fact that apoptotic cells were not increased in the group treated with EGCG and CrO₃ suggests that the 8.5 mg/kg dose did not induce the removal of cells with DNA damage.



I. INTRODUCCIÓN

La exposición a agentes mutagénicos, así como el estilo de vida y las deficiencias nutricionales; incrementan la probabilidad de desarrollar enfermedades relacionadas con el daño al ADN tales como algunos tipos de cáncer (Sloczyńska *et al.*, 2014). Un ejemplo de estos mutágenos son los compuestos del cromo hexavalente [Cr(VI)], que inducen daño genotóxico mediante especies reactivas de oxígeno (ERO's) incluyendo los radicales libres (RL) generados durante su reducción a Cr(III) (García-Rodríguez *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2012). En contraparte, varios estudios han revelado que los polifenoles tienen propiedades antioxidantes que resultan benéficas para la salud (Carlonia *et al.*, 2013; García-Rodríguez *et al.*, 2018). En estudios previos en nuestro laboratorio, se demostró que la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) (un polifenol abundante en el té verde), además de tener propiedades antioxidantes pueden reducir el daño genotóxico inducido por compuestos de Cr(VI) (García-Rodríguez *et al.*, 2016). Sin embargo, las vías por las que la EGCG protege a las células contra el daño genético inducido por Cr(VI) aún no están bien esclarecidas. Se ha propuesto que sus propiedades antioxidantes podrían estar mediadas por: (a) su capacidad para eliminar los RL, (b) estimular antioxidantes endógenos, (c) inducir apoptosis y (d) activar mecanismos de reparación del ADN (Singh *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2014; García-Rodríguez *et al.*, 2018).

1.1. Genotoxicidad y mutagénesis

La genotoxicidad es la capacidad que tiene un agente para afectar la estructura del ADN o la de los componentes celulares que regulan la fidelidad del genoma; como el huso mitótico, las topoisomerasas, los sistemas de reparación del ADN y las ADN polimerasas (ICPEMC, 1983; Eastmond *et al.*, 2009). Los agentes genotóxicos, actúan como mutágenos capaces de inducir cambios permanentes en el material genético, lo cual puede conducir a modificaciones heredables en su función, incluyendo mutaciones de genes, alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas (Eastmond *et al.*, 2009).



La inducción del daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varias etapas. El agente genotóxico ingresa al organismo por diferentes vías, se distribuye por la sangre y atraviesa las membranas celulares. Una vez dentro de la célula puede ser reactivo por sí mismo (de acción directa) o bien ser activado por enzimas metabólicas (de acción indirecta). Los daños al ADN suelen ser reparados eficiente o ineficientemente dependiendo de los efectos de los mecanismos de reparación (Ames, 1989). Por su naturaleza, los agentes genotóxicos se clasifican en físicos, biológicos y químicos. Estos últimos son los principales contaminantes y actúan como alquilantes, análogos de bases, agentes de intercalación o inductores de estrés oxidante (EOx), entre otros (Teaf y Middendorf, 2000).

1.2. Estrés oxidante (EOx)

El estrés oxidante se define como un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, que conduce a una interrupción de la señalización redox y el control, que puede alterar las proteínas, lípidos y ADN presentes en los distintos componentes celulares (Sies, 1985; Jones, 2006). Se ha demostrado que en las células con EOx se genera daño directamente al ADN, por el incremento de ERO's y RL que interactúan con el material genético e indirectamente mediante alteraciones en los componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad de los cromosomas. En ambos casos, la acumulación del daño al material genético puede llegar a ocasionar progresión descontrolada del ciclo celular y contribuir a la generación de neoplasias (Ward, 1985). Por lo que el EOx se ha asociado con diversos estados patológicos como el cáncer, Alzheimer, esclerosis múltiple, diabetes, hipertensión, asma, glaucoma y cataratas (Gutteridge y Halliwell, 1992).

1.3. Especies reactivas de oxígeno (ERO's)

“Especies reactivas de oxígeno” es el término que se le da a especies derivadas de oxígeno molecular que son más reactivas que el oxígeno mismo. Este término incluye no sólo al superóxido y a algunos otros radicales de oxígeno sino también a no radicales derivados de oxígeno como el peróxido de hidrógeno y al ácido hipocloroso. Por lo tanto, todos los RL son EROs, pero no todas las EROs son RL (Halliwell y Gutteridge, 2015). Se considera ERO's: (a) el ozono (O_3), que se genera con la unión de un oxígeno al O_2 , (b) el oxígeno singulete (1O_2), que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del O_2 , (c) el anión superóxido ($\cdot O_2^-$), (d) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y (e) al radical hidroxilo ($\cdot OH$). Las ERO's son indispensables para la diferenciación celular y para la muerte celular programada, por lo que su toxicidad depende de la concentración y del contexto en el que se producen; por ejemplo, bajas concentraciones de ERO's estimulan el crecimiento de las células (Hansberg, 2008). En condiciones normales las células metabolizan la mayor parte del oxígeno con la formación de agua sin generar intermediarios tóxicos, mientras que un pequeño porcentaje produce tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son RL ($\cdot O_2^-$ y el $\cdot OH$). Otra fuente endógena de ERO's es el metabolismo de las células defensivas tales como los polimorfonúcleares, los monocitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos. Para que éstas puedan cumplir su función, están dotadas de diversas proteínas, así como de vías metabólicas que generan varias especies químicamente agresivas como H_2O_2 , $\cdot O_2^-$ y el $\cdot OH$. En condiciones normales estas especies reactivas son producidas y utilizadas en compartimentos celulares como los lisosomas que no tienen por qué dañar a las células siempre y cuando los mecanismos antioxidantes de éstas funcionen adecuadamente (Avello y Suwalsky, 2006).

1.4. Estrés oxidante inducido por metales pesados

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 y Del Razo, 2008). Entre los contaminantes químicos considerados como peligrosos se encuentran los metales pesados, se ha informado que la



exposición a estos causa daño a los organismos; como toxicidad en las células, tejidos u órganos, así como también genotoxicidad y carcinogenicidad (Conte *et al.*, 1998). La formación de RL mediada por metales puede causar diversas modificaciones a las bases de ADN (Valko *et al.*, 2006). Particularmente metales como el cromo (Cr) son conocidos por inducir daño celular, inflamación y varios tipos de cáncer (hígado, riñón, pulmón, próstata y piel) (Lee *et al.*, 2012).

Al Cr se le puede encontrar principalmente como Cr(III) y Cr(VI), como resultado de la actividad antropogénica. El Cr(III) es un micronutriente importante, sirviendo como principal receptor de unión a la insulina, mientras que el Cr(VI) es el compuesto de cromo que ha mostrado ser más tóxico y carcinogénico en grandes dosis que otras formas (Lee *et al.*, 2012). Uno de los mecanismos por los que este último causa daño es mediante su reducción de Cr(VI) a Cr(III) en las células, en donde se generan ERO's que contribuyen al daño al ADN y por lo tanto a la actividad carcinógena del Cr(VI) (Wu *et al.*, 2000). El Cr(VI) tiene la capacidad de ingresar a la célula utilizando la vía general de los canales de proteínas transportadoras de aniones (Bridges y Zalapus, 2005), ya dentro de la célula puede ser reducido intracelularmente por moléculas como el H_2O_2 , la glutatión reductasa, los carbohidratos, el ácido ascórbico, el citocromo P450 y el aldehído oxidasa entre otros, aunque también se puede reducir en la piel ya que la metionina, la cisteína, la cistina, el ácido láctico, la hemoglobina y las globulinas han sido consideradas como reductores. El Cr(VI) al ser reducido produce reactivos intermedios como el Cr(V), Cr(IV) y finalmente Cr(III), este último es transportado principalmente por el plasma, predominantemente ligado a la transferrina (Mertz, 1969; O'Brien *et al.*, 2003). Dentro de la célula la reducción se puede llevar a cabo en el retículo endoplasmático, la mitocondria, la membrana plasmática o el núcleo celular (Figura 1) (Norseth, 1981; De Flora *et al.*, 1985). Los reactivos intermediarios generados durante la reducción participan en la producción de ERO's, las cuales pueden desencadenar reacciones con el $\cdot OH$ provocando daño a los ácidos nucleicos mediante el rompimiento de cadena del ADN y la formación de sitios apurínicos/apirimídicos, así como, la inducción de enlaces cruzados (Liu y Dixon, 1969; Mertz, 1969; Bianchi *et al.*, 1980; Tamino *et al.*, 1981; Foulkes, 1990; Vega y Reynaga, 1990; Shi y Dalal, 1992; Bagchi *et al.*, 1997). Este daño en el ADN causado por ERO's conduce a la generación de bases oxidadas, ruptura de las cadenas de ADN, formación de complejos por uniones ADN-ADN o

1.5. Antioxidantes

Un antioxidante es aquella molécula que puede capturar a los RL, prevenir la formación y dispersión de estos, sacrificando su integridad molecular protegiendo así del daño a biomoléculas como proteínas, azúcares, lípidos y ácidos nucleicos. Además, se ha observado que los antioxidantes pueden intervenir en los procesos de reparación celular e inhibir la inducción de mutaciones. Según su origen los antioxidantes se pueden clasificar en a) Endógenos: son aquellos que son sintetizados por la misma célula y b) Exógenos: son los que provienen del exterior del organismo comúnmente consumidos en los alimentos (González-Torres *et al.*, 2000; Venereo, 2002).

Los antioxidantes endógenos se clasifican según su naturaleza química en enzimáticos y no enzimáticos (Rahman, 2007; Lobo *et al.*, 2010). Dentro de los antioxidantes enzimáticos se encuentran principalmente la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT) (Figura 2). La SOD es una de las enzimas que participan en la transformación de ERO's catalizando la transformación del $\cdot\text{O}_2$ a H_2O_2 . Esta enzima se localiza en el citosol y en la matriz mitocondrial. Por su parte la GPx, que también se encuentra en el citosol y en las mitocondrias, cataliza la reducción de H_2O_2 y lipoperóxidos, para lo cual utiliza como agente reductor al glutatión (GSH). Como resultado de esta reacción el GSH se transforma a su forma oxidada (GSSG). Mientras que la CAT se localiza predominantemente en los peroxisomas, en los que el H_2O_2 se genera a una velocidad relativamente alta. Esta enzima cataliza la conversión de H_2O_2 en agua y oxígeno molecular. Otras sustancias de naturaleza enzimática que también tienen actividad antioxidante son la glutatión reductasa (GR) y la glutatión S-transferasa (GST) (Forman *et al.*, 2009; Rizzo *et al.*, 2010).

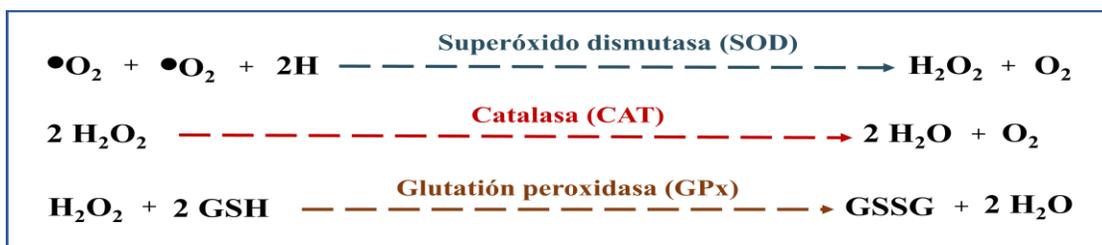


Figura 2. Sistemas antioxidantes enzimáticos y reacciones que catalizan (Modificado de Paredes y Roca, 2002)

Entre los antioxidantes no enzimáticos, el GSH junto con las enzimas que intervienen en su ciclo redox forman uno de los principales sistemas de la defensa celular antioxidante. El GSH es un tripéptido formado por residuos de aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys) y es el tiol no proteico más abundante a nivel intracelular (Martínez-Sarrasague *et al.*, 2006). El GSH interviene en la protección celular contra el daño oxidante tanto de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Esta molécula actúa mediante la interacción con radicales como el $\cdot\text{O}_2$, el $\cdot\text{OH}$ y el óxido nítrico, además, de presentar una interacción sinérgica con otros agentes antioxidantes como el ácido ascórbico, la vitamina E y la SOD. Asimismo, el GSH protege contra el daño oxidante reduciendo las concentraciones de H_2O_2 e incluso proporcionando un electrón para la reducción de peróxidos en la reacción catalizada por la GPx. El producto final de la oxidación de GSH, el GSSG, (constituido por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro) es regenerado por la GR, esta enzima le transfiere electrones de NADPH, de esta manera el GSSG es reducido a GSH, de modo que, durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR, el GSH no es consumido sino reciclado. Además de sus funciones como antioxidante, el GSH es parte importante de la desintoxicación de xenobióticos, es esencial para la proliferación celular y tiene un papel importante en la apoptosis, ya que su disminución promueve la activación de caspasas y la progresión de los mecanismos de apoptosis (Konigsberg, 2008; Martínez- Sámano *et al.*, 2011). Dentro de las células el GSH se encuentra principalmente en las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el núcleo, donde se observa un aumento de su concentración durante la apoptosis.

Por otra parte, los antioxidantes exógenos también pueden agruparse dentro de los antioxidantes no enzimáticos. Los antioxidantes exógenos son una categoría heterogénea de moléculas y su efectividad depende de sus características químicas y su ubicación física dentro de un alimento (proximidad a los fosfolípidos de la membrana, las interfaces de la emulsión o en la fase acuosa) (Tuberoso *et al.*, 2013). Dentro de los antioxidantes que se pueden encontrar en la dieta están los retinoides, los carotenos, la vitamina C, la vitamina E (tocoferoles), los licopenos y los polifenoles (flavonoides y no flavonoides). Particularmente, los polifenoles han adquirido gran interés debido a sus beneficios para la salud. Se encuentran en muchos tipos de plantas comestibles y también en bebidas como el vino tinto; sin embargo, el chocolate y el té verde (*Camellia sinensis*) son las fuentes más ricas.



1.6. Polifenoles

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos se denominan polifenoles. Se originan principalmente en las plantas como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) (Quiñones *et al.*, 2012). Además, los compuestos polifenólicos al ser omnipresentes en todos los órganos de las plantas son, por lo tanto, una parte integral de la dieta humana y van desde simples compuestos anulares de bajo peso molecular hasta complejos grandes como taninos y polifenoles derivados (Crozier y Jaganath, 2009).

En la última parte del siglo XX, el interés en los polifenoles presentes en alimentos se ha incrementado, una de las principales razones es debido a que se ha descrito que los polifenoles tienen propiedades antioxidantes que pueden resultar benéficos a la salud, mediante reacciones de transferencia de electrones y formación de un intermediario estable que los ayuda a unirse a RL (Fuhrman y Aviram, 2002; Manach *et al.*, 2004). Se han descrito más de 8000 polifenoles que pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y el tipo de sustituyente unido a estos anillos. Las principales clases de polifenoles con una amplia distribución en los alimentos son: flavonoides, ácidos y alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos. Los flavonoides son el grupo más estudiado, en la actualidad, se han identificado más de 4000 compuestos diferentes (Bravo 1998; Tasao, 2010).

Dentro de las fuentes más ricas de polifenoles se encuentran el vino tinto, el chocolate y el té verde (*Camellia sinensis*). A este último se le han atribuido efectos benéficos para la salud debido su alto contenido de compuestos polifenólicos, particularmente al de las catequinas que conforman el 30% del peso seco de las hojas. Las principales catequinas en el té verde son la epigalocatequina-3-galato (EGCG), la (-)-epicatequina-3-galato (ECG), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-epicatequina (EC), (+)- galocatequina (GC) y (+)-catequina (Zaveri, 2006).

1.7. (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG)

La EGCG (Figura 3) es el compuesto polifenólicos perteneciente a las catequinas más abundante en el té verde (59% del total de catequinas) (Cabrera *et al.*, 2006). Una taza de esta bebida puede contener en promedio 80 y hasta 200 mg de EGCG, de acuerdo con la USDA (2007); sin embargo, el contenido de catequinas en el té verde varía dependiendo de cómo se procesan las hojas antes de secar, de las condiciones de cultivo (suelo, clima, prácticas agrícolas, fertilizantes), de las propiedades de la planta (variedad, edad, etc.) y de la preparación de la infusión (cantidad de producto utilizado, tiempo de preparación, temperatura, etc.) (Hakim *et al.*, 2000; Wu, 2002). La EGCG también puede encontrarse en otros vegetales como las manzanas, las moras, los duraznos y las nueces, sin embargo, la principal fuente es el té verde (Harnly *et al.*, 2006).

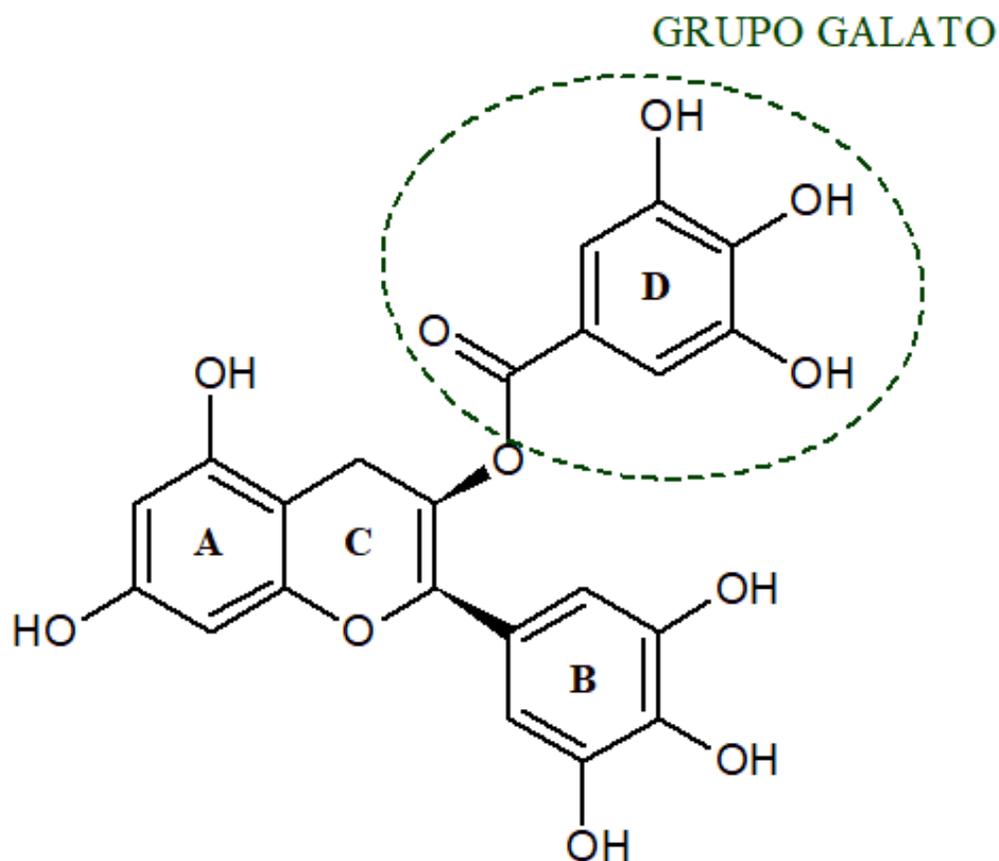


Figura 3. Estructura química de la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG)

La EGCG se absorbe predominantemente en el intestino, en el yeyuno y el íleon, a través de la difusión paracelular a través de las células epiteliales (Moore *et al.*, 2009). EGCG está presente en el plasma en una forma libre en gran medida (más del 77%) (Lee *et al.*, 2002). El EGCG se metaboliza en formas metiladas en diferentes órganos mediante catecol-O-metiltransferasa, produciendo principalmente di-metoxi-EGCG (di-OMe-EGCG) (Meng *et al.*, 2002). Por otro lado, la EGCG puede ser metabolizada por el microbiota intestinal y sus metabolitos excretados a través de vías biliares y urinarias (Schantz *et al.*, 2015).

Se ha observado que la EGCG posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticarcinogénicas y se ha descrito que posiblemente su potente efecto antioxidante se debe a que presenta ocho grupos hidroxilo distribuidos en sus anillos A y B y a su grupo galato, el cual le confiere un alto potencial antioxidante (Konigsberg, 2008, Legeay *et al.*, 2015). Se ha identificado que el anillo B es el principal sitio para las reacciones antioxidantes de la EGCG (Valcic *et al.*, 1999).

1.7.1. Actividad antioxidante

En muchos estudios se ha demostrado que la EGCG puede proteger contra el estrés oxidante en sistemas *in vitro* (Koh *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2008). En células Jurkat tratadas con 12-*o*-tetradecanoilforbol-13-acetato, la EGCG es un eficiente secuestrador de $\cdot\text{OH}$ con una tasa reactiva constante comparable con varios antioxidantes, tales como el ascorbato, el GSH y la cisteína. Además, también se ha observado que *in vitro* la EGCG es secuestradora de $\cdot\text{O}_2$ y puede inhibir el daño al ADN inducido por Cr(VI) mediante la captura de radicales $\cdot\text{OH}$ (Shi *et al.*, 2000). En otro estudio se observó que la EGCG (30 mg/kg al día durante 21 días administrados por vía oral utilizando una sonda) protegía las mitocondrias de la peroxidación lipídica provocada por un infarto al miocardio inducido químicamente utilizando isoproterenol en ratas. Asimismo, también se informó que la EGCG induce efectos antioxidantes sobre las mitocondrias del corazón de ratas expuestas a isoproterenol al disminuir la peroxidación lipídica e hidroperóxidos lipídicos en el orgánulo, así como a regular positivamente las actividades de SOD mitocondrial, CAT, GPx, GR y GST. Además, se encontró que la EGCG regula niveles de GSH (Devika y Prince, 2008-a).

1.7.2. Actividad antimutagénica

Se ha demostrado la actividad antimutagénica de la EGCG contra la mutagenicidad de la aflatoxina B1, la 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f] quinolina y la N-nitroso-N-metilurea mediante el ensayo de MN en ratones (Šmerák *et al.*, 2006). En cultivos de células de mamífero, se ha observado que la EGCG tiene efectos inhibidores contra las mutaciones resistentes a 6-tioguanina inducidas por 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) en células V79 de criceto chino. En este trabajo, se encontró únicamente la actividad antimutagénica de la catequina cuando las células se post-trataron con la catequina durante el tiempo de expresión de la mutación después del tratamiento con 4NQO (Kuroda, 1996). En un estudio en el que se administraron 10 mg / kg de EGCG a ratones CD-1, describieron que ésta disminuía los micronúcleos en ratones tratados con CrO₃, sugiriendo que este polifenol protegía del daño genotóxico (García-Rodríguez *et al.*, 2014).

1.7.3. Actividad antiproliferativa y apoptótica

En estudios previos se ha demostrado que la EGCG afecta un gran número de factores asociados con la progresión del ciclo celular y la inducción de muerte, entre ellos se ha propuesto la inhibición de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), la inactivación del factor NFκB y la inducción de la expresión de p21 y p27 (Singh *et al.*, 2011). Además, Nakazato *et al.* (2005) observaron que la EGCG induce apoptosis de células B malignas a través de la producción de ERO's. También Gupta *et al.* (2000) encontraron que el tratamiento de células de cáncer de próstata DU145 y LNCaP con EGCG resultó en la inducción de apoptosis de forma dosis-dependiente. Liang *et al.* (1999), informaron que la EGCG bloqueó la progresión del ciclo celular en fase G1 de células MCF-7 de carcinoma mamario, posiblemente mediante la inhibición de las CDK 2 y 4.

1.8. Evaluación de genotoxicidad

Las evaluaciones de daño genotóxico no solo son indispensables para detectar agentes genotóxicos y sus mecanismos inductores, sino también sustancias con propiedades protectoras o moduladoras de daño al ADN (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007). 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 (también conocido como ensayo cometa) (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 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).

Para evaluar daño genotóxico se recomienda iniciar con ensayos de tamizaje como los son los de mutaciones, ensayos *in vitro* empleando células de mamíferos (frecuencia de aberraciones cromosómicas) *in vivo* empleando médula ósea o sangre periférica (frecuencia de micronúcleos) (Krishna y Hayashi, 2000).

1.9. Micronúcleos

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

Los MN se pueden originar por alguno de estos eventos:

- a) Daño a nivel de las proteínas involucradas, directa o indirectamente, en la segregación de cromosomas, esto incluye inhibición en el ensamble o desensamble de microtúbulos, remoción de cinetocoros, daños al centriolo, centrómero inactivado, entre otros (daño aneuploidógeno) (Figura 4A).
- b) Aberraciones cromosómicas que conllevan a la formación de fragmentos acéntricos (daño clastógeno) (Figura 4B).

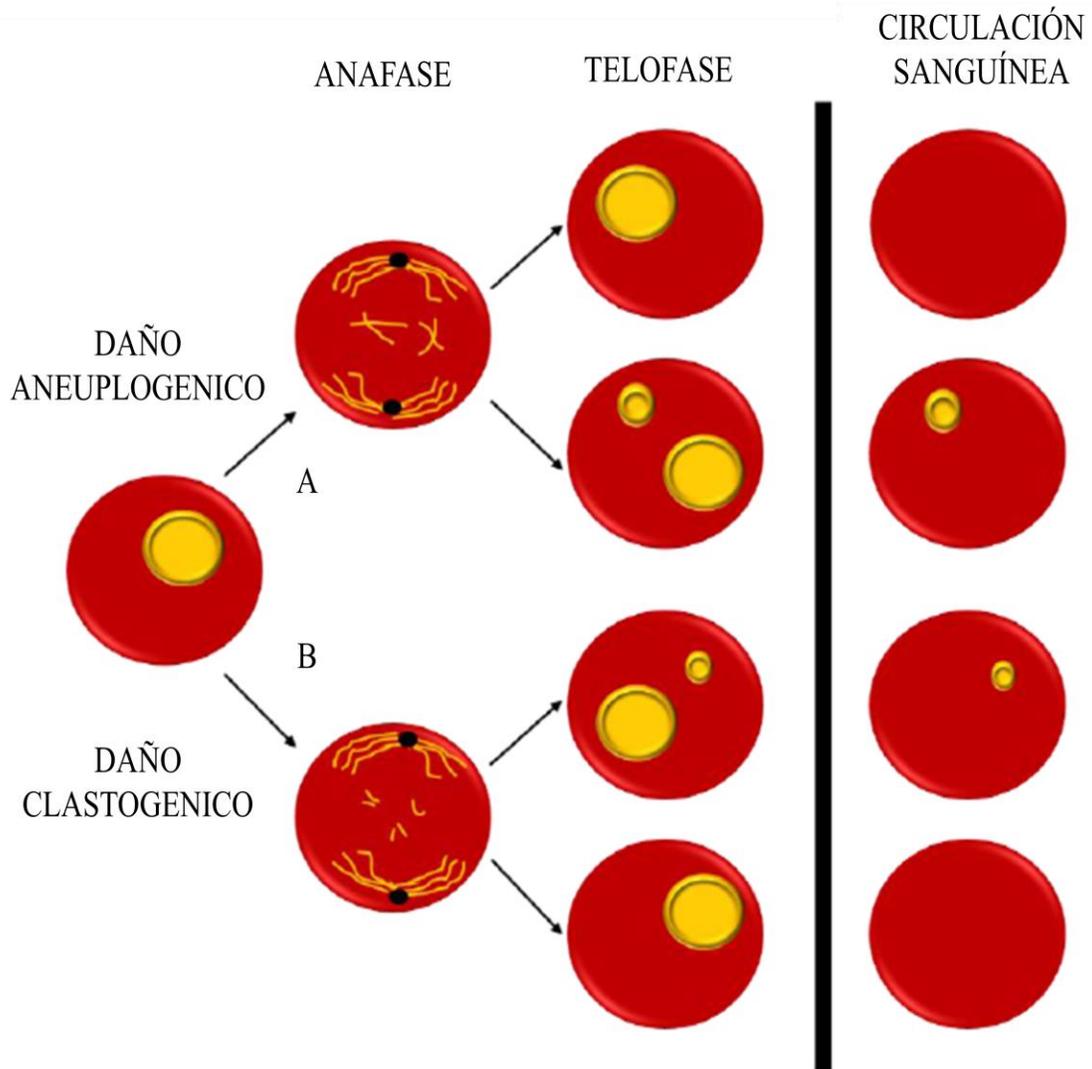


Figura 4. Mecanismos de formación de MN en eritrocitos (Tomado de Ramos-Leon, 2016).

La técnica de MN es un ensayo *in vivo* que se puede realizar en cualquier tejido que esté en proliferación, puede ser en medula ósea o en eritrocitos de sangre periférica de animales donde el bazo no elimine eritrocitos micronucleados (FDA, 2000). Cuando los eritrocitos policromáticos (EPC) son expulsados de la medula ósea, el núcleo queda extruido y si un MN se ha formado permanece en el citoplasma, estos eritrocitos aun contienen ARN y son basófilos lo que los diferencia fácilmente de eritrocitos normocromáticos (ENC) en los que se ha degradado el ARN y son acidófilos.

Con los MN se puede identificar la respuesta a la mezcla compleja de contaminantes y representa un índice valioso para la detección de daño genético acumulado durante la vida de las células (Bolognesi y Hayashi, 2011). Se caracteriza por su simplicidad, fiabilidad, sensibilidad y rapidez. Además, es ampliamente utilizado para detectar la genotoxicidad de contaminantes ya sean clastogénicos y/o aneugénicos, así como para evaluar las aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (Rocha *et al.*, 2011). Un incremento en la frecuencia de MN en animales tratados con agentes químicos, indica que éstos son inductores de daño cromosómico (Hayashi *et al.*, 2000).

1.10. Electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa)

La electroforesis alcalina de células individuales (del inglés: *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*), también conocido como el ensayo cometa, es una prueba que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos (Kassie *et al.*, 2000).

El ensayo cometa fue descrito originalmente por Ostling y Johanson (1984) como una técnica simple y rápida para medir el daño del ADN; sin embargo, las condiciones neutras limitaban su utilidad, por lo que, en 1988, Singh *et al.*, introdujeron una técnica en microgeles que involucra la electroforesis en condición alcalina, para detectar el daño al ADN en células individuales (Olive *et al.*, 1990). El principio básico del ensayo alcalino es la migración del ADN en una matriz de agarosa en condiciones de electroforesis bajo voltaje (30 Volts/cm) luego, al ser observada la célula al microscopio (por fluorescencia o por tinción con plata del material nuclear), presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear) y cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo) (Figura 5) (Singh *et al.*, 1988; Rodríguez-Rey *et al.*, 2016). El protocolo de este ensayo ha quedado bien establecido para detectar el daño al ADN, sobre todo por las rupturas de cadena, la formación de sitios lábiles al álcali, los entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas. La aplicación más reciente se ha centrado en la evaluación de los mecanismos de reparación de daño oxidante en el ADN en células eucariotas obtenidas tanto de estudios *in vivo* como *in vitro* (Lagroye *et al.*, 2004).

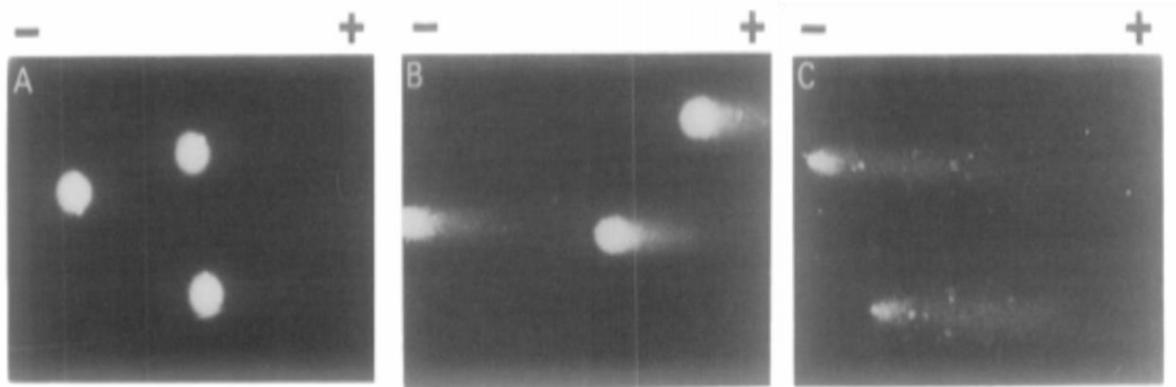


Figura 5. Negativos de microfotografía de patrones típicos de migración del ADN. (A) linfocitos humanos no tratados: (B) linfocitos humanos expuestos a 50 rads rayos de rayos X C) linfocitos humanos expuestos a 100 rads de rayos X (Tomado de Singh et al., 1988).

Las ventajas de la técnica incluyen: (1) la recopilación de datos a nivel de la célula individual, permitiendo análisis estadísticos más robustos; (2) la necesidad de un número pequeño de células por muestra (<10.000); (3) su sensibilidad para detectar daño al ADN; y (4) que prácticamente cualquier población de células eucariotas es susceptible de análisis (Singh *et al.*, 1988; Malyapa *et al.*, 1998).

1.11. 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

Se ha observado que el $\bullet\text{OH}$ preferentemente reacciona con los átomos C8 de las purinas del ADN, ocasionando la oxidación de nucleósidos en el ADN e induciendo la formación de aductos como el 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (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 (Valko *et al.*, 2007; Flora y Gupta, 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 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 nucleótido (NER) (Figura 6) (Floyd *et al.*, 1986; Chengs *et al.*, 1992; 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).

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). 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).

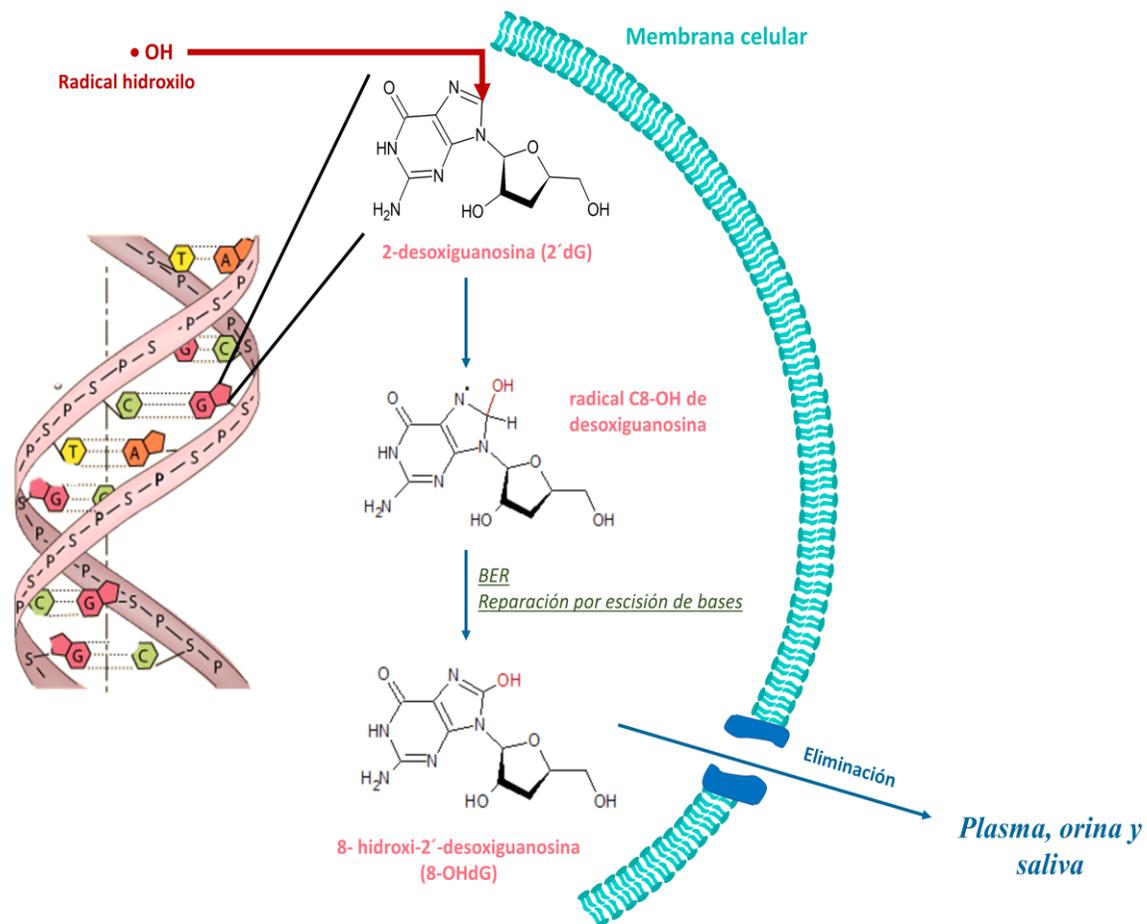


Figura 6. Formación del aducto 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). El $\bullet\text{OH}$ interacciona con la 2-desoxiguanosina formando el radical C8-OH de la desoxiguanosina que forma un aducto. Al activarse los mecanismos de reparación (reparación por escisión de bases-BER), se elimina el aducto 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) por lo que puede ser cuantificado en fluidos como sangre, orina y saliva.

1.12. Apoptosis y necrosis

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

La apoptosis (Figura 7) se presenta como un mecanismo para eliminar células anómalas de una forma controlada, sin afectar a las células vecinas. Los restos celulares resultantes, que están siempre rodeados de membrana plasmática, son eliminados mediante fagocitosis, evitando la inflamación en esta zona. Además de que la apoptosis es un proceso celular importante para el desarrollo y para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos, juega un papel fundamental como mecanismo de protección contra la carcinogénesis mediante la eliminación de las células dañadas genéticamente, por lo cual también se ha considerada como un marcador de daño al ADN (Hayashi *et al.*, 1990; Blankenberg, 2008).

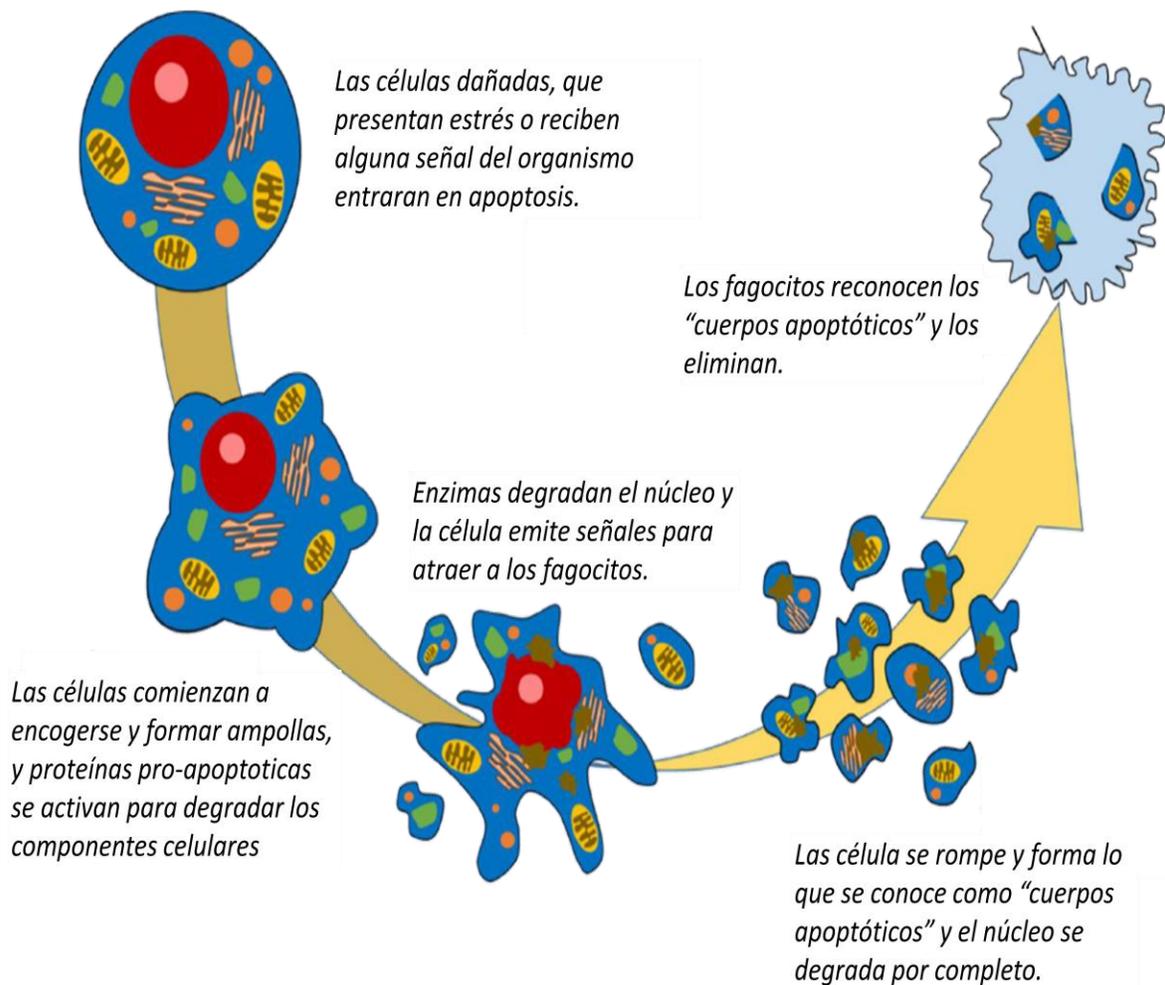


Figura 7. Procesos de apoptosis (Tomado de Ramos-Leon, 2016).

Por su parte, la necrosis (Figura 8) ocurre de manera aguda, por una forma no fisiológica, mediante una agresión que causa lesión en una porción importante del tejido. Este proceso es desencadenado por toxinas, hipoxia severa, agresión masiva y cualquier otra condición que genere disminución de ATP. En el proceso de necrosis se crean cambios histológicos, debido a que hay ganancia de volumen celular, desorganización y lisis del citoplasma, así como dilatación del retículo endoplásmico y las mitocondrias aunado a una disolución de la cromatina, pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática y fragmentación al azar del ADN. Debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular, el contenido del citoplasma es vertido al espacio extracelular, se genera el proceso de inflamación, en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitosis (Elena, 2002; Ramírez y Rojas, 2010).

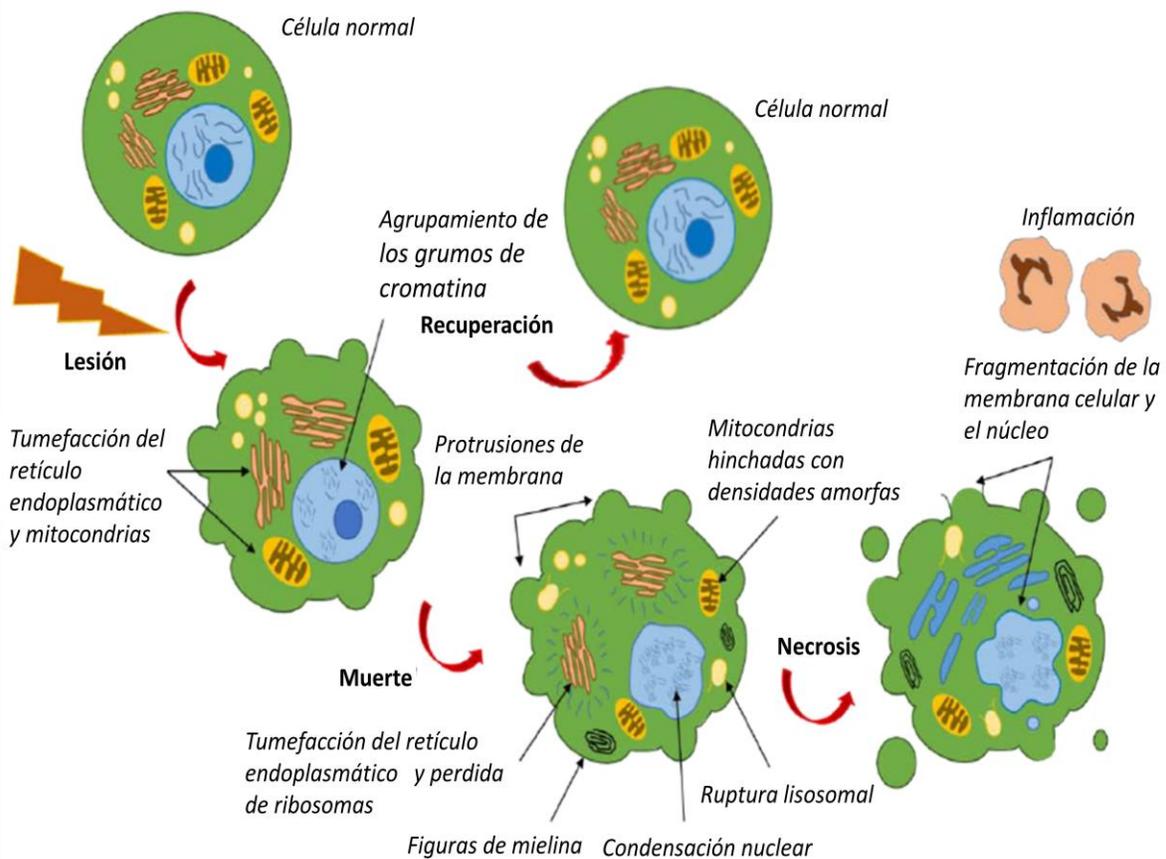


Figura 8. Proceso de necrosis (Tomado de Ramos-Leon, 2016).

1.13. Evaluación de citotoxicidad

El análisis de la muerte celular puede realizarse tanto *in vivo* como *in vitro*. Existen varios métodos que permiten diferenciar entre la muerte por apoptosis y necrosis. Las valoraciones de la integridad de la membrana a través de la tinción con colorantes vitales pueden ser específicos si se analizan las características morfológicas de las células directamente (Allen *et al.*, 1997). El método por tinción diferencial con fluorocromos, utilizando una mezcla de los colorantes naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BrEt), es uno de los métodos utilizados para la evaluación de apoptosis y necrosis. El NA se puede intercalar en el ADN (coloración amarilla), mientras que el BrEt se introduce únicamente a las células con pérdida de integridad de la membrana plasmática, mostrando una fluorescencia roja. Además, que con esta técnica se puede diferenciar a las células apoptóticas tempranas (amarilla con inicio de fragmentación nuclear) de las apoptóticas tardías (roja-fragmentada) (McGahon *et al.*, 1995; García-Rodríguez *et al.*, 2013).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los compuestos de Cr(VI) pueden dañar al ADN mediante la producción de ERO's y RL que se generan durante su reducción de Cr(VI) a Cr(III). En contraparte se ha observado que compuestos polifenólicos como la EGCG son capaces de reducir el daño genotóxico inducido por compuestos de Cr(VI), de ahí que es de interés indagar las posibles vías de protección. En el presente estudio se planteó la siguiente pregunta:

¿Hay relación entre los efectos de la EGCG sobre el sistema antioxidante endógeno, la reparación del daño al ADN y la apoptosis, con el daño genotóxico inducido por el CrO₃?

III. HIPÓTESIS

Si los compuestos de Cr(VI) inducen daño genotóxico y citotóxico mediante la generación de EOx y la EGCG es un polifenol con alto potencial antioxidante entonces, la administración por vía oral de la EGCG disminuirá el daño genotóxico y citotóxico inducido por la administración de CrO₃ mediante el restablecimiento del sistema antioxidante endógeno, la activación de los mecanismos de reparación del ADN y la inducción de apoptosis.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar los efectos de la EGCG sobre la inducción de MN, el sistema antioxidante endógeno, la apoptosis y la reparación del daño al ADN en ratones tratados con CrO_3 .

4.2. Objetivos particulares

- 1-Estudiar el efecto de la EGCG sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por CrO_3 mediante la evaluación de MN, la relación de EPC/ENC y la viabilidad celular.
- 2-Evaluar el efecto de la EGCG sobre la reparación del ADN mediante las determinaciones de los niveles de 8-OHdG y el ensayo cometa en ratones tratados con CrO_3 .
- 3-Establecer el efecto de la EGCG sobre la apoptosis en ratones tratados con CrO_3 .
- 4-Medir los niveles de antioxidantes totales, GPx, CAT y glutatión total y cuantificar el efecto de la EGCG en ratones tratados con CrO_3 .

V. MATERIAL Y MÉTODO

5.1. Animales

Se emplearon ratones machos de la cepa Hsd:ICR de 2 a 3 meses de edad, provenientes del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Los ratones se aclimataron en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, donde se mantuvieron bajo condiciones ambientales de temperatura (22°C) y circulación de aire controladas, con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad y bajo una dieta a base de alimento comprimido (NUTRI-CUBOS, Purina^{MR}) y libre acceso a agua.

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo fueron establecidos en base a los lineamientos de los programas GENOTOX, ECETOX, la EPA, la OECD, la FDA y la NOM-062-ZOO-1999 (Heddle *et al.*, 1983; EPA, 1984; Mavournin *et al.*, 1990; Hayashi *et al.*, 1994; FDA, 2000). El Comité de Bioética de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, aprobó los protocolos experimentales utilizados en el estudio (número de registro FESZ/DEPI/363/14).

5.2. Reactivos

Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, EUA). Como colorantes en la técnica de MN, ensayo cometa, apoptosis y viabilidad celular se utilizó naranja de acridina (NA) [CAS No. 10127-02-3] y bromuro de etidio (BrEt) [CAS No. 1239-45-8]. Para ensayo cometa se empleó agarosa punto normal [CAS 9012-36-6], agarosa bajo punto de fusión [CAS No. 9012-36-6], cloruro de sodio (NaCl) [CAS No. 7647-14-5], hidróxido de sodio (NaOH) [CAS No. 1310-73-2], ácido clorhídrico (HCl) [CAS No. 7647-01-0], ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) [CAS No. 60-00-4], DMSO [CAS No. 67-68-5], Triton X-100 [CAS No. 9002-93-1], Trizma Base [CAS No. 77-86-1], PBS, etanol [CAS No. 64-17-5]. Para los tratamientos fitoquímicos se usó la EGCG [989-51-5] y como agente inductor de daño al ADN se utilizó el CrO₃ [CAS No. 1333-82-0].

Para la evaluación de niveles de 8-OHdG se empleó el Kit ELISA ADN/RNA Daño Oxidante de Cayman [No. 589320] y el Kit ELISA ADN/RNA Daño Oxidante (Clone 7E6.9) de Cayman [No. 501130], para la determinación de antioxidantes totales se utilizó el Kit Cayman [No. 709001], para medir la actividad enzimática de CAT se ocupó el Kit de Cayman [No. 707002], para la actividad enzimática de GPx se utilizó el Kit de Cayman [No. 703102] y para medir los niveles de glutatión total se empleó el Kit glutatión de Cayman [No.703002].

5.3. Diseño experimental

La EGCG y el CrO₃ se prepararon en una solución mediante su disolución en agua destilada estéril, una vez preparados los reactivos se administraron inmediatamente por vía oral (sonda intragástrica) o vía i.p. según el protocolo establecido (Figura 9) en un volumen de alrededor de 0.25 mL por ratón.

Los grupos experimentales se conformaron por cinco ratones cada uno y se dividieron de la siguiente forma:

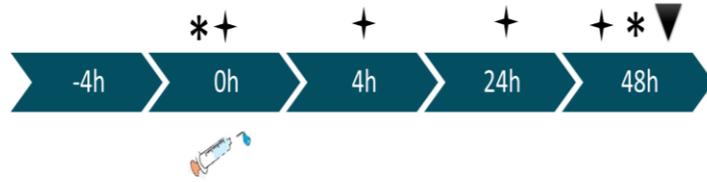
- a) Grupo testigo, se les administró solo el vehículo.
- b) Grupo de polifenol, se les administró 8.5 mg/kg de EGCG.
- c) Grupo Cr(VI), se les administró una dosis de 20 mg/kg de CrO₃.
- d) Grupo experimental, al que se le administró EGCG previo al tratamiento con CrO₃.

Las dosis usadas fueron seleccionadas con base en los resultados obtenidos en estudios previamente realizados en nuestro grupo de trabajo y en lo descrito bibliográficamente (García-Rodríguez *et al.*, 2001, O'Brien *et al.*, 2003).

Una vez establecidas las dosis, así como las condiciones de trabajo, se evaluó la frecuencia de MN, cometas, apoptosis, viabilidad celular, niveles de 8-OHdG y el estado del sistema antioxidante endógeno. En la Figuras 9 se presenta el protocolo para la administración de los tratamientos, así como la toma de muestra.

a) Grupo testigo

Administración de 0.25 mL del vehículo.



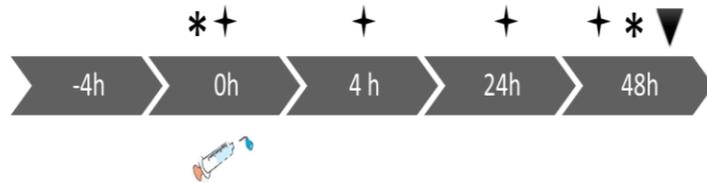
b) Grupo de polifenol (EGCG)

Administración de 8.5 mg/kg vía oral.



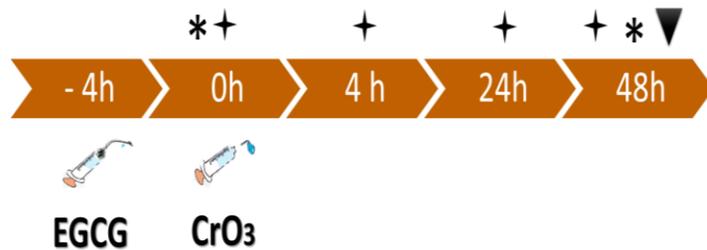
c) Grupo CrO3

Administración de 20 mg/kg Vía i.p.



d) Grupo experimental

Administración de 10 mg/kg vía oral y de 20 mg/kg CrO3 Vía i.p.



Administración vía oral



Toma de muestra para MN



Toma de muestra para ensayo cometa



Administración vía i.p.



Toma de muestra para todas las evaluaciones (excepto MN y ensayo cometa)

Figura 9. Protocolo empleado para las evaluaciones de: MN, EC, apoptosis, viabilidad celular, 8-OHdG, antioxidantes totales, CAT, GPx y GSH en ratones Hsd:ICR.

5.4. Micronúcleos

Las evaluaciones de MN y la relación de EPC/ENC se realizaron de acuerdo con la técnica descrita por Hayashi *et al.* (1990). Se obtuvieron muestras de sangre periférica (5 μ L), se colocaron en laminillas previamente tratadas con NA y se observaron en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y uno de emisión amarilla (Nikon Ophthiphon-2) 24 h después de su preparación.

La tinción de los eritrocitos con NA, permite diferenciar a los ENC de los EPC, ya que estos últimos se tiñen de color rojo debido a la presencia de ARN- ribosomal. Con esta tinción también se pueden identificar a los MN ya que el ADN se tiñe de color amarillo fluorescente. La evaluación del daño genotóxico se realizó contando 4000 EPC por ratón, entre los cuales se identificaron los EPC-MN. Para la evaluación de daño citotóxico, se contaron 2000 eritrocitos totales por ratón, entre los cuales se cuantificó la frecuencia de EPC en relación con los ENC.

5.5. Apoptosis y viabilidad celular

Se preparó una solución de NA/BrEt (100 μ g/mL) de acuerdo con McGahon *et al.* (1995) con modificaciones (García-Rodríguez *et al.*, 2013). Se tomaron muestras de sangre de la vena caudal a las que se le agregó la mezcla de colorantes.

La observación de las muestras se realizó en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y uno de emisión amarilla (Nikon Ophthiphon-2). Se evaluaron 300 células por ratón. Para la determinación de apoptosis y necrosis se cuantificaron las células apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas. Mientras que para el análisis de viabilidad celular se contabilizaron las células viables (sanas + apoptóticas tempranas) y no viables (apoptóticas tardías + necróticas).

5.6. Electroforesis alcalina de células individuales

La electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa) se realizó siguiendo la técnica propuesta por Singh *et al.* (1988), con recomendaciones de Tice *et al.* (2000). Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena caudal (10 μ L) y se observaron en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y uno de emisión amarilla (Nikon Ophthiphon-2). Se evaluaron 300 células por ratón. Además, se calcularon los porcentajes de ADN en la cauda y las unidades arbitrarias según lo propuesto por Collins *et al.* (1995).

5.7. Determinación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

Las determinaciones del aducto 8-OHdG se realizaron en plasma de sangre periférica y orina mediante ensayos inmuno-enzimáticos ELISA (“Kit” ELISA ADN/RNA Daño Oxidante de Cayman No. 589320 para plasma y No. 501130 para orina). Los ensayos se basaban en la competencia entre especies de guanina dañadas oxidativamente en las muestras y un conjugado de 8-OHdG-acetilcolinesterasa (trazador) por un anticuerpo monoclonal de ADN/RNA oxidante limitado. Debido a que la cantidad de trazador se mantenía constante mientras que la concentración de guanina dañada en las muestras variaba, la cantidad de trazador que era capaz de unirse al anticuerpo monoclonal fue inversamente proporcional a la concentración de guanina dañada oxidativamente en las muestras. El complejo de anticuerpo y guaninas dañadas oxidativamente (muestras o trazador) se unieron al anticuerpo de cabra- IgG ratón policlonal que se encontraba unido previamente al pocillo. La placa se lavó para eliminar cualquier reactivo no unido y luego se añadió el reactivo de Ellman (que contenía el sustrato para la acetilcolinesterasa) al pocillo. El producto de esta reacción enzimática tiene un color amarillo y absorbe fuertemente a 412 nm. La intensidad de este color, determinada espectrofotométricamente, fue proporcional a la cantidad de trazador unido al pocillo, que fue inversamente proporcional a la cantidad de 8-OHdG de las muestras durante la incubación. La ventaja de haber utilizado el kit Cayman es que detectaron tres especies de guaninas oxidadas; 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina a partir de ADN, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina a partir de ARN y 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina de ADN o ARN.

5.8. Evaluación del sistema antioxidante

Determinación de la capacidad antioxidante total

La determinación de antioxidantes totales se realizó mediante un “kit” comercial (Cayman No.709001) basado en el método 2,2 ‘-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato] (ABTS) propuesto por Miller *et al.* (1993). Para este ensayo se tomaron muestras de sangre de la vena caudal (100 μ L) y se centrifugaron a 3 000 rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente se recolectó el sobrenadante (plasma) y se realizaron diluciones 1:10. La placa se preparó de acuerdo con las especificaciones del “kit”, en donde, se incubó mioglobina con peróxido de hidrógeno para producir ABTS^{•+}. La cantidad de ABTS producida se controló leyendo la absorbancia a 405 nm. Los antioxidantes presentes en la muestra causaron 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 soluble en agua de vitamina E, el cual se utiliza como un estándar antioxidante. El valor de la capacidad antioxidante total de las muestras analizadas se expresó como un equivalente de la concentración milimolar de solución Trolox.

Glutación total (GSH + GSSG)

El nivel de glutación se determinó en eritrocitos de sangre periférica utilizando un “kit” comercial (Cayman No.703002) mediante el método de reciclaje enzimático de Griffith (1980) (Figura 10). Para este ensayo se tomaron muestras de sangre de la vena caudal (100 μ L) y se centrifugaron a 3 000 rpm durante 10 min a 4°C. Los eritrocitos recolectados (tapón) fueron lisados con agua HPLC helada, posteriormente las muestras se desproteinizaron y se realizaron diluciones 1:10. La placa se preparó de acuerdo con las especificaciones del “kit” y la absorbancia se leyó a 405 nm. En este ensayo el grupo sulfhidrilo de GSH reacciona con DTNB (5,5'-ditio-bis-2- (ácido nitro benzoico), reactivo de Ellman) y produce un ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) de color amarillo, el cual es monitoreado a 405 nm. El disulfuro mixto, GSTNB (GSH y TNB) que se produce simultáneamente, es reducido por la glutación reductasa para reciclar el GSH y producir más TNB. La tasa de producción de TNB es directamente proporcional a esta reacción de reciclaje que a su vez es directamente

proporcional a la concentración de GSH en la muestra. Debido a que se usa GR en este ensayo, se mide la concentración de glutatión (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), por lo tanto, el ensayo refleja el total de glutatión. 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.

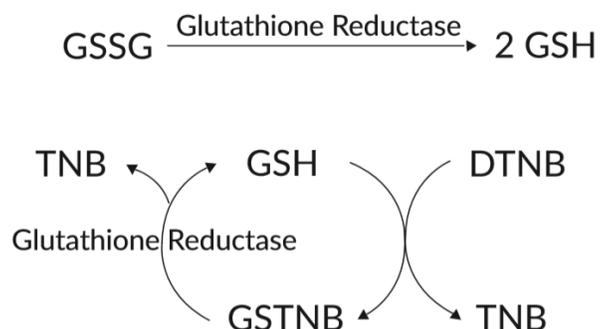
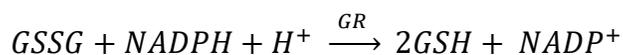
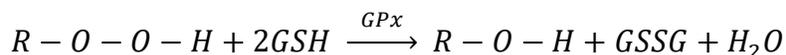


Figura 10. Reciclaje de GSH (Tomado de Griffith, 1980).

Glutatión peroxidasa (GPx)

La determinación de GPx se realizó en muestras de plasma, utilizando un “kit” comercial (Cayman No. 703102). Para este ensayo se tomaron muestras de sangre de la vena caudal (100 μL) y se centrifugaron a 3 000 rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente se recolecto el sobrenadante y se realizaron diluciones 1:10. La placa se preparó de acuerdo con las especificaciones del “kit” y la absorbancia se leyó a 340 nm. El ensayo consistió en medir la actividad GPx indirectamente mediante una reacción acoplada con GR. El GSSG, producido por reducción de hidroperóxido por GPx, es reciclado a su estado reducido por GR y NADPH:



La oxidación de NADPH a NADP⁺ se acompaña de una disminución de la absorbancia a 340 nm. Bajo condiciones en las que la actividad de GPx es limitante de la velocidad, la tasa de disminución en el A₃₄₀ es directamente proporcional a la actividad GPx de la muestra (Paglia y Valentine, 1967).

Catalasa (CAT)

La determinación de CAT se realizó en muestras de plasma, utilizando un “kit” comercial (Cayman No. 707002). Para este ensayo se tomaron muestras de sangre de la vena caudal (100 µL) y se centrifugaron a 3 000 rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente se recolectó el sobrenadante y se realizaron diluciones 1:10. La placa se preparó de acuerdo con las especificaciones del “kit” y la absorbancia se leyó a 540 nm. El ensayo utiliza la función peroxidica de CAT para la determinación de la actividad enzimática. El método se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H₂O₂. El formaldehído producido se mide colorimétricamente con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) como el cromógeno. Purpald forma específicamente un heterociclo bicíclico con aldehídos, que tras la oxidación cambia de incoloro a púrpura (Johansson y Borg, 1988; Wheeler *et al.*, 1990).

5.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron representados en promedios con su desviación estándar, y se comparados mediante un análisis de varianzas, seguido de una prueba de Tukey o Dunnett, empleando el programa estadístico SPSS/PC versión 15 (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001). Para todos los análisis se consideró una p<0.05 como significativa.

VI. RESULTADOS

6.1. Evaluación de MN

A los resultados de MN se les realizó el cálculo de la Inducción Neta debido a la variabilidad que se observó en los promedios de MN basales (es decir cuando aún no se habían administrado los tratamientos) (Anexo 1). Este cálculo parte de la premisa de que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que al restar el número de MN evaluados en la hora 0 a las demás horas restantes, se asume que se obtiene la inducción neta de MN (García-Rodríguez *et al.*, 2001). Este cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Promedios de Inducción Neta} = (\text{MN observados en "A" a la hora } X_1) - (\text{MN observados en "A" a la hora } X_0)$$

Dónde: "A" = grupo evaluado; X_1 = tiempo de evaluación; X_0 = tiempo 0

Al realizar este análisis, se observó que la administración de EGCG no modificó los promedios de MN, mientras que en el grupo tratado con CrO_3 los promedios fueron mayores con respecto al grupo testigo. En el grupo EGCG- CrO_3 , los promedios de MN son 43% menores en comparación con el grupo tratado con CrO_3 . Sin embargo, este dato sigue resultando estadísticamente significativo al compararse con el grupo testigo (Figura 11).

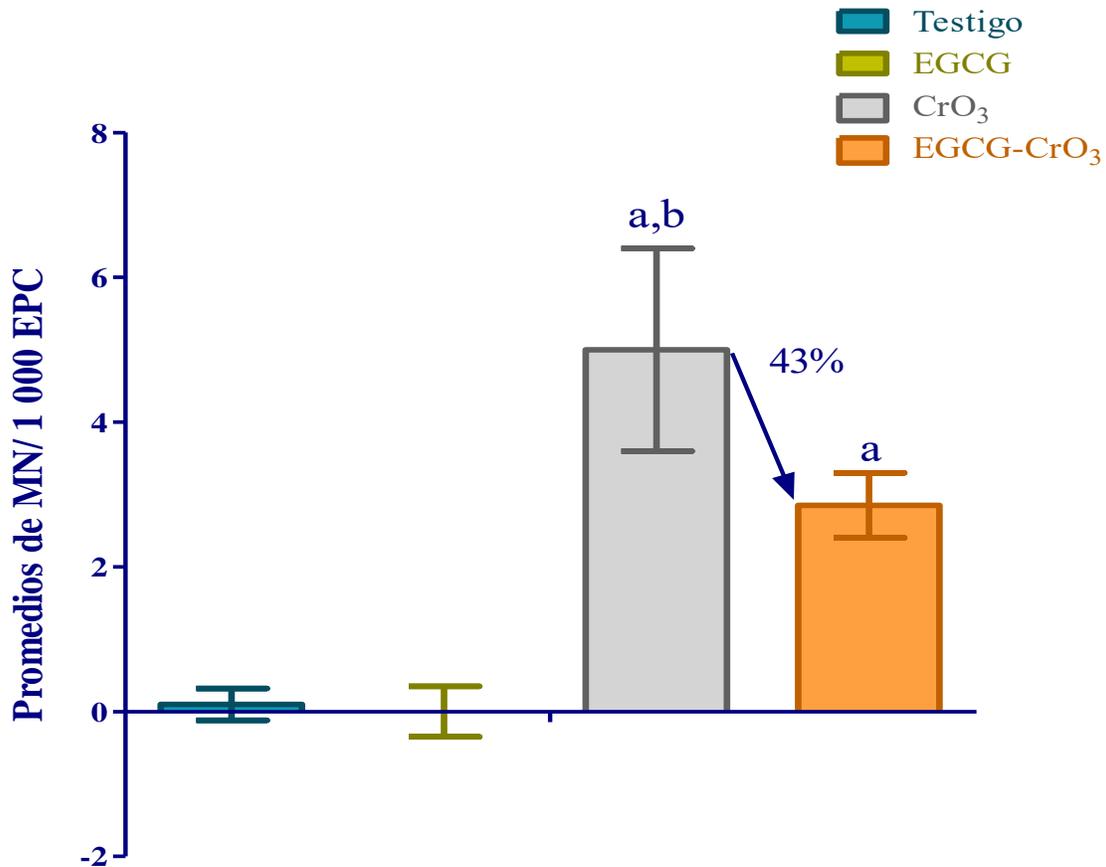


Figura 11. Inducción neta de MN: los datos representan los promedios \pm d.e. de MN obtenidos a las 48 h menos los promedios de MN a las 0 h. Los promedios obtenidos representan la inducción neta de MN, ya que se elimina la variabilidad basal que ocurre entre los grupos antes de la administración de los tratamientos. MN: micronúcleos, EPC: eritrocitos policromáticos, EGCG: (-)-epigallocatequina-3-galato CrO₃: trióxido de cromo. Diferencias significativas indicadas por ^a $p < 0.05$ vs. Testigo; ^b $p < 0.05$ vs. EGCG-CrO₃, $n=5$.

También se calcularon los Promedios de Inducción Diferencial de MN con la intención de descartar los MN inducidos por el manejo de los ratones durante el experimento. El análisis consistió en restar los valores de MN obtenidos en las 0 y 48 h del grupo testigo a sus correspondientes horas de los grupos tratados con EGCG, CrO₃ y EGCG-CrO₃, de tal manera que se observaran los MN inducidos únicamente por los tratamientos (García-Rodríguez *et al.*, 2001). Este cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Promedios de Inducción Diferencial} = (\text{MN observados en "A" a la hora } X_1) - (\text{MN observados en "T" a la hora } X_1)$$

Dónde: "A" = grupo evaluado; X_1 = tiempo de evaluación; "T" = grupo testigo

Al realizar este análisis, se observa el mismo comportamiento en los promedios de MN que en el análisis anterior (Figura 12).

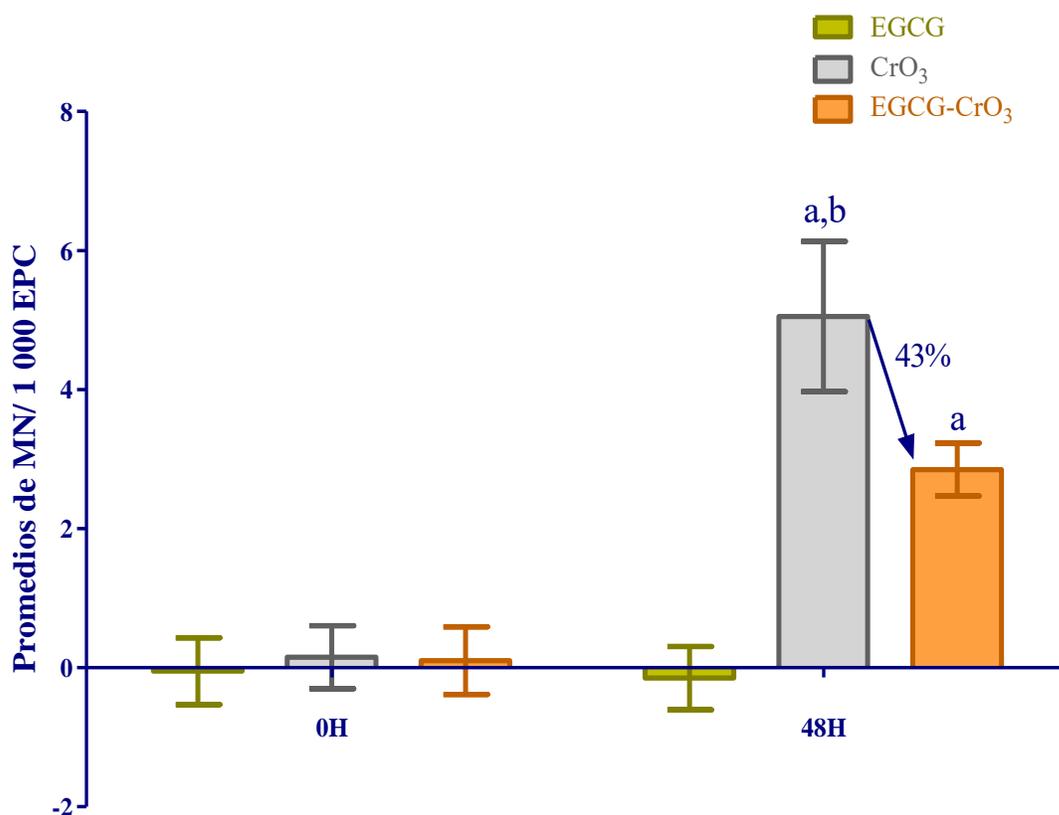


Figura 12. Inducción diferencial de MN: los datos representan los promedios \pm d.e. de MN obtenidos a las 0 y 48 h menos los promedios de MN del grupo testigo. Los promedios obtenidos representan la inducción diferencial de MN, ya que se eliminan los MN inducidos por el manejo de los ratones durante el experimento. MN: micronúcleos, EPC: eritrocitos policromáticos, EGCG: (-)-epigallocatequina-3-galato CrO₃: trióxido de cromo. Diferencias significativas indicadas por *ap* <0.05 vs. Testigo; *bp* <0.05 vs. EGCG-CrO₃, n=5.

6.2. Relación EPC/ENC y viabilidad celular

Cuando se evaluó la relación EPC con respecto a los ENC ningún tratamiento tuvo un efecto significativo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Promedios de EPC/ENC en ratones de la cepa Hsd: ICR tratados con el vehículo, la EGCG, el CrO₃ y la combinación EGCG-CrO₃.

Grupo	Dosis mg/kg	N	Hora	EPC/ENC 1000 Células $\bar{x} \pm d. e.$	ANOVA
Testigo	-----	5	0	68.8 ± 9.8	
			48	75.0 ± 13.2	
EGCG	10	5	0	50.8 ± 6.1	
			48	74.7 ± 27.4	
CrO ₃	20	5	0	49.8 ± 6.3	
			48	66.5 ± 22.8	
EGCG-CrO ₃	10-20	5	0	61.2 ± 10.2	
			48	75.9 ± 13.0	

Significancia estadística $p > 0.05$.

Debido a la alta variabilidad observada en las frecuencias de EPC con relación a los ENC se realizó una técnica basada en una tinción diferencial con NA/BrEt, en donde el NA se introduce únicamente a las células viables (vivas) y el BrEt se introduce a las células no viables (muertas) (McGahon *et al.*, 1995; García-Rodríguez *et al.*, 2013). Los resultados de esta técnica muestran que en el grupo tratado con CrO₃ el promedio de células no viables es significativamente mayor que en el grupo testigo. Cuando se administra la EGCG en combinación con el CrO₃ los promedios de células no viables fueron menores en comparación con el grupo tratado con CrO₃ (Figura 13).

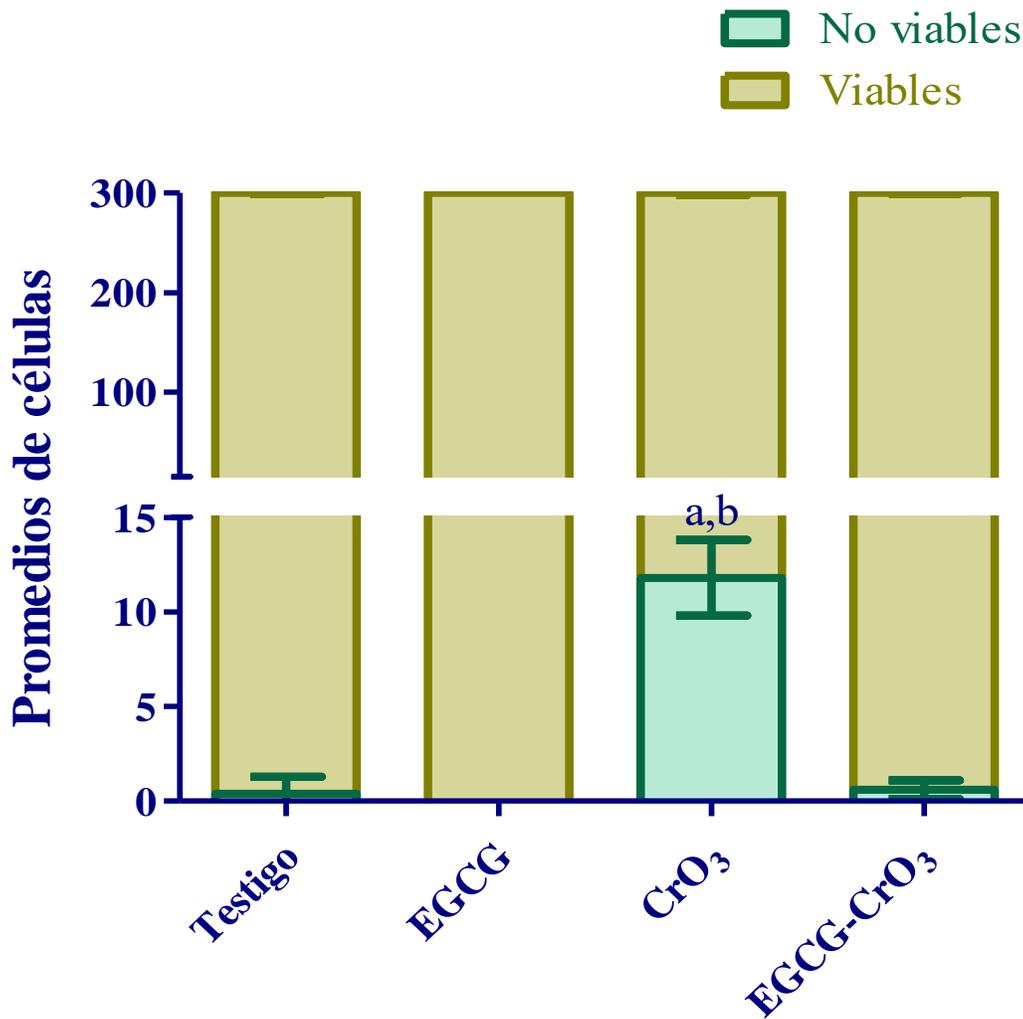


Figura 13. Células viables y no viables: los datos representan los promedios \pm d.e. de las células viables y no viables en ratones tratados con el vehículo, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO_3) y la combinación EGCG- CrO_3 . Se evaluaron 300 células por ratón, $n=5$. Diferencias significativas indicadas por ^a $p < 0.05$ vs. Testigo; ^b $p < 0.05$ vs. EGCG- CrO_3 .

6.3. Reparación del daño al ADN

6.3.1. Niveles de 8-OHdG

Cuando se evaluaron los niveles del aducto 8-OHdG a las 48 h en plasma sanguíneo, no se observaron cambios significativos en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, cuando se evalúan en orina a la misma hora, se observó un incremento significativo solo en el grupo tratado con CrO_3 en comparación con el grupo testigo. En el grupo que se combinaron los tratamientos de EGCG y CrO_3 ya no se observó el incremento en los niveles del 8-OHdG (Figura 14).

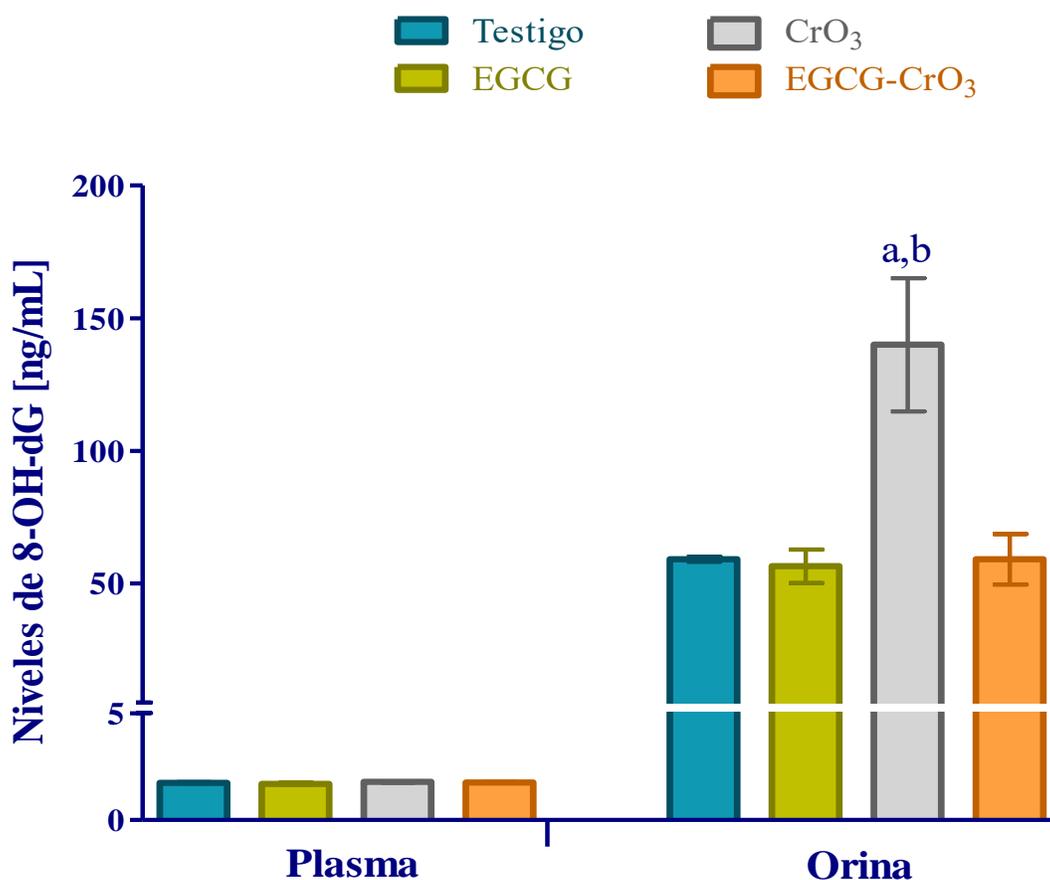


Figura 14. Niveles de 8-OHdG: Los datos representan los promedios \pm d.e. de la concentración plasmática y urinaria de los niveles del aducto 8-OHdG en ratones tratados con el vehículo, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO_3) y la combinación EGCG- CrO_3 . Diferencias significativas indicadas por ^a $p < 0.05$ vs. Testigo; ^b $p < 0.05$ vs. EGCG- CrO_3 , $n=5$.

6.3.2. Ensayo cometa

Cuando se evaluó la inducción de cometas se observó un aumento a las 4, 24 y 48 h en el grupo tratado con CrO_3 , mientras que en el grupo EGCG- CrO_3 la inducción de cometas disminuye de manera tiempo/dependiente, sin embargo, estos datos no resultaron estadísticamente significativos. (Figura 15).

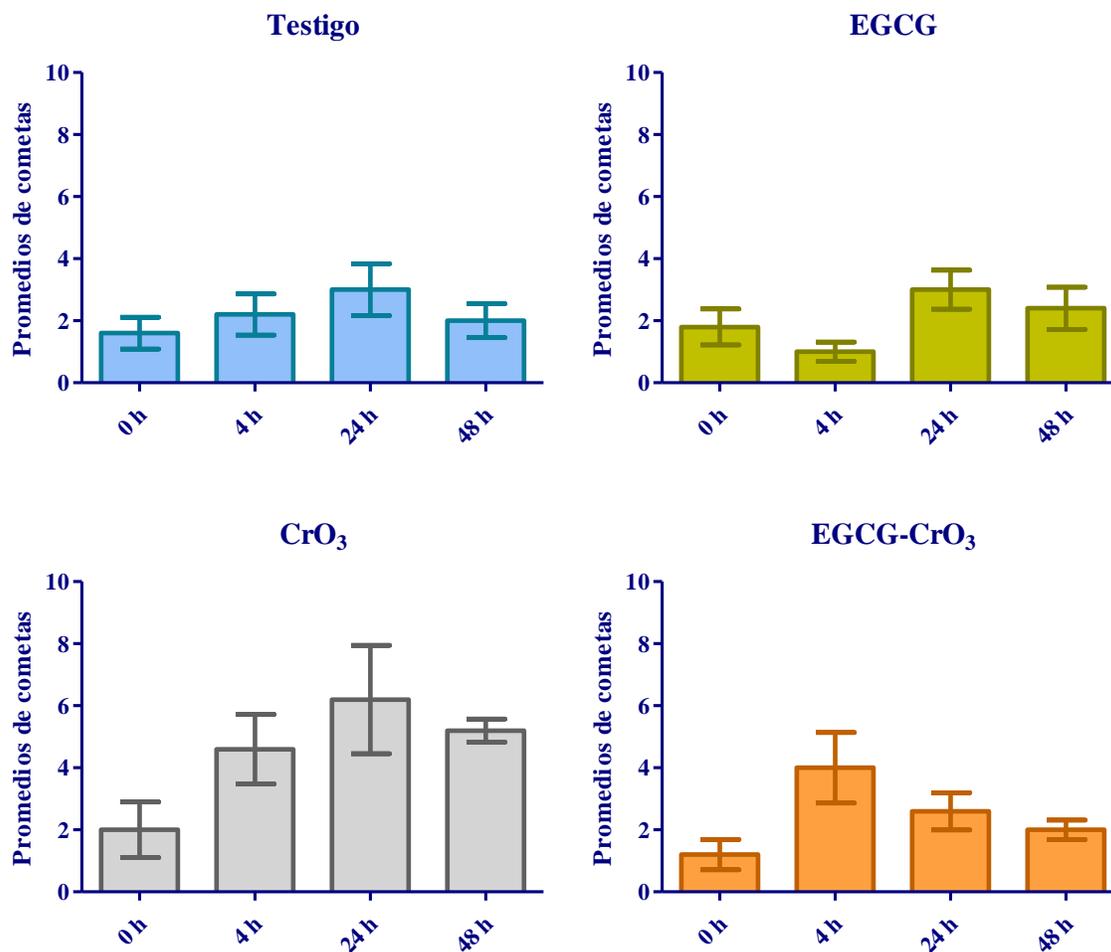


Figura 15. Promedios de cometas: los datos representan los promedios de cometas a las 0,4,24 y 48 h en ratones tratados con el vehículo, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO_3) y la combinación EGCG- CrO_3 . Diferencias significativas indicadas por * $p < 0.05$ vs. 0h, $n=5$.

Con la finalidad de evaluar si existían diferencias entre los cometas presentes por grupo, se calculó % de ADN en la cauda. Este cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de ADN en la cauda} = [(\text{Long. C}) (100)] / \text{Long. T}$$

Dónde: Long. C = longitud de la cauda; Long T = longitud total

Al realizar este cálculo se observa un aumento estadísticamente significativo a la hora 24 y 48 en los grupos tratados con el polifenol (EGCG) y con CrO_3 en comparación con la hora cero (Fig.16).

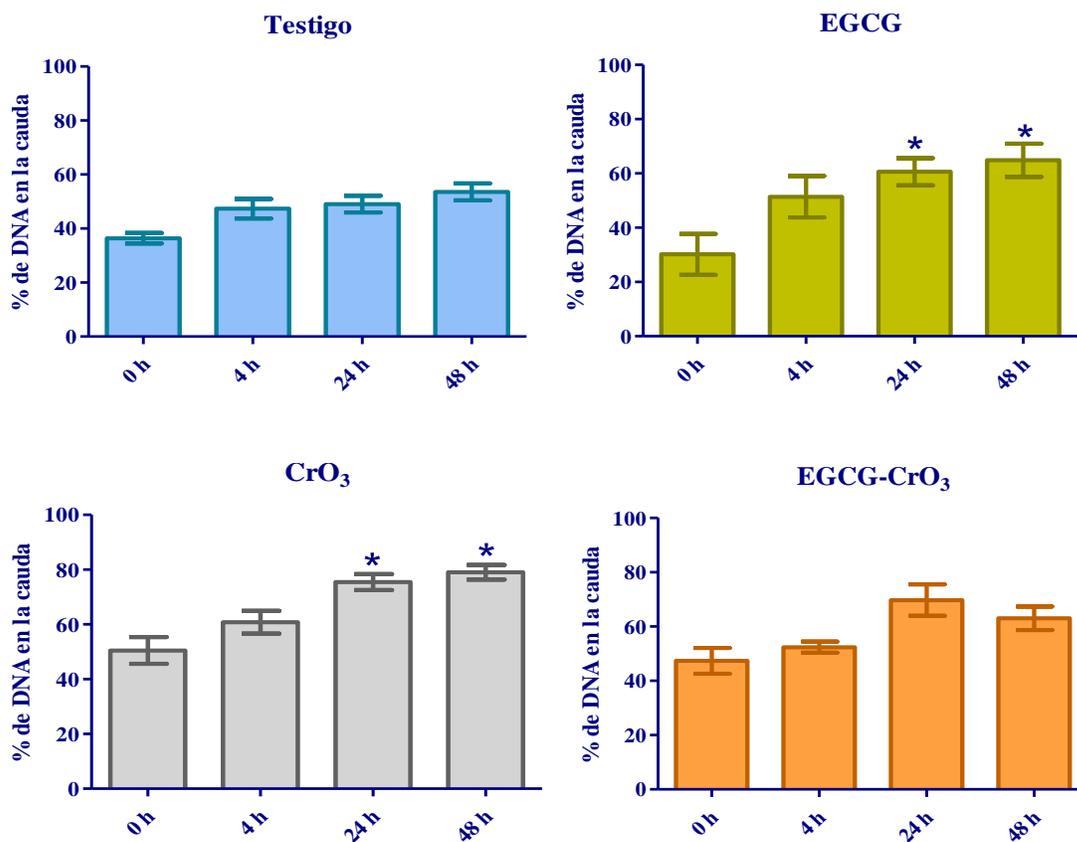


Figura 16. Cantidad de ADN en la cauda de cometas: los datos representan los promedios de porcentajes de ADN en la cauda de los cometas obtenidos para 1 500 núcleos a las 0,4,24 y 48 h en ratones tratados con el vehículo, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO_3) y la combinación EGCG- CrO_3 . Diferencias significativas indicadas por * $p < 0.05$ vs. 0h, $n=5$.

El cálculo de las unidades arbitrarias (UA) se realizó con base en la propuesta de Collins *et al.*, (1995) y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{UA} = (\text{Cantidad de células en clase 0}) (0) + (\text{Cantidad de células en clase 1}) (1) + (\text{Cantidad de células en clase 2}) (2) + (\text{Cantidad de células en clase 3}) (3) + (\text{Cantidad de células en clase 4}) (4)$$

Para la clasificación de los cometas en las distintas clases se utilizaron los criterios de Collins *et al.*, (1995) y Muñoz (2009).

Nivel de daño clase 0 (ninguno):	<5% de ADN en la cauda.
Nivel de daño clase 1 (bajo):	5-10% de ADN en la cauda.
Nivel de daño clase 2 (medio):	11-40% de ADN en la cauda
Nivel de daño clase 3 (alto):	41-95% de ADN en la cauda.
Nivel de daño clase 4 (total):	>95% de ADN en la cauda

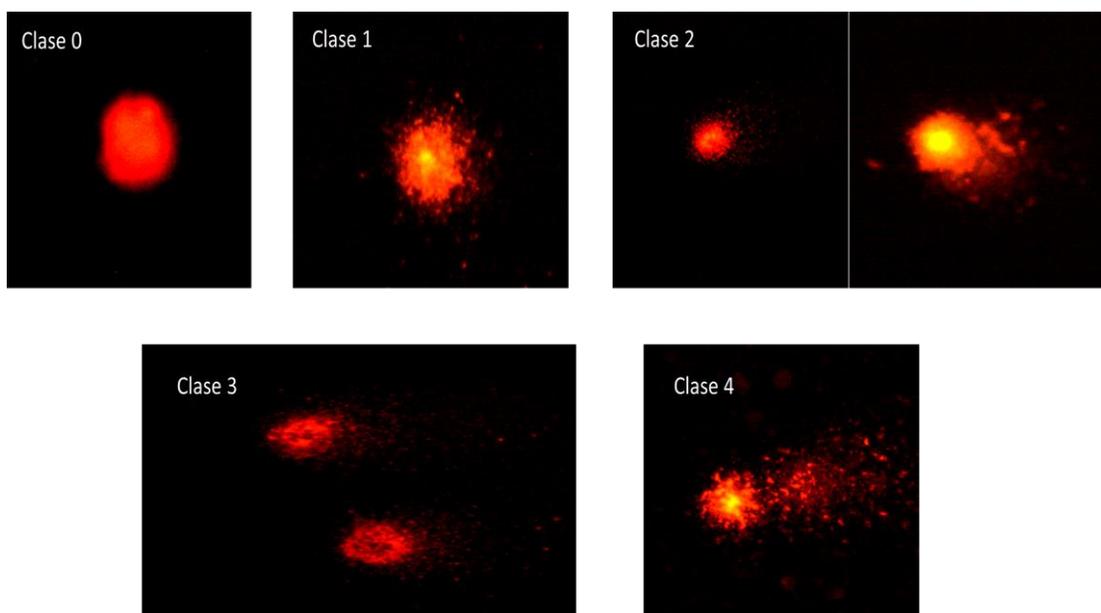


Figura 17. Clasificación del nivel de daño de los cometas (Observadas a 40x).

Al realizar ese análisis se observa que el grupo tratado con CrO_3 aumenta el promedio de las UA a las 4, 24 y 48 h, siendo mayor a las 24 h. En el grupo EGCG- CrO_3 las UA disminuyeron de una forma tiempo/dependiente, sin embargo, ningún dato resultó estadísticamente significativo (Figura 18).

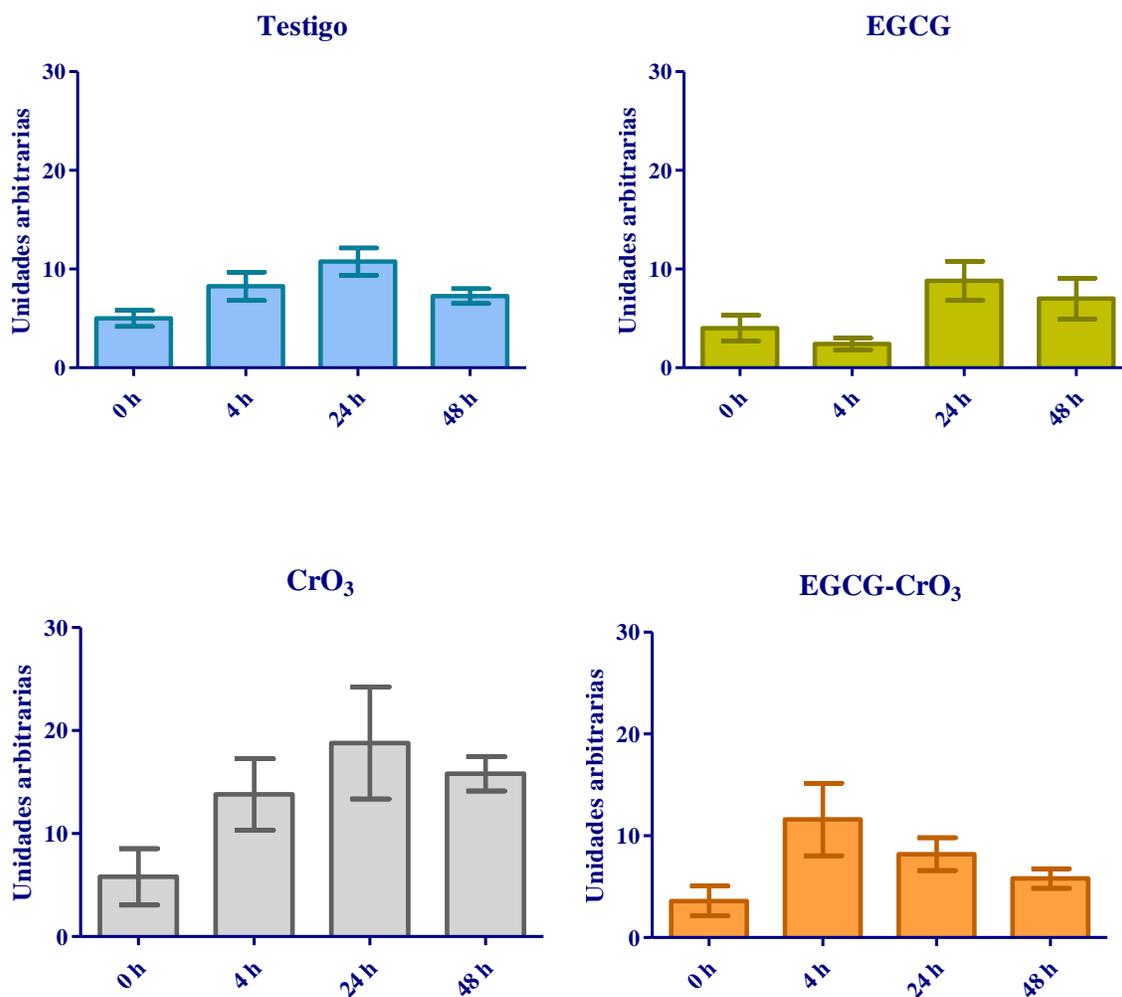


Figura 18. Unidades arbitrarias de cometas por grupos: los datos representan los promedios de las unidades arbitrarias calculadas para 1 500 núcleos a las 0,4,24 y 48 h en ratones tratados con el vehículo, la epigalocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO_3) y la combinación EGCG- CrO_3 . $p < 0.05$, $n = 5$.

Las UA también se calcularon para los diferentes tiempos de evaluación. Al igual que lo anteriormente descrito, las unidades arbitrarias son mayores en el grupo tratado con CrO_3 a las 4, 24 y 48 h en comparación con el grupo testigo. En el grupo EGCG- CrO_3 las UA disminuyeron un 55 y 63.3% a las 24 y 48 h respectivamente, en comparación con el grupo CrO_3 , sin embargo, ningún dato resultó estadísticamente significativo (Figura 19).

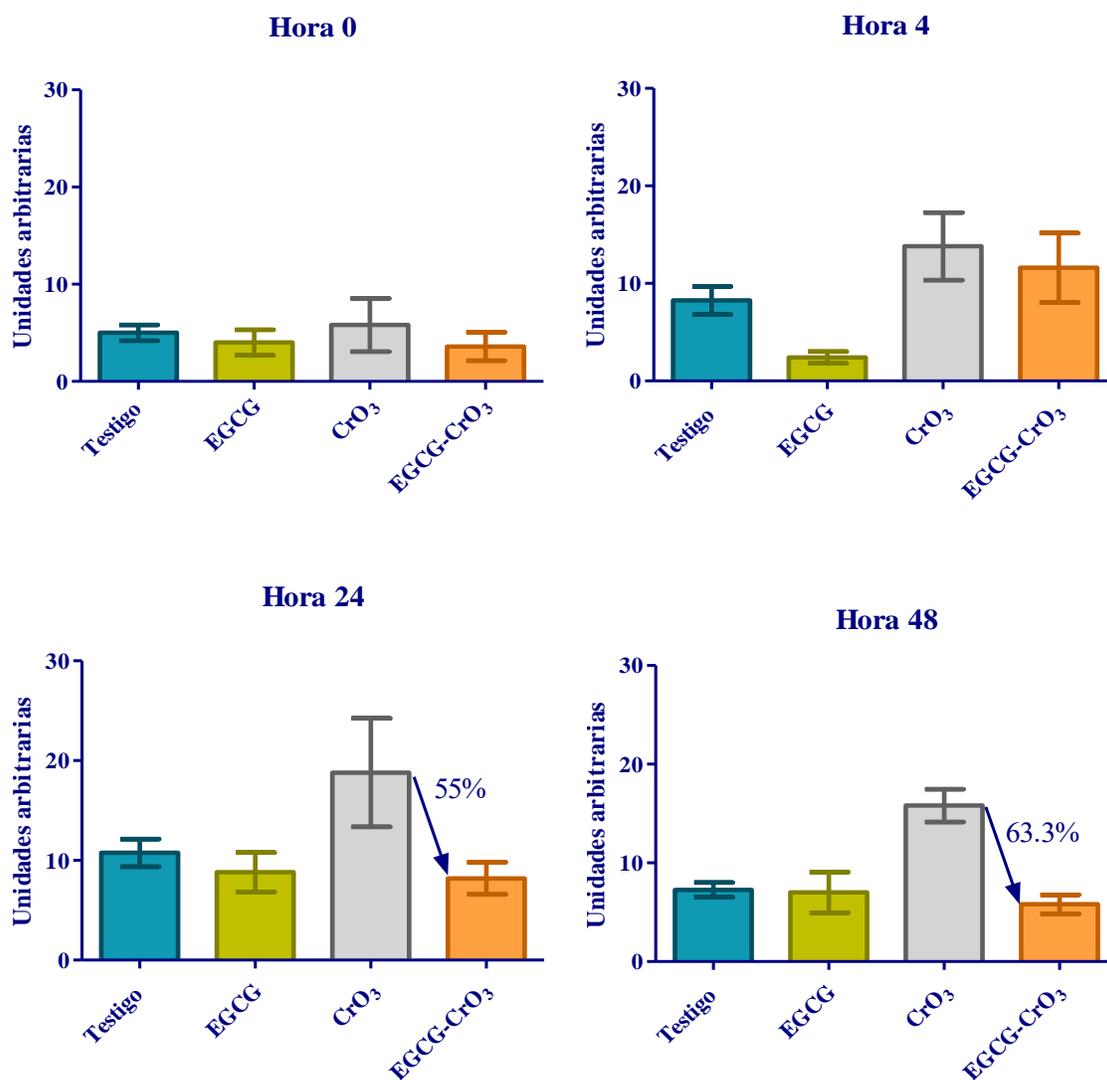


Figura 19. Unidades arbitrarias de cometas por horas: los datos representan los promedios de las unidades arbitrarias calculadas para 1 500 núcleos a las 0,4,24 y 48 h en ratones tratados con el vehículo, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO_3) y la combinación EGCG- CrO_3 . $p < 0.05$, $n = 5$.

6.4. Capacidad antioxidantes total

Los promedios de la capacidad antioxidante total son mayores en el grupo tratado con EGCG en comparación con el grupo testigo. La inyección de CrO_3 no modificó los promedios de antioxidantes, mientras que en el grupo EGCG- CrO_3 los promedios de antioxidantes son mayores en comparación con el grupo testigo y con el grupo CrO_3 (Figura 20).

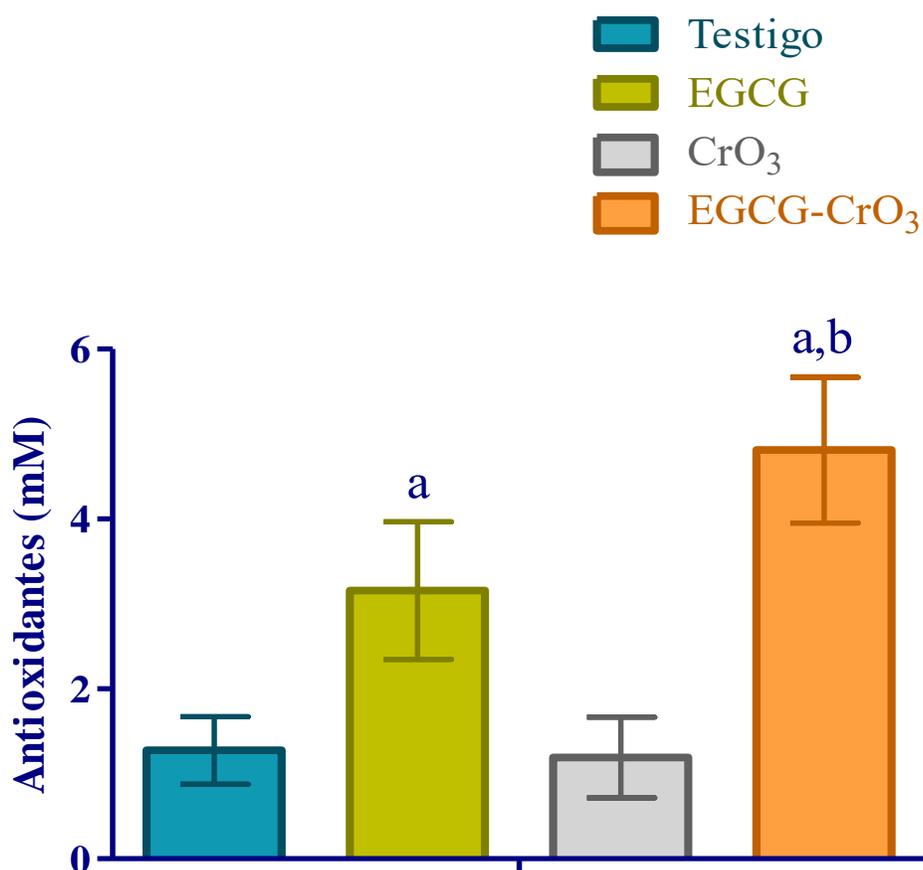


Figura 20. Capacidad antioxidante total: los datos representan los promedios \pm d.e. de la capacidad de antioxidantes totales en plasma de ratones tratados con el vehículo, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO_3) y la combinación EGCG- CrO_3 . Diferencias significativas indicadas por ^a $p < 0.05$ vs. Testigo; ^b $p < 0.05$ vs. CrO_3 , $n=5$.

6.5. Glutación total

La concentración de glutatión total es mayor en el grupo tratado con EGCG en comparación con el grupo testigo, mientras que en los grupos tratados con CrO₃ y EGCG +CrO₃ la concentración de glutatión es menor (Figura 21).

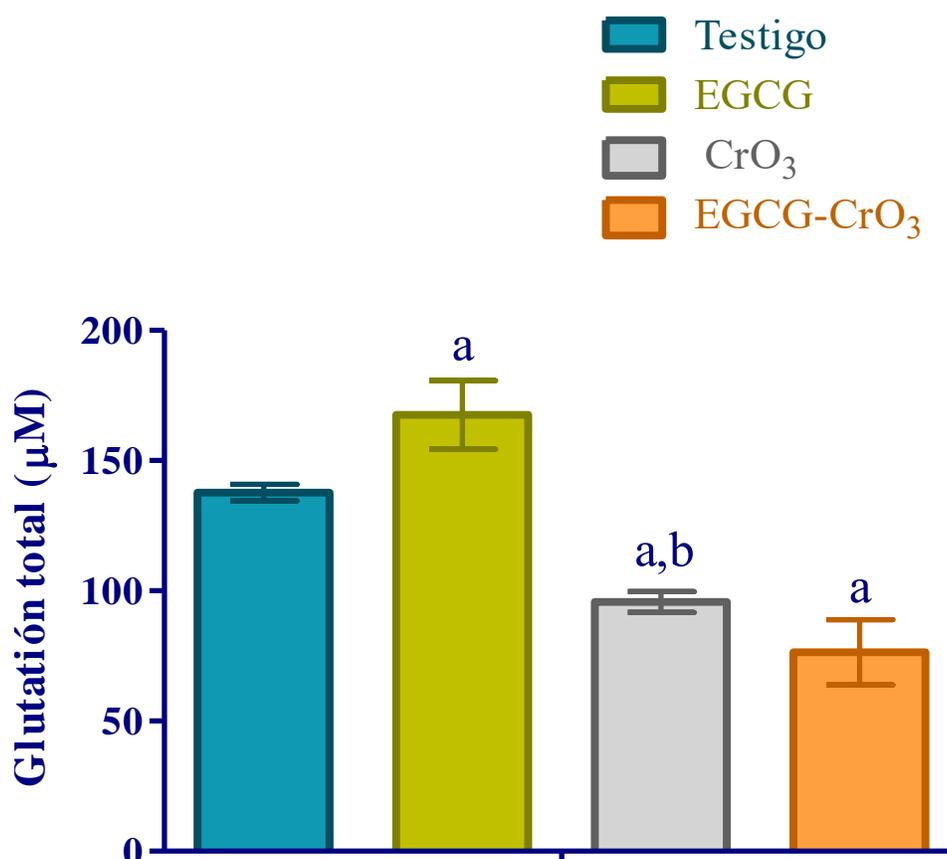


Figura 21. Concentración del glutatión total: los datos representan los promedios \pm d.e. de la concentración de GSH más la concentración de glutatión oxidado (GSSG) en eritrocitos de ratones tratados con el vehículo, la epigalocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO₃) y la combinación EGCG-CrO₃. Diferencias significativas indicadas por ^a $p < 0.05$ vs. Testigo; ^b $p < 0.05$ vs. EGCG-CrO₃, $n=5$.

6.6. GPx

La actividad enzimática de GPx fue menor en el grupo tratado con EGCG y con EGCG-CrO₃ en comparación con el grupo testigo, mientras que en el tratamiento con CrO₃ no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 22).

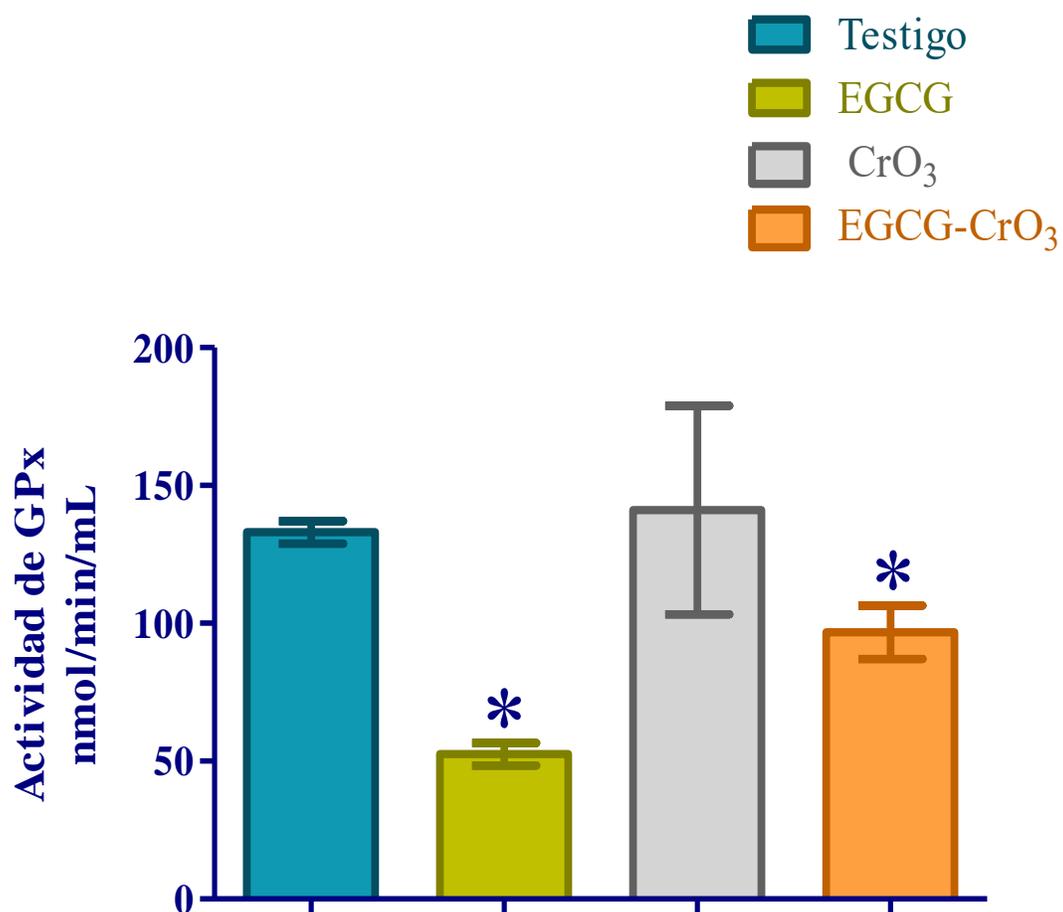


Figura 22. Actividad de GPx: los datos representan los promedios \pm d.e. de la actividad de GPx en plasma de ratones tratados con el vehículo, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO₃) y la combinación EGCG-CrO₃. Diferencias significativas indicadas por * $p < 0.05$ vs. Testigo, $n=5$.

6.7. Catalasa

La actividad de CAT fue mayor en los grupos tratados con EGCG, CrO₃ y EGCG-CrO₃ en comparación con el grupo testigo (Figura 23).

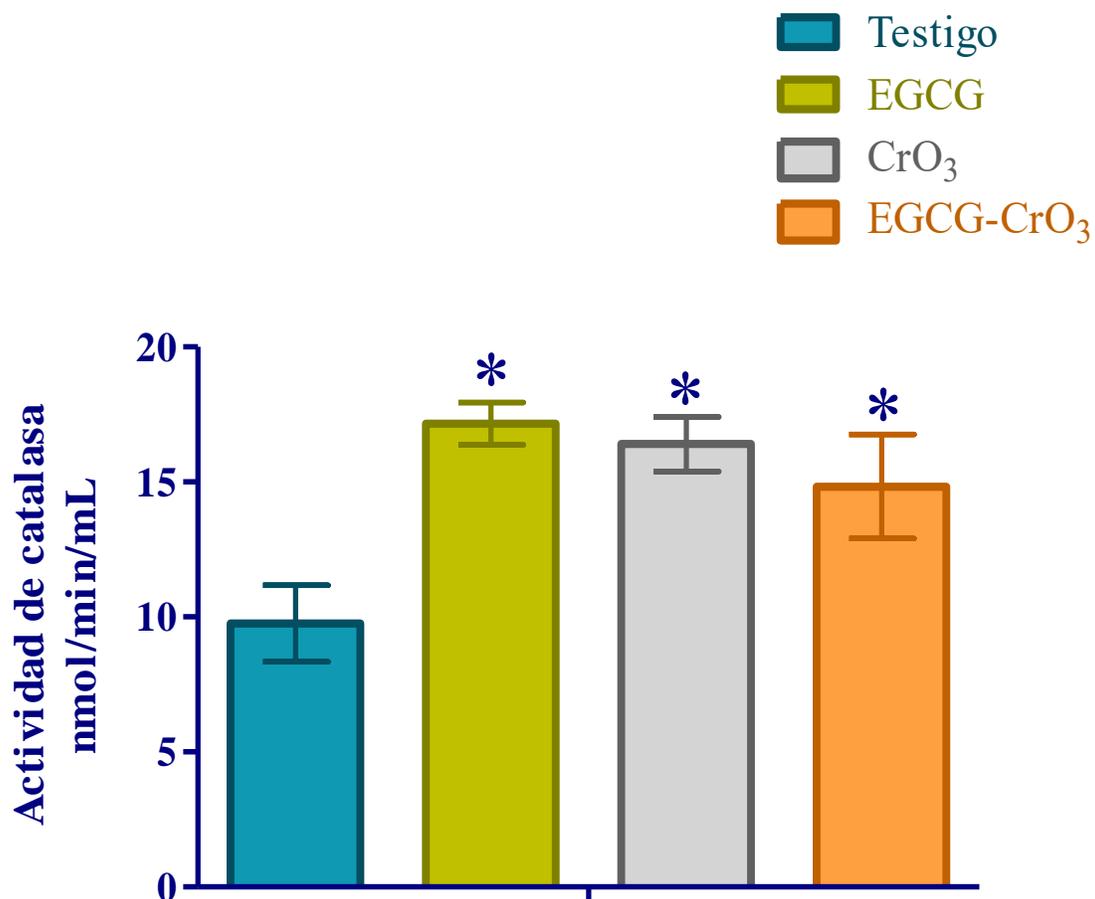


Figura 23. Actividad de CAT: los datos representan los promedios \pm d.e. de la actividad de CAT en plasma de ratones tratados con el vehículo, la epigalocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO₃) y la combinación EGCG-CrO₃. Diferencias significativas indicadas por * $p < 0.05$ vs. Testigo, $n=5$.

6.8. Evaluación de apoptosis y necrosis

Al evaluar apoptosis se observa que la administración de EGCG y la combinación EGCG-CrO₃ no modifica los promedios de células apoptóticas al compararse con el grupo testigo. Sin embargo, en el grupo tratado con CrO₃ el promedio de células apoptóticas fue mayor en comparación con el grupo testigo y con el grupo EGCG-CrO₃ (Figura 24).

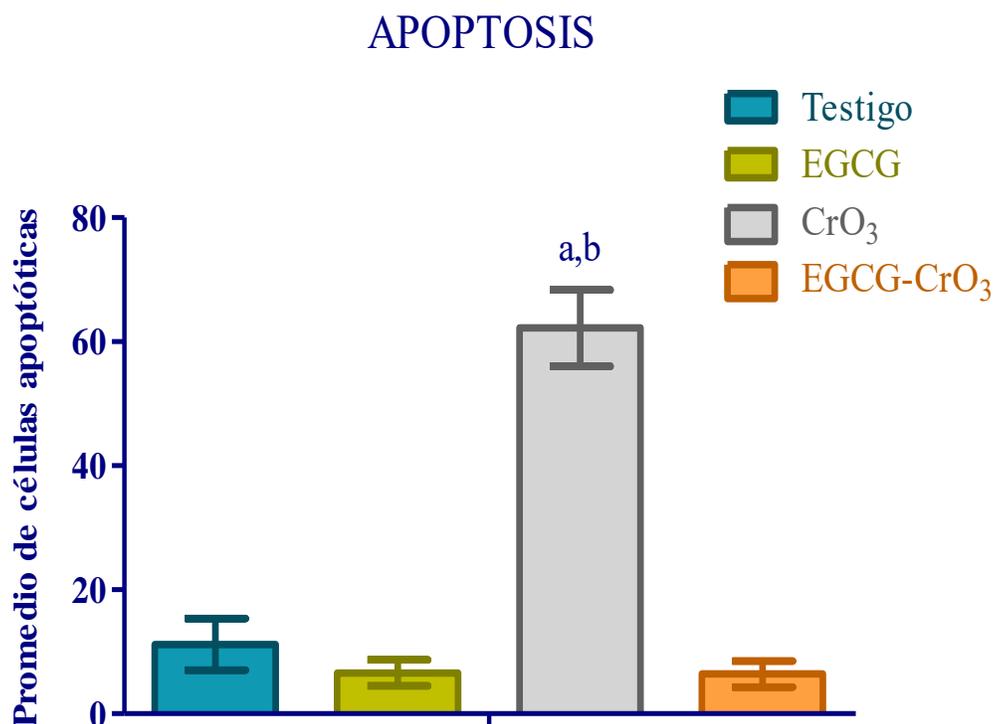


Figura 24. Células apoptóticas: los datos representan los promedios \pm d.e. de las células apoptóticas en ratones tratados con el vehículo, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO₃) y la combinación EGCG-CrO₃. Se evaluaron 300 células por ratón, $n=5$. Diferencias significativas indicadas por ^a $p < 0.05$ vs. Testigo; ^b $p < 0.05$ vs. EGCG-CrO₃.

Al evaluar necrosis se observó que la administración de EGCG y la combinación EGCG-CrO₃ no modifica los promedios de células necróticas al compararse con el grupo testigo. Sin embargo, en el grupo tratado con CrO₃ el promedio de células necróticas fue mayor en comparación con el grupo testigo y con el grupo EGCG-CrO₃ (Figura 25).

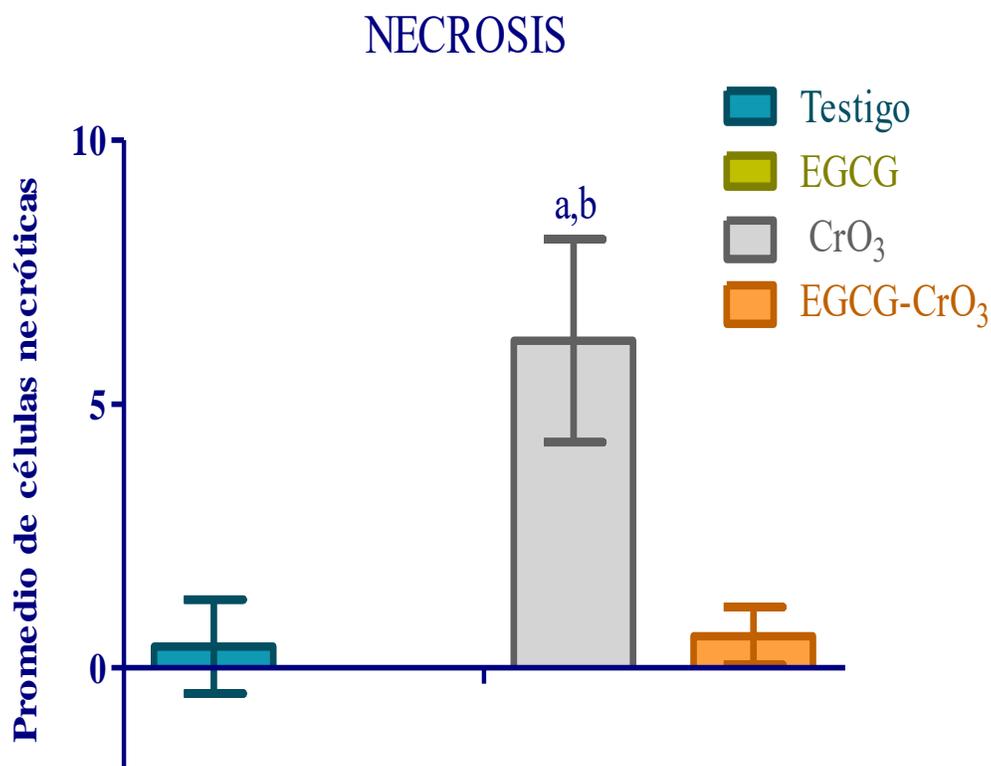


Figura 25. Células necróticas: los datos representan los promedios \pm d.e. de las células necróticas en ratones tratados con el vehículo, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), el trióxido de cromo (CrO₃) y la combinación EGCG-CrO₃. Se evaluaron 300 células por ratón, $n=5$. Diferencias significativas indicadas por ^a $p < 0.05$ vs. Testigo; ^b $p < 0.05$ vs. EGCG-CrO₃.

VII. DISCUSIÓN

Con la finalidad de estudiar las posibles vías de protección de la EGCG sobre el daño genotóxico inducido por el Cr(VI) se evaluó la frecuencia de MN, la relación EPC/ENC, la viabilidad celular, la fragmentación del ADN, la apoptosis, el aducto 8-OHdG, los antioxidantes totales, el glutati6n y la actividad de GPx y CAT en ratones tratados con EGCG y CrO₃.

La administraci6n de 8.5 mg/kg de EGCG no indujo cambios significativos en los promedios de MN. Esto concuerda con resultados previos en los cuales se ha encontrado que el tratamiento oral de 10 y de hasta 2000 mg/kg de EGCG no induce MN (Isbrucker *et al.*, 2006; Garc3a-Rodr3guez *et al.*, 2014; 2015). En otros estudios tambi6n se ha observado que la administraci6n sola de polifenoles o flavonoides del t6 verde tampoco inducen genotoxicidad en animales experimentales, a pesar de estar expuestos a largos periodos de tiempo y a dosis altas (Chang *et al.*, 2003; Zaveri, 2006; Isbrucker *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2011). No obstante, en estudios *in vitro* se ha descrito que la EGCG, en dosis mayores a 100 μ M, causa da6o genot6xico e incrementa el da6o por agentes mut6genos (Bertram *et al.*, 2003, Furukawa *et al.*, 2003, Roy *et al.*, 2003; Sugisawa *et al.*, 2004). La dosis utilizada en este estudio, 8.5 mg/kg, corresponde aproximadamente al 0.4% de la LD₅₀ (2,170 mg/kg) encontrada para la administraci6n oral de EGCG en ratones (NLM, 1999). Esta dosis puede alcanzarse en humanos con una ingesta de aproximadamente 12 tazas de t6 verde (Kanwar *et al.*, 2012).

Cuando se evalu6 la citotoxicidad de EGCG mediante la relaci6n EPC con respecto a los ENC, no se observ6 ning6n cambio significativo. Si bien la OECD (1997) indica que al realizar la prueba de MN se determine tambi6n la frecuencia de EPC/ENC, este par6metro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse tambi6n los mecanismos de divisi6n celular y, por lo tanto, enmascarar el efecto (Krishna *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 2000). Para corroborar la citotoxicidad se realiz6 la evaluaci6n de viabilidad celular empleando la t6cnica de NA/BrEt modificada por Garc3a-Rodr3guez *et al.* (2013). Al realizar este an6lisis, se observa que la administraci6n sola de EGCG no modifica los promedios de c6lulas viables, lo que sugiere que este compuesto no

induce daño citotóxico. En estudios previos *in vivo* tampoco se encontró daño citotóxico con la administración de EGCG (Fiorini *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006), lo mismo ocurrió en tratamientos *in vitro* (Schroeder *et al.*, 2009; Crispo *et al.*, 2010; Kamalden *et al.*, 2012).

El daño genotóxico y citotóxico del CrO₃ se corroboró mediante el incremento en los promedios de MN y de las células no viables. El mecanismo de daño genotóxico de los compuestos de Cr(VI), se ha planteado con base en que estos tienen la capacidad de atravesar la membrana celular y dentro de la célula se reducen rápidamente por la interacción con moléculas citoplasmáticas a cromo (V), (IV) y (III) el cual tienen afinidad por las bases y fosfatos de la cadena de ADN, además de generar ERO's en cada reducción que pueden inducir rupturas y aductos en la cadena de ADN así como entrecruzamientos, y por lo tanto causar daño mutagénico y cancerígeno (Shi y Dalal, 1992; Shi *et al.*, 1992; O'Brien *et al.*, 2003; Jomova y Valko *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). De igual manera, el Cr(VI) puede provocar efectos sobre la replicación y la transcripción del ADN, desregularizar los puntos de control en el ciclo celular, afectar los mecanismos de reparación del ADN y generar disrupción en las redes génicas reguladoras relacionadas con la muerte celular (Qi *et al.*, 2000; Zhitkovich *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2003; Reynolds y Zhitkovich, 2007; Wong *et al.*, 2012)

La administración de EGCG cuatro horas antes de la inyección de CrO₃ disminuyó los promedios de MN en un 43% en comparación con CrO₃, lo que sugiere que la EGCG protege del daño genotóxico provocado por los compuestos de Cr(VI). En estudios previos se ha demostrado que la administración de EGCG disminuye el daño genotóxico inducido por metales tanto *in vivo* como *in vitro* (Abib *et al.*, 2011; García-Rodríguez *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que tanto el té verde como sus polifenoles disminuyen la genotoxicidad inducida por arsénico y CrO₃ (Sinha *et al.*, 2003; 2005; García-Rodríguez *et al.*, 2012). El tratamiento EGCG-CrO₃ también disminuyó las células no viables significativamente en comparación con el grupo tratado con CrO₃, lo que sugiere que la EGCG protege del daño citotóxico provocado por los compuestos de Cr(VI). Anteriormente, se ha descrito que la administración de EGCG tiene efectos protectores contra la citotoxicidad inducida por H₂O₂ y rotenona (Wu *et al.*, 2006; Kamalden *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2016).

Con la finalidad de indagar si las vías de protección de la EGCG contra el daño genotóxico inducido por CrO₃ implican mecanismos de reparación se evaluó la concentración de los niveles del aducto 8-OHdG en plasma sanguíneo y en orina, así como los rompimientos de cadena doble a diferentes horas mediante el ensayo cometa.

El aducto 8-OHdG es una forma oxidada de la guanina que se produce cuando un •OH interacciona con el carbono 8 de esta base, provocando daño oxidante al ADN. Sin embargo, este aducto puede ser eliminado del ADN por mecanismos tales como BER o NER y es medido en sangre, saliva y orina como 8-OHdG, donde puede ser detectado y cuantificado como un producto de reparación, tal como se realizó en este estudio (Wu *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2013; Nakabeppu, 2014). Al medir las concentraciones de los niveles de 8-OHdG en plasma sanguíneo se obtuvieron mediciones muy bajas en todos los grupos (alrededor de 2 ng/mL). En un estudio con personas ocupacionalmente expuestas a cromatos encontraron ≈14.5 ng/mL de cromo en sangre y al medir los niveles del aducto 8-OHdG en suero se observó que éstos eran muy similares a los obtenidos en este trabajo (2.69 ± 0.73 ng/mL), sin embargo, la dosis que se aplicó fue muy superior (20mg/kg) a la descrita por Li *et al.* (2014). En las evaluaciones en orina se observó que la administración de CrO₃ aumentó significativamente la concentración de los niveles de 8-OHdG. No obstante, las concentraciones elevadas de 8-OHdG urinaria han sido tema de controversia. Por un lado, estas concentraciones implican una mayor exposición a ERO's mientras que, por el otro, podrían indicar la reparación del daño al ADN. Dado el daño oxidante reportado para los compuestos de Cr(VI), se sugiere que el aumento en las concentraciones urinarias de 8-OHdG observadas con la administración de CrO₃ se deben al incremento en la producción de ERO's durante la reducción de Cr(VI) a Cr(III) (O'Brien *et al.*, 2003; Henkler *et al.*, 2010; Jomova y Valko *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012).

Por su parte, en el grupo EGCG-CrO₃ no se observa incremento en los niveles urinarios de 8-OHdG. Estos resultados sugieren que la EGCG previene del daño oxidante inducido por el CrO₃, posiblemente evitando la formación del radical •OH. Un estudio con resonancia paramagnética de electrones reveló que EGCG puede eliminar el •OH, el cual es el responsable de la formación del aducto 8-OHdG (Shi *et al.*, 2000). Además, en estudios anteriores se ha demostrado que el tratamiento con té verde o EGCG disminuyen los niveles

urinarios de 8-OHdG en individuos expuestos tabaco (Xu *et al.*, 1992; Hakim *et al.*, 2008). Por lo tanto, se propone que la protección del 43% observada en el ensayo de MN se debe al efecto protector de la EGCG sobre el daño oxidante inducido por el CrO₃.

Para relacionar el efecto de la EGCG sobre los mecanismos de reparación del daño oxidante al ADN se realizó simultáneamente la evaluación de los rompimientos de cadena doble mediante el ensayo cometa en muestras de sangre periférica tomadas a las 4, 24 y 48 h después de los tratamientos. Con este ensayo se observó un mayor daño en el grupo tratado con CrO₃, esto debido al aumento en los promedios de cometas, el % de ADN en la cauda y las UA, y dado que este aumento persiste de las 4 h hasta las 48 h, se sugiere que el daño al ADN no está siendo reparado. Se ha propuesto que, durante el metabolismo de los xenobióticos, el daño en el ADN puede verse exacerbado y la capacidad de reparación disminuida, lo que resulta en la acumulación de daño en el ADN y aumenta la frecuencia de mutación (Tan *et al.*, 2009). Entre las lesiones que genera la reducción del Cr(VI) a Cr(III) se encuentran los rompimientos de cadena de ADN que pueden ser dobles o sencillos (O'Brien *et al.*, 2003). Estos rompimientos pueden ser observados a través del ensayo cometa, ya que permite identificar la formación de rompimientos de cadena sencilla y sitios lábiles al álcali, así como su reparación al cuantificar la migración del ADN (Rodríguez-Rey *et al.*, 2016). Diversas investigaciones realizadas *in vitro* e *in vivo*, usando ensayo cometa, revelaron que la exposición a Cr(VI) aumenta significativamente el número de rompimientos de cadena y de sitios lábiles al álcali en el ADN (Blasiak y Kowalik, 2000; Trzeciak *et al.*, 2000; Dana *et al.*, 2001; Ueno *et al.*, 2001; Cortés-Eslava *et al.*, 2018).

En el grupo EGCG-CrO₃ los promedios de cometas disminuyeron de una forma tiempo/dependiente a partir de las 24 h en comparación con el basal (0 h), y lo mismo ocurrió con las UA en comparación con el grupo tratado con CrO₃. Estos resultados confirman que la EGCG podría estar evitando el aumento en la producción de ERO's y por lo tanto las rupturas de cadena de ADN disminuyen. Actualmente existen varios estudios que muestran que la EGCG evita las roturas de la cadena de ADN inducidas por mutágenos, mediante la "neutralización" de las ERO's (Hsu *et al.*, 2001; Naoi *et al.*, 2005; Glej y Pool-Zobel 2006; Kanadzu *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2007). De modo que, las determinaciones del aducto 8-OHdG y los resultados del ensayo cometa sugieren que la EGCG con este protocolo más que

estar activando los mecanismos de reparación está evitando el daño antes de que este se produzca, ya sea suprimiendo la formación de radicales superóxido e hidroxilo, quelando al cromo a través de sus grupos orto -hidroxi fenólicos y/o estimulando al sistema antioxidante endógeno (Aherne y O'Brien, 2000; Caillet *et al.*, 2007).

Por lo tanto, también se evaluó la capacidad de antioxidantes totales, así como las actividades de antioxidantes endógenos relacionados con la inducción genotóxica de CrO₃ (glutatión, GPx y CAT).

La capacidad antioxidante total considera la acción acumulativa de todos los antioxidantes presentes en plasma y fluidos corporales, proporcionando así un parámetro integrado de antioxidantes medibles (Prior *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en este estudio revelan que la administración sola del CrO₃ no modifica los niveles de antioxidantes totales. Esto pudo deberse a que la homeostasis redox se mantiene por un sistema complejo en el que el cambio en la concentración de un antioxidante puede ser compensado por otro (Benzie y Strain, 1999; Marim *et al.*, 2015). Además, anteriormente se ha informado que los compuestos de Cr(VI) presentan una depleción del sistema antioxidante mediada por el incremento de los niveles de ERO's, en particular por el •OH, generado durante su reducción de Cr(VI) a Cr(III) (García-Rodríguez *et al.*, 2017). Por el contrario, cuando se administra la EGCG sola y la combinación de los tratamientos (EGCG-CrO₃) se observó un aumento significativo en los niveles de antioxidantes totales. Estos resultados sugieren que la EGCG estimula la producción de antioxidantes endógenos. Existe evidencia considerable y creciente de que el té verde y particularmente la EGCG pueden mejorar la expresión de los sistemas antioxidantes endógenos tanto en modelos animales como en humanos. Estos efectos incluyen la modulación de los niveles plasmáticos y tisulares de SOD, CAT y enzimas relacionadas con el metabolismo del GSH (Chow *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2009; Srividhya *et al.*, 2009; Lambert y Elias, 2010; Adikesavan *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Eng *et al.*, 2018). Se ha propuesto que el efecto de la EGCG sobre la actividad de las enzimas antioxidantes es por la vía del factor nuclear [derivado de eritroide 2] (Nrf2) (Wu *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007; Pullikotil *et al.*, 2012).

Al evaluar los niveles de glutatión total (GSH + GSSG) se observó un aumento significativo con el tratamiento de EGCG sola, lo que sugiere que este polifenol puede activar la síntesis de moléculas del sistema antioxidante endógeno como lo es el glutatión. Se ha observado que la administración de EGCG vía i.p. o su consumo crónico aumenta los niveles de GSH en ratones (Fiorini *et al.*, 2005). Sin embargo, las administraciones de CrO₃ y de EGCG previa al CrO₃ disminuyeron significativamente la concentración de glutatión total. Una de las principales funciones protectoras de GSH contra el estrés oxidante es servir como cofactor de varias enzimas desintoxicantes, por ejemplo, GPx y GST, entre otras (Masella *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007). En diversos estudios se ha demostrado que los niveles de GSH disminuyen debido al incremento en la actividad enzimática de GST, la cual utiliza la formación de conjugados xenobiótico-GSH como uno de sus mecanismos citoprotectores (Hayes *et al.*, 2005; Josephy *et al.*, 2010; Oakley, 2011; Banu *et al.*, 2016). Por lo tanto, es posible que la disminución de los niveles de glutatión, que se observaron en los grupos CrO₃ y EGCG-CrO₃, se deba a un incremento en la utilización de éste, principalmente como un cofactor de la enzima GST. Además, se propone que la administración de EGCG previa al CrO₃ disminuye aún más los niveles de glutatión debido a que se ha observado que la EGCG tiene un efecto positivo sobre la actividad GST (Wu *et al.*, 2012; Newsome *et al.*, 2014). Por otro lado, Valko *et al.* (2006) han informado que las ERO's que se forman durante la reducción de Cr(VI) a Cr(III) pueden provocar daño a las biomoléculas, incluyendo proteínas. Los mismos autores también señalan que el metal puede dañar directamente a estas biomoléculas. El daño catalizado por metales a proteínas implica la escisión oxidante, la pérdida de residuos de histidina, los enlaces cruzados de tirosina, la introducción de grupos carbonilo y la formación de radicales alquilo (Davies *et al.*, 1987; Stadtman *et al.*, 1990). Por lo tanto, se sugiere que la disminución en los niveles de glutatión total, observada con los tratamientos de CrO₃ y EGCG-CrO₃, también podría deberse a que el CrO₃ este dañando la estructura molecular del glutatión, y que la EGCG no sea capaz de evitar este daño. Abib *et al.* (2011) demostraron que la EGCG (100 µM durante 2 h) protege a las mitocondrias del deterioro provocado por el cadmio. Sin embargo, la EGCG no fue eficaz para prevenir la disminución inducida por cadmio en los niveles de GSH mitocondrial en ese modelo experimental.

Cuando se evaluó la actividad de la GPx y CAT se observó que el tratamiento con CrO₃ no modificó la actividad de GPx, sin embargo, aumentó la actividad de CAT. Mientras que, cuando se administra la EGCG sola y la combinación de EGCG-CrO₃ se evidenció una disminución de GPx, y un aumento de CAT. Estos resultados sugieren que la EGCG tiene un efecto sobre la actividad de estas enzimas. En estudios previos se ha demostrado que la administración de EGCG regula las actividades de las enzimas SOD, CAT, GPx, GR y GST en ratas expuestas a xenobióticos (Devika y Prince, 2008-b; Adikesavan *et al.*, 2013).

La GPx reacciona con el H₂O₂ para formar agua y utiliza al GSH como donador de electrones (Cemeli *et al.*, 2009). Mientras que CAT cataliza la conversión de H₂O₂ en agua y O₂, usando como donador de electrones a alcoholes de bajo peso molecular (Valko *et al.*, 2006). Se ha informado que la GPx se encuentra formando parte de un sistema antioxidante junto con GR y la CAT otro junto con SOD, se ha observado que estos sistemas no funcionan a la par. La CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H₂O₂ y la GPx lo hace a bajas concentraciones lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas (Cisneros *et al.*, 1997; Valko *et al.*, 2006; Cemeli *et al.*, 2009). Esto explica las diferencias observadas en las actividades de GPx y CAT en este estudio, proponiéndose que el efecto en la actividad de CAT se debe a un aumento de H₂O₂ provocado por la reducción de Cr(VI) a Cr(III). Skrzydlewska *et al.* (2002) demostraron que, en el tejido nervioso central, la actividad de GPx disminuyó mientras que la actividad de GR y CAT aumentó después de beber té verde.

También se evaluaron las frecuencias de células apoptóticas ya que al ser un proceso normal en los organismos para eliminar células con daño en su material genético podría ser una vía por la cual la EGCG estimula la eliminación de las células con daño genotóxico inducido por el Cr(VI) (White, 1996; Taraphdar *et al.*, 2001). Se ha observado que la EGCG aumenta la actividad apoptótica (Nakagawa *et al.*, 2004; Margină *et al.*, 2015), sobre todo en una variedad de células cancerosas (Roy *et al.*, 2003; Amin *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Papi *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2016). Particularmente, en un estudio previo en nuestro laboratorio se demostró que la dosis de 10 mg/kg de EGCG es capaz de mandar células genéticamente dañadas a apoptosis, sin embargo, la administración sola de este polifenol también aumentó las células apoptóticas (García-Rodríguez *et al.*, 2015). Por lo tanto, en este estudio se redujo

la dosis de EGCG a 8.5 mg/kg, la cual, ya no causaba apoptosis cuando se administraba sola. No obstante, cuando se combinaron los tratamientos (EGCG-CrO₃) tampoco se incrementaron las células apoptóticas. Cabe señalar que en el estudio previo en nuestro laboratorio la protección del daño genotóxico fue del 71%, mientras que en este estudio la protección es del 43%, por lo tanto, se propone que el decremento en la protección es debido a que la EGCG a una dosis de 8.5 mg/kg ya no elimina las células con daño genético, inducido por el CrO₃, mediante apoptosis. La concentración de EGCG en el entorno celular parece ser un factor importante para explicar este doble papel. Se ha demostrado que esta catequina actúa como un antioxidante eficaz cuando se usa en dosis bajas (dentro del rango de niveles altos de nanomolar y micromolar bajo) e induce la producción de ERO's y daño oxidante a dosis más altas. La actividad antioxidante de EGCG se ha asociado con la prevención del cáncer, mientras que su actividad prooxidante se ha propuesto para inducir la muerte celular en células cancerosas (Lambert y Elias, 2010). Por tal motivo, los resultados de este estudio sugieren que la disminución de apoptosis en el grupo EGCG-CrO₃ se debe a que la EGCG evita la generación excesiva de ERO's, mediante su actividad antioxidante, lo que provoca una disminución del daño al ADN. Estos resultados pueden estar relacionados con la disminución de los MN, de las UA y de los niveles urinarios de 8-OHdG sugiriendo que, al haber menos células con daño al ADN, menos células son enviadas a apoptosis. Se ha demostrado que el pretratamiento con EGCG evita la generación excesiva de ERO's lo que inhibe la apoptosis (Yao *et al.* 2008; Zou *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019).

El incremento de células apoptóticas y necróticas en el grupo tratado con CrO₃ confirma las observaciones realizadas tanto *in vivo* (García-Rodríguez *et al.*, 2013; 2015) como *in vitro* (Hayashi *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2015). El daño al ADN y la alteración de los estados oxidantes intracelulares tienen el potencial para desencadenar o sensibilizar una célula a la apoptosis. Por lo tanto, las ERO's generadas a partir de Cr(VI) durante su reducción, 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 importante 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 a escapar de la muerte celular y proliferar, lo cual es un factor importante en la carcinogénesis que se ha observado en personas expuestas al cromo.

En la figura 26 se presenta un esquema de las vías propuestas por las cuales la EGCG podría estar protegiendo del daño inducido por CrO_3 . Se propone que la EGCG evita el aumento de ERO's debido a que esta catequina podría estar estimulando la actividad de GST, la cual utiliza como cofactor al GSH para eliminar al cromo. Al estarse eliminando el cromo se reduce la formación de ERO's. Además, la EGCG también podría estar estimulando la actividad de CAT, lo que evita que el H_2O_2 entre a la reacción de Fenton y produzca radicales $\cdot\text{OH}$. Anuado a esto se ha observado que la EGCG puede quelar metales o neutralizar los RL directamente, además de estimular otros antioxidantes, lo que disminuye aún más la producción de ERO's. Por lo tanto, la disminución de los MN, de la fragmentación del ADN, de los niveles de 8-OHdG y de la apoptosis observadas en este estudio podría deberse a que la EGCG previene del daño antes de que este se lleve a cabo. No obstante, no se descarta la posibilidad de la que la EGCG también pueda estar activando los mecanismos de reparación para reparar el daño en el ADN.

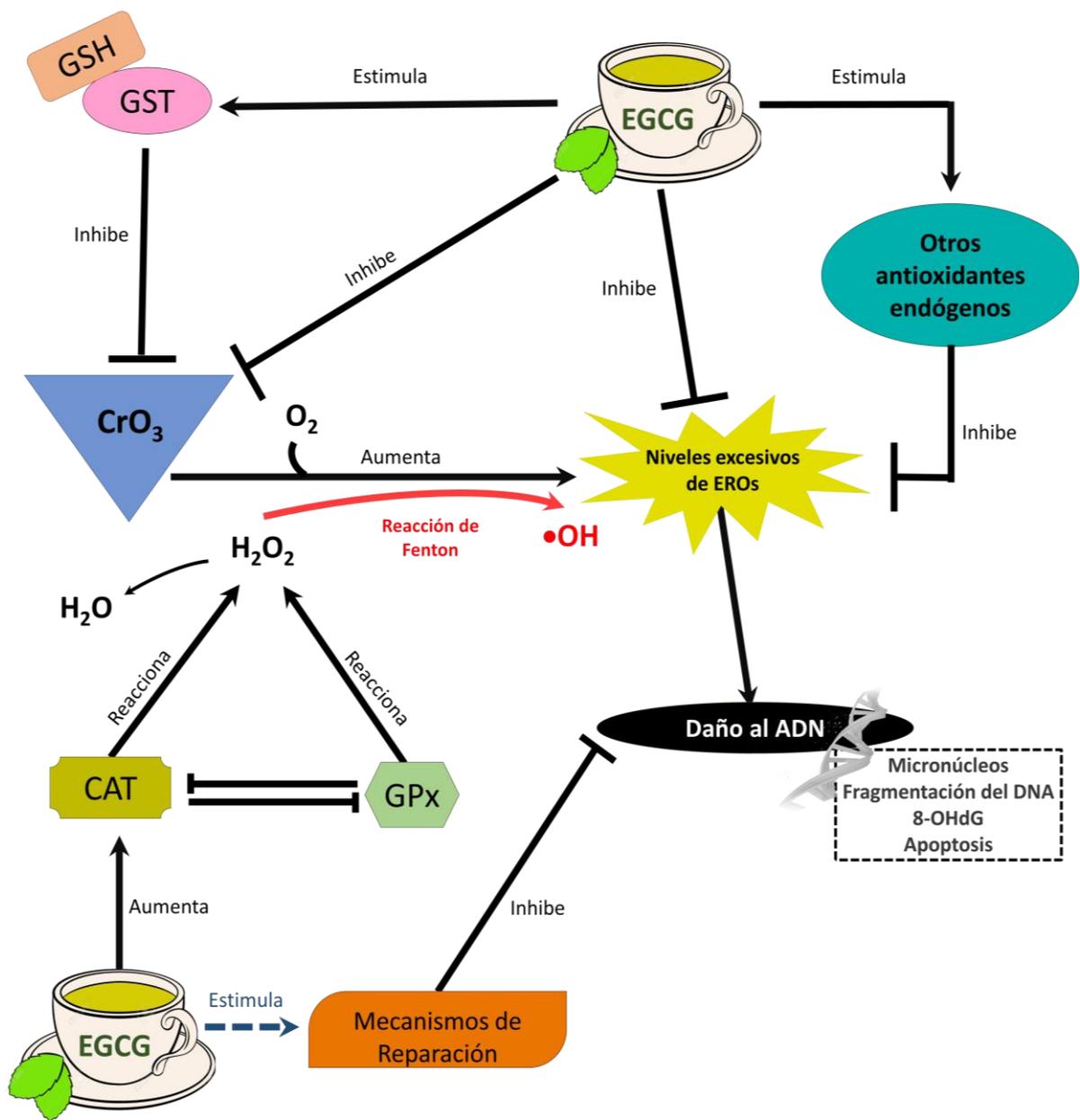


Figura 26. Vías de protección de la EGCG contra el daño cito/ genotóxico de CrO₃.

VIII. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

- 1) La administración de EGCG protege del daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO_3 , ya que se presenta una disminución en los promedios de MN y un aumento de las células viables en comparación con el grupo tratado solo con CrO_3 .
- 2) En la administración de la EGCG previa al tratamiento con CrO_3 no se incrementaron los niveles del aducto 8-OHdG y se redujeron los promedios de cometas en comparación con el grupo CrO_3 , lo que sugiere que la EGCG protege del daño oxidante al ADN.
- 3) La administración de la EGCG previa al tratamiento con CrO_3 “regularizó” el sistema antioxidante endógeno ya que aumento la concentración de antioxidantes endógenos y la actividad de catalasa, pero disminuyó la actividad de GPx y la concentración de GSH en comparación con el tratamiento con CrO_3 . Lo que nos sugiere que el efecto de la EGCG sobre el sistema antioxidante endógeno está implicado en las vías de protección del daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO_3 .
- 4) En la administración de la EGCG previa al tratamiento con CrO_3 no se incrementaron las células apoptóticas en comparación con el tratamiento de CrO_3 , lo que sugiere que la apoptosis no es una vía por la cual la EGCG elimine células genéticamente dañadas.
- 5) Estos resultados nos permiten sugerir que la EGCG protege del daño genotóxico inducido por el CrO_3 mediante la inhibición o formación del radical $\cdot\text{OH}$, ya que solo se incrementaron los niveles del aducto 8-OHdG en el grupo tratado con CrO_3 . La EGCG pudo capturar directamente el radical $\cdot\text{OH}$ o al modular el sistema antioxidante endógeno inhibió su formación. El hecho de que en el grupo tratado con la EGCG y CrO_3 no se incrementaron las células apoptóticas sugiere que la dosis de 8.5 mg/kg no indujo la eliminación de las células con daño en el ADN.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abib** R., Peres k., Barbosa A., Peres T., Bernades A., Zimmermann L., Quincozes-Santos A., Fiedler H., Leal R. y Farina M. (2011). Epigallocatechin-3-gallate protects rat brain mitochondria against cadmium-induced damage. *Food Chem. Toxicol.* 49: 2618-2623.
- Adikesavan** G., Vinayagam M., Abdulrahman L. y Chinnasamy T. (2013). (-)-Epigallocatechin-gallate (EGCG) stabilize the mitochondrial enzymes and inhibits the apoptosis in cigarette smoke-induced myocardial dysfunction in rats. *Mol. Biol. Rep.* 40: 6533-6545.
- Adler** ID., Bootman J., Favor J., Hook G., Schriever G., Welzl G., Whorton E., Yoshimura I. y Hayashi M. (1998). Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat. Res.* 417: 19-30.
- Aherne** AS. y O'Brien N. (2000). Mechanism of protection by the flavonoides, quercetin and rutin, against tertbutylhydroperoxide-and menadione-induced DNA single strand breaks in CACO-2 cells. *Free Radical Biol Med.* 6: 507-514.
- Allen** RT., Hunter WJ. III y Agrawal DK. (1997). Morphological and Biochemical Characterización and Analysis of Apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 37: 215-228.
- Ames** B. (1989). Mutagens and carcinogens: endogenous and exogenous factors. *Environ Mol Mutagen.* 14: 66-77.
- Amin** A., Wang D., Zhang H., Peng S., Shin H., Brandes J., Tighouart F., KhuriZ., Chen Z. y Shin D. (2010). Enhanced anti-tumor activity by the combination of the natural compounds (-)-epigallocatechin-3-gallate and luteolin potential role of p53. *J. Biol. Chem* 285: 34557-34565.
- Arencibia-Arrebola** DF., Rosario-Fernández LA., López-Feria Y. y Díaz-Rivero D. (2003). Las plantas, Fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. *Retel.* 21: 37-51.
- Asami** S., Hirano T., Yamaguchi R., Tsurudome Y., Itoh H. y Kasai H. (1998). Effects of Forced Spontaneous Exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem Biophys Res Commun.* 243: 678-682.
- Avello** M. y Suwalsky M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea.* 494: 161-172.
- Bach** J., Peremartí J., Annangi B., Marcos R. (2015). Reduced cellular DNA repair capacity after environmentally relevant arsenic exposure. Influence of Ogg1 deficiency. *Mutat Res.* 779: 144-51.
- Bagchi** D., Vuchetich, PJ., Bagchi M., Hassaoun E., Tran MN., Tangs L. y Stosh. (1997) Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate (Chromium VI) and Cadmium Chloride (CadmiumII) to rats. *Free Radic Biol Med.* 3: 471-478.
- Banu** KS., Stanley JA., Sivakumar KK., Arosh AJ. y Burghardt CR. (2016). Resveratrol protects the ovary against chromium-toxicity by enhancing endogenous antioxidant enzymes and inhibiting metabolic clearance of estradiol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 303: 65-78.
- Bender** M. (1980). Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production. *Basic Life Sci;* 15: 245-265.
- Benzie** I. y Strain J. (1999). Effect of vitamin C supplementation on concentrations of vitamins C and E in fasting plasma. *Asia Pac J Clin Nutr.* 8: 207-210.

- Bertram B.**, Bollow U., Rajae-Behbahani N., Bürkle A. y Schmezer P. (2003). Induction of poly(ADP-ribosyl)ation and DNA damage in human peripheral lymphocytes after treatment with (-)-epigallocatechin-gallate. *Mutat Res.* 10: 77-84.
- Bianchi V.**, Dal TR., Debetto P., Gino LA., Luciani S., Majone F. y Tamino G. (1980) Mechanism of Chromium Toxicity in mammalian cell cultures. *Toxicology.* 17: 219-224.
- Blankenberg F.** (2008). *In vivo* detection of apoptosis. *J. Nucl. Med.* 49: 81-95.
- Blasiak J.** y Kowalik, J. (2000). «A comparison of the *in vitro* genotoxicity of tri- and hexavalent chromium». *Mutat Res.* 469: 135-45.
- Bolognesi C.** y Hayashi M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animal. *Mutagenesis.* 26: 205-213.
- Bravo L.** (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 56: 317-333.
- Bridges CC.** y **Zalups RK.** (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 3: 274-308.
- Cabrera C.**, Artacho R. y Giménez R (2006). Beneficial effects of green tea a review. *J Am Coll Nutr* 25: 79-99.
- Caillet S.**, Yu H., Lessard S., Lamoureux G., Ajdukovic D. y Lacroix M. (2007). Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chem.* 100: 542-552.
- Carltonia P.**, Tiano L., Padella L., Bacchetti T., Customu C., Kay A. y Damianic E. (2013). Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. *Food Res Int.* 53: 900-908
- Cemeli E.**, Baumgartner A. y Anderson D. (2009). Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res.* 681: 51-67.
- Chang PY.**, Mirsalis J., Riccio ES., Bakke JP., Lee PS., Shimon J., Phillips S., Fairchild D., Hara Y. y Crowell JA. (2003). Genotoxicity and toxicity of the potential cancer-preventive agent polyphenon E. *Environ Mol Mutagen.* 4: 43-54.
- Chengs KC.**, Cahills DS., Kasais H., Nishimuras S. y Loeb LA. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions. *J Biol Chem.* 267: 166-172.
- Chow HH.**, Hakim IA., Vining DR., Crowell JA., Tome ME., Ranger-Moore J., Cordova CA., Mikhael DM., Briehl MM. y Alberts DS. (2007). Modulation of human glutathione s-transferases by polyphenon e intervention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 1662-1666.
- Cisneros P.**, Pupo BJ. y Cespedes ME. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutación peroxidasa. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 16: 10-15. Recuperado en 3 de septiembre de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001997000100002&lng=es&tlng=es.
- Cole J.** y **Skoper T.** (1994). International commission for protection against environmental mutagens and carcinogenesis, working paper 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population *in vivo*. *Mutation Res.* 304: 33-106.
- Collins AR.**, Ma AG. y Duthie SJ. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res.* 336: 69-77.
- Conte C.**, Mutti I., Puglisi P., Ferrarin A., Regina G., Maestri E. y Marmiroli N. (1998). DNA fingerprinting analysis by a pcr based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere.* 37: 2739-2749.

- Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Risueño MC. y Testillano PS. (2018).** The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models. *Environ Pollut.* 240: 77-86.
- Crispo J., Ansell D., Piche M., Eibl J., Khaper N., Ross G. y Tai T. (2010).** Protective effects of polyphenolic compounds on oxidative stress-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 88:429-38.
- Crozier IB. y Jaganath, MN. (2009).** Clifford Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on Health. *Nat Prod Rep.* 26: 1001-1043.
- Dana K., Rozati R., Saleha B., Jamil K. y Grover P. (2001).** *In vivo* genotoxic effect of potassium dichromate in mice leukocytes using comet assay. *Food Chem Toxicol.* 39: 859-65.
- Das J., Kang M., Kim E., Kwon D., Choi Y. y Kim J. (2015).** Hexavalent chromium induces apoptosis in male somatic and spermatogonial stem cells via redox imbalance. *Sci Rep.* 5: 1-14.
- Davies KJA., Delsignore M.E. y S.W. (1987).** LinProtein damage and degradation by oxygen radicals. Part 2. Modification of amino-acids. *J. Biol. Chem.* 262: 9902-9907.
- De Flora S. (1998).** Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 402: 151-158.
- De Flora S., Bennicelli C., Camoirano A., Serra D., Romano M., Rossi GA., Morelli A. y De Flora, A. (1985)** *In vivo* effects of N-acetylcysteine on glutathiones metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis.* 6: 1735-1745.
- De Vizcaya RM. y Del Razo ML. (2008)** Daño oxidativo y enfermedades crónicodegenerativas asociadas a la contaminación ambiental. “En Radicales libres y estrés oxidativo”, Fainstein Mina Konigsberg. México, Manual Moderno. 459-474.
- Devasagayam T., Tilak J., Boloor K., Sane K., Ghaskadbi S., Lele R. (2004).** Free radicals and antioxidants in human Health: current status and future prospects, *J. Assoc., Phys.* 52: 794-804.
- Devika P. y Prince P. (2008-a).** (-) Epigallocatechingallate protects the mitochondria against the deleterious effects of lipids, calcium and adenosine triphosphate in isoproterenol induced myocardial infarcted male wistar rats. *J. Appl. Toxicol.* 28: 938-944.
- Devika P. y Prince P. (2008-b).** (-) Epigallocatechin-gallate (EGCG) prevents mitochondrial damage in isoproterenol-induced cardiac toxicity in albino wistar rats: a trasmission electron microscopic and *in vitro* study. *Pharmacol. Res.* 57: 351-357.
- Eastmond DA., Hartwig A., Anderson D., Anwar WA., Cimino MC., Dobrev I., Douglas GR., Nohmi T., Phillips DH. y Vickers C. (2009).** Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis.* 24: 341-349.
- Elena GA. (2002).** Macanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Rev. argent. anestesiol.* 60: 391-401.
- Eng QY., Thanikachalam PV. y Ramamurthy S. (2018).** Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. *J Ethnopharmacol.* 210: 296-310.
- EPA.** *Environmental Protection Agency.* (1984). Health Assessment Document for Chromium. Environmental Assessment and Criteria Office. Research Triangle Park, NW.
- Evans MD., Dizdaroglu M. y Cooke MS. (2004).** Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Res.* 567: 1-6.
- FDA.** *Food and Drug Administration.* (2000). Guidelis for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. USA.

- Fiorini R.**, Donovan J., Rodwell D., Evans Z., Cheng G., May H., Milliken C., Markowitz J., Campbell C., Haines J., Schmidt M. y Chavin K. (2005). Short-term administration of (-)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl.* 11: 298-308.
- Flora SJS y Gupta R.** (2014). Chapter 29. Metals in "Biomarkers in Toxicol". Elsevier Inc. USA. 485-519.
- Floyd RA.**, Watson JJ., Wong PK., Altmiller DH. y Rickard RC. (1986). Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radic Res.* 1: 163-172.
- Forman H.**, Zhang H. y Rinna A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 30: 1-12.
- Foulkes EC.** (1990). Biological Effects of Heavy Metals in Metal Carcinogenesis. *CRC Press.* 2: 36-44.
- Fuhrman B.** y Aviram M. (2002). Chapter 16. Polyphenols and Flavonoids in "Handbook of Antioxidants" Protect LDL Against atherogenic Modifications. 2nd ed. New York, NY Editado por Cadenas y Packer.
- Furukawa A.**, Oikawa S., Murata M., Hiraku Y. y Kawanishi S. (2003). (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochem Pharmacol.* 66: 1769-78.
- García-Rodríguez M.**, Carvante-Juarez M. y Altamirano-Lozano M. (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.* 2013: 486419.
- García-Rodríguez M.**, García-Cárdenas G., Montaña-Rodríguez A. y Altamirano-Lozano M. (2014). Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio [II]) en ratones de la cepa CD-1: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular. *Acta Universitaria.* 24: 91-96.
- García-Rodríguez M.**, López-Santiago V. y Altamirano-Lozano M. (2001). Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res;* 496: 145-215.
- García-Rodríguez M.**, Nicolás-Méndez T., Serrano-Reyes G. y Altamirano-Lozano M. (2016). 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]. *Free Radic Biol Med.* 100: S106.
- García-Rodríguez MC y Altamirano-Lozano MA.** (2007). La clorofilina como modulador y protector de daño al DNA: experiencia en el ratón *in vivo*. *Bioquímica.* 32: 15-24
- García-Rodríguez MC.**, Altamirano-Lozano M. y Gordillo-García A. (2018). Chapter 3. The role of Green Tea Polyphenols in the Protection from Hexavalent Chromium-Induced Genotoxic Damage. "POLYPHENOLS" Wong J. London, United Kingdom: IntechOpen (51-67) .
- García-Rodríguez MC.**, Gordillo-García A. y Altamirano-Lozano M. (2017). Chapter 5. The Role of Vitamin C in the Protection and Modulation of Genotoxic Damage Induced by Metals Associated with Oxidative Stress. "VITAMIN C". Edited by Amal Hamza; Ain Shams University, Egypt.
- García-Rodríguez MC.**, Montaña-Rodríguez AR. y Altamirano-Lozano M. (2015). Modulation of hexavalent chromium-induced genotoxic damage in peripheral blood of mice by epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its relationship to the apoptotic activity. *J Toxicol Env Heal A.* 79: 28-38.

- García-Rodríguez MC.**, Vilches-Larrea RE., Nicolás-Méndez T. y Altamirano-Lozano MA. (2012). Green tea and its role on chemoprevention *in vivo* of genotoxic damage induced by carcinogenic metals (Chromium [VI]). *Nutr Hosp.* 27: 1204-1212.
- Glei M.** y **Pool-Zobel BL.** (2006). The main catechin of green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes. *Toxicol. In vitro.* 20: 295-300.
- González-Torres M.**, Betancourt RM. y Ortiz M.R., (2000). Daño Oxidante y antioxidantes. *Bioquímica.* 25: 3-9.
- Griffith O.** (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* 106: 207-12.
- Gupta S.**, Ahmad N., Nieminen AL. y Mukhtar H. (2000). Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 164: 82-90.
- Gutteridge JM.** y **Halliwell B.** (1992). Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med.* 12: 93-5.
- Hakim I.**, Harris R. y Weisgerber U. (2000). Tea intake and squamous cell carcinoma of the skin: Influence of type of tea beverages. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9: 727-731.
- Hakim JA.**, Chow HH. y Harris RB. (2008). Green tea consumption is associated with decreased DNA damage among GSTM1-positive smokers regardless of their hOGG1 genotype. *J Nutr.* 138: 15675-715.
- Halliwell B.** y **Gutteridge J.** (2015). Free radical in Biology and Medicine. 5th ed. Oxford University Press.
- Hanahan D.** y **Weinberg RA.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57-70.
- Hansberg TW.** (2008). El dióxigeno y sus especies reactivas. En Radicales libres y estrés oxidante. Editado por Fainstein Mina Konigsberg. México, Manual Moderno; 25-46.
- Harnly JM.**, Doherty RF., Beecher GR., Holden JM., Haytowitz DB., Bhagwat S. y Gebhardt S. (2006). Flavonoid Content of U.S. Fruits, Vegetables, and Nuts. *J Agric Food Chem.* 54: 9966-9977.
- Hayashi M.**, Morita T., Kodama Y., Sofuni T. y Ishidate M Jr. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research,* 245: 245-249.
- Hayashi M.**, Mac Gregor J., Gartehouse D., Adler I., Blaker D., Derting S., Krishna G., Morita T., Ruso A. y Suto S. (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol desing including repeated tratment, integration whit toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen.* 35: 234-252.
- Hayashi M.**, Tice RR., MacGregor JT., Anderson D., blakey DH., Kirsh-Vodres M., Oleson FB Jr., Pacchierotti F., Romagna F., Shimada H., Soutu S. y Vannier B. (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res.* 312: 293-304.
- Hayashi Y.**, Kondo T., Zhao Q., Ogawa R., Cui Z., Feril L. y Kasuya M. (2004). Signal transduction of p53-independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 197: 96-106.

- Hayes** JD., Flanagan JU. y Jowsey IR. (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol.* 45: 51-88.
- Heddle** AJ., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., McGahon JT., Newell GW. y Salamone MF. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.*, 123: 61-118.
- Hemmink** K., Dipple A., Shuker D., Fadlubar F., Segerback D. y Bartsch H. (1994). Adducts identification and biological significance. International Agency for Research on Cancer Lyons. *IARC Scientific Public.* 125: 478.
- Henkler** F., Brinkmann J. y Luch A. (2010). The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. *Cancers (Basel)*. 2: 376-96.
- Ho** C., Choi S., Siu P. y Benzie I. (2014). Effects of single dose and regular intake of green tea (*Camellia sinensis*) on DNA damage, DNA repair, and heme oxygenase-1 expression in a randomized controlled human supplementation study. *Mole Nutr Food Res.* 58: 1379-1383.
- Hollstein** M., Sidransky D., Vogelstein B. y Harris CC. (1991). p53 mutations in human cancer. *Science.* 253: 49-53
- Hsu** TC., Zhao YJ., Wang RY., Wu YF., Spitz MR. y Hong WK. (2001). Comparative efficacy as antioxidants between ascorbic acid and epigallocatechin gallate on cells of two human lymphoblastoid lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 124: 169-171.
- Hsu** YW., Tsai CF., Chen WK., Huang CF. y Yen CC. (2011). Una evaluación de toxicidad subaguda del extracto de té verde (*Camellia sinensis*) en ratones. *Food Chem.Toxicology.* 49: 2624-2630.
- ICPEMC.** (1983). Screening strategy for chemicals that are potential germ-cell mutagens in mammals. *Mutat Res.* 144: 117-177.
- Isbrucker** RA., Edwards JA., Wolz E., Davidovich A. y Bausch J. (2006). Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 3: teratogenicity and reproductive toxicity studies in rats. *Food Chem Toxicol.* 44: 651-61.
- Johansson** LH. y **Borg** LAH. (1988). A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal. Biochem.* 174: 331-336.
- Jomova** K. y **Valko** M. (2011). Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. *Curr Pharm Des.* 17: 3460-73.
- Jones** D. (2006). Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal.* 8: 1865-1879.
- Joseph** PD. (2010). Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genomics Proteomics.* 2010: 876940.
- Kamalden** T., Ji D. y Osborne N. (2012). Rotenone-induced death of rgc-5 cells is caspase independent, involves the jnk and p38 pathways and is attenuated by specific green tea flavonoids, *Neurochem, Res* 37, 1091-1101.
- Kanadzu** M., Lu Y. y Morimoto K. (2006). Dual function of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes. *Cancer Lett.* 241: 50-5.
- Kanvah** S. y **Schuster** GB. (2006). Oxidative damage to DNA: Inhibition of guanine damage. *Pure Appl Chem.* 78: 2297-2304.
- Kanwar** J., Taskeen M., Mohammad I., Huo C., Chan T. y Dou Q. (2012). Recent advances on tea polyphenols. *Front Biosci.* 1: 111-131.
- Kassie** F., Parzefall W. y Knasmuller S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 463: 13-31.

- Katihar SK., Bergamo BM., Praveen K. y Elmets CA. (2001).** Green tea polyphenols: DNA photodamage and photoimmunology. *J Photoch Photobio B.* 65: 109-114.
- Khan SA., Priyamvada S., Khan MW., Khan S., Farooq N. y Yusufi ANK. (2009).** Studies on the protective effect of green tea against Cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacol Res* 60: 382-391.
- Khrisna G y Hayashi M. (2000).** *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research.* 455: 155-166.
- Kim HS., Montana V., Jang H., Parpura V. y Kim J. (2013).** Epigallocatechin gallate (EGCG) stimulates autophagy in vascular endothelial cell: a potential role for reducing lipid accumulation. *J. Biol. Chem.* 288: 22693-22705.
- Kim SH., Quon MJ., Kim J. (2014).** New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Redox Biology.* 2: 187-195.
- Koh SH., Kwon H., Kim KS., Kim J., Kim MH., Yu HJ., Kim M., Lee KW., Do BR., Jung HK., Yang KW., Appel SH. y Kim SH. (2004).** Epigallocatechin gallate prevents oxidative-stress-induced death of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase (G93A) motoneuron cells by alteration of cell survival and death signals. *Toxicology.* 202: 213-225.
- Konigsberg M. (2008).** Radicales libres y Estrés Oxidante. México: El manual moderno.
- Krishana G., Nath J. y Ong T. (1986).** Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in mice by vitamin C. *Cancer Res.* 46: 2670-2674.
- Krishna G. y Hayashi M. (2000).** *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 455: 155-166.
- Kuroda Y. (1996).** Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res.* 361: 179-186.
- Lagroye I., Hook GJ., Wettring BA., Baty JD., Moros EG., Straube WL. y Roti Roti JL. (2004).** Measurements of alkali-labile DNA damage and protein-DNA crosslinks after 2450 MHz microwave and low-dose gamma irradiation *in vitro.* *Radiat Res.* 161: 201-14.
- Lambert JD. y Elias RJ. (2010).** The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention, *Arch Biochem Biophys* 501: 65-72.
- Lee JC., Son YO., Pratheeshkumar P. y Shi X. (2012).** Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 53: 742-757.
- Lee MJ., Maliakal LP., Chen X. Meng FY., Bondoc S., Prabhu G., Lambert S., Mohr CS y Yang. (2002).** Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 1025-1032.
- Lee T., Cheng I., Shue J., Whang T. (2011).** Cytotoxicity of arsenic trioxide is enhanced by (-)-epigallocatechin-3-gallate via suppression of ferritin in cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 250: 69-77.
- Legeay S., Rodier M., Fillon L., Faure S. y Clere N. (2015).** Epigallocatechin gallate: a review of its beneficial properties to prevent metabolic syndrome. *Nutrients* 7: 5443-5468.
- Li Y., Li P., Shanfa Y., Zhang J., Wang T., Jia G. (2014).** miR-3940-5p associated with genetic damage in workers exposed to hexavalent chromium. *Toxicol Lett.* 229: 319-326.

- Liang** YC., Lin-Shiau SY., Chen CF. y Lin JK. (1999). Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast cancer carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem.* 75:1-12.
- Liu** S. y **Dixon** K. (1969). induction of mutagenic DNA by chromium (VI) and Glutathione. *Environ Mol Mutagen.* 28: 71-79.
- Lobo** V., Patil A., Phatak A. y Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev;* 4: 118-126.
- Malyapa** RS., Bi C., Ahern EW. y Roti JLR. (1998). Detection of DNA Damage by the Alkaline Comet Assay after Exposure to Low-Dose Gamma Radiation. *Radiat Res.* 149: 396-400.
- Manach** C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. y Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79: 727-747.
- Margină** D., Ilie M., Grădinaru D., Androusoopoulos VP., Kouretas D. y Tsatsakis AM. (2015). Natural products-friends or foes? *Toxicol Lett.* 236: 154-67.
- Marim** R., De Gusmão A., Castanho R., Deminice R., Therezo A., Jordão A., Assis M., Taípeiro E. y Martins L. (2015). Effects of vitamin C supplementation on the chronic phase of chagas disease. *Rev Inst Med Trop.* 57: 245-250.
- Martínez-Sámano** J., Torres-Durán P. y Juárez-Oropeza M. (2011). El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Rev Educ Bioquím.* 30: 56-67.
- Martínez-Sarrasague** M., Barrado D., Zubillaga M., Hager A., De Paoli T. y Boccio J (2006). Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 40: 45-54.
- Masella** R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C. y Giovannini C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 16: 577-586.
- Mavournin** KH., BLakey DH., Cimino MC., Salamone MF. y Heddle JA. (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 239: 29-80.
- McGahon** AJ., Martin SJ., Bissonnette RP., Mahboubi A., Shi Y., Mogil RJ., Nishioka WK. y Green DR. (1995). The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *in vitro*. *Methods Cell Biol.* 46: 153-185.
- Meng** X., Sang S., Zhu N., Lu H., Sheng S., Lee MJ., Ho CT. y Yang CS. (2002). Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 1042-1050.
- Mertz** W. (1969). Chromium Occurrence and Function in Biological Systems. *Physiol Rev.* 49: 163-239.
- Miller** NJ., Rice-Evans C., y Davies MJ. (1993). A new method for measuring antioxidant activity. *Biochem. Soc. Trans.* 21: 95S.
- Moore** RJ., Jackson KG., Minihane AM. (2009). Green tea (Camellia sinensis) catechins and vascular function. *Br. J. Nutr.* 102: 1790-1802.
- Muñoz** A. (2009). Evaluación del daño en el DNA en dos poblaciones colombianas de agricultores y floricultores. *U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica.* 12: 7-16.

- Nakabeppu Y. (2014).** Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. *Int J Mol Sci.* 15: 12543-12557.
- Nakagawa T., Yokozawa T., Sano M., Takeuchi S., Kim M. y Minamoto S. (2004).** Activity of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate against oxidative stress in rats with adenine-induced renal failure. *J Agric Food Chem.* 52: 2103-7.
- Nakazato T., Ito K., Ikeda Y., y Kizaki M. (2005).** Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin Cancer Res.* 11: 6040-6049.
- Naoi M., Maruyama W., Shamoto-Nagai M., Yi H., Akao Y. y Tanaka M. (2005).** Oxidative stress in mitochondria. *Mol Neurobiol* 31: 81-93.
- Newsome BJ., Petriello MC., Han SG., Murphy MO., Eske KE., Sunkara M., Morris AJ. y Hennig B. (2014).** Green tea diet decreases PCB 126-induced oxidative stress in mice by up-regulating antioxidant enzymes. *J Nutr Biochem.* 25: 126-35.
- NLM.** National Library of Medicine. (1999). RTECS. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances.
- Norseth T. (1981).** The carcinogenicity of Chromium. *Environ Health Perspect.* 40: 121-130.
- O'Brien TJ., Ceryak S. y Patierno SR. (2003).** Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res.* 533: 3-36.
- Oakley A (2011).** "Glutathione transferases: a structural perspective". *Drug Metab Rev.* 43: 138-51.
- Ock CY., Hong KS., Choi KS., Chung MH., Kim Ys., Kim JH. y Hahm KB. (2011).** A novel approach for stress-induced gastritis based on paradoxical antioxidative and anti-inflammatory action of exogenous 8-hydroxydeoxyguanosine. *Biochem Pharmacol.* 81: 111-122.
- OECD (1997).** Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Guideline for Testing of Chemicals; 474.
- Olive PL., Banáth JP. y Durand RE. (1990).** Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.* 122: 86-94.
- Oliveira M., Nabavi S., Daglia M., Rastrelli L. y Nabavi S. (2016).** Epigallocatechin gallate and mitochondria-A story of life and death. *Pharmacol Res.* 104: 70-85.
- Ostling O y Johanson KJ. (1984).** Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 123: 291-8.
- Paglia DE. y Valentine WN. (1967).** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169.
- Papi A., Farabegoli F., Lori R., Orlandi M., De Nicola G. Bagatta M. y Angelino D. (2013).** Vitexin-2-O-xyloside, raphasatin and (-)-epigallocatechin-3-gallate synergistically affect cell growth and apoptosis of colon cancer cells. *Food Chem.* 138: 1521-1530.
- Paredes SF. y Roca F. (2002)** Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Bioquímica.* 21: 96-100.
- Pilger A. y Rüdiger W. (2006).** 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Environ Health.* 80: 1-15.
- Pires F., Geraldo V., Antunes A., Marletta A., Oliveira O. y Raposo M. (2019).** On the role of epigallocatechin-3-gallate in protecting phospholipid molecules against UV irradiation. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 173: 312-319.

- Prabhulkar S.** y Li CZ. (2010). Assessment of oxidative DNA damage and repair at single cellular level via real-time monitoring of 8-OHdG biomarker. *Biosens Bioelectron.* 26: 1743-1749.
- Prior R.**, Wu X. y Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.
- Pullikotil P.**, Chen H., Muniyappa R., Greenberg C., Yang S., Reiter C., Lee J., Chung J. y Quon M. (2012). Epigallocatechin gallate induces expresión of heme oxigenase-1 α in endothelial cells via p38 MAPK and Nrf-2 that suppresses proinflammatory actions of TNF- α . *J. Nutr. Biochem.* 23: 1134-1145.
- Qi W.**, Reiter RJ., Tan DX., Garcia JJ., Manchester LC., Karbownik M. y Calvo JR. (2000). Chromium(III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. *Environ Health Perspect.* 108: 399-403.
- Quiñones M.**, Miguel M. y Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 27: 76-89.
- Rahman K** (2007) Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging.* 2: 219-236.
- Ramírez AM.** y **Rojas LM.** (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Latreia* 23: 166-177.
- Ramos-León J.** (2016). Efecto de los flavonoles de camellia sinesis (mircetina, quercetina y rutina) sobre la inducción de MN y apoptosis en ratones tratados con trióxido de cromo. (Tesis de pregrado). Fes Zaragoza (UNAM), México.
- Reynolds M.** y **Zhitkovich A.** (2007). Cellular vitamin C increases chromate toxicity via a death program requiring mismatch repair but not p53. *Carcinogenesis.* 28: 1613-1620.
- Rizzo A.**, Berselli P., Zava S., Montorfano G., Negroni M., Corsetto P. y Berra. (2010). Capitulo: Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Bio Farms for Nutraceuticals.* US: 52-67.
- Rocha CAM.**, Da Cuncha LA., Pionheiro RHS., Bahía MO. y Burbano RMR. (2011). Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of colossoma macropomum exposed to methylmercury. *Genet. Mol. Biol.*, 34: 694-697.
- Rodríguez-Rey A.**, Noris-García E. y Fundora-Torres M. (2016). Principles and relevance of the comet assay. *Rev. cuba. investig. bioméd.* 35: 184-194.
- Roy M.**, Chakrabarty S., Sinha D., Bhattacharya RK. y Siddiqi M. (2003). Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutat Res.* 523-524: 33-41.
- Schantz M.**, Erk T. y Richling R. (2015). Metabolism of green tea catechins by the human small intestine. *Biotechnol. J.* 5: 1050-1059.
- Schroeder E.**, Kelsey N., Doyle E., Breed E., Bouchard R., Loucks F., Harbison R., Linseman D. (2009). Green tea epigallocatechin-3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective antiapoptotic Effect against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. *Antioxid. Redox Signal* 11: 469-480.
- Shi X.** y **Dalal NS.** (1992). The role of superoxide radical in the chromium (VI)-generated hydroxyl radical: The Cr(VI) Haber-Weiss cycle. *Arch Biochem Biophys.* 292: 323-327.
- Shi X.**, Chiu A., Chen CT, Halliwell B., Castranova V. y Vallyathan V. (1992). Reduction of chromium (VI) and its relationship with carcinogenesis. *J. Toxicol. Reinar.* 2: 87-104.

- Shi X.**, Ye J., Leonard S., Ding M., Vallyathan V., Castranova V., Rojanasakul Y., Dong Z. (2000). Antioxidant properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its inhibition of Cr[VI]-induced DNA damage and Cr[VI]-or TPA-stimulated NF-kB activation. *Mol. Cell. Biochem.* 206: 125-132.
- Sies H.** (1985). Oxidative Stress: Introductory Remarks. In: Oxidative Stress, edited by Sies H. London, *Academic Press*: London. 1-8
- Silva J.** y **Coutinho O.** (2010). Free radicals in the regulation of damage and cell death-basic mechanisms and prevention. *Drug Discov Ther.* 4: 144-16.
- Singh B.**, Chatterjee A., Ronghe A., Bhat N. y Bhat H. (2013). Antioxidant-mediated up-regulation of OGG1 via NRF2 induction is associated with inhibition of oxidative DNA damage in estrogen-induced breast cancer. *BMC Cancer.* 13: 253.
- Singh BN.**, Shankar S., y Srivastava RK. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* 82: 1807-1821.
- Singh NP.**, McCoy MT., Tice RR. y Schneider EL. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Expl Cell Res.* 175: 184-91.
- Sinha D.**, Dey S., Bhattacharya RK. y Roy M. (2007). *In vitro* mitigation of arsenic toxicity by tea polyphenols in human lymphocytes. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 26: 207-20.
- Sinha D.**, Roy M., Dey S. y Bhattacharya RK. (2003). Modulation of arsenic induced cytotoxicity by tea. *Asian Pac J Cancer Prev.* 4: 233-7.
- Sinha D.**, Roy M., Siddiqi M. y Bhattacharya RK. (2005). Arsenic-induced micronuclei formation in mammalian cells and its counteraction by tea. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 24: 45-56.
- Skrzydłewska E.**, Ostrowska J., Farbiszewski R., Michalak K. (2002). Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine.* 9: 232-8.
- Słoczyńska K.**, Powroźnik B., Pękala E. y Waszkielewicz A. (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genet;* 55: 273-285.
- Šmerák P.**, Šestáková H., Polívková Z., Štětina R., Langová M., Bárta I., Turek B., Bártová J. (2006). Antimutagenic Effect of Epigallocatechin Gallate and its Effect on the Immune Response in Mice. *Food Sci.* 24: 180-192.
- Song S.**, Huang YW., Tian Y., Wang XJ. y Sheng J. (2014). Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: Auto-oxidation-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in Jurkat cells. *Chin. J. Nat. Med.* 12: 654-662.
- Srividhya R.**, Zarkovic K., Stroser M., Waeg G., Zarkovic N. y Kalaiselvi P. (2009). Mitochondrial alterations in aging rat brain: effective role of (-)-epigallocatechin gallate. *Int J Dev Neurosci.* 27: 223-31.
- Stadtman ER.** (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins — biochemical-mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 315-325.
- Sugisawa A.**, Kimura M., Fenech M. y Umegaki K. (2004). Anti-genotoxic effects of tea catechins against reactive oxygen species in human lymphoblastoid cells. *Mutat Res.* 559: 97-103.
- Talhaoui I.**, Matkarimov BT., Tchenio T. y Zharkov DO. (2016). Aberrant base excision repair pathway of oxidatively damaged DNA: Implications for degenerative diseases. *Free Radic Biol & Med.* 107: 266-277.

- Tamino G.**, Peretta L. y Levis, AG. (1981). Effects of trivalent and hexavalent chromium on the physicochemicals properties of mammalian cell nucleic acids and synthetic polynucleotides. *Chem. Biol. interactions.* 37: 309-319.
- Tan X.**, Zhao C., Pan J., Shi Y., Liu G., Zhou B. y Zheng R. (2009). *In vivo* non-enzymatic repair of DNA oxidative damage by polyphenols. *Cell Biol Int.* 33: 690-6.
- Tang L.**, Tang M., Xu L., Luo H., Huang T., Yu J., Zhang L., Gao W., Cox SB. y Wang JS. (2008). Modulation of aflatoxin biomarkers in human blood and urine by green tea polyphenols intervention. *Carcinogenesis* 29: 411-417.
- Taraphdar AK.**, Roy M., y Bhattacharya RK. (2001). Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. *Curr Sci*, 80: 1387-1396.
- Tasao R** (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* 2: 1231-1246.
- Teaf C.** y **Middendorf P.** (2000). Chapter 12. Mutagenesis and Genetic Toxicology. "Principle of Toxicology". 2nd edition. New York, USA: 239-264.
- Tice RR.**, Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu JC. y Sasaki YF. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 35: 206-21.
- Trzeciak A.**, Kowalik J., Małecka-Panas E., Drzewoski J., Wojewódzka M., Iwanęko T. y Błasiak J. (2000). Genotoxicity of chromium in human gastric mucosa cells and peripheral blood lymphocytes evaluated by the single cell gel electrophoresis (comet assay). *Med. Sci. Monit.* 6: 24-9.
- Tuberoso CI.**, Boban M., Bifulco E., Budimir D. y Pirisi FM. (2013). Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: the case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chem.* 140: 686-91.
- Ueno S.**, Kashimoto T., Susa N., Furukawa Y., Ishii M., Yokoi K., Yasuno M., Sasaki Y. F., Ueda J., Nishimura Y. y Sugiyama M. (2001). Detection of dichromate (VI)-induced DNA strand breaks and formation of paramagnetic chromium in multiple mouse organs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 170: 56-62.
- USDA** (2007). Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Release 2.1. U.S. departamento of Agriculture.
- Valcic S.**, Muders A., Jacobsen NE., Liebler DC. y Timmermann BN. (1999). Antioxidant Chemistry of Green Tea Catechins. Identification of Products of the Reaction of (-)-Epigallocatechin Gallate with Peroxyl Radicals. *Chem Res Toxicol.* 12: 382-386.
- Valko M.**, Leibfritz D., Moncol J., Cronin MTD., Mazur M. y Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 44-84.
- Valko M.**, Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M. y Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1-40.
- Vega GS.** y **Reynaga O.** (1990). Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Ed. Limusa. México, D. F. p 727.
- Venereo GJ.** (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 31: 126-33.
- Wang JS.**, Luo H., Wang P., Tang L., Yu J., Huang T., Cox S. y Gao W. (2008). Validation of green tea polyphenol Biomarkers in a phase II human intervention trial. *Food Chem Toxicol.* 46: 232-40.

- Ward JF.**, Blakely WF. y Joner EI. (1985). Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. *Radiat Res.* 103: 383-92.
- Wheeler CR.**, Salzman JA., Elsayed NM., Omaye ST. y Korte DW Jr. (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal. Biochem.* 184: 193-199.
- White E** (1996). Life, death and pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 10: 1-5.
- Wong V.**, Armknecht S. y Zhitkovich A. (2012). Metabolism of Cr(VI) by ascorbate but not glutathione is a low oxidant-generating process. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 26: 192-196.
- Wu C.** y Wei G. (2002). Tea as a functional food for oral health. *Nutrition.* 18: 443-444.
- Wu CC.**, Hsu MC., Hsieh CW., Lin JB., Lai PH., Wung BS. (2006). Upregulation of heme oxygenase-1 by Epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Ark and ERK pathways. *Life Sci.* 78: 2889-2897.
- Wu F.**, Sun H., Kluz T., Hailey AC., Kiok K. y Costa M. (2012). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity *in vitro*. *Toxicol Appl Pharm.* 258: 166-175.
- Wu FY.**, Tsai FJ., Kuo HW., Tsai CH., Wu WY., Wang RY. y Lai JS. (2000). Cytogenetic study of workers exposed to chromium compounds. *Mutat Res.* 464: 289-296.
- Wu L.**, Chiou C., Chang P. y Wu J. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* 339: 1-9.
- Xu Y.**, Ho CT., Amin SG., Han C. y Chung FL. (1992). Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res.* 52: 3875-9.
- Yao K.**, Ye PP., Zhang L., Tan J., Tang XJ. y Zhang YD. (2008). Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria dependent apoptosis in human lens epithelial cells. *Mol Vis.* 14: 217-223.
- Yuan JH.**, LI YQ. y Yang XY. (2007). Inhibition of epigallocatechin gallate on orthopic colon cancer by regulating the Nrf2-UGT1A signal pathway in nude mice. *Pharmacology.* 80: 269-78.
- Zaveri NT.** (2006). Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer an noncancer applications. *Life Sci.* 78: 2073-2080.
- Zhang C.**, Liao P., Liang R., Zheng X., Jian J. (2019). Epigallocatechin gallate prevents mitochondrial impairment and cell apoptosis by regulating miR-30^a/p53 axis. *Phytomedicine* 61: 152845.
- Zhitkovich A.**, Quievryn G., Messer J. y Motylevich Z. (2002). Reductive activation with cysteine represents a chromium(III)-dependent pathway in the induction of genotoxicity by carcinogenic chromium(VI). *Environ Health Perspect.* 110: 729-731.
- Zou P.**, Song J., Jiang B., Pei F., Chen B., Yang X., Liu G. y Hu Z. (2014). Epigallocatechin-3-gallate protects against cisplatin nephrotoxicity by inhibiting the apoptosis in mouse. *Int J Clin Exp Pathol.* 7: 4607-16.

ANEXO 1

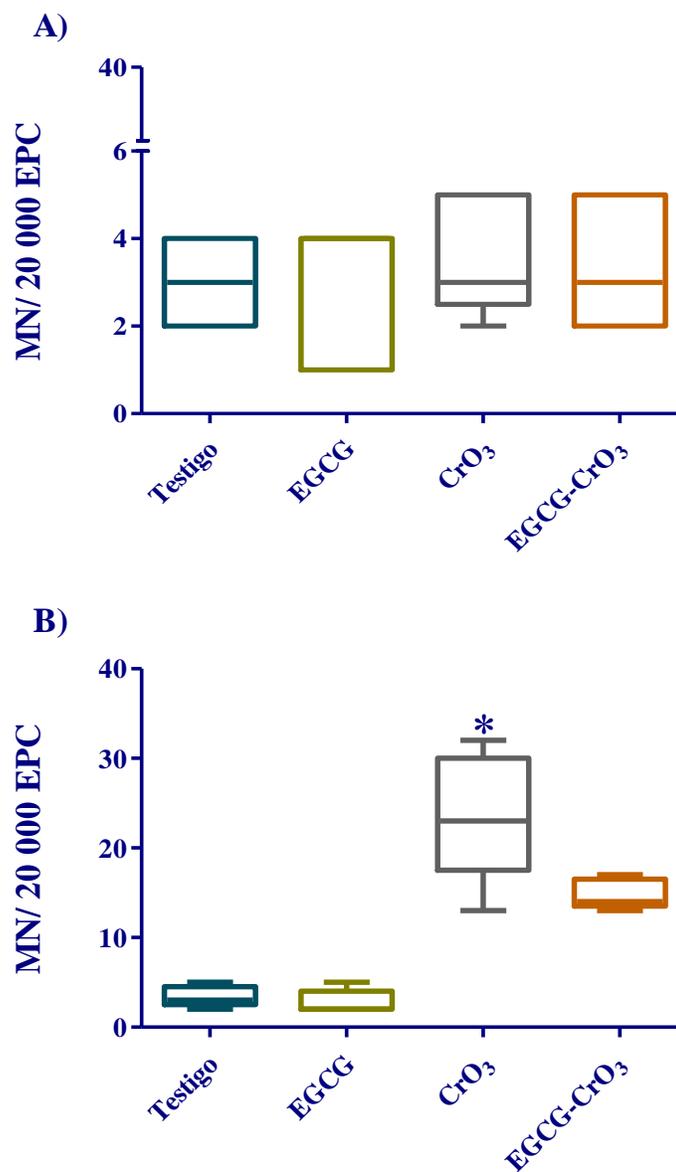


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de MN evaluados en 20,000 EPC cuando se administraron los diferentes tratamientos.

A) distribución de MN a las 0 h; B) distribución de MN a las 48 h. MN: micronúcleos, EPC: eritrocitos policromáticos, EGCG: (-)-epigallocatequina-3-galato y CrO₃: trióxido de cromo.

*p<0.05 vs testigo.

ANEXO 2

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

Evento: XVIII Reunión Internacional de Ciencias Médicas

Título de la ponencia: “Efecto de la (-)-epigallocatequina-3-galato y la (+)-catequina sobre el daño cito/genotóxico inducido por Cr(VI)”

Autores: Tonancy Nicolás Méndez, Estefani Yaquelin Hernández Cruz y María del Carmen García Rodríguez

Organizador: Universidad de Guanajuato, Campus León, División de Ciencias de la Salud y Departamento de Ciencias Médicas

Lugar y Fecha: León- Guanajuato, México 18, 19 y 20 de abril del 2018

Evento: XVIII Reunión Internacional de Ciencias Médicas

Título de la ponencia: “Efecto de extractos polifenólicos (p60) sobre la cito/genotoxicidad inducida por cromo hexavalente en ratones longevos”.

Autores: Leonel Esquivel Suárez, Estefani Yaquelin Hernández Cruz y María del Carmen García Rodríguez

Organizador: Universidad de Guanajuato, Campus León, División de Ciencias de la Salud y Departamento de Ciencias Médicas

Lugar y Fecha: León- Guanajuato, México 18, 19 y 20 de abril del 2018

Evento: 49th Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society
“Maintaining Genomics Integrity in the Face of Environmental Insult”

Título de la ponencia: “Relationship between Modulation of Genotoxic Damage and the Endogenous Antioxidant System of Mice Treated with (-)-epigallocatechin-3-gallate and Hexavalent Chromium”

Autores: Hernández-Cruz EY y García- Rodríguez MC

Organizador: Environmental Mutagenesis and Genomics Society

Lugar y Fecha: San Antonio, Texas 22-26 de septiembre del 2018

Evento: XIX Reunión Internacional de Ciencias Médicas

Título de la ponencia: “Efecto de la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre el sistema antioxidante endógeno y la cito/genotoxicidad del Cr(VI)”

Autores: Estefani Yaquelin Hernández Cruz y María del Carmen García Rodríguez

Organizador: Universidad de Guanajuato, Campus León, División de Ciencias de la Salud y Departamento de Ciencias Médicas

Lugar y Fecha: León- Guanajuato, México 10, 11 y 12 de abril del 2019

MEMORIAS

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



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

XVIII Reunión Internacional de Ciencias Médicas

18-20 abril 2018

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



www.reunioncienciasmedicasugto.org.mx



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO

122. Efecto de la (-)-epigallocatequina-3-galato y la (+)-catequina sobre el daño cito/genotóxico inducido por Cr(VI)

Estefani Yaquelin Hernández-Cruz, Tonancy Nicolás-Méndez*, María del Carmen García-Rodríguez.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental. Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”, UNAM. CDMX. *tonancymendez@gmail.com

Introducción. Al consumo del té verde se le ha asociado con los efectos benéficos para la salud. Estos efectos son debidos a su alto contenido de antioxidantes como las catequinas [(-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) y (+)-catequina]. En contra parte, los compuestos del cromo hexavalente pueden generar daño genotóxico mediante el estrés oxidante que se produce durante su reducción intracelular. De ahí que se proponga el uso de antioxidantes que se encuentran en la dieta como un procedimiento para proteger o modular el daño genotóxico.

Objetivo. Comparar el efecto de la EGCG y (+)-catequina sobre el daño genotóxico y citotóxico inducidos por compuestos de cromo hexavalente en ratones Hsd:ICR.

Material y Métodos. Grupos de cinco ratones machos fueron tratados de la siguiente manera: a) vehículo (agua destilada); b) 20 mg/kg de CrO₃, vía intraperitoneal; c) 10 mg/kg de EGCG ó 20 mg/kg de (+)-catequina, vía intragástrica; d) 10-20 mg/kg de EGCG-CrO₃ ó 20-20 mg/kg de (+)-catequina-CrO₃. Las muestras de sangre periférica fueron tomadas de la vena caudal a las 0 y 48 horas después de la aplicación de los tratamientos. El daño cito/genotóxico se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos (MN)¹, la apoptosis y viabilidad celular².

Resultados. Se corroboró el daño genotóxico y citotóxico del CrO₃ ya que se incrementaron las frecuencias de MN y apoptosis, mientras que se disminuyeron las células viables. La administración de los antioxidantes EGCG o (+)-catequina no modificaron las frecuencias de MN, pero la EGCG incrementa las células apoptóticas. El tratamiento combinado de EGCG-CrO₃ disminuyó las frecuencias de MN de forma parcial, reestablece la viabilidad celular e incrementa la apoptosis. Sin embargo, este efecto no se observó con el tratamiento combinado de (+)-catequinaCrO₃, ya que se observó un incremento en las frecuencias de MN, en las células no viables, y se disminuyeron las células apoptóticas.

Conclusión. Los resultados sugieren que la administración de EGCG protege de forma parcial el daño cito/genotóxico inducido por CrO₃, mientras que la (+)- catequina no protege el daño cito/genotóxico.

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 *CBSEP-CONACyT 853816*

6. Efecto de extractos polifenólicos [P60] sobre la cito/genotóxicidad inducida por cromo hexavalente en ratones longevos

Leonel Esquibel Suárez*, Estefani Yaquelin Hernández-Cruz, María del Carmen García-Rodríguez.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental. Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”, UNAM. CDMX. *nel2488leo@gmail.com

Introducción. En el envejecimiento los niveles de antioxidantes endógenos se reducen haciendo al organismo más susceptible al efecto tóxico de agentes como los compuestos del cromo hexavalente (Cr(VI)). La exposición a estos compuestos genera daño genotóxico y citotóxico mediante el estrés oxidante producido durante su reducción intracelular. En contra parte, al consumo de polifenoles extraídos del té verde [P60] se les ha asociado con efectos benéficos para la salud por sus propiedades antioxidantes. De ahí que se proponga el consumo de polifenoles como un procedimiento para modular el daño genotóxico y citotóxico en el envejecimiento.

Objetivo. Estudiar el efecto cito/genotóxico inducido por Cr(VI) en ratones longevos tratados con P60.

Material y Métodos. Grupos de cinco ratones hembra de 13 meses de edad (longevos) fueron tratados: a) 20 mg/kg de CrO₃, vía i.p.; b) 10 mg/kg de P60, vía i.p. y c) 10-20 mg/kg de P60-CrO₃. Como testigo positivo se empleó un grupo de ratones hembra de tres meses de edad (jóvenes) tratado con 20 mg/kg de CrO₃, vía i.p. Las muestras de sangre periférica fueron tomadas de la vena caudal a las 0, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. Se consideró la hora 0 como el testigo negativo. Los micronúcleos (MN) se evaluaron de acuerdo con Hayashi et al. (1990)¹, mientras que la apoptosis y viabilidad celular de acuerdo a GarcíaRodríguez et al. (2013)².

Resultados. Se incrementaron los promedio de MN, apoptosis y células no viables en ambos grupos (jóvenes y longevos) expuestos al CrO₃, siendo mayor el efecto en los longevos, ya que se presentó incluso mortalidad. La administración del P60 no modificó los promedios de MN, apoptosis y viabilidad celular. Mientras que, la exposición previa de P60 al CrO₃ disminuyó los promedios de MN, apoptosis y células no viables, así como la mortalidad.

Conclusión. Los resultados sugieren que la edad es un factor importante para el efecto cito/genotóxico del CrO₃ y algunos compuestos con propiedades antioxidantes como el P60 pueden llegar a proteger de tal efecto. *Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216.*

¹Hayashi, et al. (1990). *Mutat Res*; 245. 245-249.

²García-Rodríguez, et al. (2013). *Oxid Med Cell Longev*; 1-9.

An International Journal Specializing
in Environmental Mutagenesis

Volume 59
Number S1
September 2018

ay

EMGS Abstracts

Supplement to Environmental and Molecular Mutagenesis

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

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY
NEW TECHNOLOGIES
RISK ASSESSMENT
TRANSGENICS AND IN VIVO MUTAGENESIS



In this issue:

Abstracts from the Environmental Mutagenesis and Genomics Society

49th Annual Meeting, September 22-26, 2018, San Antonio, Texas

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

Environmental and Molecular Mutagenesis

JOURNAL OF THE ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS AND GENOMICS SOCIETY

(FORMERLY ENVIRONMENTAL MUTAGEN SOCIETY)

OFFICERS, ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS AND GENOMICS SOCIETY

President R. Sobol	Vice President M. Poirer	Past President T. Wilson	Secretary J. Pluth	Treasurer L. Custer	Journal Editor B. Gollapudi	Executive Director B. Bevans-Kerr
COUNCILORS						
P. Allard J. Bemis M. Banda	D. Cress-Cabelof R. Clewell	C. Farabaugh T. Glover	B. Gollapudi N. Holland	M. Honma N. Mei	M. Myers J. Meyer	Z. Nagel P. Opreskij D. Shaughnessy C. Swartz

ASSOCIATE EDITORS David M. Wilson III National Institute on Aging Baltimore, Maryland Ulla Vogel Technical University of Denmark Søborg, Denmark	JOURNAL ADMINISTRATION Alexandra Long Neeraja Gollapudi	EDITOR-IN-CHIEF B. Bhaskar Gollapudi Exponent, Inc. Alexandria, VA.
---	--	---

EDITORIAL BOARD

Volker Arlt King's College London London, United Kingdom	Robert Heflich FDA/NCTR Jefferson, Arkansas	Carlos Menck Universidade de São Paulo São Paulo, Brazil	Gisela Umbuzeiro State University of Campinas – UNICAMP São Paulo, Brazil
Janet E. Baulch UC Irvine Irvine, California	George R. Hoffmann Holy Cross College Worcester, Massachusetts	Joel Meyer Duke University Durham, North Carolina	Jan Van Benthem National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) Bilthoven, The Netherlands
Sonja I. Berndt National Cancer Institute Bethesda, Maryland	Nina Holland UC Berkeley Berkeley, California	Hannu Norppa Finnish Institute of Occupational Health Helsinki, Finland	Karen Vasquez University of Texas MD Anderson Cancer Center Smithville, Texas
Stefano Bonassi IRCCS San Raffaele Pisana Rome, Italy	Masamitsu Honma National Institute of Health Sciences Tokyo, Japan	Barbara Parsons FDA/NCTR Jefferson, Arkansas	Paul White Health Canada Ottawa, Ontario
Karin Broberg Lund University and Karolinska Institute Sweden	George Johnson Swansea University Swansea, United Kingdom	R. Julian Preston U.S. EPA Research Triangle Park, North Carolina	Carole Yauk Health Canada Ottawa, Ontario
Kerry L. Dearfield U.S. Department of Agriculture Washington, DC	William Kaufmann University of North Carolina Chapel Hill, NC	Reza Rasoulpour Dow AgroSciences, Indianapolis Indiana	Errol Zeiger Errol Zeiger Consulting Chapel Hill, North Carolina
David DeMarini U.S. EPA Research Triangle Park, North Carolina	Catherine Klein New York University School of Medicine Tuxedo, New York	Orlando D. Schärer Stony Brook University Stony Brook, New York	Luoping Zhang University of California Berkeley Berkeley, California
Stephen Dertinger Liton Laboratories Rochester, New York	Iain Lambert Carleton University Ottawa, Ontario	Peter Schmezer German Cancer Research Centre Heidelberg, Germany	
Krista L. Dobo Pfizer Global R&D Groton, Connecticut	R. Stephen Lloyd Oregon Health & Science University Portland, Oregon	Ronald D. Snyder RDS Consulting Services Maineville, Ohio	
James C. Fuscoe FDA/NCTR Jefferson, Arkansas	Francesco Marchetti Health Canada Ottawa, Ontario	Robert W. Sobol University of South Alabama Mitchell Cancer Institute, Mobile, Alabama	

© 2018 Wiley Periodicals, Inc., a Wiley Company. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored or transmitted in any form or by any means without the prior permission in writing from the copyright holder. Authorization to photocopy items for internal and personal use is granted by the copyright holder for libraries and other users registered with their local Reproduction Rights Organisation (RRO), e.g. Copyright Clearance Center (CCC), 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA (www.copyright.com), provided the appropriate fee is paid directly to the RRO. This consent does not extend to other kinds of copying such as copying for general distribution, for advertising or promotional purposes, for creating new collective works or for resale. Special requests should be addressed to: permissions@wiley.com.

ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS (ISSN: 1098-2280 [online]) is published monthly in January, March, April, May, June, July, August, October, December by Wiley Periodicals, Inc., through Wiley Subscription Services, Inc., a Wiley Company, 111 River Street, Hoboken, NJ 07030. **Postmaster:** Send address changes to ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS, Journal Customer Services, John Wiley & Sons Inc., C/O The Sheridan Press, PO Box 465, Hanover, PA 17331. **Send subscription inquiries** c/o John Wiley & Sons, Inc., Attn: Journals Admin Dept UK, 111 River Street, Hoboken, NJ 07030, (201) 748-6645.

Commercial Reprints: Lydia Supple-Pollard (Email: lsupple@wiley.com) **Author Reprints (50–500 copies):** Order online: <http://www.sheridanreprints.com/orderForm.html>; Email: chris.jones@sheridan.com. **Information for subscribers:** *Environmental and Molecular Mutagenesis* is published in 9 issues per year. Institutional subscription prices for 2018 are: Online: US\$1,784 (US), US\$1,784 (Canada/Mexico), US\$1,784 (Rest of World), €1,155 (Europe), €914 (UK). Prices are exclusive of tax. Asia-Pacific GST, Canadian GST and European VAT will be applied at the appropriate rates. For more information on current tax rates, please go to www.wileyonlinelibrary.com/tax-vat. The price includes online access to the current and all online back files to January 1st 2012, where available. For other pricing options, including access information and terms and conditions, please visit www.wileyonlinelibrary.com/access. **Publisher:** *Environmental and Molecular Mutagenesis* is published by Wiley Periodicals Inc., 350 Main St, Malden, MA 02148-5020. **Journal Customer Services:** For ordering information, claims and any enquiry concerning your journal subscription please go to www.wiley.com/go/customerhelp or contact your nearest office. **Americas:** Email: cs-journals@wiley.com; Tel: +1 781 388 8598 or 1 800 835 6770 (Toll free in the USA & Canada); **Europe, Middle East and Africa:** Email: cs-journals@wiley.com; Tel: +44 (0) 1865 778315; **Asia Pacific:** Email: cs-journals@wiley.com; Tel: +65 6511 8000. **Japan:** For Japanese-speaking support, Email: cs-japan@wiley.com; Tel: +65 6511 8010 or Tel (toll-free): 005 316 50 480. **Visit our Online Customer Help** available in 7 languages at www.wiley.com/go/customerhelp. *Environmental and Molecular Mutagenesis* accepts articles for Open Access publication. Please visit <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html> for further information about OnlineOpen. **Back issues:** Single issues from current and prior year volumes are available at the current single issue price from cs-journals@wiley.com. Earlier issues may be obtained from Periodicals Service Company, 11 Main Street, Germantown, NY 12526, USA. Tel: +1 518 537 4700. Fax: +1 518 537 5899. Email: psc@periodicals.com. For submission instructions, subscription and all other information visit: wileyonlinelibrary.com/em. **Disclaimer:** The Publisher and Editors cannot be held responsible for errors or any consequences arising from the use of information contained in this journal; the views and opinions expressed do not necessarily reflect those of the Publisher and Editors, neither does the publication of advertisements constitute any endorsement by the Publisher and Editors of the products advertised. Wiley is a founding member of the UN-backed HINARI, AGORA, and OARE initiatives. They are now collectively known as Research4Life, making online scientific content available free or at nominal cost to researchers in developing countries. Please visit Wiley's Content Access – Corporate Citizenship site: <http://www.wiley.com/WileyCDA/Section/id-390082.html>.

Wiley's Corporate Citizenship initiative seeks to address the environmental, social, economic, and ethical challenges faced in our business and which are important to our diverse stakeholder groups. Since launching the initiative, we have focused on sharing our content with those in need, enhancing community philanthropy, reducing our carbon impact, creating global guidelines and best practices for paper use, establishing a vendor code of ethics, and engaging our colleagues and other stakeholders in our efforts. Follow our progress at www.wiley.com/go/citizenship.

ISSN 0893-6692 (Print)

ISSN 1098-2280 (Online)

View this journal online at www.wileyonlinelibrary.com/journal/em

P11

Quantitative assessment of *in vitro* genotoxicity using high-throughput and high-content CometChip assay in HepaRG and HepG2 cells. Seo J¹, Tryndyak V¹, Wu Q¹, Dreval K^{1,2}, Pogribny I¹, Byrant M¹, Mei N¹, Guo X¹.
¹National Center for Toxicological Research, Food and Drug Administration, Jefferson, AR United States, ²Department of Internal Medicine, Division of Molecular Medicine, Program in Cancer Genetics, Epigenetics and Genomics, University of New Mexico Comprehensive Cancer Center, Albuquerque, NM, United States.

Improving *in vitro* genotoxicity test strategy is an ongoing task for better predicting human *in vivo* genotoxicity. Human hepatocytes that have metabolic capacity are preferred as data generated from these cells are considered to be more relevant to human *in vivo* exposure. In this study, a total of twelve genotoxic carcinogens were evaluated over a wide range of concentrations in differentiated HepaRG cells and HepG2 cells using the high-throughput high-content (HTHC) CometChip technology, a recently developed 96-well platform with a high level of reproducibility for detecting DNA-stranded breakages. DNA damaging dose-responses were assessed using benchmark dose (BMD) quantitative approaches. CYP450 enzyme activities of both cell lines were also evaluated. As results, differentiated HepaRG cells maintained a much higher level of CYP450 activities than those in HepG2 cells. For DNA damaging effects following a 24h treatment, three out of five indirect-acting genotoxic carcinogens, cyclophosphamide, 7,12-Dimethylbenzanthracene, and dimethylnitrosamine, caused significant DNA damage only in HepaRG cells. Benzo[a]pyrene induced DNA damage in both cell lines, and 2,4-Diaminotoluene slightly but significantly increased DNA damage in HepG2 cells. For seven direct-acting genotoxic carcinogens, methyl methanesulfonate, N-ethyl-N-nitrosourea, and 4-Nitroquinoline 1-oxide induced positive responses, but hydroquinone and colchicine were negative in both cell lines. Cisplatin and cadmium chloride increased DNA damage only in HepaRG or HepG2 cells, respectively. The BMD values generated from the HTHC comet data of the four chemicals positive in both cell lines were similar. Our results suggest that metabolically competent HepaRG cells is more suitable and efficient in detecting indirect-acting genotoxic carcinogens, and that the precision of the BMD analysis could be improved by increasing the number of chemical concentrations.

P12

Relationship between Modulation of Genotoxic Damage and the Endogenous Antioxidant System of Mice Treated with (-)-epigallocatechin-3-gallate and Hexavalent Chromium. Hernández-Cruz EY, García-Rodríguez MC. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, Mexico City, Mexico.

This study was conducted to investigate the relationship between modulation of genotoxic damage and the endogenous antioxidant system of mice treated with (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and hexavalent chromium [Cr(VI)]. Groups of five Hsd:ICR male mice were divided and treated as follows: (i) control, vehicle only; (ii) EGCG, 10 mg/kg by gavage; (iii) Cr(VI), 20 mg/kg of CrO₃ intraperitoneally; and (iv) EGCG-CrO₃, EGCG before to administration of CrO₃. Evaluations were performed in peripheral blood samples taken from the caudal vein at 0 and 48 h after treatments. The genotoxic damage was evaluated by the micronucleus (MN) assay in accordance with the technique described by Hayashi *et al.*¹ and apoptosis by following the technique previously adapted for peripheral blood². In the same samples, the levels of endogenous antioxidant were evaluated. The genotoxic damage induced by CrO₃ was corroborated because MN and apoptosis frequencies increased. The administration of EGCG did not modify neither MN nor the frequencies of apoptotic cells, but it modified the antioxidants levels. In the group EGCG-CrO₃, the MN and apoptosis frequencies were decreased as compared with the CrO₃ group, but the effect in antioxidant levels persisted. These results suggest that the protection of EGCG against genotoxic damage induced by CrO₃ could be related with the stimulation of the endogenous antioxidant system. **Financial support was obtained from UNAM through the DGAPA, PAPIIT-IN219216 and PAEP-2018; CONACYT 853816.**

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



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

XIX Reunión Internacional de Ciencias Médicas

10-12 abril 2019

Fecha límite de entrega de Trabajos de
Investigación y Casos Clínicos

17 de Febrero 2019

Inscripción

Costo de Pre-inscripción hasta el 29 de Marzo:

Profesionistas \$950.00 M.N.

Estudiantes con credencial \$400.00

Costo de inscripción a partir 14 de abril:

Profesionistas \$1250.00 M.N.

Estudiantes con credencial \$600.00

Informes:

Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato

20 de Enero #929, Col. Obregón, León, Guanajuato, México

e-mail: ricmugto@gmail.com

+52 (477) 2674900 Ext. 4661

Sede:

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

Profesora Calzada de los Héroes

sq. Vasco de Quiroga,

Col. La Maternidad,

León, Guanajuato, México

www.reunioncienciasmedicasugto.org.mx



@reunionciencias



108. Efecto de la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre el sistema antioxidante endógeno y la cito/genotoxicidad del Cr(VI)

Estefani Yaquelin Hernández-Cruz*, María del Carmen García-Rodríguez. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental. Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”, UNAM. CDMX. *estef_yhc@hotmail.com

Introducción. La (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) se ha asociado con efectos benéficos para la salud debido a que posee propiedades antioxidantes. Además, se ha propuesto que la EGCG estimula la producción y la actividad de antioxidantes endógenos. En contra parte, los compuestos del cromo hexavalente [Cr (VI)] generan daño genotóxico mediante el estrés oxidante que se produce durante su reducción intracelular. De ahí que se proponga el uso de antioxidantes que se encuentran en la dieta como un procedimiento para proteger o modular el daño genotóxico.

Objetivo. Evaluar la relación entre la modulación del daño cito/genotóxico y el sistema antioxidante endógeno en ratones macho Hsd: ICR tratados con EGCG y Cr(VI).

Material y Métodos. Grupos de cinco ratones macho fueron tratados de la siguiente manera: a) vehículo (agua destilada); b) 10 mg/kg de EGCG, vía intragástrica; c) 20 mg/kg de CrO₃, vía intraperitoneal; y d) 10-20 mg/kg de EGCG-CrO₃. Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0 y 48 horas después de la aplicación de los tratamientos. El daño cito/genotóxico se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos (MN)¹, la apoptosis y la viabilidad celular². La actividad del sistema antioxidante endógeno se evaluó utilizando kits de la marca Cayman.

Resultados. El daño cito/genotóxico de CrO₃ se corroboró debido a que las frecuencias de MN, la apoptosis y las células no viables aumentaron. La administración de EGCG no modificó los promedios de MN ni de las células apoptóticas. El tratamiento combinado de EGCG-CrO₃ disminuyó parcialmente las frecuencias de MN, restauró la viabilidad celular y disminuyó la apoptosis. Asimismo, la concentración de los antioxidantes endógenos y la actividad de catalasa aumentó con el tratamiento de EGCG y el tratamiento combinado de EGCG-CrO₃. Mientras que la actividad de glutatión peroxidasa disminuye en estos grupos.

Conclusión. Los resultados sugieren que la administración de EGCG protege parcialmente el daño cito/genotóxico inducido por CrO₃, y dado que se observó estimulación del sistema antioxidante endógeno es posible que esta sea la vía de protección.

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; IN224719.



*“Confiar en ti mismo no garantiza el éxito,
pero no hacerlo garantiza el fracaso”*

Albert Bandura