



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Papel del resveratrol en la estimulación del sistema antioxidante endógeno, la inducción de apoptosis y la actividad de la reparación del ADN en sangre periférica de ratones expuestos a compuestos de cromo hexavalente”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. TONANCY NICOLÁS MÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA. UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA. UNAM.

CIUDAD DE MÉXICO. NOVIEMBRE, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OFICIO CPCB/1024/2022

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 Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **26 de septiembre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **NICOLÁS MÉNDEZ TONANCY** con número de cuenta **406005730** con la tesis titulada **"Papel del resveratrol en la estimulación del sistema antioxidante endógeno, la inducción de apoptosis y la actividad de la reparación del ADN en sangre periférica de ratones expuestos a compuestos de cromo hexavalente"**, realizada bajo la dirección del **DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JOSÉ MANUEL BETANCOURT RULE
Vocal: DR. PEDRO ROSENDO MORALES RAMÍREZ
Vocal: DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
Vocal: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Secretario: DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 08 de noviembre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



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.

A la DGAPA a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN224719; IN216122. Proyectos:

1.- 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).

2.- Efecto dosis-respuesta in vivo de los polifenoles contra el daño genotóxico inducido por cromo hexavalente: vías mecanicistas subyacentes.

Al CONACyT (número de becario: 703847) por la beca recibida para desarrollar mis estudios de doctorado.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento brindado para mi participación en el evento internacional: 27th Annual Meeting of de Society for Redox Biology and Medicine (SFRBM). Presented Virtually. Evento virtual.

Expreso mi más cordial y sincero agradecimiento a la Dra. María del Carmen García Rodríguez por todo su apoyo, confianza y sabiduría brindada durante el trayecto de mis estudios.

Finalmente, agradezco a los miembros de mi comité tutorial, Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz, Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez y Dra. María del Carmen García Rodríguez por su gran apoyo durante el trayecto de mis estudios de doctorado. De igual forma agradezco a los miembros del Jurado, Dr. José Miguel Betancourt Rule, Dr. Pedro Rosendo Morales Ramírez, Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez, Dra. Ana María García Bores y el Dr. José Pedraza Chaverri por sus valiosas aportaciones, asesoría, confianza y por todo el apoyo profesional brindado para la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Esta tesis esta dedicada a mi familia, por siempre creer en mí, por apoyarme siempre, por escucharme, por todos sus consejos y por inspirarme a ser mejor cada día. Los amo.

A mis grandes amigos (Lulu, Fanny, Mary, Lalo, César) porque siempre estuvieron presentes en cada paso. Por cada aventura y su apoyo incondicional. Los admiro y los quiero mucho.

A la Dra. Carmen García por enseñarme tanto, por la confianza y el apoyo incondicional.

A los que partieron, pero vivirán siempre con nosotros.

Índice

Índice de figuras	1
Índice de abreviaturas	2
Resumen	5
Abstract	6
Introducción	7
1. Antecedentes	8
1.1. <i>Especies reactivas de oxígeno</i>	8
1.2. <i>Formación de especies reactivas de oxígeno</i>	9
1.3. <i>Estrés oxidativo</i>	11
1.4. <i>Estrés oxidativo, daño al ADN y mecanismos de reparación</i>	12
1.5. <i>Estrés oxidativo y muerte celular</i>	15
1.6. <i>Estrés oxidativo inducido por metales</i>	17
1.7. <i>Cromo hexavalente</i>	18
1.8. <i>Eliminación de especies reactivas de oxígeno: sistema antioxidante endógeno</i> ...	21
1.9. <i>Polifenoles</i>	24
1.9.1. <i>Biodisponibilidad y metabolismo</i>	25
1.9.2. <i>Actividad antioxidante</i>	26
1.10. <i>Resveratrol</i>	27
1.11. <i>Evaluación de daño genotóxico</i>	29
1.11.1. <i>Micronúcleos</i>	30
1.11.2. <i>8-oxo-7,8-dihidro-2'desoxiguanosina</i>	32
1.11.3. <i>Apoptosis y viabilidad celular</i>	34
2. Planteamiento del problema	36
3. Hipótesis	36
4. Objetivos	36
4.1. <i>Objetivo general</i>	36
4.2. <i>Objetivos particulares</i>	37
5. Material y método	37
5.1. <i>Reactivos</i>	37
5.2. <i>Animales</i>	38

5.3.	<i>Diseño experimental</i>	38
5.4.	<i>Ensayo de micronúcleos y relación de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos</i>	40
5.5.	<i>Apoptosis y viabilidad celular</i>	40
5.6.	<i>Niveles de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina</i>	41
5.7.	<i>Sistema antioxidante endógeno</i>	41
5.7.1	<i>Actividad de superóxido dismutasa</i>	41
5.7.2	<i>Actividad de glutatión peroxidasa</i>	42
5.7.3	<i>Actividad de catalasa</i>	42
5.7.4	<i>Niveles de glutatión</i>	43
5.8	<i>Análisis estadístico</i>	43
6.	<i>Resultados</i>	44
6.1.	<i>Efecto del resveratrol sobre la frecuencia de micronúcleos inducida por CrO₃</i> ..	44
6.2.	<i>Efecto del resveratrol y del CrO₃ sobre las células apoptóticas y necróticas</i>	46
6.3.	<i>Efecto del resveratrol y del CrO₃ sobre los niveles del aducto 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina</i>	49
6.4.	<i>Efecto del resveratrol y del CrO₃ sobre el sistema antioxidante endógeno</i>	50
6.5.	<i>Efecto de la administración de resveratrol sobre el daño citotóxico inducido por CrO₃</i>	54
7.	<i>Discusión</i>	57
8.	<i>Conclusión</i>	67
9.	<i>Referencias bibliográficas</i>	68
10.	<i>Anexos</i>	87

Índice de figuras

Figura 1. Generación de especies reactivas de oxígeno a partir de la reducción monovalente del oxígeno.	10
Figura 2. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss.....	18
Figura 3. Metabolismo del cromo hexavalente y su genotoxicidad..	21
Figura 4. Vías principales del sistema antioxidante endógeno.....	24
Figura 5. Estructura química <i>trans</i> y <i>cis</i> del resveratrol.....	27
Figura 6. Mecanismos de formación de micronúcleos.....	31
Figura 7. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.....	33
Figura 8. Cambios morfológicos característicos de la apoptosis.	35
Figura 9. Protocolo para la administración de los tratamientos.	39
Figura 10. Efecto del resveratrol y del CrO ₃ sobre la frecuencia de micronúcleos.....	46
Figura 11. Efecto del resveratrol y del CrO ₃ sobre las frecuencias de células sanas, apoptóticas (totales, tempranas y tardías) y necróticas.....	48
Figura 12. Efecto del resveratrol y del CrO ₃ sobre los niveles de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina.	50
Figura 13. Actividades de superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa.....	52
Figura 14. Niveles de glutatión.	53
Figura 15. Efecto del resveratrol y del CrO ₃ sobre las frecuencias de células viables y no viables.....	56
Figura 16. Efecto del resveratrol y el CrO ₃ sobre la frecuencia de micronúcleos, el sistema antioxidante endógeno, los niveles del aducto 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina y las células apoptóticas.....	66

Índice de abreviaturas

AC	<i>Aberraciones cromosómicas</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
AIF	<i>Factor inductor de la apoptosis</i>
ANOVA	<i>Análisis de varianza</i>
ARN	<i>Ácido ribonucleico</i>
As	<i>Arsénico</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutada</i>
ATR	<i>Relacionada a ATM</i>
Bcl-2	<i>Células de linfoma B-2</i>
BER	<i>Reparación por escisión de bases</i>
BIR3	<i>Baculovirus inhibidor de la apoptosis</i>
BrEt	<i>Bromuro de etidio</i>
CO₃⁻	<i>Radical carbonato</i>
Cr	<i>Cromo</i>
Cr(III)	<i>Cromo trivalente</i>
Cr(VI)	<i>Cromo hexavalente</i>
CrO₃	<i>Trióxido de cromo</i>
Cd	<i>Cadmio</i>
Co	<i>Cobalto</i>
Cu	<i>Cobre</i>
d.e.	<i>Desviación estandar</i>
DNA-PK	<i>Proteína cinasa dependiente del ADN</i>
EGCG	<i>(-)-epigallocatequina-3-galato</i>
ELISA	<i>Ensayo de inmuno-absorción ligado a enzimas</i>
ENC	<i>Eritrocitos normocromáticos</i>
EPA	<i>Enviromental Protection Agency</i>
EPC	<i>Eritrocitos policromáticos</i>
EPC/ENC	<i>Relación de eritrocitos policromáticos respecto a los eritrocitos normocromáticos</i>
ERO	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
FapyG	<i>2,6-diamino-4-hidroxi-5-formidopirimidina</i>
GPx	<i>Glutación peroxidasa</i>
GR	<i>Glutación reductasa</i>
GSH	<i>Glutación</i>
GSSG	<i>Glutación reducido</i>
GST	<i>Glutación S-transferasa</i>

H₂O₂	<i>Peróxido de hidrógeno</i>
HO-1	<i>Hemo oxigenasa-1</i>
HO₂[•]	<i>Radical hidroperoxilo</i>
Hg	<i>Mercurio</i>
hMLH1	<i>Homólogo 1 de mutL humano</i>
hMLH2	<i>Homólogo 2 de mutL humano</i>
hOGG1	<i>8-oxoguanina ADN glicosilasa 1 humana</i>
HR	<i>Reparación por recombinación homóloga</i>
HRP	<i>Peroxidasa de rábano</i>
Hsp	<i>Proteína de choque térmico</i>
IAP	<i>Proteína inhibidora de la apoptosis</i>
IARC	<i>Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer</i>
ig	<i>intragástrica</i>
ip	<i>Intraperitoneal</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal cinasa</i>
MMR	<i>Reparación MISMATCH (reparación de errores de apareamiento)</i>
MN	<i>Micronúcleos</i>
NA	<i>Naranja de acridina</i>
NA/BrEt	<i>Mezcla de colorantes naranja de acridina/bromuro etidio</i>
NADP⁺	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)</i>
NADPH	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)</i>
NHEJ	<i>Reparación por recombinación no homologa</i>
NER	<i>Reparación por escisión de nucleótido</i>
NIF	<i>Frecuencia de Inducción Neta</i>
Ni	<i>Níquel</i>
NOX's	<i>NADPH oxidasas</i>
Nrf2	<i>Factor nuclear eritroide 2</i>
O₂	<i>Oxígeno molecular</i>
¹O₂	<i>Oxígeno singulete</i>
O₂^{-•}	<i>Radical superóxido</i>
O₃	<i>Ozono</i>
¹O₂	<i>Oxígeno singulete</i>
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
OGG1	<i>8-oxo-guanina-glucosilasa</i>
OH	<i>Hidroxilo</i>
•OH	<i>Radical hidroxilo</i>
Pb	<i>Plomo</i>

<i>Prx</i>	<i>Peroxirredoxina</i>
<i>RL</i>	<i>Radicales libres</i>
<i>RM-ANOVA</i>	<i>Análisis de varianza de medidas repetidas</i>
<i>RO[•]</i>	<i>Radical alcoxil</i>
<i>RO₂[•]</i>	<i>Radical peroxil</i>
<i>Se</i>	<i>Selenio</i>
<i>SOD</i>	<i>Superóxido dismutasa</i>
<i>Ti</i>	<i>Titanio</i>
<i>TM</i>	<i>Toneladas métricas</i>
<i>TNF</i>	<i>Factor tumoral de la necrosis</i>
<i>Trx</i>	<i>Tiorredoxina</i>
<i>WST-1</i>	<i>Sales de tetrazolio solubles en agua</i>
<i>XO</i>	<i>Xantina oxidasa</i>
<i>Zn</i>	<i>Zinc</i>
<i>8-OHdG</i>	<i>8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina</i>

Resumen

Los compuestos de cromo hexavalente [Cr(VI)] generan especies reactivas de oxígeno durante su reducción intracelular que inducen daño genotóxico, incluyendo la formación de aductos como el 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina (8-OHdG). Por otro lado, se ha observado que el resveratrol posee un alto potencial antioxidante al cual se le han atribuido sus propiedades anticancerígenas. Por lo que, el objetivo de este estudio fue examinar la capacidad del resveratrol para contrarrestar el daño genético inducido por el Cr(VI), así como las posibles vías asociadas a esta protección. Los ratones macho Hsd:ICR se dividieron en grupos de cinco individuos cada uno: (a) control 1, agua destilada; (b) control 2, etanol al 30%; (c) resveratrol, 50 mg/kg vía oral por sonda intragástrica; (d) CrO₃, 20 mg/kg por vía intraperitoneal; (e) resveratrol + CrO₃, resveratrol administrado 4 horas antes del CrO₃. La evaluación se realizó en sangre periférica. La cinética de micronúcleos (MN) se midió de las 0 a las 72 horas, mientras que los niveles de reparación de los aductos 8-OHdG, los biomarcadores del sistema antioxidante endógeno y la frecuencia de apoptosis se cuantificaron a las 48 horas. El resveratrol disminuyó la frecuencia de MN inducidos por el Cr(VI) y mostró efectos significativos en los niveles de aductos de 8-OHdG, lo que sugiere que la reparación celular podría ser mejorada por este polifenol. La administración de resveratrol previo al Cr(VI) restablece las actividades de la glutatión peroxidasa y la catalasa a los niveles del control, acompañado de modificaciones en la actividad de la superóxido dismutasa y los niveles de glutatión. Las propiedades antioxidantes del resveratrol podrían desempeñar un papel importante en la inhibición de la genotoxicidad oxidativo inducida por el Cr(VI). El aumento de las células apoptóticas y la disminución de la necrosis confirmaron que el resveratrol bloquea eficazmente las acciones del Cr(VI).

Abstract

Hexavalent chromium [Cr(VI)] compounds generate reactive oxygen species during their intracellular reduction that induce genotoxic damage, including the formation of adducts such as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine (8-OHdG). On the other hand, it has been observed that resveratrol has a high antioxidant potential to which its anticarcinogenic properties have been attributed. Therefore, the aim of this study was to examine the ability of resveratrol to counteract hexavalent chromium [Cr(VI)]-induced genetic damage, as well as the possible pathways associated with this protection. Hsd:ICR male mice were divided into groups of the following five individuals each: (a) control 1, distilled water; (b) control 2, ethanol 30%; (c) resveratrol, 50 mg/kg orally by gavage; (d) CrO₃, 20 mg/kg intraperitoneally; (e) resveratrol + CrO₃, resveratrol administered 4 hours prior to CrO₃. The assessment is performed on peripheral blood. Micronuclei (MN) kinetics are measured from 0 to 72 hours, while 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) adduct repair levels, endogenous antioxidant system biomarkers, and apoptosis frequency were quantified after 48 h. Resveratrol reduces the frequency of Cr(VI)-induced MN and shows significant effects on the 8-OHdG adduct levels, suggesting that cell repair could be enhanced by this polyphenol. Concomitant administration of resveratrol and Cr(VI) results in a return of the activities of glutathione peroxidase and catalase to control levels, accompanied by modifications of superoxide dismutase activity and glutathione levels. Thus, antioxidant properties might play an important role in resveratrol-mediated inhibition of Cr(VI)-induced oxidant genotoxicity. The increase in apoptotic cells and the decrease in necrosis further confirmed that resveratrol effectively blocks the actions of Cr(VI).

Introducción

El resveratrol (3,4',5-trihidroxi-*trans*-estilbeno) es un polifenol que pertenece al grupo de los estilbenos. Tiene un alto potencial antioxidante asociado a efectos benéficos para la salud particularmente en las enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, así como en algunos tipos de cáncer, diabetes y trastornos relacionados con la obesidad (Rauf *et al.*, 2017; Nicolás-Méndez *et al.*, 2020). Los efectos antioxidantes del resveratrol se han atribuido a su capacidad para eliminar a las especies reactivas de oxígeno (ERO), activar los mecanismos de reparación e inducir apoptosis (Gülçin, 2010; Repposi *et al.*, 2020). En particular, se ha descubierto que el resveratrol previene el daño al ADN (Quincozes-Santos *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2020). Aunque se han examinado los efectos del resveratrol sobre la toxicidad inducida por metales, como el trióxido de arsénico, el arsenito de sodio, el óxido de cobre, el cloruro de cromo y el dicromato de potasio en tejido cardíaco, hepático, renal y ovárico de roedores (Burkhardt *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014; Banu *et al.*, 2016; Khalid *et al.*, 2018), no hay estudios aparentes que evalúen los efectos de este polifenol sobre la genotoxicidad inducida por compuestos de cromo hexavalente [Cr(VI)].

El Cr(VI) es liberado al ambiente debido a las actividades industriales, que incluyen principalmente la galvanoplastia, chapado (cromado) de metales, el curtido de pieles y la fabricación de pigmentos, o se encuentra en los gases de escape de los automóviles y en los productos del tabaco (EPA, 2010; Prasad *et al.*, 2021). La exposición aguda y crónica a los compuestos de Cr(VI) se ha asociado con la inducción de cáncer en diferentes órganos y tejidos (Shi *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2019). El daño genotóxico producido durante su reducción intracelular puede iniciar y promover la carcinogénesis inducida por el Cr(VI) mediante la formación de aductos de ADN, enlaces cruzados (ADN-ADN y ADN-proteína), sitios abásicos y bases de ADN oxidadas (O'Brien *et al.*, 2003). También se ha descrito que la inducción de la apoptosis, la inhibición de los mecanismos de reparación y la expresión génica desempeñan un papel crucial en el daño genotóxico generado por la exposición a compuestos de Cr(VI) (Valko *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2019). En varios estudios se ha demostrado que los antioxidantes pueden contrarrestar los efectos de las ERO incluyendo los radicales libres (RL) (Patlolla *et al.*, 2009), de modo que las sustancias ricas en antioxidantes han surgido como agentes potenciales para prevenir y coadyuvar el estrés oxidativo y el daño

al ADN (García-Rodríguez *et al.*, 2014; De Freitas *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2021). Particularmente, se ha demostrado que compuestos como los polifenoles desempeñan un papel directo como eliminadores de radicales y quelantes de metales, además de ejercer efectos indirectos al modular los niveles de factores de transcripción y enzimas (Gu *et al.*, 2020; Majolo *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). Sin embargo, no hay estudios sobre los efectos protectores del resveratrol contra la genotoxicidad inducida por el Cr(VI) *in vivo* y los procesos metabólicos subyacentes, en los que se incluya la reparación de aductos de la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina (8-OHdG), los componentes del sistema antioxidante endógeno y la apoptosis, que pueden estar involucrados en la prevención del daño al ADN inducido por el Cr(VI).

1. Antecedentes

1.1. Especies reactivas de oxígeno

Aunque el oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios, a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones, puede llegar a ser tóxico. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de ERO, que son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006; Choi *et al.*, 2019). Dentro de las ERO se encuentran los RL y las moléculas no radicales que pueden participar en la generación de RL (Turrens, 2003; Ye *et al.*, 2015). Los RL son especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados en su último orbital de energía, ya sea por ganancia o pérdida de un electrón de un no radical, o por la ruptura homolítica de una molécula. Las principales ERO son: *a*) las que se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno [el oxígeno molecular (O_2), el ozono (O_3), el oxígeno singulete (1O_2)] y *b*) las parcialmente reducidas [peróxido de hidrogeno (H_2O_2), así como los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), hidroxilo ($\cdot OH$), carbonato ($CO_3^{\cdot-}$), peróxido (RO_2^{\cdot}) y alcoxilo (RO^{\cdot})]. Todas estas moléculas participan en diferentes procesos biológicos, en donde cada una tiene distintas propiedades químicas intrínsecas, como la presencia de electrones desapareados que intervienen en su grado de reactividad (Valko *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2019).

1.2. Formación de especies reactivas de oxígeno

El O_2 es considerado un biradical debido a que contiene dos electrones desapareados ubicados, cada uno de ellos, en dos diferentes orbitales externos (Khorobrykh *et al.*, 2020). Dado que el O_2 posee estos dos electrones en giro paralelo se dificulta tomar dos electrones libres con giro antiparalelo a la vez, por ello sólo los puede recibir de uno en uno para cada orbital molecular externo (reacción univalente), produciendo así ERO. Cuando uno de los electrones desapareados del O_2 absorbe energía e invierte su rotación la especie resultante es el 1O_2 . Existen dos formas del 1O_2 : la sigma (Σ) y la delta (Δ). La forma Σ se considera un RL, debido a que conserva los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos (cada electrón en un orbital) como en el caso del O_2 , la diferencia radica en que un electrón tiene giro paralelo y el otro giro antiparalelo. Mientras que la forma Δ posee dos electrones apareados en un solo orbital, por lo que no es un RL. Por otro lado, la formación del $O_2^{\cdot-}$ ocurre por la reducción univalente del O_2 , es decir, cuando acepta un electrón, reacción que se puede llevar a cabo después de varios eventos. Este radical es muy inestable y es considerado como el precursor de muchas ERO y un mediador de las reacciones oxidativas en cadena (Khorobrykh *et al.*, 2020). El $O_2^{\cdot-}$ es convertido rápidamente a H_2O_2 , ya sea de manera espontánea o a través de la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). A su vez, el H_2O_2 puede ser totalmente reducido a agua o parcialmente reducido a $\cdot OH$ (Lushchak, 2014). La formación del $\cdot OH$ puede lograrse a través de la reacción de Haber-Weiss entre el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 , y la reacción de Fenton mediante la catálisis del H_2O_2 , con metales de transición, generalmente hierro (Figura 1). De las ERO generadas, el $\cdot OH$ es considerado una de las especies oxidantes más dañinas debido a su tiempo de vida media corto y a su alta reactividad (Turrens, 2003; Khorobrykh *et al.*, 2020).

Las vías de generación de ERO son: la xantina oxidasa (XO), la familia de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasas (NOX's) y la mitocondria, la cual se considera como la principal fuente de ERO, producidas principalmente en el complejo I, II y III, dentro de la cadena de transporte de electrones (Figura 1) (Choi *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). En condiciones normales las ERO son producidas y utilizadas en compartimentos celulares, y son reguladas mediante los mecanismos antioxidantes presentes, los cuales son

considerados como la primera defensa celular (Pisoschi y Pop, 2015; Khorobrykh *et al.*, 2020).

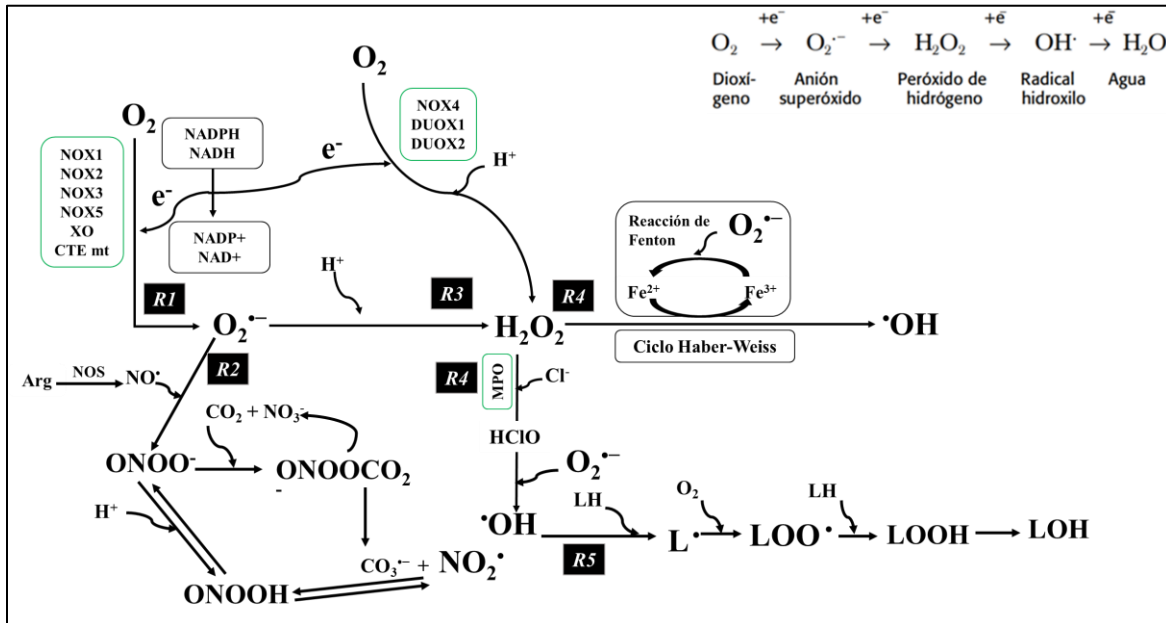


Figura 1. Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) a partir de la reducción monovalente del oxígeno molecular (O_2). La formación de ERO se lleva a cabo mediante una serie de reacciones en secuencia, en donde el producto de una primera reacción participa en la generación de una nueva ERO. Las principales vías de generación de ERO son: la xantina oxidasa (XO), la familia de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasas (NOXs) y la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (CTE mt). **R1**) generación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$): se deriva del O_2 después de recibir un electrón proveniente de varias oxidasas, o de la cadena de transporte de electrones mitocondriales (CTEmt). **R2**) Generación de especies reactivas de nitrógeno (ERN): en esta vía el $O_2^{\cdot-}$ reacciona con óxido nítrico (NO^*) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). En fase acuosa, $ONOO^-$ reacciona rápidamente con dióxido de carbono (CO_2) para generar aniones radicales de carbonato ($CO_3^{\cdot-}$) y dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$); en la fase hidrofóbica, el ácido peroxinitroso ($ONOOH$) puede sufrir fisión homolítica y formar al radical hidroxilo ($\cdot OH$) y al $NO_2\cdot$. **R3**) Generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2): en esta vía el $O_2^{\cdot-}$ se dismuta espontáneamente o por la superóxido dismutasa (SOD) en H_2O_2 . La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4 (NOX4) y la oxidasa dual 1/2 (DUOX1/2) también pueden dismutar directamente a O_2 y H_2O_2 . **R4**) Generación de $\cdot OH$: a partir de H_2O_2 a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss o mediante la conversión del H_2O_2 en ácido hipocloroso ($HClO$) por la mieloperoxidasa (MPO). El $HClO$ reacciona con $O_2^{\cdot-}$ para formar $\cdot OH$. **R5**) Generación de radicales lipídicos: la peroxidación lipídica es generalmente iniciada por $\cdot OH$: mediante la extracción de un hidrógeno alílico del lípido insaturado que forma al radical lipídico ($L\cdot$); este reacciona rápidamente con O_2 y forma un radical peróxido lipídico ($LOO\cdot$), que extrae un hidrógeno de otra molécula de lípidos

insaturados (LH) para formar al hidroperóxido (LOOH). NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleotido oxidado; NADP⁺, nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidado (modificada de Zhang et al., 2019).

Anteriormente, se creía que las ERO sólo desempeñaban un papel tóxico para la célula, sin embargo, también se ha demostrado que, desempeñan una función importante en la señalización y diferentes eventos celulares, como la muerte celular (apoptosis), proliferación, diferenciación, adaptación metabólica, activación de la expresión de proteínas y en la regulación del sistema inmunitario (Claro *et al.*, 2019; Khorobrykh *et al.*, 2020). Tal es el caso del H₂O₂, el cual está asociado con la señalización celular cuando su concentración se encuentra en el rango nanomolar. El H₂O₂ puede difundir a través de la membrana lo que lo convierte en una molécula ideal para la señalización intracelular (Claro *et al.*, 2019).

1.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, el cual lleva a una interrupción de la señalización redox celular y un daño molecular (Jones, 2006; Sies y Jones, 2020). Los seres vivos poseen sistemas altamente regulados para mantener los niveles de ERO en condiciones fisiológicas óptimas. Sin embargo, este balance puede perderse bajo ciertas circunstancias como: incremento en los niveles de compuestos, tanto endógenos como exógenos, que al autooxidarse generan ERO, disminución de la concentración o producción de antioxidantes de bajo peso molecular, inactivación de enzimas antioxidantes, o por la combinación de dos o más de éstos procesos (Lushchak, 2012; 2014; Sertan *et al.*, 2015). El estrés oxidativo induce modificaciones estructurales y funcionales de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. La degradación oxidativa de lípidos conlleva a la formación de malondialdehído, 4-hidroxinonenal e isoprostanos a partir de ácidos grasos insaturados. El daño a las proteínas ocurre por la oxidación de los grupos tiol, adición de grupos carbonilo, oxidación de las cadenas laterales, fragmentación, desnaturalización y renaturalización erróneas, con la consecuente pérdida de actividad (Pisoschi y Pop, 2015). Mientras que el daño oxidativo al ADN es uno de los principales

mecanismos por el cual se generan mutaciones. En este sentido, se estima que se producen por día, en células normales humanas, alrededor de 10,000 lesiones oxidativas en el ADN (Klaunig y Wang, 2018). Este daño puede inducir rompimientos de hebra sencilla o doble; modificación de bases, en donde la guanina es la más susceptible a oxidarse formando el aducto 8-OHdG, el cual es uno de los productos mutagénicos más abundantes (Lee *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). Además, el daño oxidativo del ADN que no es reparado conlleva a consecuencias biológicas serias como: muerte celular y carcinogénesis (Olinski *et al.*, 2002; Klaunig y Kamendulis, 2004).

Por otro lado, se ha relacionado al estrés oxidativo con diversas enfermedades como Alzheimer, Parkinson, diabetes, aterosclerosis, el desarrollo de diversos tipos de cáncer, así como con cardiomiopatías y procesos inflamatorios. En los cuales se altera la funcionalidad celular, induciendo gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos como mutaciones, inestabilidad genómica, alteración en la transcripción y replicación de genes importantes para el mantenimiento redox celular, alteración de la transducción de señales, interrupción de la proliferación celular y la comunicación intercelular, ocasionados por la activación de una reacción en cadena (Sies y Jones, 2020).

1.4. Estrés oxidativo, daño al ADN y mecanismos de reparación

El estrés oxidativo puede afectar la estabilidad del material genético generando lesiones en el ADN, que están implicadas en la muerte celular, envejecimiento, mutagénesis y carcinogénesis (Davies, 2000; Shi *et al.*, 2004; Gomez-Mejiba y Ramirez, 2019). La generación de ERO induce diferentes tipos de daño, incluyendo rompimiento de hebra (sencilla o doble), intercambio de cromátidas hermanas, entrecruzamientos (ADN-ADN y ADN-proteína), alteraciones en los mecanismos de transcripción, translación y replicación celular, daños a la pentosa, rearrreglos moleculares, sitios abásicos apurínicos y apirimidínicos, así como modificación de bases (Davies, 2000; Ba y Boldogh, 2018; Gomez-Mejiba y Ramirez, 2019; Heredia-García *et al.*, 2019). Dentro de las ERO el $\bullet\text{OH}$ es considerado el más reactivo e inestable, puede reaccionar con el ADN mediante su adición a los dobles enlaces de las bases (adición electrofílica) y por la extracción de un átomo de

hidrógeno de los grupos metilo y de cada uno de los enlaces C-H de la 2'-desoxirribosa (Sies y Jones, 2020). El •OH tiene la capacidad de hidroxilar al C5 y el C6 de las pirimidinas; y al C4, C5 y C8 de las purinas; donde las guaninas son las más susceptibles al ataque de los RL, debido a que tienen un potencial de oxidación más bajo (el potencial del punto medio es de -1,17), en relación con las otras bases (Ba y Boldogh, 2018; Heredia-García *et al.*, 2019). El producto más importante de la oxidación de la guanina es el aducto 8-OHdG. Se ha estimado que se pueden formar diariamente hasta 100,000 lesiones de 8-OHdG en el ADN por célula, lo que la hace una de las lesiones más estudiadas, descritas y utilizada como un biomarcador de estrés oxidativo (Ba y Boldogh, 2018). Este aducto es considerado mutagénico debido a que puede afectar secuencias codificantes, la estructura del ADN y la actividad de las ARN-polimerasas en un mayor porcentaje que otros aductos. El 8-OHdG formado *in situ* resulta en una sustitución G→T, mientras que la incorporación errónea de 8-OHdGTP produce una sustitución A→C. Estas transversiones pueden generar mutaciones si no son reparadas antes de la replicación (Cooke *et al.*, 2003; Gomez-Mejiba y Ramirez, 2019). Aunque se ha descrito que el 8-OHdG tiene una frecuencia de mutación baja (2.5 a 4.8%) en células de mamífero, la formación de lesiones, su persistencia y acumulación incrementan el índice mutagénico (Cooke *et al.*, 2003). Cabe señalar que en diversos estudios se ha observado que la oxidación de la guanina se relaciona con diversas condiciones asociadas al envejecimiento, incluyendo disfunción de órganos y tejidos, así como con enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, y carcinogénesis (Ames *et al.*, 1993; Radak y Boldogh, 2010; Ba y Boldogh, 2018). En este sentido, Kuo *et al.* (2007) observaron un incremento significativo de los niveles 8-OHdG en muestras de orina de pacientes con cáncer de mama. Asimismo, Liou *et al.* (2017) encontraron un incremento de los niveles de este aducto, en muestras de células cancerígenas. Además, la exposición a agentes ambientales como los metales pesados, también se ha relacionado con un incremento en los niveles de 8-OHdG (Setyaningsih *et al.*, 2015; Kordas *et al.*, 2018).

Se ha descrito que las lesiones oxidativas que se pueden generar en el ADN son una consecuencia del balance entre la inducción de daño y los mecanismos de reparación (Evans *et al.*, 2016; Czarny *et al.*, 2018). Donde la disminución de la reparación resulta en niveles elevados de daño y consecuentemente en un incremento en el riesgo de desarrollar algún tipo de patología, como el cáncer. De ahí la importancia de la eliminación de las lesiones

oxidativas del ADN para la limitación de citotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis. Existen múltiples sistemas para prevenir la formación de este tipo de daño y, en caso de ocurrir el daño, asegurar su eliminación con los sistemas enzimáticos específicos. Los diferentes tipos de daño al ADN pueden ser reparadas mediante un sistema integrado por 5 principales mecanismos de defensa: (1) *reparación de escisión de base* (BER); (2) *reparación por escisión de nucleótido* (NER); (3) *reparación por apareamiento erróneo* (MISMATCH o MMR); (4) *reparación por recombinación no homóloga* (NHEJ); y (5) *reparación por recombinación homóloga* (HR). La vía BER implica la eliminación de lesiones individuales mediante la actividad de glucosilasas. Es considerada una de las vías más activas, repara la formación de aductos, bases oxidadas o desaminadas, sitios abásicos y rompimientos de cadena sencilla (Cooke *et al.*, 2003; Klapacz *et al.*, 2016). En la mayoría de los casos, la eliminación de las lesiones oxidativas se lleva a cabo mediante mecanismos superpuestos, esto permite incrementar la eficiencia de la reparación del ADN, sin que la atenuación o la eliminación de uno de los mecanismos impida corregir algún tipo de daño en particular (Cooke *et al.*, 2003). En este sentido, se han descrito varias rutas para la eliminación del aducto 8-OHdG, siendo la vía BER la ruta predominante (Dianov *et al.*, 2000; Pascucci, 2002). La formación de 8-OHdG *in situ* da como resultado el apareamiento 8-OHdG:G,C,T; que es el sustrato para la proteína multifuncional 8-oxo-guanina-glucosilasa (OGG1). Esta enzima libera al 8-OHdG a través de un mecanismo glucolítico (dependiente de residuos de lisina) de sustratos bicatenarios (Boiteux y Radicella, 2000; Bruner *et al.*, 2000; Boiteux *et al.*, 2017). Se considera a la OGG1 como el principal mecanismo para la reparación de 8-OHdG, siendo de gran importancia en la prevención de carcinogénesis inducida por las ERO. También se ha observado en células eucariontes que el producto de 8-OHdG, el 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formidopirimidina (FapyG), es reconocido y reparado por la OGG1 (Cooke *et al.*, 2003; Ba y Boldogh, 2018). En humanos, la OGG1 (hOGG1) es importante para el mantenimiento del genoma y la prevención de tumores. Su deficiencia contribuye a la acumulación de daño en el ADN, aumentando la inestabilidad genética y promoviendo la carcinogénesis (Paz-Elizur, 2003; Mambo *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha observado que compuestos antioxidantes como los polifenoles pueden reestablecer la actividad de esta enzima (Silva *et al.*, 2008; Majidinia *et al.*, 2019).

1.5. Estrés oxidativo y muerte celular

Dentro del balance homeostático celular es necesario un equilibrio entre la proliferación y la muerte de las células no funcionales. Las células pueden morir de diferentes maneras, ya sea de forma predeterminada, programada y limpiamente ejecutada, como en el caso de la apoptosis, o puede ser traumática, inflamatoria y repentina, como ejemplifican muchos tipos de necrosis. Cabe mencionar que hay una serie de muertes celulares que se asemejan a la apoptosis y/o la necrosis, y muchas, distintas de cada una, que cumplen diversas funciones para apoyar o interrumpir la homeostasis (Nirmala y Lopus, 2020). Siendo la apoptosis un mecanismo esencial para el desarrollo normal y la homeostasis de todos los organismos multicelulares (D'Arcy, 2019). También se utiliza como mecanismo de defensa como en las reacciones inmunes, por daño celular inducido por un proceso patogénico (inflamación y procesos neurodegenerativos), o por la exposición a xenobióticos (Norbury y Hickson, 2001; Elmore, 2007; Rana, 2008). Asimismo, la apoptosis puede desencadenarse por numerosos factores incluidas las señales mediadas por receptor, disminución de factores de crecimiento, los fármacos antitumorales y el daño al ADN. Tanto la vía intrínseca como la extrínseca pueden activar la apoptosis en respuesta al daño al ADN. La activación de la vía extrínseca se debe principalmente a la c-Jun N-terminalcinasasa (JNK) y al factor de transcripción p53 (Magni *et al.*, 2018). En la vía intrínseca se producen señales intracelulares que se propagan a través de las mitocondrias. En esta vía, Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) y ATM-Rad3 (ATR), promueven la activación de p53, mediante acetilación. Posteriormente p53, activa a las proteínas pro-apoptóticas pertenecientes a la familia de las Bcl-2 (Magni *et al.*, 2018). Siendo las caspasas y la familia de las Bcl-2, los dos grupos más importantes de proteínas involucradas en la apoptosis que participan en todas las vías con actividades tanto pro-apoptóticas como anti-apoptóticas (Taylor *et al.*, 2008; McIlwain *et al.*, 2013; Grilo y Mantalaris, 2019).

Las múltiples vías que desencadenan la apoptosis, finalmente, convergen como un sólo mecanismo, que implica la participación de la mitocondria (D'Arcy, 2019). En este sentido, en diversos estudios se han descrito que la disfunción mitocondrial es uno de los mediadores más importantes de la apoptosis dentro de las condiciones de estrés oxidativo, debido a que la mitocondria es sensible a los cambios del estado redox celular (Kannan y Jain, 2000; Kang

et al., 2018; Yu *et al.*, 2018; Hao *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019). Por otro lado, la acumulación de ERO puede inducir cambios en el ciclo celular mediante la expresión de proteínas, activando proto-oncogenes, inactivando genes supresores de tumores, y mediante el daño al ADN nuclear o mitocondrial (Matés y Sánchez-Jiménez, 2000; Circu y Aw, 2010). Diferentes niveles de daño al ADN pueden promover diversas respuestas celulares. Bajos niveles de daño activan a los mecanismos de reparación; mientras que, niveles más elevados, inducen la muerte celular. Cabe mencionar que p53 desempeña un papel fundamental en esta respuesta, estimulando la detención del ciclo celular para promover la reparación o desencadenar la apoptosis (Redza-Dutordoir y Averill-Bates, 2016). Adicionalmente, se ha descrito que el sistema antioxidante endógeno, también está relacionado con la inducción de apoptosis, mediante la disminución de su actividad (Schafer y Buettner, 2001; Circu *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2008; Circu y Aw, 2010). Por otro lado, la exposición de ciertos xenobióticos también puede desencadenar la apoptosis. Por ejemplo, los metales de transición como el Cromo (Cr), el cadmio (Cd) y el níquel (Ni) pueden inducir un incremento en la apoptosis mediante modificaciones en las bases del ADN, roturas de hebras y reordenamientos (Kannan y Jain, 2000; Rana, 2008; Galanis *et al.*, 2009). Particularmente, los compuestos de Cr(VI) inducen apoptosis mediante la generación de ERO y el daño al ADN (Rana, 2008).

Para evitar la replicación del ADN dañado, todos los organismos han desarrollado una red de vías moleculares que detecta las lesiones y, dependiendo de la gravedad las repara, promueve la senescencia celular, o induce la apoptosis. Así, la activación correcta de esta vía es importante para la prevención de mutaciones y cáncer (Tang *et al.*, 2019).

Dependiendo del tipo o el grado del estímulo, las células pueden desencadenar apoptosis o necrosis; estos dos procesos pueden ocurrir de manera independiente, simultánea, o secuencialmente (D'Arcy, 2019). La necrosis se caracteriza principalmente por la ausencia de activación de caspasas, liberación del citocromo c, fragmentación del ADN y ausencia de fagocitosis. En este sentido se ha descrito que, en ausencia de fagocitosis, las células apoptóticas se vuelven necróticas secundarias (Krysko *et al.*, 2008). Durante la muerte celular por necrosis hay inflamación celular, pérdida de la integridad de las membranas mitocondriales, peroxisomales y lisosómicas, y ruptura de la membrana plasmática, por lo que el contenido celular afecta a las células adyacentes y desencadena respuestas inmunes

importantes. Se ha observado, que este tipo de muerte celular se presenta, generalmente, cuando los niveles del estímulo y daño a la célula son elevados (Halliwell y Gutteridge, 2015). Por otro lado, durante la apoptosis los estímulos internos o externos inician una serie de reacciones controladas, que finalmente conducen a la muerte celular. Las células apoptóticas se caracterizan por la contracción y condensación celular, la fragmentación de la cromatina, el colapso del citoesqueleto, y la formación de cuerpos apoptóticos. Posteriormente, los cuerpos apoptóticos son fagocitados para impedir una reacción inmune mientras que se reciclan nutrientes utilizables. Por lo que, la eliminación de células dañadas mediante apoptosis, representa una ventaja sobre la necrosis. De ahí que sea considerada como un mecanismo de defensa importante (Nirmala y Lopus, 2020).

1.6. Estrés oxidativo inducido por metales

Cuando las poblaciones se exponen crónicamente a los contaminantes ambientales, con frecuencia se observa un aumento en la prevalencia de las enfermedades crónico-degenerativas (De Vizcaya y Del Razo, 2008). Entre los contaminantes químicos considerados como peligrosos se encuentran los metales pesados, como el Cr, cobalto (Co), arsénico (As), Ni, cobre (Cu), zinc (Zn), Cd, mercurio (Hg), titanio (Ti), selenio (Se) y plomo (Pb) (EPA, 1998). De los cuales se ha descrito, pueden generar daño a los organismos, como toxicidad en las células, tejidos u órganos, así como también genotoxicidad y carcinogenicidad, debido a que son capaces de incrementar la formación de RL y generar estrés oxidativo (Jomova y Valko, 2011). Se ha observado, que la exposición a metales se da principalmente a través del suelo, agua, aire y por productos de consumo, lo cual incrementa el riesgo de exposición a nivel global. La toxicidad de estos elementos se debe a la facilidad con que reaccionan con moléculas orgánicas, específicamente con sus grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El resultado de estas uniones ocasiona principalmente, alteración metabólica, estrés oxidativo y genotoxicidad (Navarro-Aviño *et al.*, 2007).

La toxicidad y el comportamiento oxidativo de los metales pesados en las células está determinado por la reacción química de Fenton y el ciclo de Haber-Weiss, en las que participan el radical $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 en la formación del $\cdot OH$ (Figura 2) (Valko *et al.*, 2005).

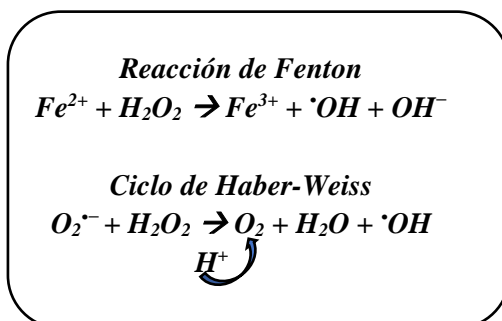


Figura 2. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss, en las que se produce el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Fe^{2+} , ion hierro (II); Fe^{3+} , ion hierro (III); H_2O , agua; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; H^+ , ion hidrógeno; O_2 , oxígeno; OH^- , ion hidroxilo; $O_2^{\cdot-}$, radical superóxido.

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

1.7. Cromo hexavalente

Los compuestos de Cr(VI) son ampliamente utilizados en procesos industriales y comerciales incluyendo galvanoplastia, acabado de metales, curtido de cuero, procesamiento de minerales, refinación de petróleo, manufactura de textiles, preservación de la madera, elaboración de pulpa y fabricación de productos químicos inorgánicos y orgánicos (Thacher *et al.*, 2015). La exposición ocupacional al Cr(VI) por inhalación depende de la industria y la función laboral, pero puede alcanzar varios cientos de microgramos por metro cúbico. Sin

embargo, estas exposiciones estimadas se han reducido significativamente en las últimas décadas a medida que se implementaron las prácticas de higiene industrial y los controles de los trabajadores. Por otro lado, la exposición ambiental a compuestos de Cr(VI) se produce por las emisiones de automóviles, el humo del cigarro, agua y alimentos contaminados. En este sentido, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) estimó que, en promedio, el humo de cigarro producido en los Estados Unidos contienen de 0.24 a 6.3 mg Cr(VI)/kg (O'Brien *et al.*, 2003; Flora, 2014). Alrededor del mundo los niveles de Cr(VI) están concentrados sólo en algunas regiones como áreas cercanas a vertederos, sitios de eliminación de desechos peligrosos, industrias de cromato y carreteras. De acuerdo con el *Statista Research Department*, en el año 2020 se produjeron mundialmente 30.9 millones de toneladas métricas (TM) de Cr (*Statista Research Department*, 2021), alcanzado para el año 2021, 41 millones de TM (Pistilli, 2022). Siendo Sudáfrica, Kasajistán, Turquía, India y Finlandia, los principales países de producción de Cr (Pistilli, 2022). En general, las poblaciones están expuestas a través del aire, los alimentos y agua contaminados, o por contacto de productos o suelos. Se ha considerado que las principales rutas de exposición a Cr(VI) se presentan por inhalación y por consumo de alimentos, en donde el contenido de este metal varía ampliamente y depende del procesamiento y preparación (Nickens *et al.*, 2010). Mientras que, los trabajadores de la industria relacionada con compuestos de Cr(VI) pueden estar expuestos a concentraciones hasta 2 órdenes de magnitud más elevados que la población general. La exposición por inhalación genera irritación del tracto respiratorio, perforación del septum nasal, bronquitis crónica, decremento de la función pulmonar, neumonía, así como efectos carcinógenos (O'Brien *et al.*, 2003; Jomova y Valko, 2011).

El Cr(VI) ha sido categorizado dentro de los principales carcinógenos para el ser humano, como consecuencia de su reactividad en los sistemas biológicos (Flora, 2014). Los compuestos de Cr(VI) son los más tóxicos debido a su reducción intracelular a Cr(III) que genera ERO, esta reducción es considerada el mecanismo más importante de la toxicidad del Cr(VI) (Wu *et al.*, 2000; Jomova y Valko, 2011; Flora, 2014). En los sistemas biológicos el Cr(VI) es encontrado en forma de anión cromato, el cual es similar a los sulfatos y fosfatos, lo que favorece su transporte a través de los canales aniónicos al medio celular (Figura 3) (Bridges y Zalapus, 2005; Wise y Wise, 2012). Dentro de la célula el Cr(VI) puede ser

reducido por moléculas como NADPH, glutatión (GSH), citocromo p450 o aldehído oxidasa; esta reducción puede llevarse a cabo en el retículo endoplasmático, la mitocondria, la membrana plasmática o el núcleo celular (O'Brien *et al.*, 2003). El Cr(VI) al ser reducido produce reactivos intermedios como el Cr(V), Cr(IV) y finalmente Cr(III) (O'Brien *et al.*, 2003; Jomova y Valko, 2011). Aunque el GSH es capaz de reducir al Cr(VI), la velocidad de esta reacción es cinéticamente más lenta que la observada para el ascorbato. Sin embargo, las altas concentraciones intracelulares de GSH sugieren que participa en el metabolismo reductor del Cr(VI), produciendo Cr(V), Cr(IV) y complejos Cr(III)-GSH (O'Brien *et al.*, 2003).

El Cr(VI) no interacciona directamente con el ADN, pero puede dañar a esta molécula al generar ERO durante su reducción, las cuales pueden ocasionar daño oxidativo (Wise y Wise, 2012). Se ha descrito que la generación de $\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 se lleva cabo tanto por la vía Haber-Weiss como por la reacción de Fenton (Lee *et al.*, 2012). Además el Cr(III) originado durante la reducción del Cr(VI), tiene una gran afinidad por las bases y fosfatos del ADN y puede producir aductos ADN-Cr, generación de bases oxidadas, ruptura de las cadenas de ADN, formación de complejos por uniones ADN-ADN y de sitios apurínicos/apirimídicos, así como inducción de enlaces cruzados o interacciones del ADN con proteínas (Hanahan y Weinber, 2000; Jomova y Valko, 2011).

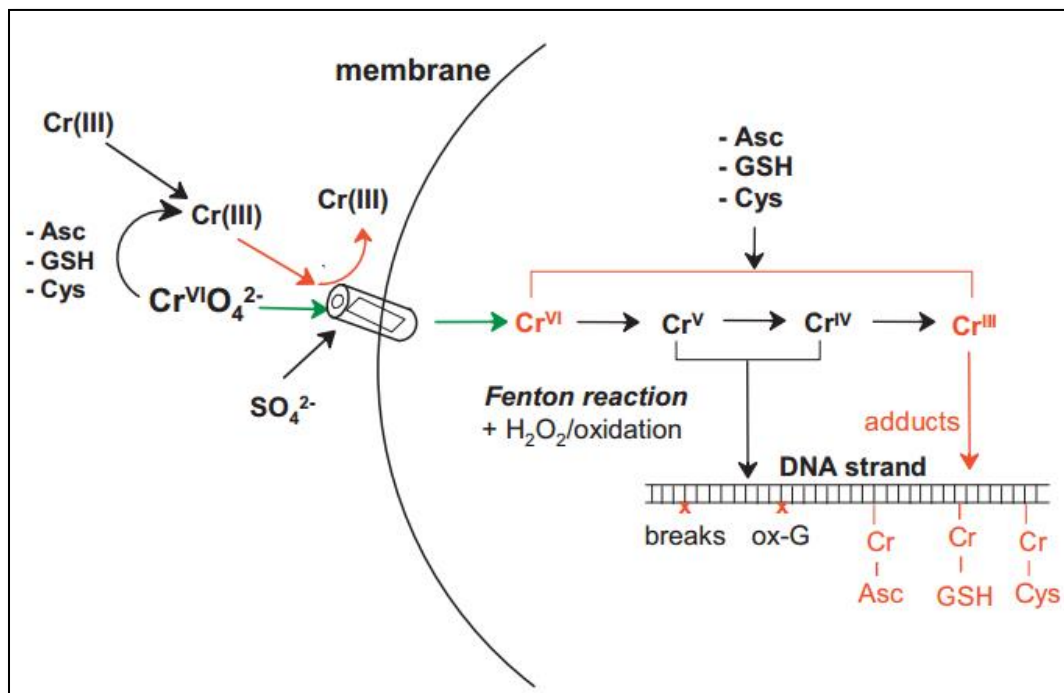


Figura 3. Metabolismo del cromo hexavalente [Cr(VI)] y su genotoxicidad. Asc, ácido ascórbico; Cr, cromo; $Cr^{VI}O_4^{2-}$, cromato (VI); Cys, cisteína; GSH, glutatión; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; SO_4^{2-} , ion sulfato; (tomada de Jomova y Valko, 2011).

1.8. Eliminación de especies reactivas de oxígeno: sistema antioxidante endógeno

Los sistemas biológicos y en general todos los organismos aerobios, utilizan una amplia variedad de moléculas antioxidantes para tratar de minimizar el daño que producen las ERO (Davies, 2000; Lushchak, 2014; Cadet y Davies, 2017). El concepto biológico de *antioxidante* hace referencia a algún compuesto que, en una baja concentración comparada con la del sustrato oxidante, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación del sustrato. La actividad antioxidante implica la atenuación del estrés oxidativo, la inhibición de mutaciones, disminución de la alteración de vías de señalización y otros parámetros de daño celular. Se ha descrito que los antioxidantes pueden contrarrestar los efectos de las ERO, así como la incidencia de cáncer y otras enfermedades degenerativas (Godic *et al.*, 2014; Pisoschi y Pop, 2015). La clasificación de estos antioxidantes se basa, principalmente, en sus características: enzimáticas y no-enzimáticas; preventivas o de reparación; endógenas o exógenas; actividad primaria o secundaria; hidrosolubles o liposolubles; y naturales o sintéticas (Pisoschi y Pop,

2015; Oh y Shahidi, 2018). También se pueden clasificar en: *antioxidantes de bajo peso molecular* y *de alto peso molecular*. El primer grupo comprende a sustancias químicamente diferentes como el ácido úrico y el GSH, así como los que pueden obtenerse por medio de la dieta (ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides, antocianinas y polifenoles). Dentro de los *antioxidantes de alto peso molecular* se encuentran enzimas como: SOD, catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-transferasa (GST) (Davies, 2000; Valko *et al.*, 2007). Por otro lado, el sistema de defensa antioxidante *endógeno* en los sistemas vivos se categoriza en enzimáticos y no enzimáticos. Dentro del grupo de los enzimáticos se encuentran: SOD, catalasa, GPx, glutatión reductasa (GR), tioredoxinas (Trx), peroxirredoxina (Prx) y GST. Mientras que, en el grupo de los no enzimáticos está el GSH, el ácido úrico, la bilirrubina, la melatonina, la coenzima Q, la ferritina y la ceruloplasmina (Davies, 2000; Birben *et al.*, 2012; Pisoschi y Pop, 2015; Ye *et al.*, 2015). En las células, una pequeña fracción de la reducción biológica total del O₂ se produce por una vía univalente, en donde el O₂^{•-} es el primer intermediario, siendo capaz de iniciar la formación en cadena de ERO (Lushchak, 2014). El daño potencial del O₂^{•-} es contrarrestado por la SOD (Figura 4). Dado que el O₂^{•-} es la principal ERO producida, su dismutación es primordial para las células. Existen 3 isoformas de SOD, que se encuentran en diferentes compartimentos celulares (Halliwell, 2006; Ye *et al.*, 2015). SOD1 (con Cu y Zn: CuZn-SOD), se encuentra en el citoplasma, el núcleo y la membrana plasmática; SOD2 (con manganeso (Mn): Mn-SOD), se encuentra principalmente en las mitocondrias; y SOD3 (con Cu y Zn: CuZn-SOD), en el espacio extracelular (Birben *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2015). El H₂O₂, puede ser dismutado por catalasa o reducido por diferentes peroxidases, como la GPx. Si GPx es utilizada para inactivar el H₂O₂, deben mantenerse los niveles de GSH, para esto el GSSG (glutatión disulfuro, forma oxidada de GSH), es de nuevo reducido por GR (Figura 4). Se han descrito cuatro GPx; GPx1, presente en el citosol y la mitocondria; GPx2, localizada en el epitelio de células gastrointestinales; GPx3, en el medio extracelular; y GPx4, unida a la membrana celular (Birben *et al.*, 2012). Por otro lado, la GST cataliza la formación de conjugados con GSH, para la desintoxicación de xenobióticos (Figura 4) además, inactiva metabolitos secundarios, como: aldehídos insaturados, epóxidos e hidroperóxidos (Ye *et al.*, 2015). Se han descrito tres familias de GST, localizadas en el citosol, la mitocondria y asociadas a membrana (Ladner *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2004; Birben *et al.*, 2012). La función antioxidante de GSH se presenta al

ser cofactor de enzimas antioxidantes como GPx y GST, y al intervenir en la generación de las formas activas de antioxidantes importantes como las vitaminas C y E (Valko *et al.*, 2007). El GSH es un tripéptido (glutamina, cisteína y glicina) que existe en concentraciones milimolares dentro de las células. Es un antioxidante intracelular crítico que participa en reacciones de biotransformación con enzimas de fase II. Se ha descrito que el GSH es el mayor antioxidante soluble presente en la célula, encontrándose en concentraciones altas en el citosol, el núcleo y la mitocondria en donde sus niveles son ajustados para condiciones y vías específicas (Birben *et al.*, 2012; Lushchak, 2014). La acción de todos estos antioxidantes puede ser categorizada en 4 líneas principales de defensa, en donde se suprime la formación de ERO, se inhiben las reacciones en cadena de formación, mediante la donación de electrones, se repara el daño y se activan los mecanismos de reparación (Ighodaro, 2018; Ighodaro y Akinloye, 2018). Así, todo el sistema de defensa antioxidante trabaja en conjunto para ajustar a niveles óptimos la producción de ERO (Lushchak, 2014; Ye *et al.*, 2015). Sin embargo, actualmente, no se conoce alguna vía del sistema antioxidante para la eliminación directa del $\bullet\text{OH}$; siendo la prevención de su formación la mejor vía para proteger a los organismos vivos de los efectos deletéreos de este radical. De ahí que, se ha propuesto la capacidad antioxidante de los polifenoles, como un mecanismo adaptado para impedir la formación de $\bullet\text{OH}$ (Lushchak, 2014). En este sentido, en diversos estudios se ha descrito que la suplementación con polifenoles, particularmente el resveratrol, inhiben la formación de ERO, y modula el sistema antioxidante endógeno (Hu *et al.*, 2011; Pisoschi y Pop, 2015).

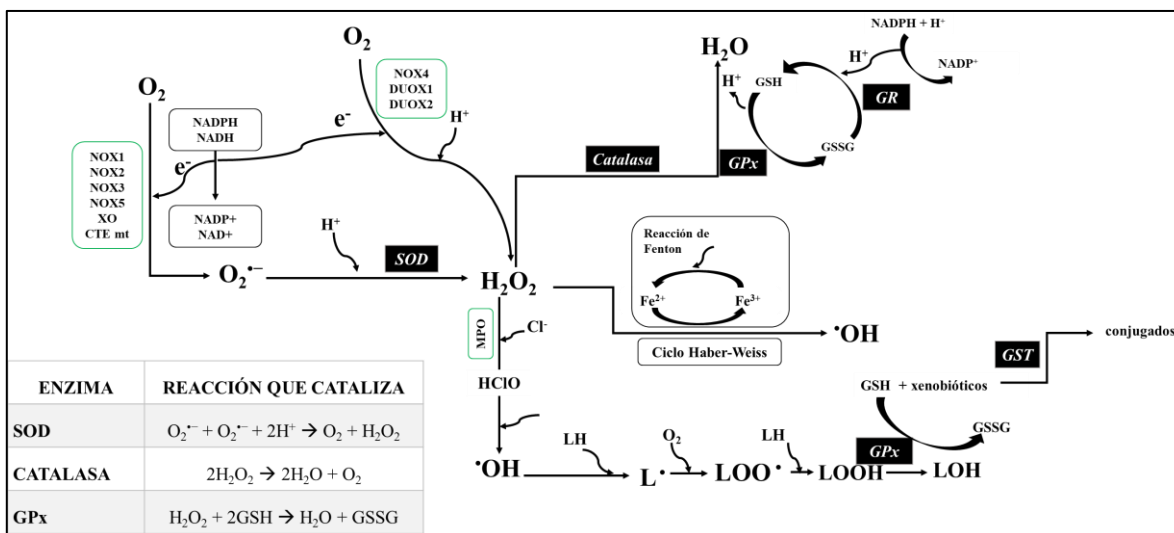


Figura 4. Vías principales del sistema antioxidante endógeno. El daño potencial del radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) es contrarrestado por la superóxido dismutasa (SOD). Dado que el $O_2^{\cdot -}$ es la principal especie reactiva de oxígeno (ERO) producida, su dismutación a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es primordial para las células. El H_2O_2 , puede ser dismutado por catalasa o reducido por la glutatión peroxidasa (GPx). Si GPx es utilizada para inactivar el H_2O_2 , deben mantenerse los niveles de glutatión (GSH), para esto el glutatión oxidado (GSSG), es de nuevo reducido por la glutatión reductasa (GR). La glutatión S-transferasa (GST) cataliza la formación de conjugados con GSH, para la desintoxicación de xenobióticos. CTE mt; cadena de transporte de electrones mitocondrial; Cl^- , cloruro; DUOX, oxidasa dual; Fe^{2+} , ion hierro (II); Fe^{3+} , ion hierro (III); HClO, ácido hipocloroso; H_2O , agua; H^+ , ion hidrógeno; LH, lipasa hepática; LOO^{\cdot} , lípido peroxil radical; LOOH, lipoperóxido; MPO, mieloperoxidasa; $NADP^+$, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado; NAD^+ , nicotinamida adenina dinucleótido oxidado; NADH, nicotinamida adenina dinucleótido; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NOX, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; XO, xantina oxidasa (modificada de Zhang et al., 2019).

1.9. Polifenoles

Los polifenoles se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y constituyen uno de los grupos más numerosos e importantes de metabolitos secundarios de plantas, los cuales son parte esencial de su fisiología y morfología debido a que están involucrados en el crecimiento y reproducción, además de proveer protección contra la radiación ultravioleta, resistencia a patógenos y predadores (Islam et al., 2021). Se han descrito más de 8,000 polifenoles distintos clasificados de acuerdo con su estructura química básica, es decir, por el número de anillos fenólicos que contienen o el tipo de sustituyente unido a éstos. De los

polifenoles actualmente descritos se considera que los flavonoides, lignanos, estilbenos y ácidos fenólicos, son los que se encuentran más ampliamente distribuidos en los alimentos (Rijken *et al.*, 2002; Doo y Maskarinec, 2014; Roleira *et al.*, 2015).

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

1.9.1. Biodisponibilidad y metabolismo

La biodisponibilidad de los polifenoles no siempre está relacionada con los más abundantes en el organismo, esto es debido a que no presentan la misma actividad. Para que los polifenoles ejerzan bioactividad en humanos, deben estar biodisponibles y llegar a los tejidos del organismo. La biodisponibilidad desde una perspectiva nutricional se define como el grado de digestión, absorción, metabolismo y excreción de un compuesto después de su ingestión (Dabeek y Marra, 2019). Así, la actividad intrínseca de los polifenoles dependerá de su absorción en el intestino, así como de la rapidez de su metabolismo o excreción (Manach *et al.*, 2004).

Después de la administración de polifenoles, algunos de ellos se absorben en el estómago, mientras que otros compuestos como catequinas, flavanoles y flavonas en el intestino delgado. En general, la absorción de fenoles y sus correspondientes glucósidos, está relacionada con la escisión y liberación de la aglicona, como resultado del metabolismo microbiano y la actividad de las enzimas digestivas (Teng y Chen, 2019). Además, el límite y la velocidad de absorción de los polifenoles en el intestino se deben a su estructura química. Generalmente, las agliconas pueden absorberse en el intestino delgado, pero los polifenoles presentes en forma de ésteres, glucósidos o polímeros no pueden absorberse en su forma nativa. Por lo tanto, son hidrolizados por las enzimas intestinales, como las β -glucosidasas y la lactasa-florizina hidrolasa, o por la microflora colónica, y luego adsorbidos. Así, las formas de polifenoles que están presentes en la sangre y los tejidos son diferentes de las presentes en los alimentos (Cipolletti *et al.*, 2018). Aproximadamente, sólo el 5% del total de

polifenoles ingeridos diariamente alcanzan la circulación sanguínea sin cambios en su estructura, como las antocianinas, de las que se ha reportado que solo entre el 1% y el 2% mantienen su estructura original después de la ingestión (Lee, 1995; Di Lorenzo *et al.*, 2021).

1.9.2. Actividad antioxidante

Los mecanismos de la actividad antioxidante de los polifenoles están determinados principalmente por su estructura química, su configuración y el número total de grupos hidroxilo (OH) (Cipolletti *et al.*, 2018). Para que un compuesto polifenólico pueda ser considerado como un antioxidante debe estar presente en una baja concentración comparado con la del sustrato oxidante, ser capaz de retrasar o prevenir la oxidación del sustrato y que los radicales secundarios formados sean estables (Gulcin, 2020). Este mecanismo se debe, principalmente, a que pueden donar un electrón y/o átomos de hidrógeno para detener la reacción química y reducir así el daño al ADN, la alteración de lípidos y proteínas, y la tasa de mutaciones (Pisoschi y Pop, 2015; Siti *et al.*, 2015). La acción antioxidante comprende no sólo la captura de RL, sino también previene su formación, inhibe su propagación y estimula los procesos de reparación celular (Gulcin, 2020). Se ha establecido que un antioxidante ideal es aquel que es rápidamente absorbido, que puede prevenir o eliminar la formación de ERO, reducir los iones metálicos y activar factores de transcripción para inducir la expresión de enzimas (López-Alarcón y Denicola, 2013; Poljsak *et al.*, 2013).

Se ha descrito, que los polifenoles pueden activar el sistema antioxidante endógeno, al interactuar con ciertas vías de señalización celular que incrementan la expresión del sistema enzimático y no enzimático (Nani *et al.*, 2021). En este sentido, la medida de la capacidad antioxidante considera la acción acumulativa y sinérgica de todos los antioxidantes presentes en el plasma y los fluidos corporales proporcionando así un parámetro integrado que puede ayudar en la evaluación de factores fisiológicos, ambientales o nutricionales que afectan el estado redox *in vivo* (Ghiselli *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005; López-Alarcón y Denicola, 2013).

1.10. Resveratrol

El resveratrol es una fitoalexina perteneciente a la familia de los estilbenos. Es sintetizado por más de 70 especies de plantas en respuesta a infecciones fúngicas, estrés, lesiones mecánicas y la radiación UV (Hasan y Bae, 2017). La síntesis de esta molécula en las plantas es catalizada por la resveratrol sintasa en la vía de los fenilpropanoides en un proceso similar al de los flavonoides (Kapetanovic *et al.*, 2011). Su estructura química presenta dos anillos de fenol (monofenol y difenol) unidos por un doble enlace de estireno, además de tres grupos OH que participan en la eliminación de RL y la quelación de metales (Caruso *et al.*, 2004; Gülçin, 2010). El resveratrol existe tanto en su forma *trans* como en su isómero *cis*, siendo la estructura *trans* la más estable y abundante (Figura 5) (Galiniak *et al.*, 2019).

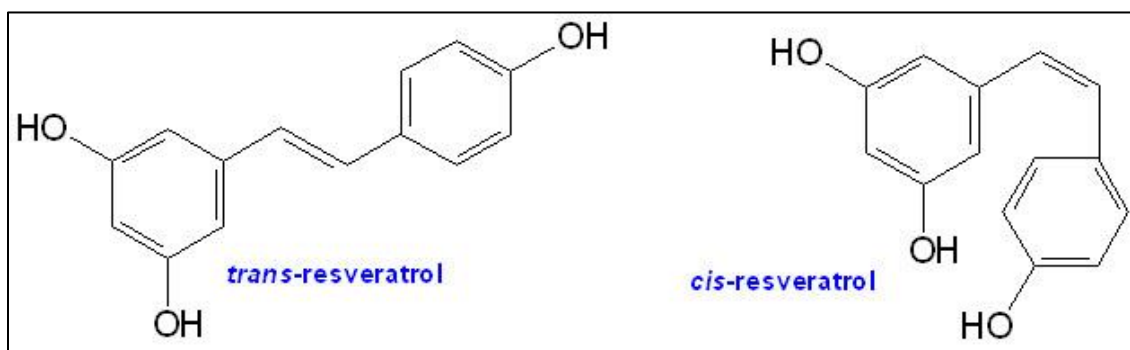


Figura 5. Estructura química *trans* y *cis* del resveratrol.

El resveratrol se encuentra en altas concentraciones en las uvas, arándanos, bayas, pistachos, cacahuates y como suplemento alimenticio (Baur y Sinclair, 2006; Kuršvietienė *et al.*, 2016; Pannu y Bhatnagar, 2019). Las concentraciones de resveratrol varían notablemente entre las especies de plantas. En los arándanos, por ejemplo, las concentraciones de resveratrol se aproximan a sólo 32 ng/g, en comparación con niveles de hasta 3540 ng/g en uvas (Carter *et al.*, 2014). El resveratrol también puede encontrarse en productos procesados como el vino tinto en una concentración promedio de 0.1–14.3 mg/l, la cual depende de diversos factores

como la variedad de uva, las condiciones del suelo, el clima o la radiación UV (Carter *et al.*, 2014).

En diversos estudios se ha demostrado que el resveratrol tiene múltiples efectos benéficos para la salud, principalmente, por sus propiedades cardioprotectoras, antiinflamatorias, hipoglucemiantes, neuroprotectoras y anticancerígenas (Kirk *et al.*, 2000; De la Lastra y Villegas, 2007; Mukherjee *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011; Sadi *et al.*, 2014; Javid *et al.*, 2019). Las actividades biológicas del resveratrol se han atribuido a sus mecanismos antioxidantes que dependen, principalmente, del número y posición de sus grupos OH que le permiten eliminar a los RL ($O_2^{\cdot-}$ y $\cdot OH$), inhibir la oxidación lipídica, reducir la formación de hidroperóxidos e interactuar con el sistema antioxidante endógeno, incrementando la actividad catalítica de enzimas como GPx, GR, GST, catalasa y SOD, o manteniendo la concentración intracelular de los antioxidantes no enzimáticos (De la Lastra y Villegas, 2007; Mukherjee *et al.*, 2010; Mojica-Villegas *et al.*, 2014; Kuršvietienė *et al.*, 2016). Otro mecanismo observado, es la prevención del daño al ADN, mediante su interacción con los mecanismos de reparación (OGG1), la activación de enzimas de fase II para la desintoxicación de carcinógenos o mediante la inhibición de ERO (De la Lastra y Villegas, 2007). También se ha descrito que el resveratrol inhibe la formación de aductos de ADN, inducidos por diversos agentes químicos. Este mecanismo es importante debido a que estas alteraciones son responsables de la fase de iniciación de la formación de tumores (Zhang *et al.*, 2013). Asimismo, pueden modular diversos mecanismos fisiológicos de supervivencia o muerte celular, a través de la regulación de la expresión de genes y vías de señalización (De la Lastra y Villegas, 2007; Arcanjo *et al.*, 2018). Los efectos antioxidantes del resveratrol también se han observado sobre el estrés oxidativo generado por compuestos metálicos. En este sentido, se ha informado que el tratamiento previo con resveratrol modifica los niveles de 8-OHdG en el ADN inducidos por Cr(III), de manera dosis dependiente; proponiendo la eliminación del $\cdot OH$ y la activación de los mecanismos de reparación del ADN como posibles vías de protección (Burkhardt *et al.*, 2001). En otro estudio, Banu *et al.* (2016) describen que el resveratrol es capaz de reducir los niveles de H_2O_2 y la peroxidación lipídica, así como incrementar la expresión de enzimas antioxidantes en tejido ovárico de ratas expuestas a Cr(VI).

El resveratrol posee múltiples propiedades benéficas y por esta razón se ha descrito como un potente antioxidante. Sin embargo, también se ha observado que posee efectos prooxidantes, los cuales tienen importancia clínica relevante. Este efecto prooxidante se ha atribuido a la concentración utilizada de resveratrol así como al modelo de estudio (De la Lastra y Villegas, 2007; Kuršvietienė *et al.*, 2016; Arcanjo *et al.*, 2018). Se ha considerado que los efectos prooxidantes del resveratrol podrían explicarse por la formación de radicales intermediarios durante su autooxidación (Mikuła-Pietrasik *et al.*, 2012). Dentro de los efectos prooxidantes, se han descrito las lesiones oxidativas al ADN, dado que estos efectos son observados, principalmente, en líneas celulares de cáncer, se ha propuesto como un mecanismo anticancerígeno (De la Lastra y Villegas, 2007). De ahí que, muchos de los estudios que utilizan tratamientos con dosis altas de resveratrol evalúen su efecto prooxidante como tratamiento contra el cáncer (Kuršvietienė *et al.*, 2016). Asimismo, se ha observado el efecto prooxidante del resveratrol en presencia de iones de Cu, atribuyendo a este metal los efectos citotóxicos observados (Ahmad *et al.*, 2005; De la Lastra y Villegas, 2007; Kuršvietienė *et al.*, 2016).

1.11. Evaluación de daño genotóxico

La evaluación de daño genotóxico se realiza para identificar agentes contaminantes que representan un riesgo para la estabilidad del material genético, así como compuestos propuestos para uso terapéutico y sustancias que podrían ser capaces de regular o reducir los efectos mutagénicos de algunos productos químicos (Sloczyńska *et al.*, 2014). Los ensayos de prueba para la detección de daño genotóxico, se pueden agrupar 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 pre-mutagénicas, como la formación de aductos, ligamientos cruzados intra e inter banda 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 (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 AC), *in vivo* empleando médula ósea o sangre periférica (frecuencia de micronúcleos (MN)) (Krishna y Hayashi, 2000).

1.11.1. Micronúcleos

Uno de los ensayos propuestos para evaluar los niveles de genotoxicidad es la prueba de MN que se caracteriza por su simplicidad, fiabilidad, sensibilidad y rapidez. Esta técnica, desarrollada por Boller y Schmid en 1970, es ampliamente utilizada para detectar la genotoxicidad de contaminantes ya sean clastogénicos o aneugénicos, así como para evaluar las AC numéricas y estructurales, y efectos citotóxicos (Schmid y Ledebur, 1973; Krishna y Hayashi, 2000; 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; Fenech *et al.*, 2016).

Un MN es un pequeño cuerpo de cromatina, formado por fragmentos de cromosomas o por cromosomas completos que durante la anafase de la mitosis no se incorporaron dentro del núcleo de las células hijas, consecuentemente el MN que se forma puede visualizarse en el citoplasma (Figura 6) (Schmid y Ledebur, 1973).

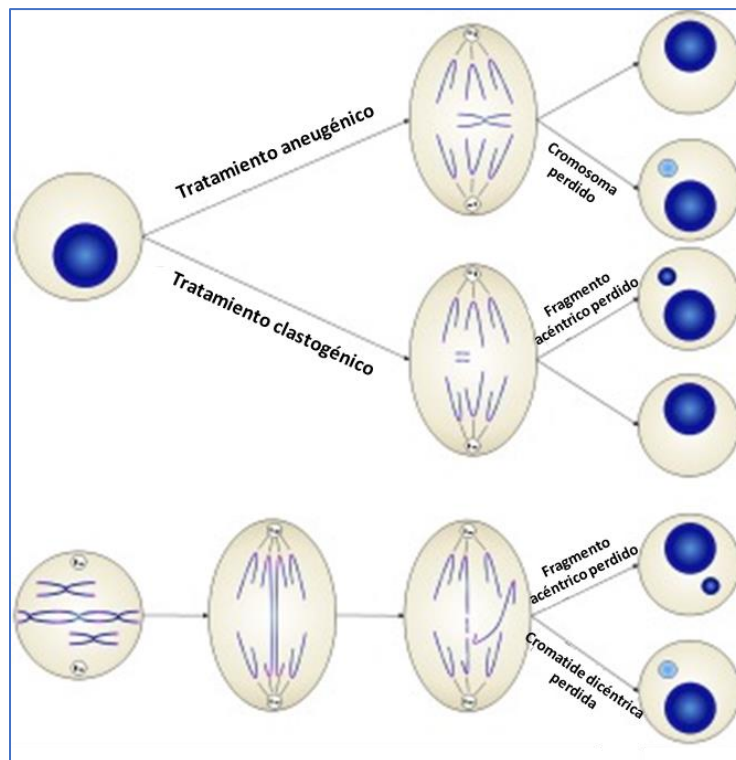


Figura 6. Mecanismos de formación de micronúcleos (modificada de Terradas *et al.*, 2010).

Los MN pueden ser evaluados en diferentes tipos celulares como: mieloblastos, mielocitos, medula ósea de ratón (eritrocitos) o en eritrocitos de sangre periférica, células binucleadas (linfocitos) inducidas mediante citocalasina B, así como en células uroteliales y exfoliadas de la mucosa bucal y nasal (Schmid y Ledebur, 1973; Heddle *et al.*, 1983; Sommer *et al.*, 2020). Los MN pueden ser detectados fácilmente, ya que son de forma redonda con un diámetro de alrededor de 1/20 a 1/5 de un eritrocito (Krishna y Hayashi, 2000; Sommer *et al.*, 2020).

La visualización de los MN en células eritroides es fácil, ya que carecen de un núcleo principal. Entre estas células se distinguen claramente a los eritrocitos policromáticos (EPC) que aún conservan el ARN ribosómico y a los eritrocitos normocromáticos (ENC) que ya perdieron el ARN ribosómico y retienen altas concentraciones de hemoglobina. Los ENC y EPC pueden diferenciarse utilizando diferentes colorantes como: May-Gruenwald, Giemsa y naranja de acridina (NA) (Schmid y Ledebur, 1973; Hayashi *et al.*, 1990; Sommer *et al.*, 2020).

1.11.2. 8-oxo-7,8-dihidro-2'desoxiguanosina

El daño oxidativo del ADN es de las modificaciones más estudiadas debido a su grado mutagénico. Se han descrito varios productos de oxidación del ADN, pero el bajo potencial redox de la guanina la convierte en la más susceptible a la oxidación (Larsen *et al.*, 2019). La lesión de la guanina ampliamente investigada es el aducto 8-OHdG, el cual tiene un papel importante en la mutagénesis y carcinogénesis. Este aducto es considerado un biomarcador relevante del daño oxidativo del ADN y su reparación, carcinogénesis y genotoxicidad (Evans *et al.*, 2016; Talhaoui *et al.*, 2016; Larsen *et al.*, 2019; Urbaniak *et al.*, 2020). Se ha observado que el radical $\bullet\text{OH}$ es el responsable de la mayoría de las lesiones oxidativas en el ADN. Este radical reacciona principalmente con los átomos C8 de las purinas, ocasionando la oxidación de nucleósidos e induciendo la formación de aductos como el 8-OHdG, que a su vez pueden generar transversiones de guanina por timina durante la replicación (Pilger y Rüdiger, 2006; Evans *et al.*, 2016).

Dado que el aducto 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 del ADN, lo que permite que, posteriormente, pueda detectarse y medirse en orina, saliva o plasma (Evans *et al.*, 2016; Pilger y Rüdiger, 2006; Ock *et al.*, 2011). Existen diferentes técnicas para llevar a cabo la medición del aducto 8-OHdG, uno de los más utilizados es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Hnasko, 2015), el cual consiste en utilizar un anticuerpo anti-8-OHdG monoclonal, un anticuerpo secundario y sustrato colorimétrico de detección. El anticuerpo monoclonal 8-

OHdG se une competitivamente al 8-OHdG inmovilizado en pocillos pre-cubiertos y en solución. El anticuerpo unido al 8-OHdG en la muestra es eliminado por lavado, mientras que se retiene al anticuerpo unido al 8-OHdG unido al pocillo. La detección del anticuerpo retenido se realiza usando un conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) o de acetilcolinesterasa (AChE) y sustrato colorimétrico (Figura 7). Una de las ventajas de utilizar esta técnica es que puede ser realizada fácilmente (Pilger y Rüdiger, 2006).

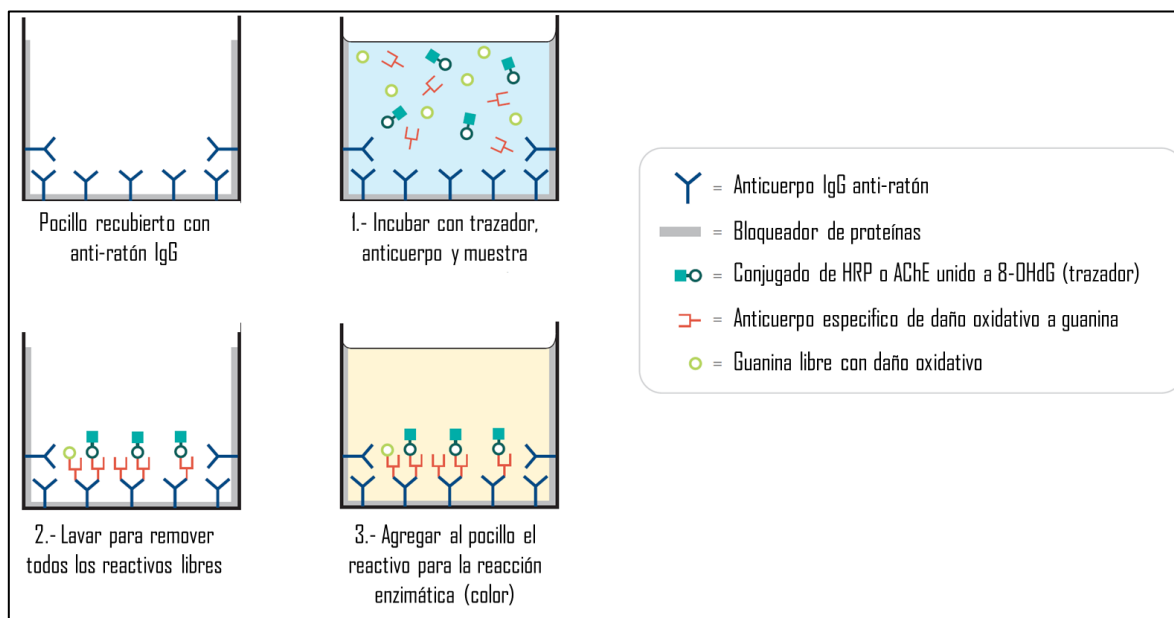


Figura 7. El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se basa en la competencia entre el 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina (8-OHdG) y un conjugado de 8-OHdG con acetilcolinesterasa (AChE) por una cantidad limitada de anticuerpo monoclonal 8-OHdG. Debido a que la concentración del conjugado de 8-OHdG (trazador) se mantiene constante mientras que la concentración de 8-OHdG varía, la cantidad de trazador que puede unirse al anticuerpo monoclonal 8-OHdG será inversamente proporcional a la concentración de 8-OHdG en el pozo. Este complejo de anticuerpo-8-OHdG se une a la IgG anti-ratón policlonal que se ha unido previamente al pocillo. La placa se lava para eliminar los reactivos no unidos y luego se agrega al pocillo el reactivo (que contiene el sustrato de la AChE o de la HRP). El producto de esta reacción enzimática tiene un color distintivo y se absorbe a 412 o 450 nm. La intensidad de este color, determinada espectrofotométricamente, es proporcional a la cantidad de 8-OHdG unida al pocillo, que es inversamente proporcional a la cantidad de 8-OHdG libre presente en el pocillo durante la incubación. HRP, peroxidasa de rábano (modificada de DNA/RNA oxidative damage ELISA "kit" de Cayman Chemicals. No. 589320; Ann Arbor, MI, EUA).

1.11.3. Apoptosis y viabilidad celular

La muerte celular programada es un proceso fundamental y esencial para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, con el objetivo de eliminar las células dañadas, infectadas o transformadas (Norbury y Hickson, 2001). La apoptosis comienza por la activación de un programa intrínseco o extrínseco y se caracteriza por el mantenimiento de las membranas celulares intactas permitiendo así su eliminación por fagocitosis; se considera un proceso en el cual la muerte celular es iniciada y completada de una manera ordenada mediante una serie de cambios bioquímicos y morfológicos, incluyendo la activación de caspasas, encogimiento celular, condensación de la cromatina y degradación nucleosomal (Tait y Green, 2012; Forbes-Hernández *et al.*, 2014). Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye condensación citoplasmática y nuclear, el rompimiento específico de proteínas celulares, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, y el rompimiento del ADN en fragmentos oligonucleosómicos que posteriormente son fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas (Ramírez y Rojas, 2010; Tait y Green, 2012).

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir las de muerte. Estas últimas son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión del ADN por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos. Siendo la apoptosis un proceso activo y estrictamente regulado. Existen diversos activadores como citocromo c, smac/diablo, factor inductor de la apoptosis (AIF) y Baculovirus inhibidor de la apoptosis (BIR3); así como reguladores negativos: proteína inhibidora de la apoptosis (IAP), proteína de choque térmico (Hsp), Bcl-2 y BclXL, etc. (Figura 8) (Forbes-Hernández *et al.*, 2014).

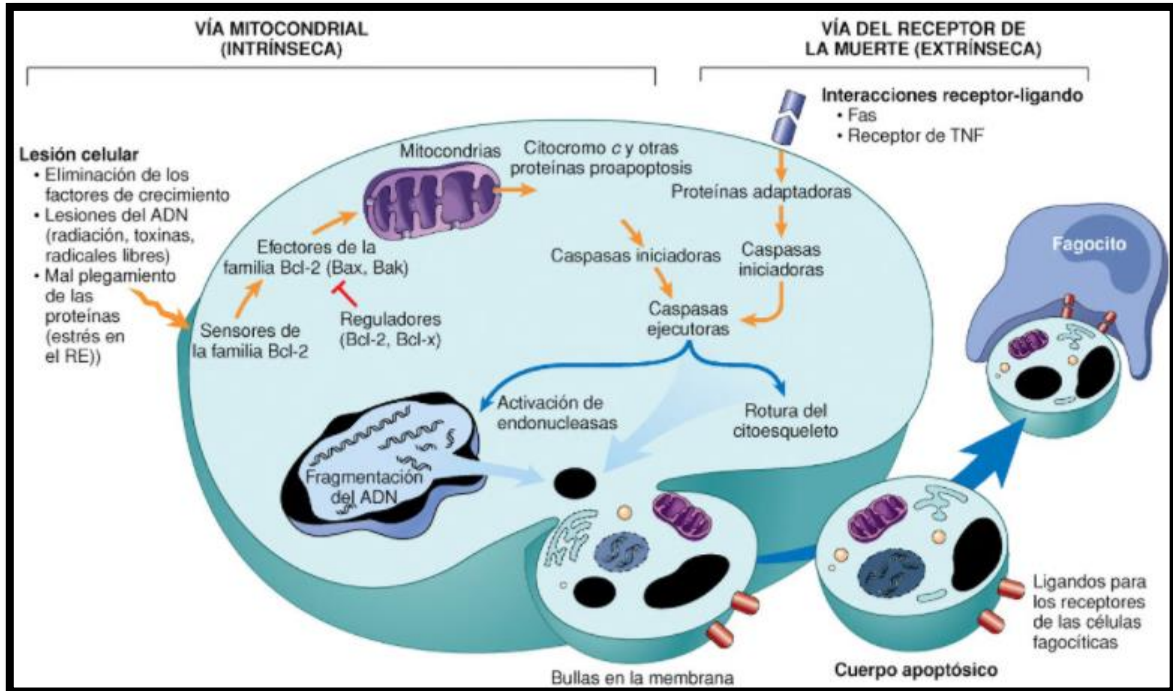


Figura 8. Cambios morfológicos característicos de la apoptosis. *TNF*, factor tumoral de la necrosis (tomada de Robbins y Cotran, 2010).

El análisis de la muerte celular puede ser llevado a cabo tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* con diversos métodos, como la tinción diferencial con fluorocromos, que permiten la adecuada distinción entre la apoptosis y la necrosis mediante la integridad de la membrana (Allen *et al.*, 1997).

2. Planteamiento del problema

La exposición de las poblaciones humanas a agentes genotóxicos como los compuestos de Cr(VI) se ha relacionado con el desarrollo de algunos tipos de cáncer. Uno de los principales mecanismos de daño que se ha propuesto es el estrés oxidativo. En contraparte, se ha mostrado en diferentes sistemas de prueba tanto *in vitro* como *in vivo*, que polifenoles como el resveratrol presentan actividad antioxidante. En estudios previos realizados en nuestra línea de investigación se observó que el resveratrol es capaz de disminuir las frecuencias de MN inducidos por compuestos de Cr(VI). De ahí que, en el presente trabajo, además de evaluar la protección del daño al ADN, se estudiaron las posibles vías subyacentes de protección del daño al ADN inducido por Cr(VI).

3. Hipótesis

Si el resveratrol posee potencial antioxidante que podría modular el sistema antioxidante endógeno, además de neutralizar a las ERO, y se ha observado *in vitro* que puede activar enzimas de reparación de daño oxidativo en el ADN, entonces, se espera que la protección del resveratrol sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃ esté mediada por la regulación del sistema antioxidante endógeno (SOD, GPx, catalasa y GSH) y la activación de la reparación del aducto 8-OHdG, además de la apoptosis como vía de eliminación de células con daño en el ADN.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Estudiar los efectos protectores del resveratrol contra la genotoxicidad inducida por el Cr(VI) *in vivo* y los procesos metabólicos subyacentes, incluyendo la reparación de aductos de 8-OHdG, los componentes del sistema antioxidante endógeno y la apoptosis, que pueden estar involucrados en la prevención del daño al ADN inducido por el Cr(VI).

4.2. Objetivos particulares

- I. Evaluar el efecto del resveratrol sobre el daño genotóxico inducido por CrO_3 mediante la cinética de inducción de MN en sangre periférica.
- II. Evaluar el efecto del resveratrol y el CrO_3 sobre la apoptosis en ratones Hsd:ICR, mediante el ensayo dual con los fluorocromos naranja de acridina y bromuro de etidio en sangre periférica.
- III. Evaluar el efecto del resveratrol y el CrO_3 sobre la reparación del daño al ADN en ratones Hsd:ICR, mediante las evaluaciones de los niveles del aducto 8-OHdG en plasma sanguíneo.
- IV. Evaluar el efecto del resveratrol y el CrO_3 sobre el sistema antioxidante endógeno en ratones Hsd:ICR, mediante las determinaciones de la actividad de SOD, GPx y catalasa, así como los niveles de GSH en sangre periférica.
- V. Evaluar el efecto del resveratrol sobre el daño citotóxico inducido por CrO_3 mediante las frecuencias de EPC con relación a los ENC y la viabilidad celular en sangre periférica.

5. Material y método

5.1. Reactivos

Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, EUA). Como colorantes para las evaluaciones de MN, apoptosis y viabilidad celular se utilizaron NA [CAS No. 10127-02-3] y bromuro de etidio (BrEt) [CAS No. 1239-45-8]. Para el tratamiento fitoquímico se utilizó 3,4',5-trihidrox*trans*-estilbeno [resveratrol, grado de pureza $\geq 98\%$; CAS No 501-36-0] y como agente inductor de daño al ADN el trióxido de cromo (CrO_3) [grado de pureza 99.9%; CAS No. 1333-82-0].

5.2. Animales

Se emplearon 25 ratones machos de la cepa Hsd:ICR de 2 a 3 meses de edad, con un peso entre los 28 a los 35 gramos. Los ratones se obtuvieron de Harlan® (Ciudad de México, México) en la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM y fueron aclimatados en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza durante dos semanas antes de iniciar los experimentos. Durante el periodo de aclimatación, los grupos de cinco ratones fueron colocados en una jaula de plástico bajo condiciones de temperatura controladas ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (las luces se encendían a las 7:00 a.m. y se apagaban a las 7:00 p.m.). Los ratones tenían libre acceso al alimento (Purina-México®, Ciudad de México, México) y al agua.

5.3. Diseño experimental

Considerando que en estudios previos, los efectos genotóxicos entre hembras y machos tratados con CrO_3 por inyección intraperitoneal (ip) no presentaron diferencias (García-Rodríguez *et al.*, 2001; 2013; O'Brien *et al.*, 2003), este estudio se realizó empleando únicamente ratones macho de acuerdo con los lineamientos para el ensayo de sustancias químicas (test de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos) de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, por sus siglas en inglés), y la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) (EPA, 1998; OECD, 2016).

Los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos de cinco individuos cada uno y se trataron de la siguiente manera: Se utilizaron dos grupos control (C1: ratones tratados por vía ip con agua destilada estéril y C2: ratones tratados con etanol al 30% por sonda intragástrica (ig). Estos grupos control fueron utilizados debido a que el CrO_3 se preparó disolviendo el compuesto en agua, mientras que el resveratrol se disolvió en etanol al 30%. El grupo resveratrol fue tratado con una dosis única de 50 mg/kg vía ig, y el grupo CrO_3 fue tratado con una dosis única de 20 mg/kg vía ip. El último grupo recibió un tratamiento combinado de resveratrol y Cr(VI) (resveratrol+ CrO_3), los ratones fueron tratados con 50 mg/kg de resveratrol vía ig 4 horas antes de la inyección ip de CrO_3 (20 mg/kg).

Una vez preparados los reactivos se administraron inmediatamente en un volumen aproximado de 0.25 ml por ratón. Las evaluaciones se realizaron en sangre periférica obtenida de la vena caudal, ya que no requiere el sacrificio de los animales. El Comité de Bioética de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, aprobó las condiciones y protocolos experimentales utilizados en el estudio (Código: **FESZ-CE/21-118-13**).

En la Figura 9 se presenta el protocolo para la administración de los tratamientos, así como la toma de muestra.

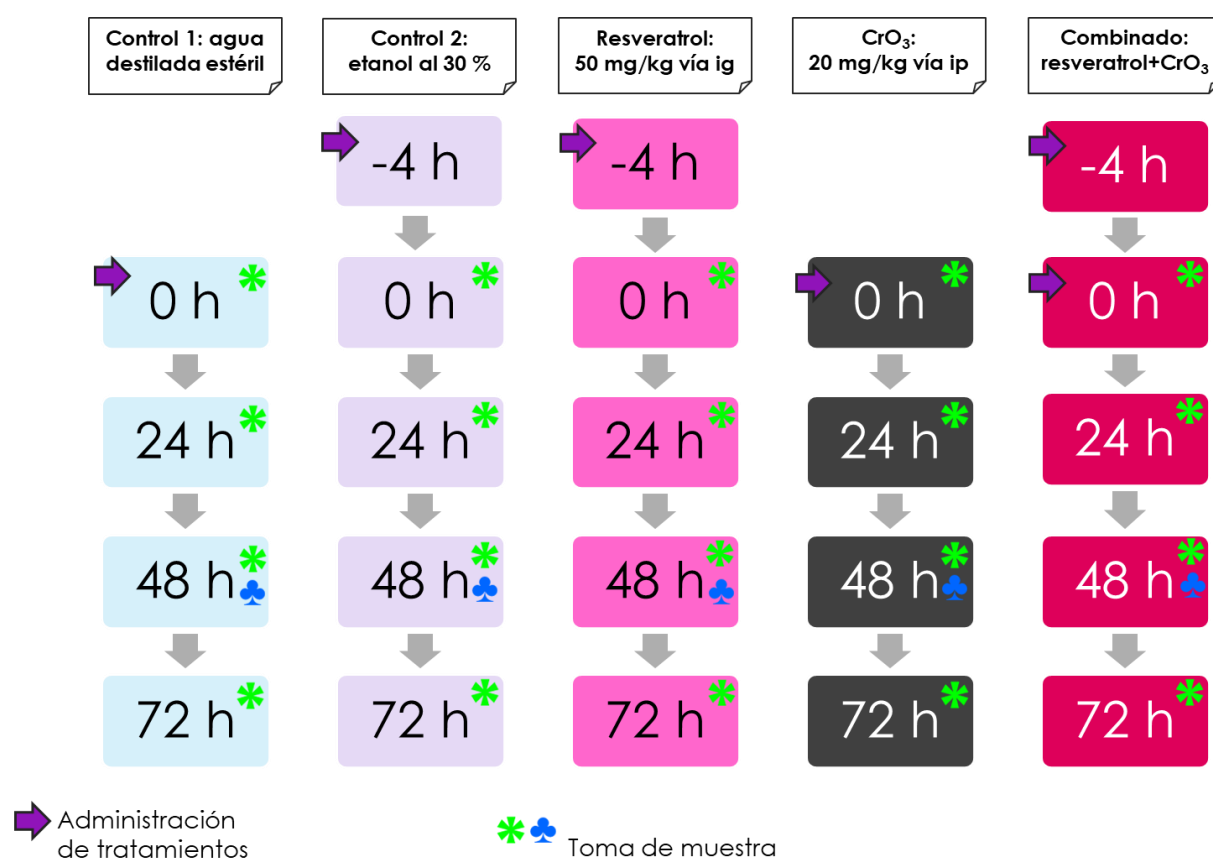


Figura 9. Protocolo para la administración de los tratamientos: resveratrol vía ig y CrO₃ vía ip Grupos control: C1 (agua destilada estéril) y C2 (etanol 30%); resveratrol: 50 mg/kg por vía ig; CrO₃: 20 mg/kg vía ip; resveratrol+CrO₃: combinación de ambos tratamientos. La administración del polifenol se realizó 4 horas antes del tratamiento de CrO₃.

5.4. Ensayo de micronúcleos y relación de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos

Para las evaluaciones de MN y la relación de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos (EPC/ENC) se obtuvo, secuencialmente, sangre periférica (5 µl) de los ratones cada 24 horas durante 4 días (0-72 horas), donde las muestras obtenidas a las 0 horas se designaron como control negativo. Las muestras fueron colocadas directamente en portaobjetos previamente cubiertos con NA de acuerdo con la técnica descrita por Hayashi *et al.* (1990). Se prepararon dos portaobjetos por ratón y se almacenaron en la oscuridad a 4 °C durante 24 horas. Las evaluaciones se realizaron identificando a los EPC, los ENC y los MN presentes en EPC utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon™ OPTIPHOT-2; Tokio, Japón) con excitación azul (480 nm) y un filtro de barrera (515-530 nm) con un aumento de 100×. Para la evaluación de daño genotóxico se cuantificaron los MN presentes en 4,000 EPC por ratón y para la evaluación de daño citotóxico se cuantificó la relación de EPC con respecto a los ENC en 2,000 eritrocitos totales.

En este estudio, los procesos metabólicos subyacentes, como la reparación de aductos de 8-OHdG, los componentes del sistema antioxidante endógeno, la apoptosis y el análisis de viabilidad celular también fueron evaluados, debido a que pueden estar involucrados en la prevención del daño por ADN inducido por Cr(VI). Estos parámetros se midieron utilizando las mismas muestras de sangre periférica obtenidas a las 48 horas después de los tratamientos en los que se midió la frecuencia de MN, ya que este es el momento en que se ha observado el mayor daño genotóxico inducido por Cr(VI) (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

5.5. Apoptosis y viabilidad celular

Para evaluar la apoptosis, necrosis y viabilidad celular se realizó una tinción diferencial de naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BrEt) de acuerdo con la técnica previamente adaptada para sangre periférica (García-Rodríguez *et al.*, 2013). Las muestras (10 µl) se centrifugaron a 4,500× *g* durante 5 minutos. El botón celular obtenido se resuspendió con 20 µl de la mezcla de los colorantes NA/BrEt y se colocó en un portaobjetos limpio. Se

prepararon dos portaobjetos por ratón y el análisis se realizó inmediatamente. Para las evaluaciones se contaron 300 células por ratón. Se identificaron las células apoptóticas, necróticas, viables y no viables utilizando un microscopio de fluorescencia OPTIPHOT-2 con excitación azul (480 nm) y un filtro de barrera (515-530 nm) con un aumento de 40×.

5.6. Niveles de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

Los niveles plasmáticos de 8-OHdG se determinaron mediante el ensayo ELISA. Las muestras de sangre periférica (50 µl) se centrifugaron durante 15 minutos a 2,500× g a temperatura ambiente para obtener el plasma, el cual se analizó inmediatamente de acuerdo con las instrucciones del “kit” ELISA II HT 8-oxo-dG de Trevigen (No. 4380-192-K; Gaithersburg, MD, EUA). La absorbancia se midió a 450 nm utilizando un lector de microplacas Multiskan™ FC (Thermo Scientific™, Vantaa, Finlandia). La formación de producto es inversamente proporcional a la cantidad de 8-OHdG presente en la muestra. Los niveles de 8-OHdG se determinaron por duplicado (por muestra) y de acuerdo con la curva estándar de 8-OHdG.

5.7. Sistema antioxidante endógeno

El sistema antioxidante endógeno se evaluó mediante la determinación de las actividades de SOD, GPx y catalasa, así como los niveles de GSH.

5.7.1 Actividad de superóxido dismutasa

La actividad de SOD se evaluó en eritrocitos de sangre periférica. Muestras de 50 µl fueron diluidas en una solución salina tamponada de fosfatos. Los eritrocitos fueron separados mediante centrifugación con FicollPaque™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 800× g durante 25 minutos a 12°C. El precipitado fue separado y resuspendió (10:1) con agua

fría (4°C). Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 0°C durante 15 minutos para lisar las células. La hemoglobina fue precipitada añadiendo etanol y cloroformo, y centrifugando a 10,000× g durante 10 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se determinó la actividad de SOD de acuerdo con las instrucciones del “kit” de superóxido dismutasa de Trevigen (No. 7501-500-k; Gaithersburg, MD, EUA). La absorbancia se leyó a 450 nm a intervalos de 1 minuto durante 10 minutos en un lector de microplacas Multiskan™ FC (Thermo Scientific™, Vantaa, Finlandia). La cantidad de proteína que inhibió al tetrazolio (WST-1)-formazan en un máximo del 50% se definió como 1 U de actividad SOD. La concentración de proteínas totales fue determinada de acuerdo con las instrucciones del “kit” de determinación de proteínas de Cayman Chemicals (No. 704002; Ann Arbor, MI, EUA). La actividad de SOD se midió por duplicado (por muestra) y de acuerdo con la curva estándar de SOD.

5.7.2 Actividad de glutatión peroxidasa

La actividad de GPx se determinó en el plasma de la sangre periférica. Muestras de 25 µl se centrifugaron a 1,000× g durante 10 minutos a 4°C. Se separó el plasma y se diluyó con el *buffer para muestras de GPx* (1:2) incluido en el “kit”. La actividad de GPx se determinó de acuerdo con las instrucciones del “kit” de glutatión peroxidasa de Cayman Chemicals (No. 703102; Ann Arbor, MI, EUA). Para este ensayo, 1 U de GPx se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 nmol de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)/min. La absorbancia se leyó a 340 nm en un lector de microplacas Multiskan™ FC (Thermo Scientific™, Vantaa, Finlandia). La actividad de GPx se midió por duplicado (por muestra) y de acuerdo con la curva estándar.

5.7.3 Actividad de catalasa

La actividad de la catalasa se determinó en el plasma de la sangre periférica. Muestras de 25 µl se centrifugaron a 1,000× g durante 10 minutos a 4°C para obtener el plasma. La actividad

de catalasa de determinó de acuerdo con las instrucciones “kit” de catalasa de Cayman Chemicals (No. 707002; Ann Arbor, MI, EUA). Este ensayo utiliza la función de peroxidación de la catalasa para determinar la actividad enzimática. La absorbancia se leyó a 540 nm en un lector de microplacas Multiskan™ FC (Thermo Scientific™, Vantaa, Finlandia). Para este ensayo 1 U de catalasa se definió como la cantidad de enzima que induce la formación de 1 nmol de formaldehído/min. La actividad de catalasa se midió por duplicado (por muestra) y de acuerdo con la curva estándar.

5.7.4 Niveles de glutatión

Los niveles de GSH se evaluaron en eritrocitos de sangre periférica. Muestras de 50 µl se centrifugaron a 3,000× g durante 15 a 0°C. Posteriormente, los eritrocitos obtenidos se resuspendieron en ácido metafosfórico frío al 5% (p/v) y se almacenaron a 0°C durante 15 minutos. Después se centrifugó a 14,000× g durante 10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante clarificado y se analizaron los niveles de GSH de acuerdo con las instrucciones del “kit” de glutatión Trevigen HT (No. 7511-100-K; Gaithersburg, MD, EUA). La absorbancia se leyó a 405 nm en un lector de microplacas Multiskan™ FC (Thermo Scientific™, Vantaa, Finlandia). Los niveles de GSH se determinaron por duplicado (por muestra) y de acuerdo con la curva estándar de GSH.

5.8 Análisis estadístico

En este estudio cada ratón fue considerado como una repetición independiente de acuerdo con los lineamientos de la OECD y la EPA (EPA, 1998; OECD, 2016). Se promediaron las muestras individuales de cada grupo experimental. Las frecuencias de MN, la relación EPC/ENC, la viabilidad celular (células viables/no viables), el número células apoptóticas y necróticas, los niveles de 8-OHdG y GSH, así como las actividades de SOD, GPx y catalasa, se expresan como media ± desviación estándar (d.e.). Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La significancia estadística entre los grupos para la

frecuencia de MN y la relación de EPC/ENC se determinó mediante un análisis de varianza de dos vías de medidas repetidas (RM-ANOVA), ya que tanto los MN como la relación de EPC/ENC dependen de dos factores (tratamiento y tiempo). El tratamiento es independiente, mientras que las evaluaciones en cada momento se consideran dependientes ya que las muestras fueron obtenidas del mismo ratón. Para los otros parámetros se utilizó un ANOVA de una vía porque las evaluaciones dependen de un solo factor (tratamiento). Después de los análisis de ANOVA, se realizó una prueba post hoc de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para todos los análisis se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

6. Resultados

6.1. Efecto del resveratrol sobre la frecuencia de micronúcleos inducida por CrO_3

El daño genotóxico inducido por el Cr(VI) se evaluó utilizando el ensayo de MN en eritrocitos de sangre periférica utilizando portaobjetos cubiertos de NA. La tinción diferencial con NA permitió distinguir los EPC de los ENC, ya que los EPC se tiñeron, mostrando fluorescencia naranja debido a la presencia de ARN (Figura 10A(i)), mientras que los ENC no se tiñeron (Figura 10A(ii)). El NA también permitió identificar a los MN, con una fluorescencia amarilla debido a su contenido de ADN (Figura 10A(iii)). Para comparar la cinética de inducción de MN en los grupos de tratamiento, los datos se analizaron calculando la frecuencia de inducción neta (NIF, por sus siglas en inglés) mediante la ecuación (1):

$$\text{NIF} = |\text{Frecuencias de MN medidas en el tiempo } x_i - \text{Frecuencias de MN medidas en el tiempo } 0| / n \dots \dots \dots (1)$$

donde x_i es la evaluación a las 24, 48 o 72 horas por grupo, *el tiempo 0* es la evaluación a las 0 horas (antes del tratamiento) por grupo, y n es el número de ratones por grupo.

El NIF se calculó para mejorar la capacidad de determinar la inducción neta de MN eliminando la variabilidad que se observó en los promedios de MN basales entre los grupos

tratados en el *tiempo 0* (la distribución de los datos en todos los tiempos evaluados se pueden observar en el Anexo 1). En la Figura 10B se presenta el NIF de los valores de MN para todos los tratamientos a las 24, 48 y 72 horas después de la administración. Se observa que la administración de los tratamientos mostró un efecto significativo ($p < 0.0001$) sobre las frecuencias de MN cuando se comparó con el RM-ANOVA de dos vías. En el grupo CrO_3 se observó un aumento de alrededor de 7, 10 y 5 MN a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente, que resultó significativo cuando se comparó contra el grupo control C1 ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, y $p < 0.015$, respectivamente). El grupo tratado con resveratrol y CrO_3 (resveratrol+ CrO_3) presentó una frecuencia de MN menor que con el tratamiento solo de CrO_3 en todos los tiempos evaluados, siendo mayor a las 48 horas ($p < 0.001$), aunque esta reducción ya no fue significativa a las 72 horas ($p > 0.05$). Sin embargo, en este grupo, las frecuencias de MN observadas a las 48 horas fueron significativamente diferentes de las de los grupos control (C1, $p < 0.001$; C2, $p < 0.040$) y del grupo tratado solo con resveratrol ($p < 0.006$). Al comparar el efecto del tiempo sobre la frecuencia de MN mediante RM-ANOVA de dos vías se encontró un efecto significativo ($p < 0.0001$). En el grupo CrO_3 , la frecuencia de MN aumentó a las 48 horas comparado con el tiempo inicial ($p < 0.038$) y disminuyó a las 72 horas ($p < 0.004$). En el grupo resveratrol+ CrO_3 , la frecuencia de MN disminuyó a las 72 horas ($p < 0.009$), y los valores en los tiempos inicial y final fueron similares. El tratamiento solo con resveratrol no afectó significativamente a la frecuencia de MN en comparación con el grupo control C2 ($p > 0.05$).

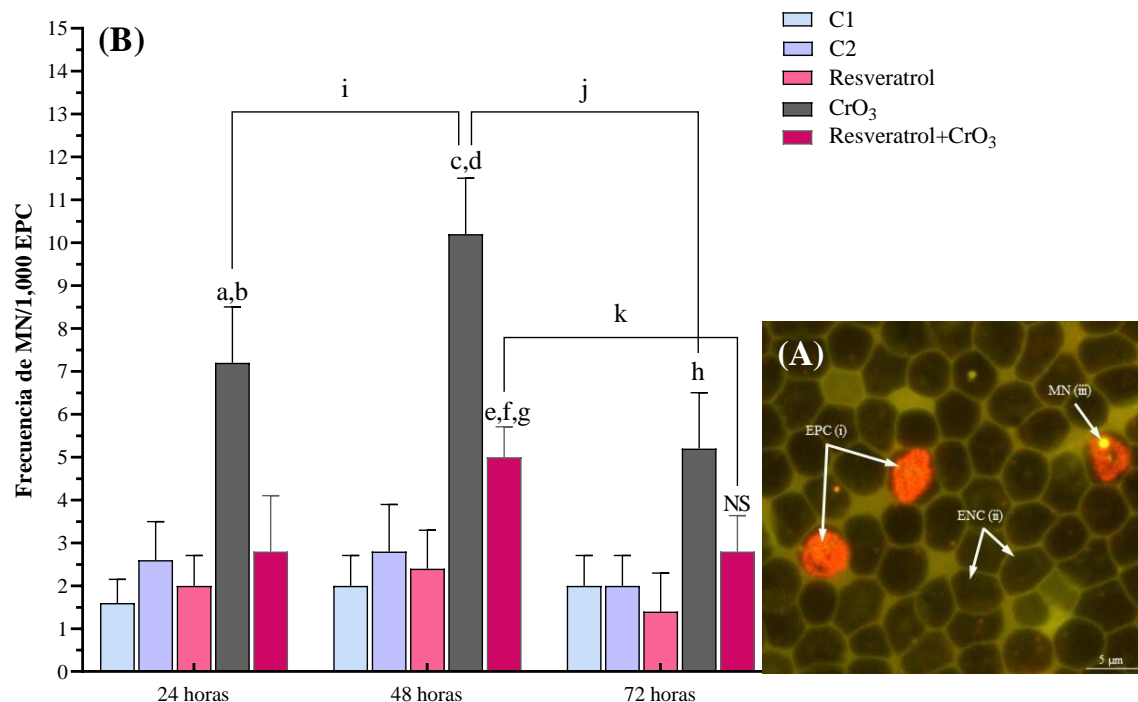


Figura 10. Efecto del resveratrol y del CrO_3 sobre la frecuencia de micronúcleos (MN) evaluada en sangre periférica. (A) Micrografía de fluorescencia ($1000\times$) de células de sangre periférica utilizando el método de tinción con naranja de acridina (NA). Los eritrocitos policromáticos (EPC) presentan fluorescencia naranja (i), los eritrocitos normocromáticos (ENC) no se tiñen (sombra) (ii), y los MN presentan fluorescencia amarilla (iii). (B) Los datos muestran la frecuencia de MN a las 24, 48 y 72 horas menos la frecuencia de MN a las 0 horas (frecuencia de inducción neta: NIF). Las frecuencias de MN en el grupo resveratrol+ CrO_3 disminuyeron en un 63, 50 y 47% a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente, en comparación con el grupo CrO_3 . Se evaluó un total de 4,000 EPC en cada ratón ($n = 5$ ratones/grupo). La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas (RM-ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Tukey. Análisis por tratamiento: ^a $p < 0.001$ vs. C1, 24 horas; ^b $p < 0.004$ vs. resveratrol+ CrO_3 , 24 horas; ^c $p < 0.0001$ vs. C1, 48 horas; ^d $p < 0.001$ vs. resveratrol+ CrO_3 , 48 horas; ^e $p < 0.001$ vs. C1, 48 horas; ^f $p < 0.040$ vs. C2, 48 horas; ^g $p < 0.006$ vs. resveratrol, 48 horas; ^h $p < 0.015$ vs. C1, 72 horas; ^{NS} $p > 0.05$ vs. CrO_3 , 72 horas. Análisis por tiempo de evaluación: ⁱ $p < 0.038$, CrO_3 ; ^j $p < 0.004$, CrO_3 ; ^k $p < 0.009$, resveratrol+ CrO_3 . C1, Control 1, solo el vehículo (agua destilada). C2, Control 2, solo el vehículo (etanol al 30%). CrO_3 , trióxido de cromo.

6.2. Efecto del resveratrol y del CrO_3 sobre las células apoptóticas y necróticas

Las células apoptóticas y necróticas, así como la viabilidad celular, se evaluaron mediante la tinción diferencial de naranja de NA/BrEt (Figura 11A). El ensayo de fluorocromos dual es

capaz de distinguir entre células viables y no viables basándose en la integridad de la membrana. Cuando las células son todavía viables, mantienen la membrana plasmática intacta permitiendo que sólo el NA se intercale en el ADN, lo que hace que el núcleo tenga fluorescencia verde (Figura 11A(i,iii)). Sin embargo, en las células no viables, se pierde la integridad de la membrana, lo que provoca que el BrEt se intercalen también en el ADN, haciendo que el núcleo tenga fluorescencia roja, ya que el BrEt cubre la tinción del NA (Figura 11A(ii,iv)). Así, el color del núcleo depende de la viabilidad de la célula, no del estado del núcleo. Las células apoptóticas tempranas que tienen las membranas intactas, pero en las que el ADN ha empezado a fragmentarse siguen mostrando núcleos verdes porque el BrEt no puede entrar en la célula, pero la condensación de la cromatina es visible como manchas verdes brillantes en los núcleos (Figura 11A(iii)). A medida que la célula avanza por la vía apoptótica y comienza a perderse la integridad de la membrana, el BrEt penetra en la célula, produciendo una célula teñida de rojo. Las células apoptóticas tardías muestran manchas rojas brillantes de cromatina condensada en los núcleos (Figura 11A(iv)); esto las distingue de las células necróticas, que presentan un color rojo uniforme (Figura 11A(ii)). Al comparar el efecto de los tratamientos sobre la apoptosis mediante ANOVA de una vía, se observó un efecto significativo del tratamiento sobre la frecuencia de células sanas, apoptóticas totales, tempranas y tardías, así como de células necróticas, en comparación con los grupos control ($p < 0.0001$). El resveratrol redujo la frecuencia de células apoptóticas totales y tempranas en comparación con los grupos control ($p < 0.022$ y $p < 0.015$, respectivamente), mientras que el CrO_3 incrementó el número de células apoptóticas totales, tempranas y tardías, así como las células necróticas en comparación con los grupos control ($p < 0.0001$). En los ratones tratados con resveratrol+ CrO_3 , se observaron menos células apoptóticas tardías y necróticas en comparación con el grupo de CrO_3 ($p < 0.001$ y $p < 0.0001$, respectivamente) y un aumento de las células apoptóticas totales y tempranas en comparación con los grupos control ($p < 0.0001$) y el grupo de resveratrol ($p < 0.0001$) (Figura 11B).

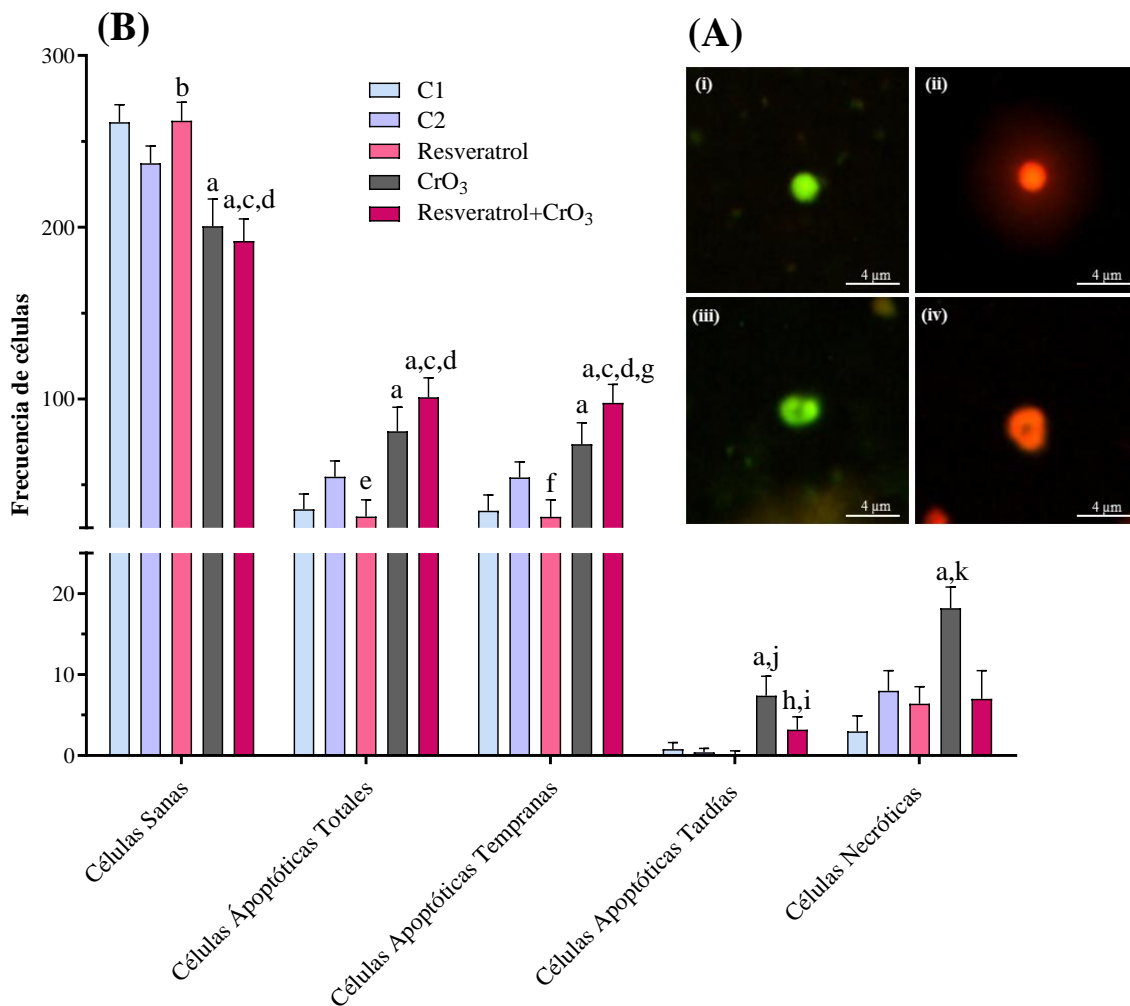


Figura 11. (A) Microfotografía fluorescente (400×) de células de sangre periférica con tinción diferencial de naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BrEt). (i) Célula sana. (ii) Célula necrótica. (iii) Célula apoptótica temprana. (iv) Célula apoptótica tardía. (B) Efecto del resveratrol y del CrO₃ sobre las frecuencias de células sanas, apoptóticas (totales, tempranas y tardías) y necróticas en sangre periférica, evaluadas 48 horas después de los tratamientos. Se evaluó un total de 300 células nucleadas en cada ratón ($n = 5$ ratones/grupo). La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey: ^a $p < 0.0001$ vs. C1; ^b $p < 0.03$ vs. C2; ^c $p < 0.0001$ vs. C2; ^d $p < 0.0001$ vs. resveratrol; ^e $p < 0.022$ vs. C2; ^f $p < 0.015$ vs. C2; ^g $p < 0.011$ vs. CrO₃; ^h $p < 0.034$ vs. C2; ⁱ $p < 0.02$ vs. resveratrol; ^j $p < 0.001$ vs. resveratrol+CrO₃; ^k $p < 0.0001$ vs. resveratrol+CrO₃. C1, Control 1, solo el vehículo (agua destilada). C2, Control 2, solo el vehículo (etanol al 30%). CrO₃, trióxido de cromo.

6.3. *Efecto del resveratrol y del CrO₃ sobre los niveles del aducto 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina*

El aducto 8-OHdG se midió a las 48 horas en plasma sanguíneo, ya que este método no requiere sacrificar a los animales. En general, se acepta que la excreción de los nucleósidos oxidados 8-oxodG y 8-oxoGuo puede medirse en fluidos como el plasma, bajo el supuesto de que un organismo mantiene un estado estacionario sin cambios en la tasa de oxidación (Poulsen *et al.*, 2014). En donde, el número de moléculas de guanina oxidadas en el ácido nucleico y su reserva de precursores debe ser igual al número eliminado/excretado de la célula. Así, los niveles de 8-OHdG evaluados en los fluidos representan el equilibrio entre las tasas de formación y reparación. Cuando se evaluó el daño oxidativo del ADN utilizando los niveles de reparación de aductos 8-OHdG en el plasma de la sangre periférica, analizados mediante ANOVA de una vía, se encontró un efecto significativo del tratamiento ($p < 0.0015$). El grupo tratado con resveratrol previo al CrO₃ (resveratrol+CrO₃) presentó niveles de 8-OHdG más altos que los grupos control (C1, $p < 0.012$; C2, $p < 0.007$) y el grupo CrO₃ ($p < 0.002$) (Figura 12). Aunque el grupo resveratrol mostró niveles de 8-OHdG más altos que los grupos C2 y CrO₃, y niveles más bajos que el grupo control C1, ninguna de las dos comparaciones fue estadísticamente significativa.

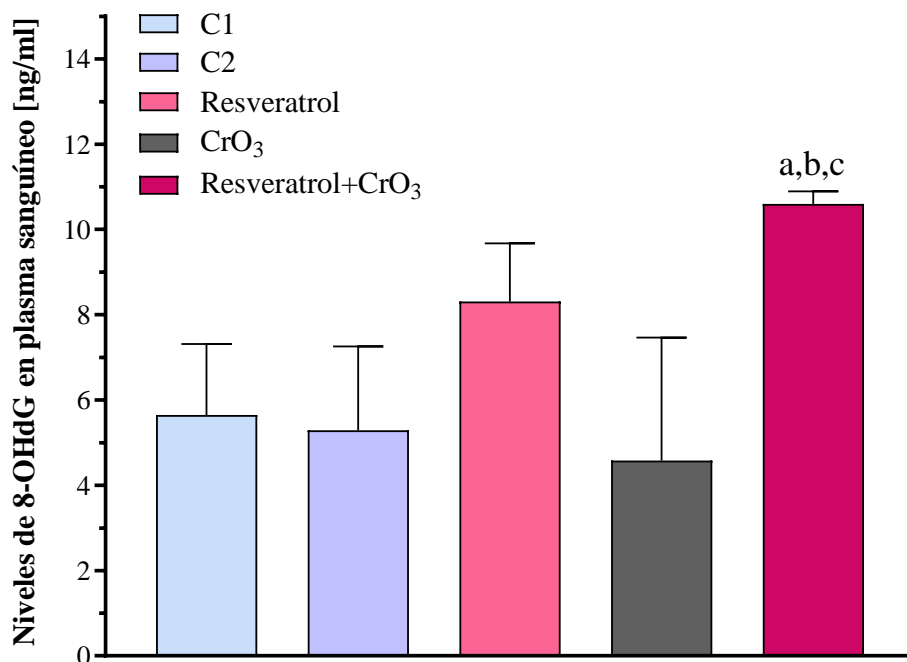


Figura 12. Efecto del resveratrol y del CrO₃ sobre los niveles de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina (8-OHdG) evaluados en el plasma de la sangre periférica 48 horas después de los tratamientos ($n = 4$ ratones/grupo). La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey: ^a $p < 0.012$ vs. C1; ^b $p < 0.007$ vs. C2; ^c $p < 0.002$ vs. CrO₃. C1, Control 1, solo el vehículo (agua destilada). C2, Control 2, solo el vehículo (etanol al 30%). CrO₃, trióxido de cromo.

6.4. Efecto del resveratrol y del CrO₃ sobre el sistema antioxidante endógeno

El efecto de los tratamientos sobre el sistema antioxidante endógeno se determinó evaluando los niveles de GSH y la actividad enzimática de la SOD, la GPx y la catalasa. Durante la reducción del Cr(VI) a Cr(III) se genera el radical O₂^{•-}, que puede ser dismutado por la SOD. Mientras que la GPx y la catalasa, al interactuar con el H₂O₂, pueden inhibir la producción del •OH. Por su parte, el GSH participa en una de las vías de reducción del Cr(VI) (Valko *et al.*, 2006). Las actividades enzimáticas de la SOD, GPx y catalasa se muestran en la Figura 13. Los datos fueron analizados con un ANOVA de una vía. Los tratamientos tuvieron un efecto significativo sobre la actividad de la SOD ($p < 0.0001$). El grupo tratado con resveratrol presentó una mayor actividad de SOD que el grupo C2 ($p < 0.0001$), y el grupo

resveratrol+CrO₃ mostró un aumento en comparación con los grupos control (C1, $p < 0.016$; C2, $p < 0.001$), el grupo resveratrol ($p < 0.019$) y el grupo CrO₃ ($p < 0.0001$). La actividad de GPx también fue significativamente afectada por el tratamiento ($p < 0.0001$). El tratamiento con CrO₃ incrementó la actividad de GPx en comparación con el grupo control C1 ($p < 0.019$) y el grupo de resveratrol+CrO₃ ($p < 0.004$). La administración de resveratrol también aumentó la actividad de GPx en comparación con el control C2 ($p < 0.0001$). El grupo de resveratrol+CrO₃ tuvo una menor actividad de GPx que con el tratamiento sólo de resveratrol ($p < 0.0001$). También hubo un efecto significativo de los tratamientos sobre la actividad de catalasa ($p < 0.0001$). El resveratrol solo incrementó la actividad de catalasa en comparación con el grupo control C2 ($p < 0.005$), mientras que la administración de CrO₃ la aumentó en comparación con el control C1 ($p < 0.034$). En el grupo resveratrol+CrO₃ la actividad de catalasa fue menor que con el tratamiento solo de resveratrol ($p < 0.001$) y con CrO₃ ($p < 0.0002$). En conjunto, estos resultados demuestran que en el grupo resveratrol+CrO₃, el resveratrol restaura las actividades de GPx y catalasa a niveles similares a los controles, mientras que la actividad de SOD en el grupo resveratrol+CrO₃, fue superior a la de los grupos control y CrO₃.

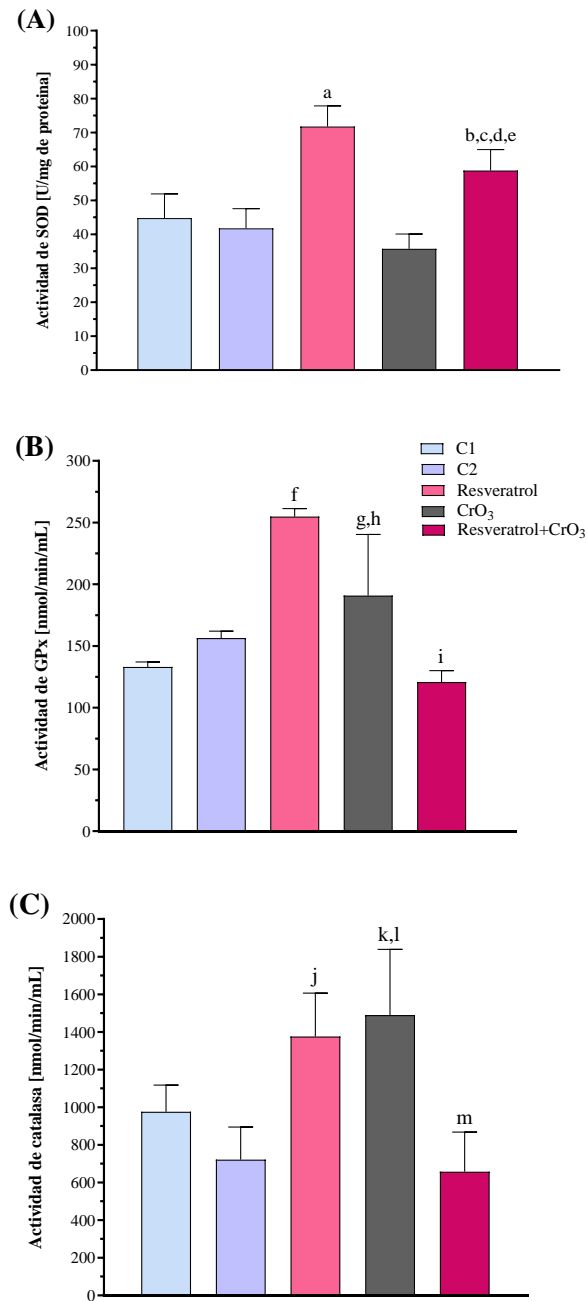


Figura 13. Actividades de superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa, evaluados en la sangre periférica a las 48 horas después de los tratamientos con resveratrol y CrO₃ (n = 5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey: ^ap<0.0001 vs. C2; ^bp<0.016 vs. C1; ^cp<0.001 vs. C2; ^dp<0.019 vs. resveratrol; ^ep<0.0001 vs. CrO₃; ^fp<0.0001 vs. C2; ^gp<0.019 vs. C1; ^hp<0.004 vs. resveratrol+CrO₃; ⁱp<0.0001 vs. resveratrol; ^jp<0.005 vs. C2; ^kp<0.034 vs. C1; ^lp<0.0002 vs. resveratrol+CrO₃; ^mp<0.001 vs. resveratrol. C1, Control 1, solo el vehículo (agua destilada). C2, Control 2, solo el vehículo (etanol al 30%). CrO₃, trióxido de cromo.

Los niveles de GSH se muestran en la Figura 14. Se observó un efecto significativo de los tratamientos sobre los niveles de GSH ($p < 0.0001$). No hubo diferencias significativas en los niveles de GSH entre los animales tratados con CrO_3 y alguno de los otros grupos ($p > 0.05$), mientras que los ratones tratados con resveratrol+ CrO_3 presentaron niveles de GSH significativamente más bajos que los controles (C1, $p < 0.0001$; C2, $p < 0.0001$), el grupo resveratrol ($p < 0.0001$) y el grupo CrO_3 ($p < 0.0001$).

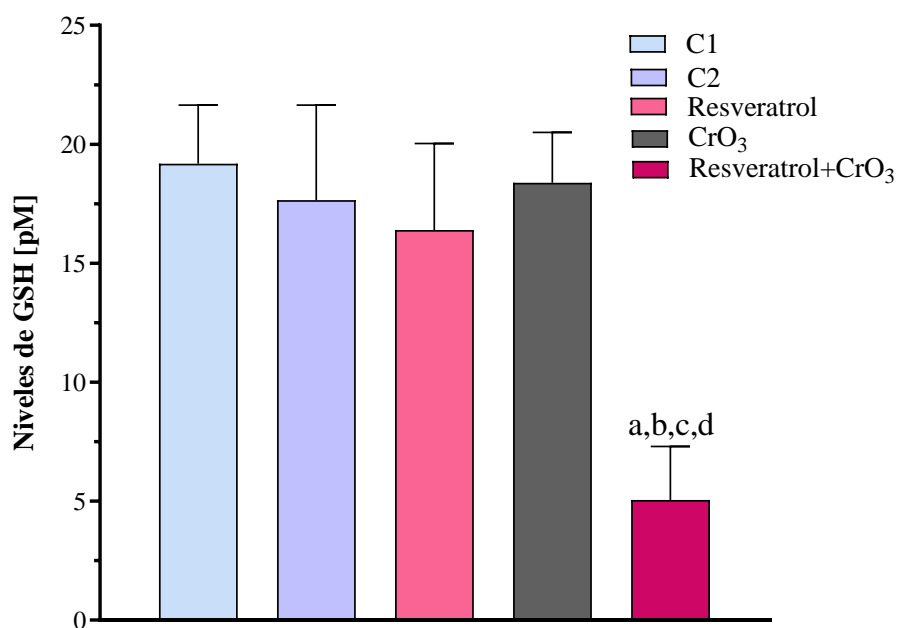


Figura 14. Niveles de glutatión (GSH) evaluados en los eritrocitos de la sangre periférica obtenidas 48 horas después del tratamiento con resveratrol y CrO_3 ($n = 5$ ratones/grupo). La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey: ^a $p < 0.0001$ vs. C1; ^b $p < 0.0001$ vs. C2; ^c $p < 0.0001$ vs. resveratrol; ^d $p < 0.0001$ vs. CrO_3 . C1, control 1 (vehículo: agua); C2, control 2 (vehículo: etanol al 30%); CrO_3 , trióxido de cromo.

6.5. *Efecto de la administración de resveratrol sobre el daño citotóxico inducido por CrO₃*

En la Tabla 1 se muestran las frecuencias de EPC con relación a los ENC. Esta evaluación se realizó en las mismas muestras y tiempos utilizados para MN. No hubo cambios significativos en ninguno de los tratamientos en comparación con sus grupos control (C1, C2) o con el tiempo 0. Sin embargo, cuando se comparó la viabilidad celular en las células nucleadas de la sangre periférica (48 horas) usando el ensayo dual de fluorocromos, se observó un efecto significativo del tratamiento en las células viables y no viables ($p < 0.0001$) (ANOVA de una vía). El ensayo dual de fluorocromos es un indicador del metabolismo celular y la muerte causada por la lesión de la membrana celular. Las células viables incluían aquellas con una membrana intacta y, por lo tanto, exhibieron un núcleo con fluorescencia verde debido a la intercalación del NA (células apoptóticas sanas y tempranas; Figura 10A(i,iii), respectivamente). Además, las células no viables incluían aquellas en las que se había perdido la integridad de la membrana y que, por lo tanto, presentaba un núcleo con fluorescencia roja debido a la intercalación del BrEt (células apoptóticas tardías y necróticas; Figura 10A(ii,iv), respectivamente). El tratamiento con CrO₃ aumentó las células no viables en comparación con el grupo control C1 ($p < 0.0001$), mientras que el tratamiento con resveratrol previo al CrO₃ disminuyó las células no viables observadas en el grupo tratado con CrO₃ solo ($p < 0.0001$). El tratamiento con resveratrol solo no tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad celular (Figura 15).

Tabla 1. Promedios de EPC/ENC en ratones Hsd:ICR tratados con resveratrol y CrO₃.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de análisis (hora)	n	EPC/1,000 ENC (media ± d.e)
C1	0	0	5	48.5 ± 8.6
		24		46.7 ± 4.6
		48		48.2 ± 11.9
		72		52.0 ± 8.2
C2	60	0	5	46.7 ± 7.0
		24		47.2 ± 9.6
		48		53.0 ± 7.5
		72		43.4 ± 13.2
Resveratrol	50	0	5	54.8 ± 12.2
		24		47.5 ± 9.5
		48		48.7 ± 5.9
		72		50.5 ± 6.4
CrO₃	20	0	5	46.5 ± 10.0
		24		45.8 ± 7.0
		48		51.1 ± 12.8
		72		39.8 ± 12.9
Resveratrol+CrO₃	50 + 20	0	5	45.6 ± 7.9
		24		46.4 ± 2.8
		48		53.8 ± 12.7
		72		44.6 ± 5.8

Se evaluaron un total de 2,000 eritrocitos en cada ratón ($n = 5$ ratones/grupo). C1, Control 1, solo el vehículo (agua destilada). C2, Control 2, solo el vehículo (etanol al 30%). CrO₃, trióxido de cromo. EPC, eritrocitos policromáticos. ENC, eritrocitos normocromáticos.

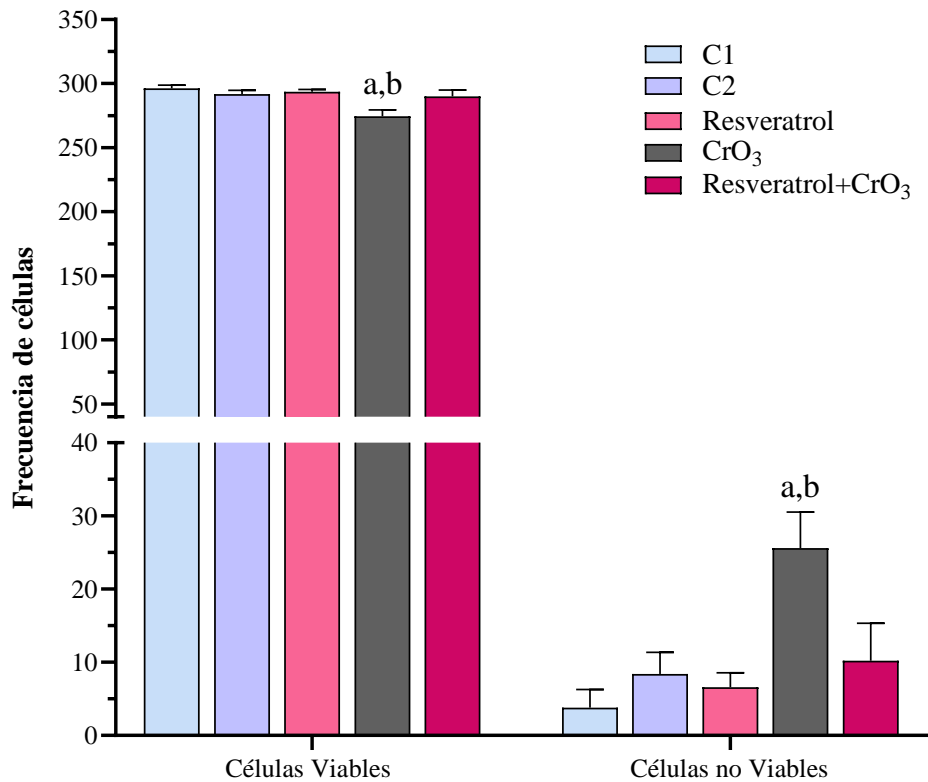


Figura 15. Efecto del resveratrol y del CrO₃ sobre las frecuencias de células viables y no viables en la sangre periférica de los ratones, evaluadas a las 48 horas después de la administración de los tratamientos mediante tinción diferencial de naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BrEt). Las células viables incluyen células sanas y apoptóticas tempranas. Las células no viables incluyen a las células apoptóticas tardías y necróticas. Se evaluaron 300 células nucleadas por ratón ($n = 5$ ratones /grupo). La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey: ^a $p < 0.0001$ vs. C1; ^b $p < 0.0001$ vs. resveratrol+CrO₃. C1, Control 1, solo el vehículo (agua destilada). C2, Control 2, solo el vehículo (etanol al 30%). CrO₃, trióxido de cromo.

Los ratones del grupo CrO₃ presentaron signos clínicos de toxicidad, como erizamiento del pelo, disminución de la movilidad y pérdida de apetito. La dosis de 50 mg/kg de resveratrol no mostró ningún signo clínico de toxicidad. Ninguno de los ratones expuestos al resveratrol, al CrO₃ o a ambos tratamientos murió.

7. *Discusión*

El objetivo de este estudio fue (1) examinar el efecto protector del resveratrol contra el daño genotóxico inducido por Cr (VI) *in vivo* y, (2) explorar las posibles vías de protección del resveratrol en el momento de la mayor inducción de daño genotóxico por CrO₃ (48 horas). Las vías exploradas fueron los niveles de la reparación del aducto 8-OHdG, los niveles de GSH del sistema antioxidante y las actividades enzimáticas de SOD, GPx y catalasa. Estos parámetros fueron evaluados en las mismas muestras de sangre periférica en las que se estudió la protección del daño genotóxico (MN). Los resultados mostraron que la administración de resveratrol 4 horas antes de la exposición a CrO₃ redujo la frecuencia de MN inducida por este metal en ratones machos Hsd:ICR. Del mismo modo, se logró una aproximación de las posibles vías involucradas en la protección del daño genotóxico inducido por el CrO₃.

Para evaluar el daño genotóxico atribuido al Cr(VI), se administró una dosis de 20 mg/kg de CrO₃ por vía ip. La cual se basó en un estudio anterior en el que no indujo la formación de MN en sangre periférica de ratones (García-Rodríguez *et al.*, 2001). La desintoxicación del Cr(VI) es relativamente rápida (no más de 48 horas) cuando se administra por inyección ip, en contraste con los efectos observados con la exposición a largo plazo, oral e inhalatoria, al Cr(VI) (Jomova y Valko, 2011). Aunque la administración ip es una vía de exposición artificial, es útil para detectar daño genotóxico en protocolos de corta duración, como el ensayo de MN, cuando se analizan compuestos con propiedades clastogénicas. Asimismo, es una ruta más sensible y directa que la exposición oral o por inhalación (Hayashi *et al.*, 1989; Jomova y Valko, 2011). Por lo tanto, se seleccionó un protocolo a corto plazo utilizando la vía ip para evaluar el efecto genotóxico del CrO₃. Los estudios de biodisponibilidad del resveratrol, que han descrito concentraciones plasmáticas máximas de aproximadamente 1 a 6 horas después del tratamiento (Pannu y Bhatnagar, 2019), también apoyan el uso de un protocolo a corto plazo para evaluar el daño genotóxico.

El aumento de MN es una indicación de los efectos genotóxicos ejercidos por el Cr(VI). De acuerdo con los lineamientos de la OECD y la EPA, una sustancia o compuesto que induzca más de 4 MN/1000 EPC debe considerarse un agente genotóxico (EPA, 1998; OECD, 2016). Nuestros resultados son consistentes con el daño genotóxico reportado para

el Cr(VI) y particularmente CrO₃ (García-Rodríguez *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2021), ya que se observaron incrementos mayores a 5 MN en todos los tiempos evaluados. Los compuestos de Cr(V) pueden entrar en la célula a través de transportadores generales de sulfato o fosfato (transporte activo) y se reducen por su interacción con moléculas citoplasmáticas intracelulares, generando estrés oxidativo (Shi *et al.*, 1999; DesMarais y Costa, 2019). Asimismo, se ha informado que la exposición a estos compuestos puede inducir diferentes tipos de daño al ADN, como roturas de cadena simple, enlaces cruzados ADN-ADN o ADN-proteína, aductos Cr-ADN, AC y oxidación de nucleótidos (8-OHdG) (Jomova y Valko, 2011; Handa *et al.*, 2020), los cuales pueden conducir a la formación de MN.

Al evaluar los niveles de 8-OHdG en el plasma sanguíneo a las 48 horas después del tratamiento con CrO₃, no se observaron modificaciones significativas en la reparación del aducto. Durante la reducción del Cr(VI) se generan ERO y RL como el •OH, que desempeña un papel importante en el daño oxidativo del ADN (Jomova y Valko, 2011; Hu *et al.*, 2017). Maeng *et al.* (2003) observaron que, la inhalación de 0.18 mg/m³ de cromato de sodio incremento significativamente los niveles de 8-OHdG medidos en pulmón después de 1 semana. Sin embargo, después de 2 semanas de exposición, esta dosis no produjo diferencias significativas en los niveles pulmonares de 8-OHdG, con una recuperación total después de 3 semanas. Maeng *et al.* (2003) también demostraron que la inhalación de niveles más altos de cromato de sodio no alteraba significativamente los niveles pulmonares de 8-OHdG. Del mismo modo, Thompson *et al.* (2012) observaron que la genotoxicidad *in vitro* del Cr(VI) es principalmente de naturaleza oxidativa a bajas concentraciones. Observaron que los aductos de 8-OHdG alcanzan concentraciones no citotóxicas a las 24 horas en cultivos celulares tratados con diferentes dosis de dicromato sódico. De ahí que, es posible que, en nuestro estudio, la administración ip de 20 mg/kg de CrO₃ fue demasiado alta como para afectar significativamente los niveles de 8-OHdG en plasma sanguíneo, de acuerdo con los hallazgos *in vivo* de Maeng *et al.* (2003) y las observaciones *in vitro* de Thompson *et al.* (2012). Asimismo, la inactivación de los mecanismos de reparación por el Cr(VI), también podría estar relacionado con la disminución observada de los niveles de 8-OHdG. En este sentido, se ha descrito que el Cr(VI) pueda reducir los niveles de expresión de las proteínas que inician la reparación de alteraciones del ADN mediante la inhibición de los genes hMLH1 (homólogo 1 de mutL humano) y hMLH2 (homólogo 2 de mutL humano) y de la enzima de

reparación OGG1 que participa en la vía BER (Urbano *et al.*, 2012; Wise y Wise, 2012; Xia *et al.*, 2019).

Por otro lado, los ratones tratados con resveratrol antes del CrO₃ presentaron un incremento de los niveles de 8-OHdG. Hay dos posibles explicaciones para estos resultados: (1) el resveratrol activó los mecanismos de reparación que contrarrestan el daño oxidativo en el ADN, y/o (2) el resveratrol contribuyó a la eliminación de los aductos de 8-OHdG formados por el daño oxidativo. Se ha descrito, que los niveles de 8-OHdG están relacionados con el equilibrio entre el daño oxidativo del ADN y la velocidad de reparación del mismo, los cuales pueden fluctuar tras la administración de agentes que inducen, ya sea la oxidación de la guanina o cambios en los mecanismos de reparación (Wu *et al.*, 2004; Poulsen *et al.*, 2014; Gorini *et al.*, 2021). Previamente, Yan *et al.* (2012) observaron *in vitro* que el resveratrol activa la vía BER, aumentando la expresión de la enzima OGG1. De manera similar, Mikuła-Pietrasik *et al.* (2012) observaron que el resveratrol aumentaba la actividad de la enzima de reparación OGG1 en las células humanas senescentes. Anteriormente, Leonard *et al.* (2003) demostraron *in vitro* que el resveratrol eliminaba el •OH en las células JB6 expuestas al Cr(VI). Mientras que, en su estudio *in vivo* García-Rodríguez *et al.* (2021) observaron que los niveles de 8-OHdG volvieron a los niveles del grupo control cuando se administraron (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) y Cr(VI), lo que contrasta con nuestros resultados. García-Rodríguez *et al.* (2021) también describieron que la administración de EGCG y Cr(VI) disminuía la frecuencia de MN en comparación con el grupo tratado solo con Cr(VI), un efecto similar al observado cuando se administró el resveratrol. Por lo tanto, es posible que en nuestro estudio, la administración de resveratrol previo al tratamiento de CrO₃ reforzara los mecanismos de reparación, contribuyendo a la reducción de los niveles de MN.

La administración de resveratrol 4 horas antes de la exposición al Cr(VI) disminuyó las frecuencias de MN, proporcionando aproximadamente un 50% de protección contra el daño genotóxico inducido por el CrO₃ en todos los tiempos de evaluación. Este efecto podría atribuirse a las propiedades antioxidantes del resveratrol, que le permiten interactuar con el H₂O₂ y los radicales O₂^{•-} y •OH (Truong *et al.*, 2018). Aunque se observó una disminución de las frecuencias de MN del 60, 51 y 46% a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente, la reducción a las 72 horas dejó de ser significativa. Esto puede deberse a la farmacocinética

del CrO_3 , ya que se ha informado que los compuestos de Cr(VI) empiezan a eliminarse a partir de las 48 horas después de la exposición (O'Flaherty, 1993; Jomova y Valko, 2011). De ahí que, el mayor daño al ADN se produce durante ese periodo. Otra posibilidad es que los EPC micronucleados inducidos a lo largo de 24 horas hayan madurado hasta convertirse en ENC a las 72 horas, de modo que éstos no se cuantificaron en ese momento. Al salir de la médula ósea, el EPC degrada el ARN ribosómico en 24 horas (Moras *et al.*, 2017). En otros estudios, también se observó esta misma tendencia en la reducción de MN a las 72 horas después de la administración de Cr(VI) (García-Rodríguez *et al.*, 2013; García-Rodríguez *et al.*, 2014).

Las evaluaciones de las actividades de SOD, GPx y catalasa, así como de los niveles de GSH se realizaron en las muestras de sangre periférica que se obtuvieron a las 48 horas, debido a que no requiere el sacrificio de los animales y permite continuar con las evaluaciones de la cinética de MN en los mismos organismos. Además, en estudios previos *in vitro*, se observó que las propiedades antioxidantes del resveratrol pueden neutralizar la capacidad oxidante en eritrocitos humanos (Gallardo *et al.*, 2019), en donde la SOD y el GSH desempeñan funciones importantes en el sistema antioxidante de los eritrocitos (Nwose *et al.*, 2007). Asimismo, se ha descrito que las funciones alteradas de los antioxidantes extracelulares pueden determinarse mediante la evaluación de las moléculas antioxidantes en el plasma (Zeitz *et al.*, 2018). De ahí que, las mediciones de SOD y GSH se llevaron a cabo en los eritrocitos, mientras que las de catalasa y GPx se realizaron en el plasma.

En el grupo tratado con CrO_3 se observó una disminución de la actividad de SOD, así como un incremento de las actividades de GPx y catalasa, lo cual es consistente con investigaciones previas. En estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha demostrado el efecto de los compuestos de Cr(VI) sobre los antioxidantes endógenos, como las actividades de SOD, GPx, catalasa, hemo oxigenasa-1 (HO-1) y los niveles de GSH (García-Rodríguez *et al.*, 2021; Wani *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2006). Matés (2000) propuso que la SOD juega un papel importante como enzima de la primera línea de defensa antioxidante al catalizar la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar H_2O_2 , que posteriormente es reducido a H_2O por la GPx y la catalasa. La disminución de la actividad de la SOD observada en el grupo tratado con CrO_3 podría estar relacionada con su agotamiento al reaccionar con los radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$ que se generan en exceso durante la reducción a Cr(III). Mientras tanto, el H_2O_2 generado por la

actividad de la SOD podría estar aumentado la actividad de la GPx y la catalasa que se observó en este grupo. En cuanto a los niveles de GSH, no se observaron cambios significativos con el tratamiento de CrO₃, lo que sugiere que la reducción del Cr(VI) no estaba mediada principalmente por esta vía. En este sentido, estudios *in vivo* han reportado que la reducción de los compuestos de Cr(VI) se produce principalmente a través de la vía NADPH y otros agentes reductores como el ascorbato, la cisteína, el ácido lipoico, la fructosa y la ribosa (Valko *et al.*, 2006). En el grupo tratado con resveratrol y CrO₃, los niveles de GSH disminuyeron significativamente. El GSH es una molécula antioxidante primaria que desempeña un papel fundamental en la reducción del estrés oxidativo celular. El GSH puede actuar de las siguientes maneras: (1) directamente como donante de electrones eliminando el O₂^{•-}, (2) a través de la catálisis de la GPx reduciendo los niveles de H₂O₂, o (3) formando complejos con enzimas de desintoxicación como la GST (Franco y Cidlowski, 2009). El GSH, la GPx y la GST son algunos de los principales sistemas de defensa antioxidante que eliminan a las ERO (Upadhyay *et al.*, 2008). Se ha descrito que el resveratrol activa a las enzimas de desintoxicación de fase II en sistemas *in vitro* e *in vivo* (Chow *et al.*, 2010), y que aumenta la actividad de la GST en cultivos celulares de tejido arterial (Li *et al.*, 2006). Además, varios investigadores han demostrado que los polifenoles elevan los niveles de GSH y estimulan la transcripción de genes relevantes para la síntesis de antioxidantes endógenos, contrarrestando así el estrés oxidativo (Rodrigo y Gil-Becerra, 2014). Por otro lado, en este mismo grupo (resveratrol+CrO₃), las actividades de GPx y catalasa se restauraron, mientras que la actividad de SOD aumentó. Los datos sugieren que el resveratrol podría contrarrestar el estrés oxidativo inducido por el CrO₃ mediante un efecto antioxidante indirecto relacionado con la regulación del sistema antioxidante endógeno. En estudios *in vitro*, Yao *et al.* (2010) observaron que el resveratrol protegía contra el daño oxidativo inducido por el sulfato de sodio dextrano, mientras que Chen *et al.* (2013) encontraron que los polifenoles disminuían el daño inducido por el arsenito de sodio. En ambos casos, las pruebas indicaban que la protección observada estaba relacionada con el aumento de la actividad de la SOD. La SOD es una enzima de fase 2 que puede activarse a través de la vía de señalización Nrf2 (factor nuclear eritroide 2) y Keap1. Donde Nrf2 es un sensor fundamental del estrés oxidativo que desempeña un papel central en la regulación de las enzimas antioxidantes y desintoxicantes de fase 2 y de las proteínas relacionadas (Lau *et al.*, 2015). Zhuang *et al.*

(2019) observaron que el resveratrol regula los niveles de p-Nrf2 de forma dependiente de la dosis. Esto sugiere que el resveratrol atenúa el estado oxidativo, probablemente mediante la activación de la vía de señalización Nrf2, que a su vez eleva la actividad de la SOD. También se ha descrito que el resveratrol puede mantener el equilibrio redox celular mediante la regulación de la actividad de las enzimas antioxidantes como HO-1, catalasa, GPx, y SOD, en células endoteliales arteriales de rata (Ungvari *et al.*, 2007). Banu *et al.* (2016) demostraron que 10 mg/kg de resveratrol protegían contra el estrés oxidativo inducido por el dicromato de potasio en el tejido ovárico de rata, aumentando las actividades de GPx, catalasa, SOD, Prx y Trx, así como reduciendo la concentración de H₂O₂. Por lo tanto, es posible que en nuestro estudio, el resveratrol, también este reduciendo al H₂O₂ generado por la actividad de la SOD. Disminuyendo la necesidad de activar a la GPx y a la catalasa en el grupo tratado con resveratrol y CrO₃. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el sistema antioxidante endógeno es dinámico, por lo que, es posible que nuestros resultados dependan del tiempo de evaluación (48 horas), la dosis de resveratrol utilizada, y el modelo experimental.

Aunque la relación EPC/ENC se incluye en el ensayo de MN como un indicador de citotoxicidad (OECD, 2016), no se observaron cambios significativos en ninguno de los grupos tratados en este estudio. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con precaución, ya que cuando la toxicidad se produce durante la eritropoyesis, la activación de los mecanismos de división celular puede enmascarar los efectos sobre la relación EPC/ENC (Krishna y Hayashi, 2000). Por esta razón, se evaluó la citotoxicidad analizando la viabilidad celular mediante la técnica de tinción diferencial con NA/BrEt, que permite distinguir entre células viables y no viables dependiendo de la integridad de la membrana (García-Rodríguez *et al.*, 2013). Cuando se determinó la viabilidad celular, la apoptosis y la necrosis, se observó que el tratamiento con CrO₃ aumentó significativamente el número de células apoptóticas totales, tempranas y tardías, así como las células necróticas y no viables. Estos resultados corroboran la citotoxicidad reportada para los compuestos de Cr(VI) (García-Rodríguez *et al.*, 2001; Jomova y Valko, 2011; García-Rodríguez *et al.*, 2013). La generación de ERO y el daño al ADN inducido por la exposición al Cr(VI) podrían desempeñar un papel esencial en la citotoxicidad y la vía de señalización apoptótica (Hu *et al.*, 2017). Se ha reportado que la inducción de la apoptosis está mediada por sensores de daño en el ADN que activan

directamente a p53 a través de proteínas como la cinasa dependiente del ADN (DNA-PK) o indirectamente a través de las mutaciones de ATM y ATR con Chk1 o Chk2 (Chiu *et al.*, 2010). También se ha descrito que la inducción de la apoptosis puede estar mediada a través de vías independientes de p53, como la caspasa 3 y el citocromo C (Banu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020). Sin embargo, cuando se administró el polifenol 4 horas antes del CrO₃, se observó un aumento significativo del número de células apoptóticas tempranas en comparación con el grupo tratado únicamente con CrO₃. Este efecto quedó enmascarado cuando se sumaron las células apoptóticas tempranas y tardías, ya que las células apoptóticas tardías también mostraron una disminución significativa en este grupo. De ahí que, el incremento de las células apoptóticas tempranas después del tratamiento combinado (resveratrol+CrO₃) esté relacionado con la eliminación de las células que presentan daño en el ADN inducido por el Cr(VI). Aunque no hay estudios sobre los efectos del resveratrol en las vías de apoptosis inducidas por el Cr(VI), se ha comprobado que el resveratrol induce la apoptosis como mecanismo de eliminación de las células dañadas en líneas celulares de cáncer (Repossi *et al.*, 2020). Se ha descrito, que las alteraciones en la expresión de la proteína Bcl2 (células de linfoma B-2), la pérdida de la función mitocondrial, la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas desencadenan la respuesta para la activación de la apoptosis (Takashina *et al.*, 2017). Mirzapur *et al.* (2018) observaron que en las células de cáncer de mama, el resveratrol elevaba los niveles de la proteína Bcl2/Bax, así como la expresión de los genes p53 y de las caspasas 3 y 8. De acuerdo con estas observaciones y con los resultados reportados en el presente estudio, es evidente la necesidad de llevar a cabo investigaciones que tengan como objetivo llegar a una comprensión más detallada de cómo el resveratrol interactúa con proteínas como p53, ADN-PK, ATM, ATR, Bax, Bcl2, caspasas (3 y 8), entre otros. De hecho, estos estudios pueden aportar, en gran medida, información que ayude a comprender los mecanismos por los que, los polifenoles como el resveratrol, podrían contribuir a la eliminación de las células con daño genotóxico inducido por compuestos con potencial carcinogénico como el Cr(VI).

La administración de resveratrol disminuyó la frecuencia de MN inducida por CrO₃ y el tratamiento de resveratrol solo no produjo daños en el ADN (inducción de MN). La reducción de GSH y la elevación del número de células apoptóticas con ambos tratamientos (resveratrol+CrO₃), así como el aumento de la actividad de la SOD, la GPx, la catalasa y los

niveles de 8-OHdG (este último no significativo) con el resveratrol solo, sugieren un efecto tóxico. En estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha observado que el resveratrol presenta efectos bifásicos (antioxidante y prooxidante). Martins *et al.* (2014) consideraron que el incremento de la actividad de la SOD y de SOD/catalasa observados *in vitro* con diferentes dosis de resveratrol se generan para mantener el equilibrio redox celular. Por lo que, se ha propuesto que su actividad prooxidante contribuye a la activación del sistema antioxidante endógeno (Shaito *et al.*, 2020). Sinha *et al.* (2016) descubrieron que los efectos prooxidantes del resveratrol están asociados a la generación del $O_2^{\cdot-}$, de H_2O_2 , y a semiquinonas y quinonas. Sin embargo, en este estudio, no se observaron efectos significativos en el número de células viables en el grupo resveratrol+CrO₃, además mostró una disminución significativa en la frecuencia de células necróticas, lo que sugiere que los polifenoles disminuyeron la citotoxicidad producida por el CrO₃. En otros estudios *in vivo* también observaron que el resveratrol disminuyó la toxicidad inducida por metales, como el As (Yu *et al.*, 2013), el Cu y el Zn (Asadi *et al.*, 2017). Contribuyendo al equilibrio del sistema redox celular y reduciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias. Por otra parte, la administración de resveratrol solo disminuyó significativamente las células apoptóticas totales y tempranas en comparación con su control (C2), lo que sugiere que el resveratrol no induce toxicidad y que además reduce el potencial efecto tóxico del vehículo (etanol 30%). Aunque el etanol es un vehículo polar que ha presentado toxicidad, aunque menor que otros vehículos como el dimetilsulfóxido (DMSO) en modelos *in vivo* (Marques y Morris, 2010), se ha descrito que la administración *ad libitum* de etanol al 11% aumenta las ERO séricas en los ratones tratados durante 60 días (Petrella *et al.*, 2020). Basándonos en nuestros resultados, se sugiere ampliar este estudio utilizando dosis más diluidas de resveratrol e incluso administrándolo en dosis repetidas, para reducir los posibles efectos tóxicos y mejorar la protección contra el daño genotóxico observado en el presente trabajo.

En la figura 16 se resume el efecto de los tratamientos sobre la frecuencia de MN, el sistema antioxidante endógeno, la reparación del aducto 8-OHdG y las células apoptóticas. La coadministración de resveratrol y CrO₃ presentó una disminución de la frecuencia de MN inducida por el CrO₃. En este mismo grupo también se observó un incremento de los niveles del aducto 8-OHdG, así como de la frecuencia de células apoptóticas. Además de modular al

sistema antioxidante endógeno. Sugiriendo que estas vías podrían estar implicadas en la protección del daño genotóxico inducido por el CrO_3 .

Efecto protector del resveratrol contra la genotoxicidad inducida por Cr(VI)

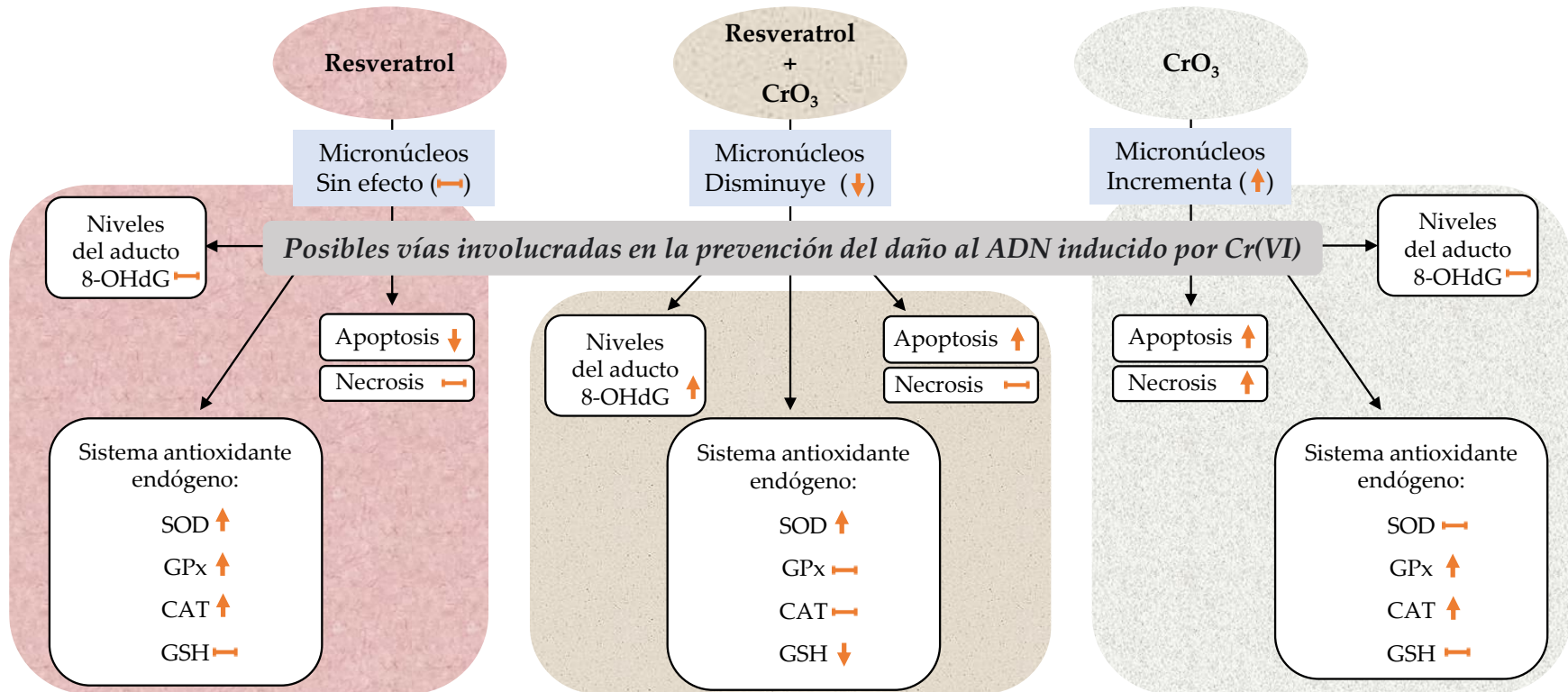


Figura 16. El pretratamiento con resveratrol disminuyó la frecuencia de micronúcleos (MN) inducida por el trióxido de cromo (CrO₃). La modulación del sistema antioxidante endógeno, el incremento de los niveles del aducto 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina (8-OHdG) a través de su reparación, y el aumento de las células apoptóticas en el grupo resveratrol+CrO₃ sugiere que estas vías podrían estar implicadas en la protección de este polifenol contra el daño genotóxico inducido por el cromo hexavalente [Cr(VI)]. GPx, glutatión peroxidasa; GSH, glutatión; SOD, superóxido dismutasa.

8. *Conclusión*

Nuestros resultados demostraron que el pretratamiento con resveratrol protege del daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO_3 , ya que presenta una disminución de la frecuencia de MN y un aumento de las células viables. La administración previa del resveratrol incrementó significativamente los niveles del aducto 8-OHdG, sugiriendo que podría estar activando a los mecanismos de reparación del ADN. Además, moduló al sistema antioxidante endógeno y aumentó las células apoptóticas (totales y tempranas). Estos resultados sugieren que estas vías podrían estar implicadas en la protección de este polifenol contra el daño genotóxico inducido por el Cr(VI).

9. Referencias bibliográficas

Ahmad A, Syed FA, Singh S, Hadi SM. Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicol Lett.* 2005; 159: 1-12.

Allen RT, Hunter WJ III, Agrawal DK. Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis. *J Pharmacol Toxicol.* 1997; 37: 215-228.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 7915-7922.

Arcanjo NMO, Luna C, Madruga MS, Estévez M. Antioxidant and pro-oxidant actions of resveratrol on human serum albumin in the presence of toxic diabetes metabolites: Glyoxal and methyl-glyoxal. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2018; 1862: 1938-19478.

Asadi S, Moradi MN, Khyripour N, Goodarzi MT, Mahmoodi M. Resveratrol Attenuates Copper and Zinc Homeostasis and Ameliorates Oxidative Stress in Type 2 Diabetic Rats. *Biol Trace Elem Res.* 2017; 177: 132-138.

Ba X, Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions. *Redox Biology.* 2018; 14: 669-678.

Banu KS, Stanley JA, Sivakumar KK, Arosh AJ, Burghardt CR. Resveratrol protects the ovary against chromium-toxicity by enhancing endogenous antioxidant enzymes and inhibiting metabolic clearance of estradiol. *Tox and Applied Pharmacol.* 2016; 303: 65-78.

Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol : the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5: 493-506.

Bender M. Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production. *Basic Life Sci.* 1980; 15: 245-265.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5: 9-19.

Boiteux S, Coste F, Castaing B. Repair of 8-oxo-7, 8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N - glycosylases. *Free Radic Biol Med.* 2017; 107: 179-201.

- Boiteux S, Radicella JP. The human OGG1 gene: Structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 377: 1-8.
- Boller K, Schmid W. Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon. *Humangenetik*. 1970; 1: 35-54.
- Bridges CC, Zalups RK. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 3: 274-308.
- Bruner SD, Norman DP, Verdine GL. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*. 2000; 403: 859-866.
- Burkhardt S, Reiter RJ, Tan DX, Hardeland R, Cabrera J, Karbownik M. DNA oxidatively damaged by chromium (III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001; 33: 775-783.
- Cadet J, Davies KJA. Oxidative DNA damage and repair: An introduction. *Free Radic Biol Med*. 2017; 106: 100-110.
- Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *Educación Química*. 2006; 17.
- Carter LG, D'Orazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocr Relat Cancer*. 2014; 21: R209-R225.
- Caruso F, Tanski J, Villegas-Estrada A, Rossi M. Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: ab initio calculations and crystal and molecular structure. *J Agric Food Chem*. 2004; 52: 7279-7285.
- Chen C, Jiang X, Zhao W, Zhang Z. Dual role of resveratrol in modulation of genotoxicity induced by sodium arsenite via oxidative stress and apoptosis. *Food Chem Toxicol*. 2013; 59: 8-17.
- Chen QY, Murphy A, Sun H, Costa M. Molecular and epigenetic mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019; 377: 114636.
- Chiu A, Shi XL, Lee WK, Hill R, Wakeman TP, Katz A, Xu B, Dalal NS, Robertson JD, Chen C, et al. Review of chromium (VI) apoptosis, cell-cycle-arrest, and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2010; 28: 188-230.
- Choi T, Kim S. Physiological Functions of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. En: *Free Radical Medicine and Biology*. Ed: Kusal D, et al. *IntechOpen*. 2019.

Chow HH, Garland LL, Hsu CH, Vining DR, Chew WM, Miller JA, et al. Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010; 3: 1168-75.

Cipolletti M, Solar Fernandez V, Montalesi E, Marino M, Fiocchetti M. Beyond the Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols in Cancer: the Modulation of Estrogen Receptors (ERs) Signaling. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: 2624

Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48: 749-762.

Circu ML, Rodriguez C, Maloney R, Moyer MP, Aw TY. Contribution of mitochondrial GSH transport to matrix GSH status and colonic epithelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44: 768-778.

Claro S, Ferreira A, Oshiro M. Radiation-Generated ROS Induce Apoptosis via Mitochondrial. En: *Free Radical Medicine and Biology*. Ed: Kusal D, et al. *IntechOpen*. 2019.

Clifford MN. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med*. 2004; 70: 1103-1114.

Cole J, Skoper T. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogenesis, working paper 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population *in vivo*. *Mutation Res*. 1994; 304: 33-106.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 2003; 17: 1195-1214.

Czarny P, Wigner P, Galecki P, Sliwinski T. The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage, DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018; 80: 309-321.

Dabeek WM, Marra MV. Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. *Nutrients*. 2019; 25: 2288.

D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019; 43: 582-592.

Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 2000; 50: 279-289.

De Freitas KS, Squarisi IS, Acésio NO, Nicolella HD, Ozelin SD, Reis Santos de Melo M, et al. Licochalcone A, a licorice flavonoid: antioxidant, cytotoxic, genotoxic, and chemopreventive potential. *J Toxicol Environ Health A*. 2020; 83: 673-686.

De la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35: 1156-1160.

De Vizcaya RAMG, Del Razo ML. Daño oxidativo y enfermedades crónico-degenerativas asociadas a la contaminación ambiental. En: Radicales libres y estrés oxidativo. México. Ed: Fainstein MK. *Manual Moderno*. 2008. p. 459-474.

DesMarais TL, Costa M. Mechanisms of Chromium-Induced Toxicity. *Curr Opin Toxicol*. 2019; 4: 1-7.

Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*. 2021; 13: 273.

Dianov GL, Thybo T, Dianova II, Lipinski LJ, Bohr VA. Single nucleotide patch base excision repair is the major pathway for removal of thymine glycol from DNA in human cell extracts. *J Biol Chem*. 2000; 275: 11809-11813.

Doo T, Maskarinek G. Polyphenols and Breast Cancer Prevention. A Summary of the Epidemiologic Evidence. *Polyphenols in Human Health and Disease*. 2014; 100: 1331-1340.

Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35: 495-516.

EPA, Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) on Chromium VI. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC. 1998.

EPA. Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5395. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101). US. 1998. EPA 712-C-98-226.

EPA. Environmental Protection Agency. Toxicological review of hexavalent chromium. CAS No. 18540-29-9. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). External Review Draft. Office of research and development. Washington, DC. USA. 2010. Vol. 635. EPA/635/R-10/004A.

Evans MD, Mistry V, Singh R, Gackowski D, Róźalski R, Siomek-Gorecka A, et al. Nucleotide excision repair of oxidised genomic DNA is not a source of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Free Radic Biol Med*. 2016; 99: 385-91.

Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C, Bonass S, Holland N, Migliore L, et al. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes *in vivo* and *ex vivo* in humans. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2016; 770(Pt A): 12-25.

Flora SJS. Metals. En: Biomarkers in Toxicol. Ed: Gupta R. *Elsevier Inc*. 2014. p. 485-519.

Forbes-Hernández TY, Giampieri F, Gasparri M, Mazzoni L, Quiles JL, Alvarez-Suarez JM, et al. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food Chem Toxicol*. 2014; 68: 154-82.

Franco R, Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ*. 2019; 16: 1303-1314.

Galanis A, Karapetsas A, Sandaltzopoulos R. Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signalling. *Mutat Res*. 2009; 674: 31-35.

Galiniak S, Aebischer D, Bartusik-Aebischer D. Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochim Pol*. 2019; 66:13-21.

Gallardo MJ, Suwalsky M, Ramírez D, Tapia J, Sepulveda B. Antioxidant effect of resveratrol in single red blood cells measured by thermal fluctuation spectroscopy. *Arch Biochem Biophys*. 2019; 665: 30-35.

García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano MA. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res*. 2001; 96: 145-151.

García-Rodríguez MC, Carvente-Juárez MM, Altamirano-Lozano MA. Antigenotoxic and apoptotic activity of green tea polyphenol extracts on hexavalent chromium-induced DNA damage in peripheral blood of CD-1 mice: analysis with differential acridine orange/ethidium bromide staining. *Oxid Med Cell Longev*. 2013: 486419.

García-Rodríguez MC, Nicolás-Méndez T, Montaña-Rodríguez AR, Altamirano-Lozano MA. Antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), quercetin, and rutin on chromium trioxide-induced micronuclei in the polychromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *J Toxicol Environ Health A*. 2014; 77: 324-336.

García-Rodríguez MC, Serrano-Reyes G, Hernández-Cortés LM, Altamirano-Lozano M. Antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its

relationship with the endogenous antioxidant system, 8-hydroxydeoxyguanosine adduct repair (8-OHdG), and apoptosis in mice exposed to chromium(VI). *J Toxicol Environ Health A*. 2021; 18: 331-344.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29: 1106-14.

Godic A, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 860479.

Gomez-Mejiba SE, Ramirez DC. Trapping of DNA radicals with the nitron spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide and genotoxic damage: Recent advances using the immuno-spin trapping technology. *Mutat Res*. 2019; 782.

Gorini F, Scala G, Cooke MS, Majello B, Amente S. Towards a comprehensive view of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Highlighting the intertwined roles of DNA damage and epigenetics in genomic instability. *DNA Repair*. 2021; 97: 103027.

Grilo AL, Mantalaris A. Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnol Adv*. 2019; 37: 459-475.

Gu HF, Mao XY, Du M. Prevention of breast cancer by dietary polyphenols-role of cancer stem cells. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020; 60: 810-825.

Gülçin I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innov Food Sci Emerg Techno*. 2010; 111: 210-218.

Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol*. 2020; 94: 651-715.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem*. 2006; 97: 1634-1658.

Halliwell B, Gutteridge MC. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death. *Free Radic Biol Med*. 2015; 199-283.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.

Handa K, Jindal R. Genotoxicity Induced by Hexavalent Chromium Leading to Eryptosis in Ctenopharyngodon Idellus. *Chemosphere*. 2020; 247: 125967.

Hao Y, Chen H, Xu W, Gao J, Yang Y, Zhang Y, et al. Roundup® confers cytotoxicity through DNA damage and Mitochondria-Associated apoptosis induction. *Environ Pollut*. 2019; 252: 917-923.

Hasan M, Bae H. An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: perspectives for resveratrol-enriched grape products. *Molecules*. 2017; 22.

Hayashi M, Sutou S, Shimada H, Sato S, Sasaki YF, Wakata A. Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test. The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test/Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan. *Mutat Res*. 1989; 223: 329-344.

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

Hayashi M, Mac Gregor J, Gartehouse D, Adler I, Blaker D, Derting S, et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatment, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen*. 2000; 35: 234-252.

Heddle AJ, Hite M, Kirkhart MK, Salamone FM. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Else Science Pub*. 1983; 123: 165-1110.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002; 13: 572-84.

Hemmink K, Dipple A, Shuker D, Fadlubar F, Segerback D, Bartsch H. Adducts identification and biological significance. International Agency for Research on Cancer Lyons. *IARC Scientific Public*. 1994; 125: 478.

Heredia-García G, Gómez-Oliván LM, Orozco-Hernández JM, Luján-Mondragón M, Islas-Flores H, SanJuan-Reyes N, et al. Alterations to DNA, apoptosis and oxidative damage induced by sucralose in blood cells of *Cyprinus carpio*. *Sci Total Environ*. 2019; 692: 411-421.

Hnasko, R. ELISA. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Ed: Hnasko R. Springer protocols. *Humana press*. 2015; 1318.

Hu G, Zheng P, Feng H, Jia G. Imbalance of oxidative and reductive species involved in chromium(VI)-induced toxic effects. *React Oxyg Species*. 2017; 3.

Hu G, Long C, Hu L, Xu BP, Chen T, Gao X, et al. Circulating lead modifies hexavalent chromium-induced genetic damage in a chromate-exposed population: An epidemiological study. *Sci Total Environ*. 2021; 15: 141824.

Hu Y, Guo DH, Liu P, Cao JJ, Wang YP, Yin J, et al. Bioactive components from the tea polyphenols influence on endogenous antioxidant defense system and modulate

inflammatory cytokines after total-body irradiation in mice. *Phytomedicine*. 2011; 18: 970-975.

Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem*. 2005; 53: 1841-1856.

Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2018; 108: 656-662.

Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med*. 2018; 54: 287-293.

Islam BU, Suhail M, Khan MK, Zughaibi TA, Alserihi RF, Zaidi SK, et al. Polyphenols as anticancer agents: Toxicological concern to healthy cells. *Phytother Res*. 2021; 35: 6063-6079.

Javid AZ, Hormoznejad R, Yousefimanesh HA, Haghghi-Zadeh MH, Zakerkish M. Impact of resveratrol supplementation on inflammatory, antioxidant, and periodontal markers in type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *Diabetes Metab Syndr*. 2019; 13: 2769-2774.

Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol*. 2011; 283: 65-87.

Jones D. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8: 1865-1879.

Kang P, Zhang W, Chen X, Yi X, Song P, Chang Y, et al. TRPM2 mediates mitochondria-dependent apoptosis of melanocytes under oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2018; 126: 259-268.

Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiol*. 2000; 7: 243-258.

Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, Thompson TN, McCormick DL. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 68: 593-601.

Khalid S, Afzal N, Khan JA, Hussain Z, Qureshi AS, Anwar H, et al. Antioxidant resveratrol protects against copper oxide nanoparticle toxicity in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2018; 391: 1053-1062.

Khorobrykh S, Havurinne V, Mattila H, Tyystjärvi E. Oxygen and ROS in Photosynthesis. *Plants (Basel)*. 2020; 1: 91.

- Kirk RI, Deitch JA, Wu JM, Lerea KM. Resveratrol decreases early signaling events in washed platelets but has little effect on platelet in whole blood. *Blood Cells Mol Dis.* 2000; 26: 144-150.
- Klapacz J, Pottenger LH, Engelward BP, Heinen CD, Johnson GE, Clewell RA, et al. Contributions of DNA repair and damage response pathways to the non-linear genotoxic responses of alkylating agents. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2016; 767: 77-91.
- Klaunig JE, Wang Z. Oxidative stress in carcinogenesis. *Curr Opin Toxicol.* 2018; 7: 116-121.
- Klaunig J, Kamendulis L. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 239-267.
- Kordas K, Roy A, Vahter M, Ravenscroft J, Mañay N, Peregalli F, et al. Multiple-metal exposure, diet, and oxidative stress in Uruguayan school children. *Environ Res.* 2018; 166: 507-515.
- Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 2000; 455: 155-166.
- Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.* 2008; 44: 205-221.
- Kuo HW, Chou SY, Hu TW, Wu FY, Chen DJ. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutat Res.* 2007; 631: 62-68.
- Kuršvietienė L, Stanevičienė I, Mongirdienė A, Bernatoniene J. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina.* 2016; 52: 148-155.
- Ladner JE, Parsons JF, Rife CL, Gilliland GL, Armstrong RN. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry.* 2004; 43: 352-361.
- Larsen EL, Weimann A, Poulsen HE. Interventions targeted at oxidatively generated modifications of nucleic acids focused on urine and plasma markers. *Free Radic Biol Med.* 2019; 145: 256-283.
- Lau WL, Liu SM, Pahlevan S, Yuan J, Khazaeli M, Ni Z, et al. Role of Nrf2 dysfunction in uremia-associated intestinal inflammation and epithelial barrier disruption. *Dig Dis Sci.* 2015; 60: 1215-1222.

- Lee J, Son Y, Pratheeshkumar P, Shi X. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53: 742-757.
- Lee MJ, Wang ZY, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S, et al. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995; 4: 393-399.
- Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 309: 1017-1026.
- Li Y, Cao Z, Zhu H. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol Res.* 2006; 53: 6-15.
- Lin HY, Tang HY, Davis FB, Davis PJ. Resveratrol and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1215: 79-88.
- Liou SH, Wu WT, Liao HY, Chen CY, Tsai CY, Jung WT, et al. Global DNA methylation and oxidative stress biomarkers in workers exposed to metal oxide nanoparticles. *J Hazard Mater.* 2017; 331: 329-335.
- Liu Q, Lei Z, Gu C, Guo J, Yu H, Fatima Z, et al. Mequindox induces apoptosis, DNA damage, and carcinogenicity in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2019; 127: 270-279.
- López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta.* 2013; 763: 1-10.
- Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids.* 2012; 2012: 1-26.
- Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014; 224: 164-175.
- Maeng SH, Chung HW, Yu IJ, Kim HY, Lim CH, Kim KJ, et al. Changes of 8-OH-dG levels in DNA and its base excision repair activity in rat lungs after inhalation exposure to hexavalent chromium. *Mutat Res.* 2003; 539: 109-116.
- Magni M, Buscemi G, Zannini L. Cell cycle and apoptosis regulator 2 at the interface between DNA damage response and cell physiology. *Mutat Res.* 2018; 76: 1-9.

- Majidinia M, Bishayee A, Yousefi B. Polyphenols: Major regulators of key components of DNA damage response in cancer. *DNA Repair (Amst)*. 2019; 82: 102679.
- Majolo F, Bitencourt S, Wissmann Monteiro B, Viegas Haute G, Alves C, Silva J, et al. Antimicrobial and antileukemic effects: in vitro activity of *Calyptranthes grandifolia* aqueous leaf extract. *J Toxicol Environ Health A*. 2020; 83: 289-301.
- Mambo E, Chatterjee A, de Souza-Pinto NC, Mayard S, Hogue BA, Hoque MO, et al. Oxidized guanine lesions and hOgg1 activity in lung cancer. *Oncogene*. 2005; 24: 4496-4508.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79: 727-747.
- Marques FZ, Morris JB. Commentary on resveratrol and hormesis: Resveratrol—A hormetic marvel in waiting? *Hum Exp Toxicol*. 2010; 29: 1026-1028.
- Martínez-Flórez S, Gonzáles-Gallego J, Culebras JM, Tuñón JM. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*. 2002; 6: 271-278.
- Martínez-Martínez D, Soto A, Gil-Araujo B, Gallego B, Chiloeches A, Lasa M. Resveratrol promotes apoptosis through the induction of dual specificity phosphatase 1 and sensitizes prostate cancer cells to cisplatin. *Food Chem Toxicol*. 2019; 124, 273-279.
- Martins LA, Coelho BP, Behr G, Pettenuzzo LF, Souza IC, Moreira JC, et al. Resveratrol induces pro-oxidant effects and time-dependent resistance to cytotoxicity in activated hepatic stellate cells. *Cell Biochem Biophys*. 2014; 68: 247-257.
- Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000; 153: 83-104.
- Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: Implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000; 32: 157-170.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 1: a008656.
- Mikuła-Pietrasik J, Kuczmarska A, Rubiś B, Filas V, Murias M, Zieliński P, et al. Resveratrol delays replicative senescence of human mesothelial cells via mobilization of antioxidative and DNA repair mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52: 2234-2245.

- Mirzapur P, Khazaei MR, Moradi MT, Khazaei M. Apoptosis induction in human breast cancer cell lines by synergic effect of raloxifene and resveratrol through increasing proapoptotic genes. *Life Sci.* 2018; 205: 45-53.
- Mojica-Villegas MA, Izquierdo-Vega JA, Chamorro-Cevallos G, Sánchez-Gutiérrez M. Protective effect of resveratrol on biomarkers of oxidative stress induced by iron/ascorbate in mouse spermatozoa. *Nutrients.* 2014; 6: 489-503.
- Moras M, Lefevre SD, Ostuni MA. From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. *Front Physiol.* 2017; 8: 1076.
- Mukherjee S, Dudley JI, Das DK. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response.* 2010; 8: 478-500.
- Nani A, Murtaza B, Sayed Khan A, Khan NA, Hichami A. Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Polyphenols Contained in Mediterranean Diet in Obesity: Molecular Mechanisms. *Molecules.* 2021; 26: 985.
- Navarro-Aviño J, Aguilar I, López-Moya J. Aspectos bioquímicos y genéticos de la acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas.* 2007; 16: 10-25.
- Nickens KP, Patierno SR, Ceryak S. Chromium genotoxicity: A double-edged sword. *Chem Biol Interact.* 2010; 188: 276-88.
- Nicolás-Méndez T, Ortiz-Muñiz AR, Mendoza-Núñez VM, García-Rodríguez MDC. The role of resveratrol on heavy metal-induced oxidative stress. *Nutr Hosp.* 2020; 37: 374-383.
- Nirmala JG, Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol.* 2020; 36: 145-164.
- Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41: 367-401.
- Nwose EU, Jelinek HF, Richards RS, Kerr PG. Erythrocyte oxidative stress in clinical management of diabetes and its cardiovascular complications. *Br J Biomed Sci.* 2007; 64: 35-43.
- O'Brien TJ, Fornsglio JL, Ceryak S, Patierno SR. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Res.* 2003; 533: 3-36.
- O'Flaherty EJ. A pharmacokinetic model for chromium. *Toxicol. Lett.* 1993; 68: 145-158.

Ock CY, Hong KS, Choi KS, Chung MH, Kim Ys, Kim JH, et al. A novel approach for stress-induced gastritis based on paradoxical anti-oxidative and anti-inflammatory action of exogenous 8-hydroxydeoxyguanosine. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81: 111-122.

OECD, Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2016.

Oh WY, Shahidi F. Antioxidant activity of resveratrol ester derivatives in food and biological model systems. *Food Chem.* 2018; 261: 267-273.

Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K, Jaruga P. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, arteriosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic Biol.* 2002; 33: 192-200.

Pannu N, Bhatnagar A. Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomed Pharmacother.* 2019; 109: 2237-2251.

Pascucci B. Reconstitution of the base excision repair pathway for 7,8-dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: 2124-2130.

Patlolla AK, Barnes C, Yedjou C, Velma VR, Tchounwou PB. Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. *Environ Toxicol.* 2009; 24: 66-73.

Paz-Elizur T. DNA Repair Activity for Oxidative Damage and Risk of Lung Cancer. *Cancer Spectrum Knowl Environ.* 2003; 95: 1312-1319.

Petrella C, Carito V, Carere C, Ferraguti G, Ciafrè S, Natella F, Bello C, Greco A, Ralli M, Mancinelli R, et al. Oxidative stress inhibition by resveratrol in alcohol-dependent mice. *Nutrition.* 2020; 79-80: 110783.

Pilger A, Rüdiger W. 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Environ Health.* 2006; 80: 1-15.

Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett.* 1999; 447: 287-291.

Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress. *Eur J Med Chem.* 2015; 97: 55-74.

Pistilli M. Chromium. *Investigating News Network.* 2022. <https://investingnews.com/daily/resource-investing/industrial-metals-investing/chromium-investing/top-chromium-producing-countries/>.

Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 1-11.

Poulsen HE, Nadal LL, Broedbaek K, Nielsen PE, Weimann A. Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840: 801-808.

Prasad S, Yadav KK, Kumar S, Gupta N, Cabral-Pinto MMS, Rezanian S, et al. Chromium contamination and effect on environmental health and its remediation: A sustainable approaches. *J Environ Manage*. 2021; 285: 112174.

Quincozes-Santos A, Andrezza AC, Nardin P, Funchal C, Gonçalves CA, Gottfried C. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology*. 2007; 28: 886-891.

Radak Z, Boldogh I. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: Links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49: 587-596.

Ramírez AME, Rojas LM. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Latreia*. 2010; 23: 166-177.

Rana SVS. Metals and apoptosis: Recent developments. *J Trace Elem Med. Biol*. 2008; 22: 262-284.

Rauf A, Imran M, Suleria HAR, Ahmad B, Peters DG, Mubarak MS. A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol. *Food Funct*. 2017; 8: 4284-4305.

Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1863: 2977-2992.

Reposi G, Das UN, Eynard AR. Molecular Basis of the Beneficial Actions of Resveratrol. *Arch Med Res*. 2020; 51: 105-114.

Rijken PJ, Wiseman SA, Weisgerber UM, van Mierlo CAJ, Quinlan PT, van de Put F. Antioxidant and Other Properties of Green and Black Tea. En: *Handbook of antioxidants*. Ed: Cadenas E, Packer L. 2002. p. 29.

Robinson A, Huttley GA, Booth HS, Board PG. Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *Biochem J*. 2004; 379, 541-552.

Rocha CAM, Da Cuncha LA, Pionheiro RHS, Bahía MO, Burbano RMR. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of colossoma macropomum exposed to methylmercury. *Genet Mol Biol.* 2011; 34: 694-697.

Rodrigo R, Gil-Becerra D. Chapter 17-Implications of polyphenols on endogenous antioxidant defense systems in human diseases. En: *Polyphenols in Human Health and Disease*. Ed: Watson RR, et al. Academic Press, San Diego. 2014. pp. 201-217.

Roleira FMF, Tavares-da-silva EJ, Varela CL, Costa SC, Silva T, Garrido J, et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chem.* 2015; 183: 235-258.

Sadi G, Bozan D, Yildiz HB. Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Mol Cell Biochem.* 2014; 393: 111-122.

Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30: 1191-1212.

Schmid W, Ledebur MV. The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Rest.* 1973; 19: 109-117.

Sertan CU, Virit O, Hanifi KM, Orkmez M, Bulbul F, Binnur EA, et al. Increased oxidative stress and oxidative DNA damage in non-remission schizophrenia patients. *Psychiatry Res.* 2015; 229: 200-205.

Setyaningsih Y, Husodob AH, Astuti I. Detection of Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) Levels as a Biomarker of Oxidative DNA Damage among Home Industry Workers Exposed to Chromium. *Procedia Environ Sci.* 2015; 23: 290-296.

Shaito A, Posadino AM, Younes N, Hasan H, Halabi S, Alhababi D, et al. Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 2084.

Shi H, Hudson LG, Liu KJ. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 582-593.

Shi X, Chiu A, Chen CT, Halliwell B, Castranova V, Vallyathan V. Reduction of chromium(VI) and its relationship to carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 1999; 2: 87-104.

Si H, Liu D. Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. *J Nutr Biochem.* 2014; 25: 581-591.

- Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21: 363-383.
- Silva JP, Gomes AC, Coutinho OP. Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *Eur J Pharmacol.* 2008; 601: 50-60.
- Sinha D, Sarkar N, Biswas J, Bishayee A. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Seminars in Cancer Biology.* 2016; 41: 209-232.
- Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular in inflammation in cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol.* 2015; 71: 40-56.
- Sloczyńska K, Powroźnik B, Pękala E, Waszkielewicz A. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genet.* 2014; 55: 273-285.
- Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 1534.
- Sousa HG, Uchôa VT, Cavalcanti SMG, de Almeida PM, Chaves MH, Lima Neto JS, et al. Phytochemical screening, phenolic and flavonoid contents, antioxidant and cytogenotoxicity activities of *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae). *J Toxicol Environ Health A.* 2021; 84: 399-417.
- Statista Research Department. Mine production of chromium worldwide in 2021, by country. Chemicals & Resources. Mining, Metals & Minerals. 2021. <https://www.statista.com/statistics/1040991/mine-production-of-chromium-worldwide-by-country/>.
- Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci.* 2012; 125: 807-815.
- Takashina M, Inoue S, Tomihara K, Tomita K, Hattori K, Zhao QL, et al. Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on the type of human cancer cells. *Int J Oncol.* 2017; 50: 787-797.
- Talhaoui I, Matkarimov BT, Tchenio T, Zharkov DO. Aberrant base excision repair pathway of oxidatively damaged DNA: Implications for degenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 2016; 107: 266-277.
- Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* 2019; 29: 347-364.

- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 231-241.
- Teng H, Chen L. Polyphenols and bioavailability: an update. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019; 59: 2040-2051.
- Terradas M, Martín M, Tusell L, Genescà A. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat Res.* 2010; 705: 60-7.
- Thacher R, Hsu L, Ravindran V, Nealson KH, Pirbazari M. Modeling the transport and bioreduction of hexavalent chromium in aquifers: Influence of natural organic matter. *Chem Eng J.* 2015; 138: 552-565.
- Thompson CM, Fedorov Y, Brown DD, Suh M, Proctor DM, Kuriakose L, et al. Assessment of Cr(VI)-induced cytotoxicity and genotoxicity using high content analysis. *PLoS one* 7. 2012; e42720.
- Truong VL, Jun M, Jeong WS. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors.* 2018; 44: 36-49.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552: 335-344.
- Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinsky N, Xiangmin Z, Olson S, et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292: H2417-H2424.
- Upadhyay G, Singh AK, Kumar A, Prakash O, Singh MP. Resveratrol modulates pyrogallol-induced changes in hepatic toxicity markers, xenobiotic metabolizing enzymes and oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 2008; 596: 146–52.
- Urbaniak SK, Boguszewska K, Szewczuk M, Kaźmierczak-Barańska J, Karwowski BT. 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a Potential Biomarker for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Development. *Molecules.* 2020; 25: 202.
- Urbano AM, Ferreira LM, Alpoim MC. Molecular and cellular mechanisms of hexavalent chromium-induced lung cancer: an updated perspective. *Curr Drug Metab.* 2012; 13: 284-305.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.

- Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 1161-1208.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160: 1-40.
- Wang J, Schipper HM, Velly AM, Mohit S, Gornitsky M. Salivary biomarkers of oxidative stress: A critical review. *Toxicol Sci.* 2015; 85: 95-104.
- Wang S, Wang H, Wang Y, Chen J, Liu X, He D, et al. Protective effects of (-)-epigallocatechin gallate and curcumin against acrylamide toxicity. *Toxicol Environ Chem.* 2021; 103: 199-218.
- Wang XF, Xing ML, Shen Y, Zhu X, Xu LH. Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology.* 2006; 228: 16-23.
- Wani PA, Hussaini NA, Garba SH, Wahid S, Damilola FK, Adeola AA, et al. Prospective of chromium (VI) reduction under in vitro and in vivo conditions and stimulation of antioxidant defense of cowpea under the exposure of Cr (VI). *Appl Soil Ecol.* 2018; 132: 187-193.
- Wise SS, Wise JP Sr. Chromium and genomic stability. *Mutat Res.* 2012; 733: 78-82.
- Wu FY, Tsai FJ, Kuo HW, Tsai CH, Wu WY, Wang RY, et al. Cytogenetic study of workers exposed to chromium compounds. *Mutat Res.* 2000; 464: 289-296.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* 2004; 339: 1-9.
- Wu YH, Lin JC, Wang TY, Lin TJ, Yen MC, Liu YH, Wu PL, Chen FW, Shih YL, Yeh IJ. Hexavalent chromium intoxication induces intrinsic and extrinsic apoptosis in human renal cells. *Mol Med Rep.* 2020; 21: 851857.
- Xia H, Ying S, Feng L, Wang H, Yao C, Li T, et al. Decreased 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (hOGG1) expression and DNA oxidation damage induced by Cr (VI). *Chem Biol Interact.* 2019; 299: 44-51.
- Yan Y, Yang JY, Mou YH, Wang LH, Zhou YN, Wu CF. Differences in the activities of resveratrol and ascorbic acid in protection of ethanol-induced oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50: 168-174.

- Yao J, Wang JY, Liu L, Li YX, Xun AY, Zeng WS, et al. Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch Med Res.* 2010; 41: 288-294.
- Ye Z, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimic et Biophysic Acta.* 2015; 1850: 1607-1621.
- Yu M, Xue J, Li Y, Zhang W, Ma D, Liu L, et al. Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced nephrotoxicity by facilitating arsenic metabolism and decreasing oxidative stress. *Arch Toxicol.* 2013; 87: 1025-1035.
- Yu X, Yu RQ, Gui D, Zhang X, Zhan F, Sun X, et al. Hexavalent chromium induces oxidative stress and mitochondria-mediated apoptosis in isolated skin fibroblasts of Indo-Pacific humpback dolphin. *Aquat Toxicol.* 2018; 203: 179-186.
- Zeitz JO, Mohrmann S, Fehse L, Most E, Helmbrecht A, Saremi B, et al. Tissue and plasma antioxidant status in response to dietary methionine concentration and source in broilers. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2018; 102: 999-1011.
- Zhang L, Wang X, Cueto R, Effi C, Zhang Y, Tan H, et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biology.* 2019; 26: 101284.
- Zhang W, Yao C, Ge M, Xue J, Ma D, Liu Y, et al. Attenuation of arsenic retention by resveratrol in lung of arsenic trioxide-exposed rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013; 36: 35-39.
- Zhang Y, Guo L, Law BY, Liang X, Ma N, Xu G, et al. Resveratrol decreases cell apoptosis through inhibiting DNA damage in bronchial epithelial cells. *Int J Mol Med.* 2020; 45: 1673-1684.
- Zhao X, Zhang KP, Huang T, Yan CC, Liu LR, Zhu QL, et al. The rescuable function and mechanism of resveratrol on As₂O₃-induced hERG K⁺ channel deficiency. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014; 387: 1079-1089.
- Zhuang Y, Wu H, Wang X, He J, He S, Yin Y. Resveratrol Attenuates Oxidative Stress-Induced Intestinal Barrier Injury through PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 7591840.

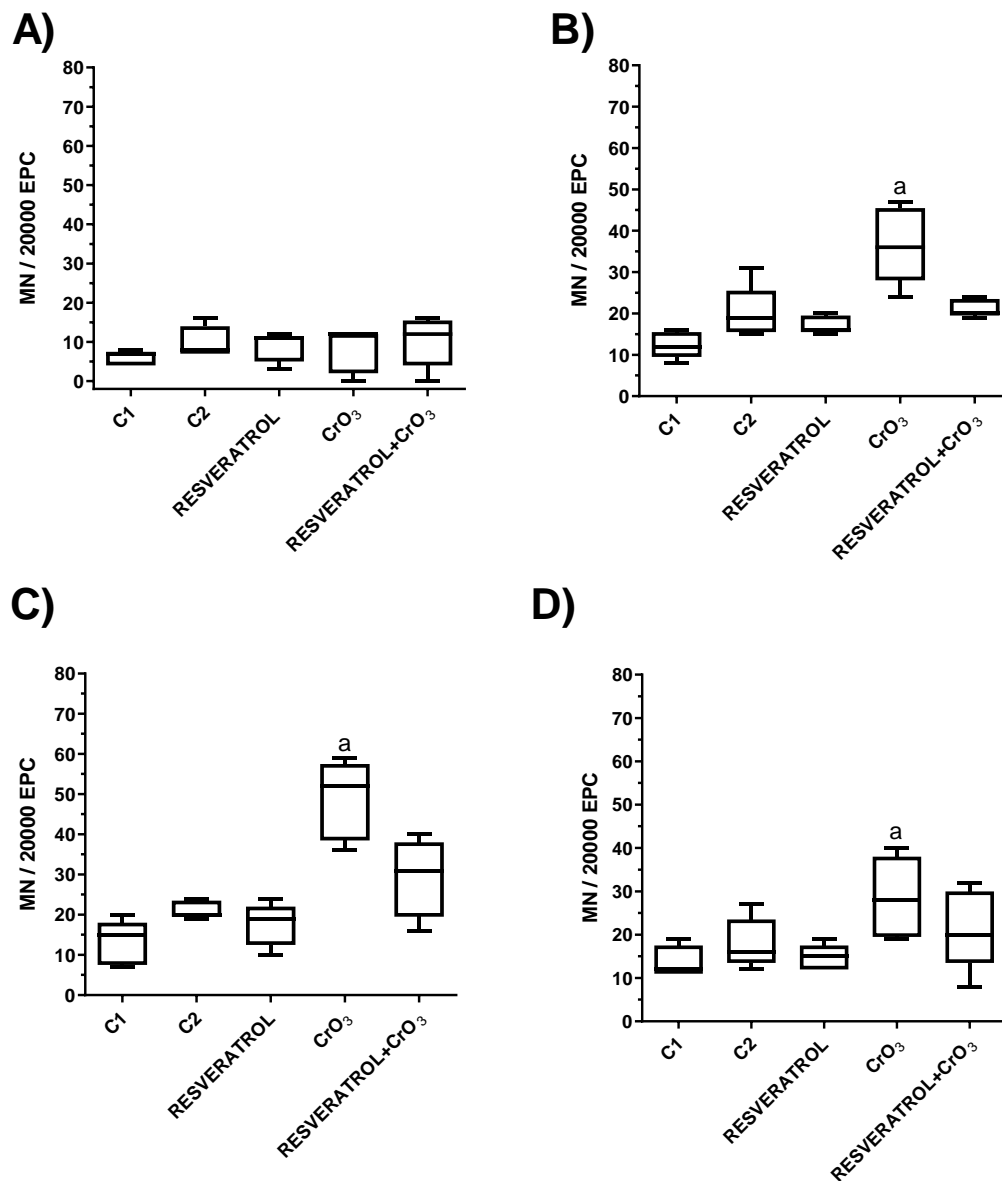


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de MN evaluados en 20,000 EPC cuando se administraron resveratrol y CrO₃. A) distribución de MN a las 0 horas; B) distribución de MN a las 24 horas; C) distribución de MN a las 48 horas; D) distribución de MN a las 72 horas. $p < 0.05$; ^avs C1. Análisis realizado mediante Kruskal-Wallis.

Anexo 2

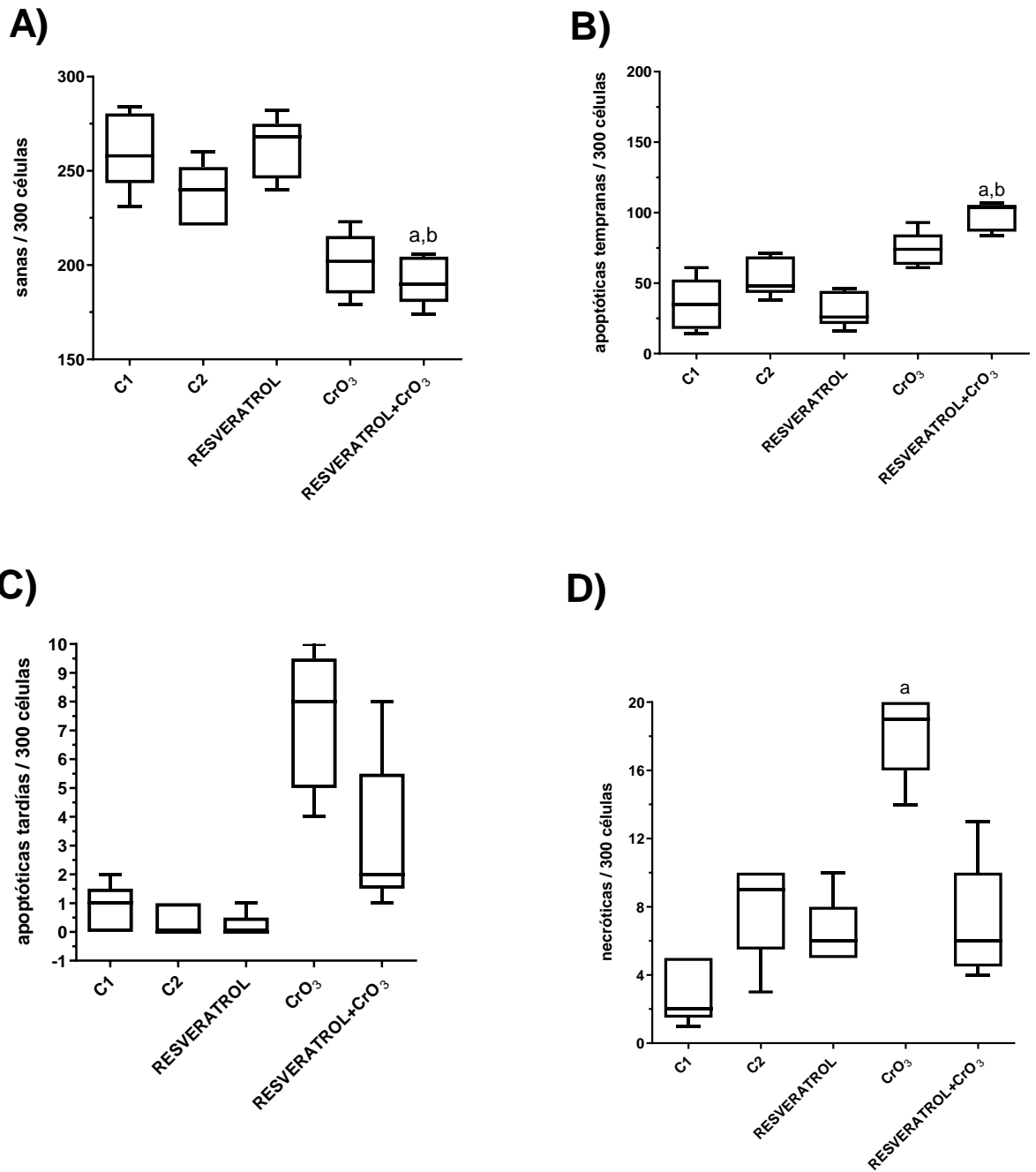


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de las células apoptóticas y necróticas evaluados en 300 células nucleadas cuando se administraron resveratrol y CrO₃. A) distribución de células sanas a las 48 horas; B) distribución de células apoptóticas tempranas a las 48 horas; C) distribución de células apoptóticas tardías a las 48 horas; D) distribución de células necróticas a las 48 horas. $p < 0.05$; ^avs C1; ^bvs resveratrol. Análisis realizado mediante Kruskal-Wallis.

Anexo 3

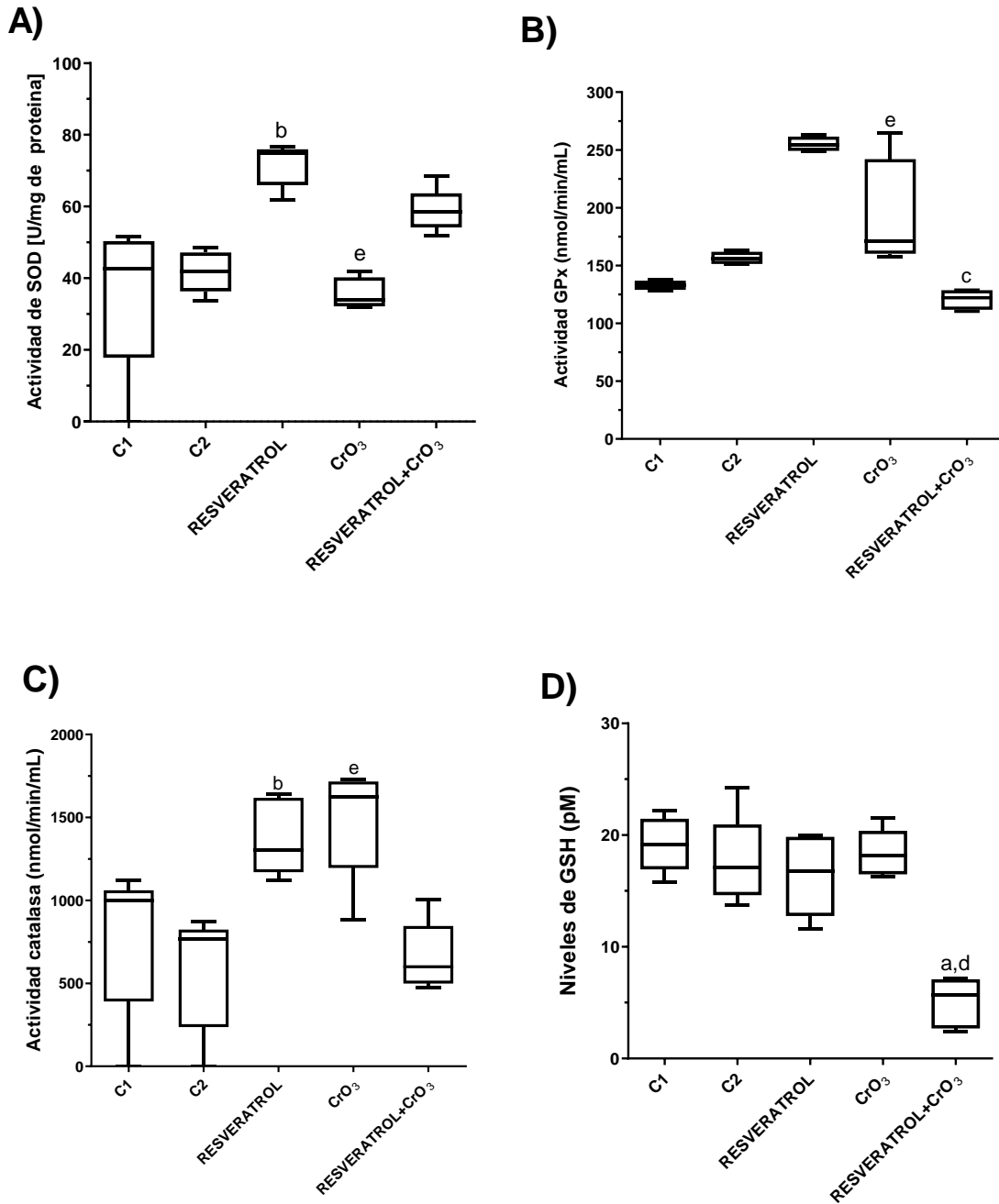


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de la actividad de SOD, GPx, catalasa y concentración de GSH cuando se administraron resveratrol y CrO₃. A) distribución de la actividad de SOD a las 48 horas; B) distribución de la actividad de GPx a las 48 horas; C) distribución de la actividad de catalasa a las 48 horas; D) distribución de los niveles de GSH a las 48 horas. $p < 0.05$; ^avs C1; ^bvs C2; ^cvs resveratrol; ^dvs CrO₃; ^evs resveratrol+CrO₃. Análisis realizado mediante Kruskal-Wallis.

Anexo 4

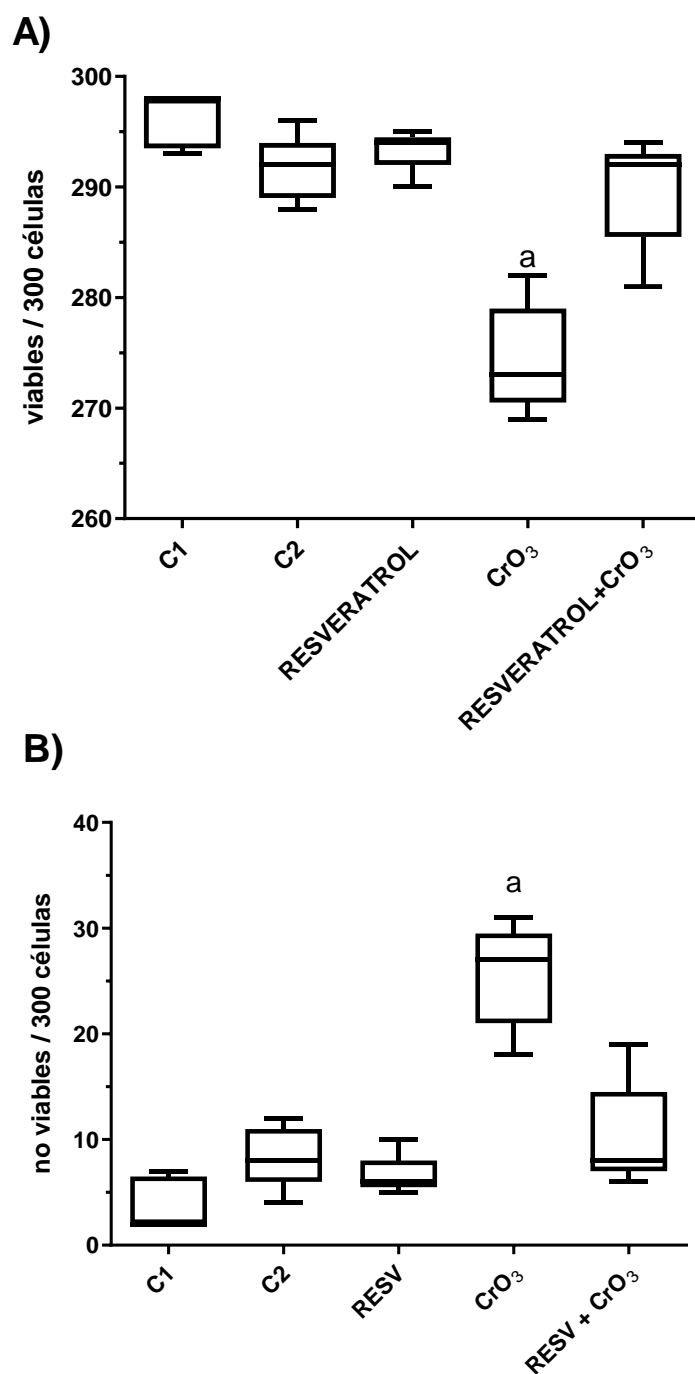


Gráfico de caja y bigote en el cual se representan y comparan las distribuciones de los valores obtenidos de células viables y no viables evaluados en 300 células nucleadas cuando se administraron resveratrol y CrO₃. A) distribución de células viables a las 48 horas; B) distribución de células no viables a las 48 horas. $p < 0.05$; ^avs C1. Análisis realizado mediante Kruskal-Wallis.

Anexo 5

Publicaciones generadas de este trabajo:

Título: Protective Effect of Resveratrol against Hexavalent Chromium-Induced Genotoxic Damage in Hsd:ICR Male Mice.

Autores: Nicolás-Méndez T, Kacew S, Ortiz-Muñiz AR, Mendoza-Núñez VM, García-Rodríguez MC.

Revista: Molecules.

Número y año: 13, 2022.

País: Suiza.

Título: El papel del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por metales pesados.

Autores: Nicolás-Méndez, Tonancy; Ortiz-Muñiz, Alda Rocío; Mendoza-Núñez, Víctor Manuel Y García-Rodríguez, María Del Carmen.

Revista: Nutrición Hospitalaria.

Número y año: 2, 2020.

País: España.

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

Evento: XXII Reunión Internacional de Ciencias Médicas.

Título de la ponencia: “Efecto del resveratrol sobre la apoptosis y la viabilidad celular en ratones expuestos a cromo hexavalente”.

Autores: Tonancy Nicolás-Méndez, Alda Rocío Ortiz-Muñiz, Víctor Manuel Mendoza-Núñez, María Del Carmen García-Rodríguez.

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

Lugar y Fecha: Universidad de Guanajuato. Campus León. León Guanajuato. Del 24 al 26 de agosto del 2022.

Evento: 4th International Summer Symposium on Systems Biology.

Título de la ponencia: *“Protection of hexavalent chromium-induced genotoxic damage in peripheral blood of mice by resveratrol and its relationship to the apoptotic activity”*.

Autores: Tonancy Nicolás-Méndez, Sam Kacew, Alda Rocío Ortiz-Muñiz, Víctor Manuel Mendoza-Núñez, María del Carmen García-Rodríguez.

Organizador: Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Lugar y Fecha: Instituto Nacional de Medicina Genómica. Ciudad de México. Del 1 al 3 de agosto del 2022.

Evento: 27th Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine (SFRBM). Presented Virtually.

Título de la ponencia: *“Effect of resveratrol on SOD, GPx and catalase activity and genotoxic damage in mice treated with chromium(VI)”*.

Autores: Tonancy Nicolás-Méndez, Alda Rocío Ortiz-Muñiz, Víctor Manuel Mendoza-Núñez, and María del Carmen García-Rodríguez.

Organizador: Society for Redox Biology and Medicine.

Lugar y Fecha: Evento virtual. Del 18 al 20 de noviembre de 2020.

Evento: XX Reunión Internacional de Ciencias Médicas.

Título de la ponencia: *“Efecto del resveratrol sobre el daño genotóxico y sistema antioxidante-enzimático de ratones tratados con Cr(VI)”*.

Autores: Tonancy Nicolás-Méndez, Alda Rocío Ortiz-Muñiz, Víctor Manuel Mendoza-Núñez, y María del Carmen García-Rodríguez.

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

Lugar y Fecha: Universidad de Guanajuato. Campus León. León Guanajuato. Del 14 al 16 de octubre de 2020.

Evento: VII Congreso de Especies Reactivas de Oxígeno en Biología y Medicina.

Título de la ponencia: *“Simultaneous evaluation of genotoxic damage, GSH levels, Gpx and catalase activity in mice treated with chromium(VI) and resveratrol”.*

Autores: Tonancy Nicolás-Méndez, Alda Rocío Ortiz-Muñiz, Víctor Manuel Mendoza-Núñez, María del Carmen García-Rodríguez.

Organizador: Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Lugar y Fecha: Universidad Autónoma de México, Ciudad de México. Del 9 al 11 de septiembre de 2019.

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

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

Lugar y Fecha: Universidad de Guanajuato. Campus León. León Guanajuato. Del 18 al 20 de abril de 2018.

Article

Protective Effect of Resveratrol against Hexavalent Chromium-Induced Genotoxic Damage in Hsd:ICR Male Mice

 Tonancy Nicolás-Méndez ^{1,2}, Sam Kacew ³, Alda Rocío Ortiz-Muñiz ⁴, Víctor Manuel Mendoza-Núñez ⁵ 
 and María del Carmen García-Rodríguez ^{1,*} 

¹ Laboratorio de Antimutagenesis, Anticarcinogenesis y Antiteratogenesis Ambiental, Facultad de Estudios Superiores—Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 09230, Mexico; tonic_1986@comunidad.unam.mx

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 04510, Mexico

³ McLaughlin Centre for Population Health Risk Assessment, University of Ottawa, Ottawa, ON K2G 3G8, Canada; skacew@uottawa.ca

⁴ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Mexico City 09310, Mexico; arom@xanum.uam.mx

⁵ Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores—Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 09230, Mexico; mendovic@unam.mx

* Correspondence: carmen.garcia@unam.mx; Tel.: +52-55-5623-0772



Citation: Nicolás-Méndez, T.; Kacew, S.; Ortiz-Muñiz, A.R.; Mendoza-Núñez, V.M.; García-Rodríguez, M.d.C. Protective Effect of Resveratrol against Hexavalent Chromium-Induced Genotoxic Damage in Hsd:ICR Male Mice. *Molecules* **2022**, *27*, 4028. <https://doi.org/10.3390/molecules27134028>

Academic Editor: Nour Eddine Es-Safi

Received: 20 May 2022

Accepted: 21 June 2022

Published: 23 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The aim of this study is to examine the ability of resveratrol to counteract hexavalent chromium [Cr(VI)]-induced genetic damage, as well as the possible pathways associated with this protection. Hsd:ICR male mice are divided into groups of the following five individuals each: (a) control 1, distilled water; (b) control 2, ethanol 30%; (c) resveratrol, 50 mg/kg by gavage; (d) CrO₃, 20 mg/kg intraperitoneally; (e) resveratrol + CrO₃, resveratrol administered 4 h prior to CrO₃. The assessment is performed on peripheral blood. Micronuclei (MN) kinetics are measured from 0 to 72 h, while 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) adduct repair levels, endogenous antioxidant system biomarkers, and apoptosis frequency were quantified after 48 h. Resveratrol reduces the frequency of Cr(VI)-induced MN and shows significant effects on the 8-OHdG adduct levels, suggesting that cell repair could be enhanced by this polyphenol. Concomitant administration of resveratrol and Cr(VI) results in a return of the activities of glutathione peroxidase and catalase to control levels, accompanied by modifications of superoxide dismutase activity and glutathione levels. Thus, antioxidant properties might play an important role in resveratrol-mediated inhibition of Cr(VI)-induced oxidant genotoxicity. The increase in apoptotic cells and the decrease in necrosis further confirmed that resveratrol effectively blocks the actions of Cr(VI).

Keywords: resveratrol; hexavalent chromium; 8-hydroxydeoxyguanosine adduct repair; apoptosis; endogenous antioxidant system; antigenotoxic

1. Introduction

Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene) is a polyphenol found in a group of stilbenes. It has high antioxidant potential associated with beneficial health effects in the context of neurodegenerative and cardiovascular diseases, as well as some types of cancer, diabetes, and obesity-related disorders [1,2]. The antioxidant effects of resveratrol have been attributed to its ability to scavenge reactive oxygen species (ROS), activate repair mechanisms, and induce apoptosis [3,4]. Notably, resveratrol has been found to prevent DNA damage [5,6]. Although the effects of resveratrol on toxicity induced by metals (e.g., arsenic trioxide, sodium arsenite, copper oxide, chromic chloride, and potassium dichromate) have been examined in rodent hearts, livers, kidneys, thymus, and ovaries [7–11], there are no studies evaluating the effects of this polyphenol on hexavalent chromium [Cr(VI)] compound-induced genotoxicity.

Cr(VI) is largely released into the environment due to industrial activities, mainly including electroplating, welding, leather tanning, and pigment manufacturing, or found in automobile exhaust and tobacco products [12,13]. Both acute and chronic exposure to Cr(VI) compounds have been associated with cancer induction in different organs and tissues [14,15]. The genotoxic damage produced during its intracellular reduction may initiate and promote Cr(VI)-induced carcinogenesis by the formation of DNA adducts, cross-linking (DNA-protein and DNA-DNA), abasic sites, and oxidized DNA bases [16]. It is important to highlight that the induction of apoptosis, the inhibition of repair mechanisms, and gene expression play a crucial role in the genotoxic damage generated by exposure to Cr(VI) compounds [15,17]. Several studies have shown that antioxidants can counteract the effects of ROS and free radicals [18], such that antioxidant-rich substances have emerged as potential agents for preventing and adjuvating oxidative stress and DNA damage [19–21]. More precisely, compounds such as polyphenols have been shown to play a direct role as radical scavengers and metal chelators and to exert indirect effects by modulating levels of transcription factors and enzymes [22–24]. Therefore, the aim of the present study was to examine the protective effects of resveratrol against Cr(VI)-induced genotoxicity *in vivo* and the underlying metabolic processes including 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG, 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine) adduct repair, the endogenous antioxidant component system, and apoptosis, which may be involved in preventing Cr(VI)-induced DNA damage.

2. Results

2.1. Effect of Resveratrol on MN Induced by CrO₃

The genotoxic damage caused by Cr(VI) was evaluated using the micronuclei (MN) assay in erythrocytes of peripheral blood using acridine orange (AO)-coated slides. Differential AO staining distinguished polychromatic erythrocytes (PCE) from normochromatic erythrocytes (NCE) because PCE were stained, showing orange fluorescence due to the presence of ribosomal RNA (Figure 1A(i)), while NCE did not stain at all (shadow) (Figure 1A(ii)). The AO also enabled the identification of MN, which exhibited yellow fluorescence due to their DNA content (Figure 1A(iii)). To compare the kinetics of MN induction in treatment groups, data were analyzed by calculating the net induction frequency (NIF) using Equation (1) as follows:

$$\text{NIF} = \frac{\text{MN frequencies measured at time } x_i - \text{MN frequencies measured at time } 0}{n} \quad (1)$$

where x_i is the evaluation at 24, 48, or 72 h per group, *time 0* is the evaluation at 0 h (before treatment) per group, and n is the number of mice per group.

Calculating the NIF enhanced the ability to determine net MN induction by eliminating baseline MN variability among treated groups at *time 0*. Figure 1B illustrates the NIF of MN values for all treatments at 24, 48, and 72 h after administration. Treatments had a significant effect ($p < 0.0001$) on the MN frequencies according to the two-way repeated-measures analysis of variance (RM-ANOVA). In the chromium trioxide (CrO₃) group, an increase of about 7, 10, and 5 MN was observed at 24, 48, and 72 h, respectively, which was significantly higher than the control C1 ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, and $p < 0.015$, respectively). The group treated with resveratrol and CrO₃ (resveratrol + CrO₃) had lower MN frequency than the CrO₃ only treatment at all times examined and was highest at 48 h ($p < 0.001$), though this reduction was no longer significant at 72 h ($p > 0.05$). However, in this group, the MN frequencies observed at 48 h were significantly different from the control groups (C1, $p < 0.001$; C2, $p < 0.040$) and the group treated with resveratrol alone ($p < 0.006$). There was a significant effect of time on the frequency of MN in the two-way RM-ANOVA ($p < 0.0001$). In the CrO₃ group, the frequency of MN increased at 48 h with respect to the initial time ($p < 0.038$) and decreased at 72 h ($p < 0.004$). In the resveratrol + CrO₃ group, the MN frequency decreased at 72 h ($p < 0.009$), and values at the initial and final times were similar. Treatment with resveratrol alone did not significantly affect the frequency of MN compared to control group C2 ($p > 0.05$).

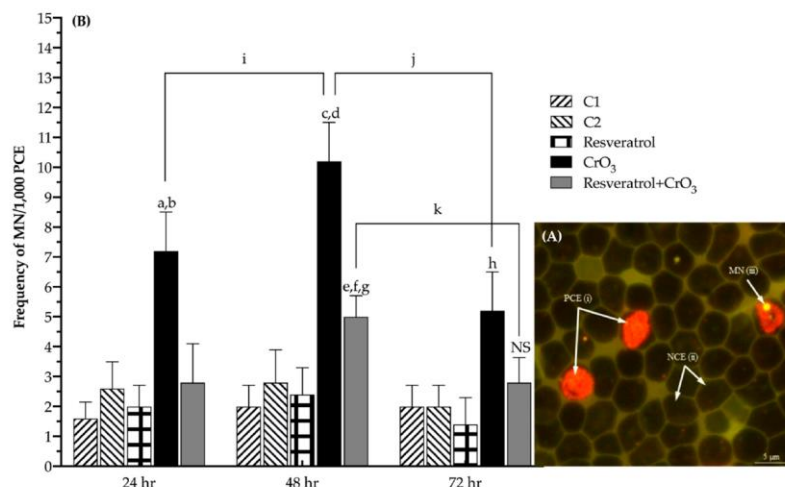


Figure 1. Effect of resveratrol and CrO₃ on the frequency of micronuclei (MN) were evaluated in the peripheral blood of mice. (A) Fluorescent microphotograph (1000×) of peripheral blood cells using the AO coating method. Polychromatic erythrocytes (PCE) stain fluorescent orange (i), normochromic erythrocytes (NCE) do not stain at all (shadow) (ii), and MN fluoresces yellow (iii). (B) Data show the MN frequency at 24, 48, and 72 h minus the MN frequency at 0 h (net induction frequency: NIF, see results text). The frequencies of MN in the resveratrol + CrO₃ group decreased by 63, 50, and 47% at 24, 48, and 72 h, respectively, compared with those in the CrO₃ group. A total of 4000 PCE were evaluated in each mouse ($n = 5$ mice/group). Statistical significance was determined using two-way repeated measures-ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Analysis by treatments: ^a $p < 0.001$ vs. C1, 24 h; ^b $p < 0.004$ vs. resveratrol + CrO₃, 24 h; ^c $p < 0.0001$ vs. C1, 48 h; ^d $p < 0.001$ vs. resveratrol + CrO₃, 48 h; ^e $p < 0.001$ vs. C1, 48 h; ^f $p < 0.040$ vs. C2, 48 h; ^g $p < 0.006$ vs. resveratrol, 48 h; ^h $p < 0.015$ vs. C1, 72 h; ^{NS} $p > 0.05$ vs. CrO₃, 72 h. Analysis by time of evaluations: ⁱ $p < 0.038$, CrO₃; ^j $p < 0.004$, CrO₃; ^k $p < 0.009$, resveratrol + CrO₃. C1, Control 1, vehicle only (distilled water). C2, Control 2, vehicle only (ethanol 30%). CrO₃, chromium trioxide. AO, acridine orange.

2.2. Effect of Resveratrol and CrO₃ on 8-OHdG Adduct Levels

The 8-OHdG adduct was measured at 48 h in blood plasma since this method does not require sacrificing the animals. It is generally accepted that the excretion of the oxidized nucleosides 8-oxodG and 8-oxoGuo can be measured in fluids such as plasma, under the assumption that an organism maintains a steady-state with no changes in the rate of oxidation [25]. In that situation, the number of oxidized guanine moieties in the nucleic acid and its precursor pool must be equal to the number removed/excreted from the cell. Thus, the levels of 8-OHdG evaluated in fluids represent the balance between formation and repair rates. When evaluating oxidative damage to DNA using the 8-OHdG adduct repair levels in peripheral blood plasma analyzed by one-way ANOVA, there was a significant effect of treatment ($p < 0.0015$). The group treated with resveratrol prior to CrO₃ (resveratrol + CrO₃) had higher 8-OHdG levels than the control groups (C1, $p < 0.012$; C2, $p < 0.007$) and the CrO₃ group ($p < 0.002$) (Figure 2). Although the resveratrol group displayed numerically higher 8-OHdG levels than the control C2 and CrO₃ had lower levels than control C1, neither comparison was statistically significant.

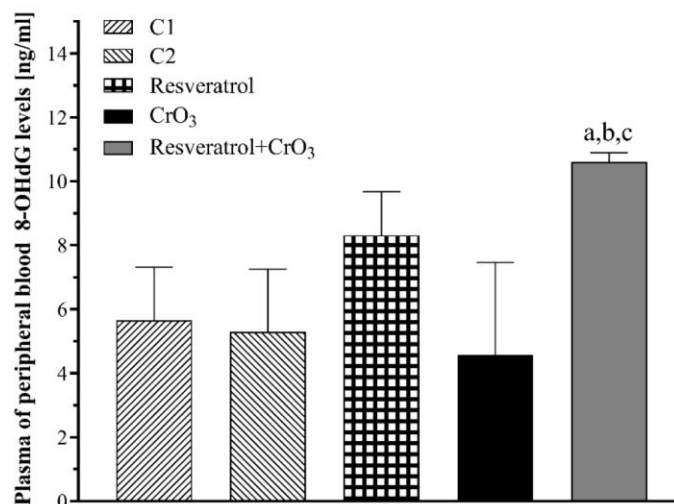


Figure 2. Effect of resveratrol and CrO₃ on 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG, 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine) levels evaluated in peripheral blood plasma 48 h after treatments ($n = 4$ mice/group). Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: ^a $p < 0.012$ vs. C1; ^b $p < 0.007$ vs. C2; ^c $p < 0.002$ vs. CrO₃. C1, Control 1, vehicle only (distilled water); C2, Control 2, vehicle only (ethanol 30%); CrO₃, chromium trioxide.

2.3. Effect of Resveratrol and CrO₃ on the Antioxidant System

The effect of the treatments on the antioxidant system was determined by evaluating glutathione (GSH) levels and the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT). During the reduction of Cr(VI) to trivalent chromium [Cr(III)] superoxide radical (O_2^{\bullet}) is generated, which can be dismutated by SOD. While GPx and CAT, when interacting with hydrogen peroxide (H_2O_2), can inhibit the production of the hydroxyl radical ($\bullet OH$), and GSH participates in one of the Cr(VI) reduction pathways [15]. The enzymatic activities of SOD, GPx, and CAT are shown in Figure 3. Data were analyzed with a one-way ANOVA. Treatment had a significant effect on SOD activity ($p < 0.0001$). The resveratrol group had higher SOD activity than the control group (C2) ($p < 0.0001$), and the resveratrol + CrO₃ group showed an increase compared to the control groups (C1, $p < 0.016$; C2, $p < 0.001$), the resveratrol group ($p < 0.019$) and the CrO₃ group ($p < 0.0001$). GPx activity was also significantly affected by treatment ($p < 0.0001$). The CrO₃ treatment increased GPx activity compared to the control group C1 ($p < 0.019$) and the resveratrol + CrO₃ group ($p < 0.004$). Resveratrol treatment alone also increased GPx activity compared to control group C2 ($p < 0.0001$). The resveratrol + CrO₃ group had lower GPx activity than the resveratrol only group ($p < 0.0001$). There was also a significant effect of treatment on CAT activity ($p < 0.0001$). Resveratrol treatment increased CAT activity relative to the C2 control ($p < 0.005$), while treatment with CrO₃ increased it compared to control group C1 ($p < 0.034$). CAT activity was lower in the resveratrol + CrO₃ group than in the resveratrol group ($p < 0.001$) and the CrO₃ group ($p < 0.0002$). Together, these results demonstrate that in the resveratrol + CrO₃ mice, resveratrol restored GPx and CAT activity to levels similar to the controls. In the resveratrol + CrO₃ group, SOD levels were higher than those of the control and CrO₃ groups.

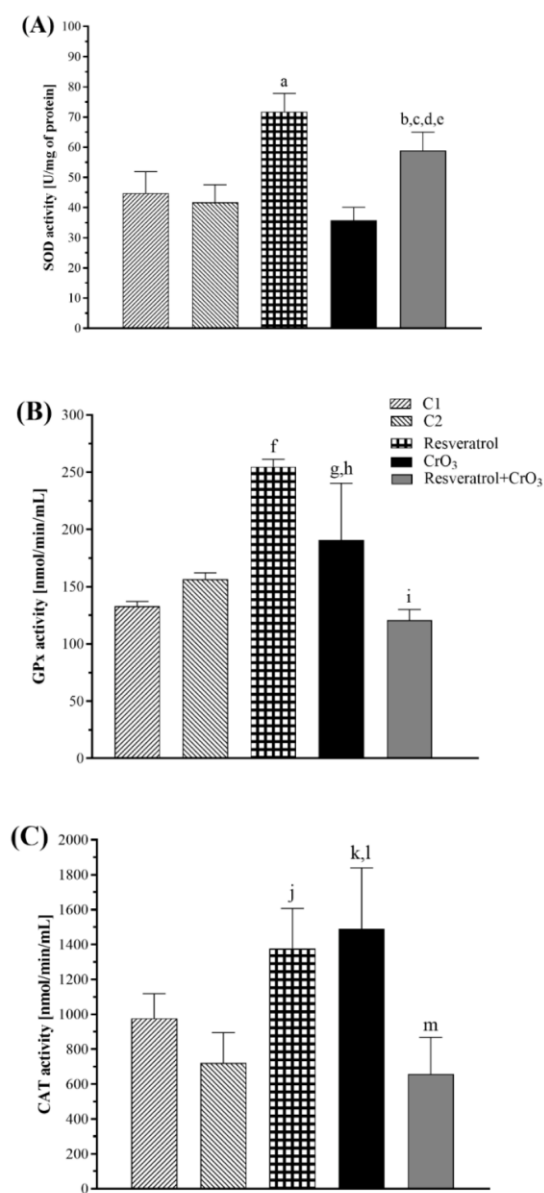


Figure 3. (A) Superoxide dismutase (SOD), (B) glutathione peroxidase (GPx), and (C) catalase (CAT) activities evaluated in peripheral blood at 48 h after treatments with resveratrol and CrO₃ ($n = 5$ mice/group). Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: ^a $p < 0.0001$ vs. C2; ^b $p < 0.016$ vs. C1; ^c $p < 0.001$ vs. C2; ^d $p < 0.019$ vs. resveratrol; ^e $p < 0.0001$ vs. CrO₃; ^f $p < 0.0001$ vs. C2; ^g $p < 0.019$ vs. C1; ^h $p < 0.004$ vs. resveratrol + CrO₃; ⁱ $p < 0.0001$ vs. resveratrol; ^j $p < 0.005$ vs. C2; ^k $p < 0.034$ vs. C1; ^l $p < 0.0002$ vs. resveratrol + CrO₃; ^m $p < 0.001$ vs. resveratrol. C1, Control 1, vehicle only (distilled water); C2, Control 2, vehicle only (ethanol 30%); CrO₃, chromium trioxide.

The GSH levels are shown in Figure 4. There was a significant effect of treatment on GSH levels ($p < 0.0001$). There were no significant differences in GSH levels between CrO_3 -treated animals and any other group ($p > 0.05$), while resveratrol + CrO_3 mice had significantly lower GSH levels than the controls (C1, $p < 0.0001$; C2, $p < 0.0001$), the resveratrol group ($p < 0.0001$), and the CrO_3 only group ($p < 0.0001$).

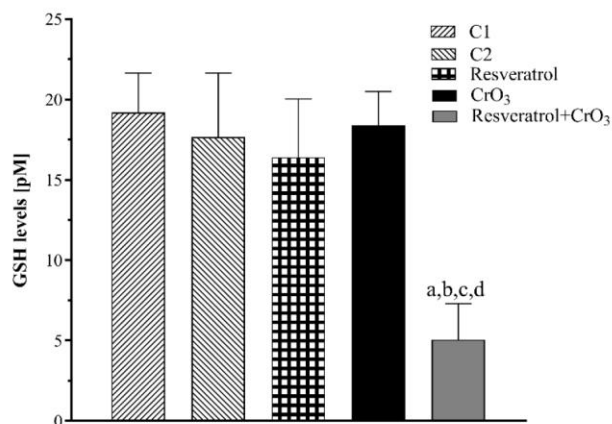


Figure 4. Average glutathione (GSH) levels evaluated in peripheral blood erythrocytes 48 h after treatment with resveratrol and CrO_3 ($n = 5$ mice/group). Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: ^a $p < 0.0001$ vs. C1; ^b $p < 0.0001$ vs. C2; ^c $p < 0.0001$ vs. resveratrol; ^d $p < 0.0001$ vs. CrO_3 . C1, Control 1, vehicle only (distilled water); C2, Control 2, vehicle only (ethanol 30%); CrO_3 , chromium trioxide.

2.4. Effect of Resveratrol and CrO_3 on Apoptotic and Necrotic Cells

Apoptotic and necrotic cells as well as cell viability were evaluated using differential acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining (Figure 5A). The dual fluorochrome assay is capable of distinguishing between viable and nonviable cells based on membrane integrity. When cells are still viable, they keep the plasma membrane intact, allowing only AO to intercalate into DNA, which causes the nucleus to fluoresce green (Figure 5A(i,iii)). However, in nonviable cells, membrane integrity is lost, causing, ethidium bromide (EB) to also intercalate into DNA, making the nucleus fluoresce red since EB overwhelms AO staining (Figure 5A(ii,iv)). The color of the nucleus depends on the viability of the cell, not the state of the nucleus. Early apoptotic cells that have intact membranes but in which the DNA has begun to fragment still exhibit green nuclei because the EB cannot enter the cell, but chromatin condensation is visible as bright green patches in the nuclei (Figure 5A(iii)). As the cell progresses through the apoptotic pathway and membrane blebbing begins to occur, EB permeates the cell, producing a red-stained cell. Late apoptotic cells show bright red patches of condensed chromatin in the nuclei (Figure 5A(iv)); this distinguishes them from necrotic cells, which stain uniformly red (Figure 5A(ii)). When comparing the effect of treatments on apoptosis by one-way ANOVA, there was a significant effect of treatment on the frequency of healthy, total, early and late apoptotic cells as well as necrotic cells when compared to their control groups ($p < 0.0001$). Resveratrol reduced the frequency of total and early apoptotic cells compared to control groups ($p < 0.022$ and $p < 0.015$, respectively), while CrO_3 induced an increased number of total, early, late apoptotic, and necrotic cells compared to control groups ($p < 0.0001$). In the resveratrol + CrO_3 mice, there were fewer late apoptotic and necrotic cells compared to the CrO_3 group ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively) and an increase in total and early apoptotic cells compared to the control group ($p < 0.0001$) and the resveratrol group ($p < 0.0001$) (Figure 5B).

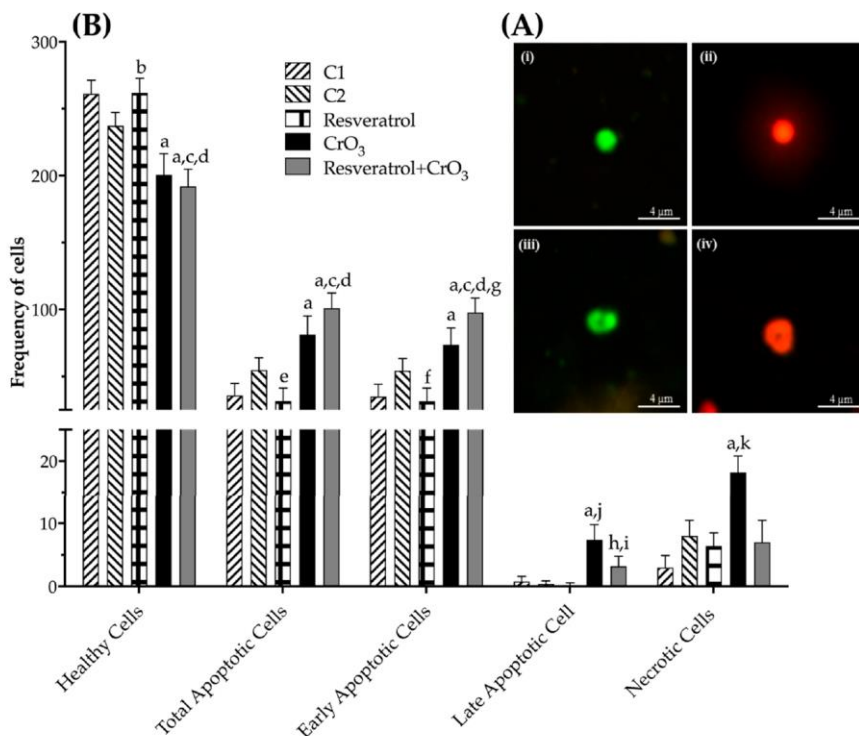


Figure 5. (A) Fluorescent microphotograph (400×) of peripheral blood cells using differential acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining. (i) Healthy cell. (ii) Necrotic cell. (iii) Early apoptotic cell. (iv) Late apoptotic cell. (B) Effect of resveratrol and CrO₃ on the frequencies of healthy, apoptotic (total, early, and late), and necrotic cells in peripheral blood, evaluated 48 h after treatments. A total of 300 nucleated cells were evaluated in each mouse ($n = 5$ mice/group). Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: ^a $p < 0.0001$ vs. C1; ^b $p < 0.03$ vs. C2; ^c $p < 0.0001$ vs. C2; ^d $p < 0.0001$ vs. resveratrol; ^e $p < 0.022$ vs. C2; ^f $p < 0.015$ vs. C2; ^g $p < 0.011$ vs. CrO₃; ^h $p < 0.034$ vs. C2; ⁱ $p < 0.02$ vs. resveratrol; ^j $p < 0.001$ vs. resveratrol + CrO₃; ^k $p < 0.0001$ vs. resveratrol + CrO₃. C1, Control 1, vehicle only (distilled water); C2, Control 2, vehicle only (ethanol 30%); CrO₃, chromium trioxide.

Table 1 shows the PCE/NCE ratio. These evaluations were performed on the same samples and times used for MN. There were no significant effects in any of the treatments compared to their control groups (C1, C2) or time 0. However, when cell viability was compared in nucleated peripheral blood cells (48 h) using the dual fluorochrome assay, a significant effect of treatment on viable and nonviable cells ($p < 0.0001$) was observed (one-way ANOVA). The dual fluorochrome assay is an indicator of cell metabolism and death caused by cell membrane injury. Viable cells included those with an intact membrane, and thus they exhibited a nucleus fluoresced green by AO intercalation (healthy and early apoptotic cells; Figure 5A(i,iii), respectively). Moreover, nonviable cells included those in which the integrity of the membrane had been lost and that, therefore, presented a nucleus fluoresced red due to the intercalation of the EB (late apoptotic and necrotic cells; Figure 5A(ii,iv), respectively). Treatment with CrO₃ increased nonviable cells compared to the control group ($p < 0.0001$), while treatment with resveratrol prior to CrO₃ exposure decreased the nonviable cells observed in the group treated with CrO₃ alone ($p < 0.0001$). Resveratrol treatment alone had no significant effect on cell viability (Figure 6).

Table 1. PCE/NCE ratio in peripheral blood of mice treated with resveratrol and CrO₃.

Treatment	Dose (mg/kg)	Time Analysis (h)	n	PCE/NCE 1000 Cells (mean ± SD)
C1	0	0	5	48.5 ± 8.6
		24		46.7 ± 4.6
		48		48.2 ± 11.9
		72		52.0 ± 8.2
C2	60	0	5	46.7 ± 7.0
		24		47.2 ± 9.6
		48		53.0 ± 7.5
		72		43.4 ± 13.2
Resveratrol	50	0	5	54.8 ± 12.2
		24		47.5 ± 9.5
		48		48.7 ± 5.9
		72		50.5 ± 6.4
CrO ₃	20	0	5	46.5 ± 10.0
		24		45.8 ± 7.0
		48		51.1 ± 12.8
		72		39.8 ± 12.9
Resveratrol + CrO ₃	50 + 20	0	5	45.6 ± 7.9
		24		46.4 ± 2.8
		48		53.8 ± 12.7
		72		44.6 ± 5.8

A total of 2000 erythrocytes were evaluated in each mouse ($n = 5$ mice/group). C1, Control 1, vehicle only (distilled water); C2, Control 2, vehicle only (ethanol 30%). CrO₃, chromium trioxide; PCE, polychromatic erythrocytes; NCE, normochromatic erythrocytes.

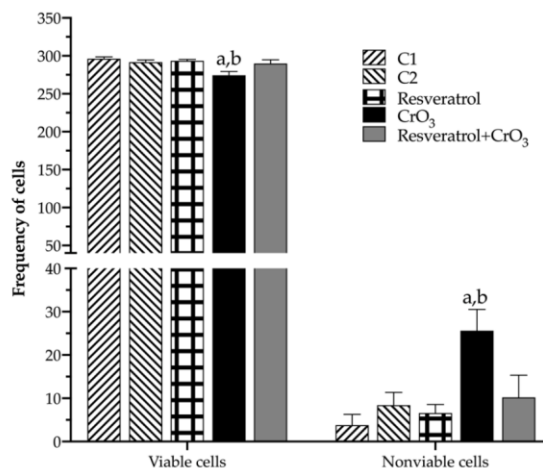


Figure 6. Effect of resveratrol and CrO₃ on the frequencies of viable and nonviable cells in the peripheral blood of mice evaluated 48 h after treatment using differential acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining. Viable cells include healthy and early apoptotic cells. Nonviable cells include late apoptotic and necrotic cells. A total of 300 nucleated cells were evaluated for each mouse ($n = 5$ mice/group). Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test: ^a $p < 0.0001$ vs. C1; ^b $p < 0.0001$ vs. resveratrol + CrO₃. C1, Control 1, vehicle only (distilled water); C2, Control 2, vehicle only (ethanol 30%); CrO₃, chromium trioxide.

The mice in the CrO₃ group showed clinical signs of toxicity, including bristling hair, decreased mobility, and loss of appetite. The dose of 50 mg/kg of resveratrol did not exhibit any apparent clinical signs of toxicity. None of the mice exposed to resveratrol, CrO₃, or both treatments died.

3. Discussion

The aim of this study was to (1) examine the protective effect of resveratrol against Cr(VI)-induced genotoxic damage *in vivo* and, (2) explore the possible protective pathways of resveratrol at the time of greatest induction of genotoxic damage by CrO₃ (48 h). The evaluations were carried out on the same peripheral blood samples, in which the protection from genotoxic damage (MN) was studied. The pathways explored were adduct repair 8-OHdG levels, antioxidant system GSH levels, and enzymatic activities of SOD, GPx, and CAT. Our findings showed that the administration of resveratrol 4 h prior to exposure to CrO₃ reduced the frequency of MN induced by this metal in Hsd:ICR male mice. Similarly, an approximation of the possible pathways involved in the protection of genotoxic damage induced by CrO₃ was achieved.

To evaluate the genotoxic damage attributed to Cr(VI), a dose of 20 mg/kg CrO₃ was administered intraperitoneally (ip). The 20 mg/kg dosage was based upon a previous study, in which this dose induced the formation of MN in the peripheral blood of mice [19,26]. Cr(VI) detoxification is relatively fast (no more than 48 h) when administered ip, in contrast to the effects observed with long-term oral and inhalation exposure to Cr(VI) [27]. Although the ip route is an artificial exposure route, it is useful for detecting genotoxic damage in short-term protocols, such as the MN assay, when testing compounds with potential clastogenic properties. Similarly, it is a more sensitive and direct route than inhalation or oral exposure [28,29]. Thus, a short-term protocol using the ip route of administration was selected to examine direct genotoxic damage induced by CrO₃. Resveratrol bioavailability studies, which have described peak plasma concentrations from approximately 1 to 6 h after treatment [30], also support the use of a short-term protocol to assess genotoxic damage.

The increase in MN is an indication of the genotoxic effects exerted by Cr(VI). According to the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) and the Environmental Protection Agency (EPA), a substance or compound that induces more than 4 MN/1000 PCE should be considered a genotoxic agent [29,31]. Our results are consistent with the genotoxic damage reported for Cr(VI) compounds and particularly CrO₃ [26,32], as increases greater than 5 MN were observed at all times evaluated. Administration of resveratrol 4 h before exposure to CrO₃ reduced these frequencies of MN *in vivo*. When evaluating the levels of 8-OHdG in blood plasma at 48 h after CrO₃ treatment, no significant alterations in adduct repair were detected. Notably, Maeng et al. [33] reported that inhalation of 18 mg/m³ of sodium chromate resulted in significantly elevated 8-OHdG levels in the lungs after 1 week. However, after 2 weeks of exposure, this dose produced no significant differences in pulmonary 8-OHdG levels, with full recovery after 3 weeks. Maeng et al. [33] also demonstrated that inhalation of higher sodium chromate levels did not significantly alter pulmonary 8-OHdG levels. Similarly, Thompson et al. [34] noted that the *in vitro* genotoxicity of Cr(VI) is primarily oxidative in nature at low concentrations. They observed that 8-OHdG reaches non-cytotoxic concentrations at 24 h in cell cultures treated with different doses of sodium dichromate. It is conceivable that ip administration of 20 mg/kg CrO₃ might be too high to significantly affect 8-OHdG levels in the blood, in agreement with *in vivo* findings of Maeng et al. [33] and *in vitro* observations of Thompson et al. [34]. However, it should not be ruled out that Cr(VI) might reduce the levels of protein expression initiating DNA mismatch repair by inhibiting the hMLH1 and hMLH2 genes and the 8-oxoguanine DNA glycosylase1 (OGG1) repair enzyme involved in base excision repair (BER) [35–37]. Mice treated with resveratrol prior to CrO₃ showed an elevation in 8-OHdG levels. There are the following two possible explanations for these results: (1) resveratrol activated repair mechanisms that counteract oxidative damage in DNA, and/or (2) resveratrol contributed to the elimination of 8-OHdG

adducts formed by the oxidative damage. The 8-OHdG levels are known to be related to the balance between oxidative DNA damage and the rate at which it is repaired [25]. Yan et al. [38] observed *in vitro* that resveratrol activates the BER pathway, increasing the expression of OGG1. Further, Mikula-Pietrasik et al. [39] noted that resveratrol enhanced the activity of the repair enzyme OGG1 in senescent human cells. In our study, resveratrol provided approximately 50% protection against genotoxic damage from CrO₃ at all evaluation times. This effect might be attributed to the antioxidant properties of resveratrol, which enable this substance to interact with H₂O₂ and O₂[•] and •OH radicals [40]. Previously, Leonard et al. [41] demonstrated *in vitro* that resveratrol scavenged •OH in JB6 cells exposed to Cr(VI). In a previous study *in vivo* with (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), García-Rodríguez et al. [42] reported that 8-OHdG levels returned to control levels when EGCG and Cr(VI) were co-administered, contrasting with the findings of this study. They also found that co-administration of EGCG and Cr(VI) decreased the magnitude of MN increase compared to Cr(VI) alone [42], similar to the effect observed in this study with resveratrol. Hence, it is possible that when resveratrol was administered in combination with CrO₃, the repair mechanisms were enhanced by this polyphenol, contributing to a reduction in MN levels.

In the group treated with resveratrol and CrO₃, MN frequencies were reduced by 60, 51, and 46% at 24, 48, and 72 h, respectively. However, the reduction at 72 h was no longer significant. This may be due to the pharmacokinetics of CrO₃. It has been reported that Cr(VI) compounds might be excreted within 48 h of exposure [27,43]. Hence, the greatest damage to DNA occurs during that period. Another possibility is that the micronucleated PCE induced over 24 h matured into NCE by 72 h, such that these were not quantified at that time. When leaving the bone marrow, PCE degrades ribosomal RNA in 24 h [44]. In other studies, this same trend was also observed in the reduction of MN at 72 h after administration of Cr(VI) [19,45].

The evaluations of SOD, GPx, CAT, and GSH activities were performed in peripheral blood samples obtained at 48 h because this did not require sacrificing the animals, which was necessary to continue with the evaluation of MN kinetics in the same individuals. Further, *in vitro* studies showed that resveratrol's antioxidant properties may neutralize oxidative capacity in human erythrocytes [46], and SOD and GSH play important roles in the antioxidant system of erythrocytes [47]. In addition, altered functions of extracellular antioxidants may be assessed by the evaluation of antioxidant molecules in plasma [48]. SOD and GSH measurements were carried out in erythrocytes while CAT and GPx were carried out in plasma.

In the group treated with CrO₃, there was a decrease in SOD activity accompanied by an elevation in GPx and CAT activities, which is consistent with previous findings. Both *in vitro* [49] and *in vivo* studies demonstrated the effects of oral [50] and *ip* [42] administration of Cr(VI) compounds on endogenous antioxidants, such as activities of SOD, CAT, GPx, heme oxygenase-1 (HO-1) and levels of GSH. Matés [51] proposed that SOD plays an important role as a first-line antioxidant defense enzyme by catalyzing the dismutation of O₂[•] to form H₂O₂, which is subsequently reduced to H₂O by GPx and CAT. The decrease in SOD activity observed in the group treated with CrO₃ might be related to its depletion by reacting with the O₂[•] radicals that are generated in excess during reduction to Cr(III). Meanwhile, the H₂O₂ generated by the activity of SOD may be increased due to the activity of GPx and CAT that was observed in this group. Regarding GSH levels, no significant changes were observed with CrO₃ treatment, suggesting that reduction of Cr(VI) was not primarily mediated by this pathway. In this sense, *in vivo* studies noted that the reduction of Cr(VI) compounds is predominantly via nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and other reducing agents such as ascorbate, cysteine, lipoic acid, fructose, and ribose [15]. In the group treated with resveratrol and CrO₃, GSH levels were significantly decreased. GSH is a primary antioxidant molecule that plays a fundamental role in reducing cellular oxidative stress. GSH might act in the following different ways: (1) directly as an electron donor by eliminating O₂[•], (2) through

GPx catalysis by reducing H_2O_2 levels, or (3) by forming complexes with detoxifying enzymes such as glutathione S-transferase (GST) [52]. GSH, GPx, and GST are some of the major antioxidant defense systems that scavenge ROS [53]. Resveratrol was found to induce phase II detoxification enzymes in *in vitro* and *in vivo* systems [54], and to increase GST activity in cultured aortic smooth muscle cells [55]. Further, several investigators have shown that polyphenols elevate GSH levels and stimulate the transcription of genes that are relevant for the synthesis of endogenous antioxidants, thus counteracting oxidative stress [56]. On the other hand, in this same group (resveratrol + CrO_3), the activities of GPx and CAT were restored, and SOD activity increased. Data suggest that resveratrol might counteract CrO_3 -induced oxidative stress by an indirect antioxidant effect related to the regulation of the endogenous antioxidant system. In *in vitro* studies, Yao et al. [57] observed that resveratrol protected against oxidative damage induced by sodium sulfate dextran, while Chen et al. [8] found that polyphenols diminished damage mediated by sodium arsenite. In both cases, evidence indicated that the observed protection was related to increased SOD activity. SOD is a phase 2 enzyme that can be activated through the Nrf2/Keap1 signaling pathway. Nrf2 is a fundamental sensor of oxidative stress that plays a central role in the regulation of phase 2 antioxidant and detoxifying enzymes and related proteins [58]. Zhuang et al. [59] found that resveratrol regulates p-Nrf2 levels in a dose-dependent manner. This suggests that resveratrol attenuates the oxidative state, probably by activating the Nrf2 signaling pathway, which in turn elevates SOD activity. Resveratrol was also found to maintain the cellular redox balance by enhancing the activity of antioxidant enzymes, including HO-1, CAT, GPx, and SOD, in rat arterial endothelial cells [60]. Banu et al. [10] showed that 10 mg/kg resveratrol protected against potassium dichromate-induced oxidative stress in rat ovarian tissue by enhancing the activities of GPx, CAT, SOD, peroxiredoxin, and thioredoxin, and by lowering the concentration of H_2O_2 . Therefore, it is possible that resveratrol also removed H_2O_2 generated by SOD activity, which reduced the need for GPx and CAT activation in the group treated with resveratrol and CrO_3 . Nevertheless, it is important to keep in mind that the endogenous antioxidant system is dynamic, and thus, it is possible that our results may depend upon the evaluation time (48 h), the dose of resveratrol used, and the experimental model.

Although the PCE/NCE ratio is included in the MN assay as an indicator of cytotoxicity [29], no marked changes in the PCE/NCE ratio were observed in any of the treated groups in this study. These results need to be interpreted with caution, since when toxicity occurs during erythropoiesis, activation of cell division mechanisms may mask the effects on the PCE/NCE ratio [61]. For this reason, cytotoxicity was assessed by analyzing cell viability using the AO/EB differential staining technique, which allows us to distinguish between viable and non-viable cells according to the integrity of the membrane [45]. When cell viability, apoptosis, and necrosis were determined, treatment with CrO_3 significantly increased the numbers in total, early and late apoptotic cells, as well as necrotic and nonviable cells. These results corroborate the cytotoxicity reported for Cr(VI) compounds [26,27,45]. ROS generation and DNA damage induced by Cr(VI) exposure might play an essential role in cytotoxicity and the apoptotic signaling pathway [62]. It has been proposed that apoptosis induction is mediated by DNA damage sensors that directly activate p53 through proteins such as DNA-dependent kinase (DNA-PK) or indirectly through mutated ataxia-telangiectasia (ATM) and ATM-Rad3 (ATR) with Chk1 or Chk2 [63]. It has also been reported that apoptosis induction may be mediated through p53-independent pathways such as cleaved caspase 3 and cytochrome C [10,64]. However, when polyphenol was administered 4 h prior to CrO_3 in mice, a significant increase in early apoptotic cell number was observed compared to the group treated with CrO_3 alone. This effect was masked when early and late apoptotic cells were summed, as late apoptotic cells also showed a significant decrease in this group. Hence, it is possible that the enhanced induction of early apoptotic cells following combined CrO_3 resveratrol treatment may contribute to the elimination of cells containing Cr(VI)-induced DNA (MN) damage. Although there are no apparent studies of the effects of resveratrol on Cr(VI)-induced apoptosis pathways,

resveratrol was reported to induce apoptosis as a mechanism of elimination of damaged cells in cancer cell lines [4]. Further, alterations in the expression of the Bcl2 protein, the loss of mitochondrial function, the release of cytochrome c, and the activation of caspases trigger the response for the activation of apoptosis [65]. Mirzapur et al. [66] reported that in breast cancer cells, resveratrol elevated the levels of the Bcl2/Bax protein, as well as the expression of p53 genes and caspases 3 and 8. Therefore, based upon these observations and the results reported in the present study, there is clearly a need to conduct studies that aim to reach a more detailed understanding of how resveratrol interacts with proteins such as p53, DNA-PK, ATM, ATR, Bax, Bcl2, caspases (3 and 8), among others. Indeed, these studies may greatly contribute toward understanding the mechanisms by which polyphenols such as resveratrol might contribute to the elimination of cells with genotoxic damage induced by compounds with carcinogenic potential such as Cr(VI).

The administration of resveratrol reduced the frequency of MN induced by CrO₃ and resveratrol treatment itself did not produce DNA damage (MN induction). The reduction in GSH and elevation in apoptotic cell number with both treatments (resveratrol + CrO₃), as well as increases in SOD, GPx, CAT, and 8-OHdG (the latter non-significant) with resveratrol alone, suggest a toxic effect. In *in vitro* and *in vivo* studies, it has been observed that resveratrol exhibits biphasic effects (antioxidant and prooxidant). Meira-Martin et al. [67] considered that the increases in SOD and SOD/CAT activity observed *in vitro* with different doses of resveratrol are generated to maintain the cellular redox balance. Hence, it has been proposed that its prooxidant activity contributes to the activation of the endogenous antioxidant system [68]. Sinha et al. [69] found that the prooxidative effects of resveratrol are associated with the generation of the O₂[•] radical, H₂O₂, and a complex mixture of semiquinones and quinones. However, in this study, no marked effects on viable cell numbers were observed in the group treated with resveratrol and CrO₃, and this group exhibited a significant decrease in necrotic cell frequency, suggesting that polyphenols diminished the cytotoxicity produced by CrO₃. Other *in vivo* studies also noted that resveratrol diminished the toxicity induced by metals, such as arsenic [70], copper, and zinc [71], contributing to the balance of the cellular redox system and reducing the expression of proinflammatory cytokines. On the other hand, the administration of resveratrol alone significantly decreased total and early apoptotic cells when compared to its control, suggesting that resveratrol alone does not induce toxicity and that it reduced the potential toxic effect of the vehicle (30% ethanol). Although ethanol is a less toxic polar vehicle than other vehicles such as dimethyl sulfoxide (DMSO) [72], *ad libitum* administration (11%) was shown to increase serum ROS in treated mice for 60 days [73]. Based on our results, it is suggested to extend these studies by using more diluted doses of resveratrol and even administering it in repeated doses, to reduce the possible toxic effects and improve the protection against the genotoxic damage observed in the present study.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals and Reagents

Cr(VI) [CrO₃, purity grade 99.9%; CAS 1333-82-0], 3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene [resveratrol, purity grade ≥ 98%; CAS 501-36-0], AO [CAS 10127-02-3], and EB [CAS 1239-45-8] were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

4.2. Animals

A group of 25 adult male Hsd:ICR mice (8–12 weeks old, 28–35 g) were used in the experiment. The animals were obtained from Harlan® (Mexico City, CDMX, Mexico) at the "Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM" and acclimated for two weeks prior to initiating the experiments. During the acclimation period, the groups of five mice were kept in a plastic cage at a controlled room temperature (22 ± 2 °C) with a 12-h light-dark cycle (the lights came on at 7:00 a.m. and went off at 7:00 p.m.). Mice had free access to food (Purina-Mexico®, Mexico City, CDMX, Mexico; small rodent chow) and water. Considering that in previous studies there were no differences between males

and females in the genotoxic effects of CrO_3 administered by ip injection [16,26,45], this study was carried out using only male mice, in accordance with guidelines for the testing of chemicals (mammalian erythrocyte micronucleus test) of the OECD and the EPA [29,31].

The mice were randomly divided into five groups of five individuals each. Two control groups were used (C1: mice treated ip with sterile distilled water and C2: mice treated with 30% ethanol by gavage) because the CrO_3 solution was prepared by dissolving the compound in water, whereas resveratrol was dissolved in 30% ethanol. The resveratrol group was treated with a single dose of 50 mg/kg by gavage, and the CrO_3 group was treated with a single dose of 20 mg/kg ip. The last group received combined resveratrol and Cr(VI) treatments (resveratrol + CrO_3); the mice were treated with resveratrol at 50 mg/kg by gavage 4 h prior to CrO_3 ip injection (20 mg/kg).

The assessment was carried out on peripheral blood obtained from the tail vein since this does not require animals to be sacrificed.

4.3. Micronuclei Assay

For the MN evaluations, sequential peripheral blood samples (5 μL) were obtained from the same individuals (0 to 72 h), and 0-h samples were designated as a negative control. The samples were placed directly onto slides previously treated with AO, as described by Hayashi et al. [74]. Two slides were prepared for each mouse and were stored in the dark at 4 °C for 24 h. The assessments were performed by identifying PCE, NCE, and MN in PCE using a fluorescence microscope (NikonTM OPTIPHOT-2; Tokyo, Japan) with blue excitation (480 nm) and a barrier filter emission (515–530 nm) at 100 \times magnification. MN analysis was based upon 4000 PCE per mouse, and the presence of MN was considered to indicate genotoxic damage. The relative proportion of PCE to NCE was also analyzed for 2000 erythrocytes.

In this study, underlying metabolic processes such as 8-OHdG adduct repair, endogenous antioxidant component system, apoptosis, and cell viability analyses were also evaluated because these processes may be involved in preventing Cr(VI)-induced DNA damage. These parameters were measured using the same peripheral blood samples obtained at 48 h after treatments, in which MN were measured since this is the time when the greatest genotoxic damage induced by Cr(VI) has been observed [26].

4.4. Plasma 8-Hydroxydeoxyguanosine Levels

Plasma 8-OHdG levels were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay. Peripheral blood samples (50 μL) were centrifuged (15 min at 2500 \times g) at room temperature. The plasma was collected and immediately analyzed according to the manufacturer's instructions using Trevigen's HT 8-oxo-dG ELISA Kit II (No. 4380-192-K; Gaithersburg, MD, USA). The absorbance at 450 nm of each well was determined using a MultiskanTM FC microplate reader (Thermo ScientificTM, Vantaa, Finland). Product formation is inversely proportional to the amount of 8-OHdG present in the sample. The 8-OHdG levels were determined in duplicate (per sample) and according to the 8-OHdG standard curve.

4.5. Antioxidant System

The antioxidant system was evaluated by determining the activities of SOD, GPx, and CAT, as well as the GSH levels.

4.5.1. Superoxide Dismutase Activity

SOD activity was evaluated in peripheral blood erythrocytes. Fifty- μL samples were diluted in phosphate-buffered saline. The erythrocytes were separated using FicollPaqueTM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). (800 \times g for 25 min at 12 °C). The precipitate was separated, and cold distilled water (4 °C) was added (10:1). Then, it was incubated (0 °C for 15 min) to lyse. Hemoglobin was then precipitated by adding ethanol and chloroform (10,000 \times g for 10 min at 4 °C). The SOD activity was determined according to

the manufacturer's instructions using Trevigen's HT Superoxide Dismutase Assay Kit (No. 7501-500-K; Gaithersburg, MD, USA). The absorbance was read at 450 nm at 1-min intervals for 10 min in a Multiskan™ FC microplate reader (Thermo Scientific™, Vantaa, Finland). One unit of SOD activity was defined as the amount of protein that inhibited tetrazolium salt (WST-1)-formazan, up to a maximum of 50%. The protein concentration was determined according to the instructions for the Cayman Chemicals Protein Determination Kit (No. 704002; Ann Arbor, MI, USA). SOD activity was measured in duplicate (per sample) and according to the SOD standard curve.

4.5.2. Glutathione Peroxidase Activity

GPx activity was detected in the plasma of peripheral blood. Twenty-five μL samples were centrifuged at $1000\times g$ for 10 min at 4 °C. The plasma was collected and diluted with the GPx sample buffer (1:2) included in the kit. GPx activity was determined according to the instructions for the Cayman Chemicals Glutathione Peroxidase Assay Kit (No. 703102; Ann Arbor, MI, USA). One unit of GPx was defined as the amount of enzyme that oxidized 1 nmol of NADPH/min. The absorbance was read at 340 nm in a Multiskan™ FC microplate reader (Thermo Scientific™, Vantaa, Finland). GPx activity was determined in duplicate (per sample) and according to the GPx standard curve.

4.5.3. Catalase Activity

CAT activity was evaluated in the plasma of peripheral blood. Twenty-five μL samples were centrifuged at $1000\times g$ for 10 min at 4 °C to obtain plasma. The activity of CAT was evaluated according to the instructions for the Cayman Chemicals Catalase Assay (No. 707002; Ann Arbor, MI, USA). This kit uses the peroxidation function of CAT to determine enzyme activity. The absorbance was read at 540 nm in a Multiskan™ FC microplate reader (Thermo Scientific™, Vantaa, Finland). One unit of CAT was defined as the amount of enzyme that induced the formation of 1 nmol of formaldehyde/min. CAT activity was measured in duplicate (per sample) and according to the CAT standard curve.

4.5.4. Glutathione Levels

GSH levels were evaluated in the erythrocytes of peripheral blood. Fifty μL samples were centrifuged at $3000\times g$ for 15 min at 0 °C. The erythrocytes were suspended in 5% cold (*w/v*) metaphosphoric acid, mixed and stored at 0 °C for 15 min. Subsequently, the suspension was centrifuged at $14,000\times g$ for 10 min at 4 °C. The clarified supernatant was collected, and GSH levels were analyzed according to the instructions using Trevigen's HT Glutathione Assay Kit (Item No. 7511-100-K; Gaithersburg, MD, USA). The absorbance was read at 405 nm in a Multiskan™ FC microplate reader (Thermo Scientific™, Vantaa, Finland). The levels of GSH were determined in duplicate (per sample) according to the GSH standard curve.

4.6. Apoptosis and Cell Viability

To evaluate apoptosis, necrosis, and cell viability, differential acridine AO/EB staining was performed using a technique previously adapted for peripheral blood [45]. Ten μL samples were centrifuged at $4500\times g$ for 5 min. The cell pellet was resuspended in 20 μL of AO/EB dye mix and plated on a clean slide. Two slides were prepared per mouse, and the analysis was performed immediately. The assessments were based upon 300 cells per mouse. Apoptotic, necrotic, viable, and nonviable cells were identified using a fluorescence microscope OPTIPHOT-2 (Nikon™; Tokyo, Japan) with blue excitation (480 nm) and a barrier filter emission (515–530 nm) at $40\times$ magnification.

4.7. Statistical Analysis

Each mouse was considered an independent replicate according to the OECD and EPA guidelines [29,31]. Individual samples were averaged for each experimental group. The MN frequencies, PCE/NCE ratio, viability (viable/nonviable cells), number of apop-

otic and necrotic cells, levels of 8-OHdG and GSH, and activities of SOD, GPx, and CAT are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The data were checked for normality using the Shapiro–Wilk test. Statistical significance between the groups for MN was determined by using two-way RM-ANOVA because MN depends on two factors (i.e., treatment and time). The treatment is independent, while the evaluations at each time are considered dependent since the samples were obtained from the same mouse. For the other parameters, one-way ANOVA was used because the evaluations depended only on one factor (i.e., treatment). In the analysis of ANOVA, post hoc Tukey multiple comparisons were carried out. GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for all analyses. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

5. Conclusions

Our findings demonstrate a protective effect of resveratrol against Cr(VI)-induced genotoxic damage, by reducing the frequency of MN induced by CrO₃ in vivo. Likewise, an approximation of the possible pathways involved in the protection of genotoxic damage induced by these compounds with carcinogenic potential, such as Cr(VI), was achieved. Resveratrol showed effects on the modulation of the endogenous antioxidant system, 8-OHdG adduct repair, and apoptosis when administered 4 h prior to Cr(VI) exposure. These effects suggest that these pathways might be involved in the protection provided by this polyphenol against genotoxic damage induced by Cr(VI). Although resveratrol treatment modified endogenous antioxidant system constituents, the dose of 50 mg/kg alone did not alter MN frequencies, suggesting that it is not related to the induction of DNA damage. In vivo studies using more diluted doses of resveratrol and even administering it in repeated doses, as well as direct evaluations in target organs, could help determine the specific mechanisms, by which resveratrol counteracts Cr(VI)-induced genotoxicity. These studies contribute to the understanding of the potential antigenotoxic value of polyphenols such as resveratrol, and to the exploration of their possible use as chemotherapeutic agents in the prevention and treatment of diseases related to genotoxic damage.

Author Contributions: Conceptualization, M.d.C.G.-R.; Methodology, T.N.-M.; Validation, M.d.C.G.-R., V.M.M.-N., A.R.O.-M.; Data Curation, T.N.-M., M.d.C.G.-R., V.M.M.-N. and A.R.O.-M.; Investigation, M.d.C.G.-R., T.N.-M.; Writing—Original Draft Preparation, TN.-M.; Writing—Review and Editing, M.d.C.G.-R., S.K. and T.N.-M.; Supervision, M.d.C.G.-R., S.K., A.R.O.-M. and V.M.M.-N.; Project Administration, M.d.C.G.-R.; Funding Acquisition, M.d.C.G.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by DGAPA-UNAM, Support Program for Research and Technological Innovation Projects, PAPIIT-IN224719; IN216122. The National Council of Science and Technology granted a scholarship for postgraduate studies (CONACyT, No. 703847) to Tonancy Nicolás-Méndez.

Institutional Review Board Statement: The Bioethics Committee of the “Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM” approved the experimental conditions and protocols (Code: FESZ/DEPI/363/14; FESZ/DEPI/CE/016/21).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Rauf, A.; Imran, M.; Suleria, H.A.R.; Ahmad, B.; Peters, D.G.; Mubarak, M.S. A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol. *Food Funct.* **2017**, *8*, 4284–4305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nicolás-Méndez, T.; Ortiz-Muñoz, A.R.; Mendoza-Núñez, V.M.; García-Rodríguez, M.C. The role of resveratrol on heavy metal-induced oxidative stress. *Nutr. Hosp.* **2020**, *37*, 374–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Gülçin, İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2010**, *11*, 210–218. [CrossRef]
4. Repposi, G.; Das, U.N.; Eynard, A.R. Molecular Basis of the Beneficial Actions of Resveratrol. *Arch. Med. Res.* **2020**, *51*, 105–114. [CrossRef] [PubMed]
5. Quincozes-Santos, A.; Andreazza, A.C.; Nardin, P.; Funchal, C.; Gonçalves, C.A.; Gottfried, C. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology* **2007**, *28*, 886–891. [CrossRef]
6. Zhang, Y.; Guo, L.; Law, B.Y.; Liang, X.; Ma, N.; Xu, G.; Wang, X.; Yuan, X.; Tang, H.; Chen, Q.; et al. Resveratrol decreases cell apoptosis through inhibiting DNA damage in bronchial epithelial cells. *Int. J. Mol. Med.* **2020**, *45*, 1673–1684. [CrossRef] [PubMed]
7. Burkhardt, S.; Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Hardeland, R.; Cabrera, J.; Karbownik, M. DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, *33*, 775–783. [CrossRef]
8. Chen, C.; Jiang, X.; Zhao, W.; Zhang, Z. Dual role of resveratrol in modulation of genotoxicity induced by sodium arsenite via oxidative stress and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *59*, 8–17. [CrossRef]
9. Zhao, X.; Zhang, K.P.; Huang, T.; Yan, C.C.; Liu, L.R.; Zhu, Q.L.; Guo, F.F.; Liu, C.; Li, B.X. The rescuable function and mechanism of resveratrol on As₂O₃-induced hERG K⁺ channel deficiency. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2014**, *387*, 1079–1089. [CrossRef]
10. Banu, S.K.; Stanley, J.A.; Sivakumar, K.K.; Arosh, J.A.; Burghardt, R.C. Resveratrol protects the ovary against chromium-toxicity by enhancing endogenous antioxidant enzymes and inhibiting metabolic clearance of estradiol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *303*, 65–78. [CrossRef]
11. Khalid, S.; Afzal, N.; Khan, J.A.; Hussain, Z.; Qureshi, A.S.; Anwar, H.; Jamil, Y. Antioxidant resveratrol protects against copper oxide nanoparticle toxicity in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2018**, *391*, 1053–1062. [CrossRef] [PubMed]
12. Rowbotham, A.L.; Levy, L.S.; Shuker, L.K. Chromium in the environment: An evaluation of exposure of the UK general population and possible adverse health effects. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **2000**, *3*, 145–178. [CrossRef] [PubMed]
13. EPA. Environmental Protection Agency. Toxicological review of hexavalent chromium. CAS No. 18540-29-9. In *Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). External Review Draft*; EPA/635/R-10/004⁹; Office of Research and Development: Washington, DC, USA, 2010; Volume 635. Available online: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/recordisplay.cfm?deid=221433# (accessed on 1 January 2022).
14. Shi, X.; Chiu, A.; Chen, C.T.; Halliwell, B.; Castranova, V.; Vallyathan, V. Reduction of chromium(VI) and its relationship to carcinogenesis. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **1999**, *2*, 87–104. [CrossRef] [PubMed]
15. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1–40. [CrossRef]
16. O'Brien, T.J.; Ceryak, S.; Patierno, S.R. Complexities of chromium carcinogenesis: Role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat. Res.* **2003**, *533*, 3–36. [CrossRef]
17. Mishra, S.; Bharagava, R.N. Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **2016**, *34*, 1–32. [CrossRef]
18. Patlolla, A.K.; Barnes, C.; Yedjou, C.; Velma, V.R.; Tchounwou, P.B. Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. *Environ. Toxicol.* **2009**, *24*, 66–73. [CrossRef]
19. García-Rodríguez, M.C.; Nicolás-Méndez, T.; Montaña-Rodríguez, A.R.; Altamirano-Lozano, M.A. Antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), quercetin, and rutin on chromium trioxide-induced micronuclei in the polychromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2014**, *77*, 324–336. [CrossRef]
20. de Freitas, K.S.; Squarisi, I.S.; Acésio, N.O.; Nicoletta, H.D.; Ozelin, S.D.; Reis Santos de Melo, M.; Guissone, A.; Fernandes, G.; Silva, L.M.; da Silva Filho, A.A.; et al. Licochalcone A, a licorice flavonoid: Antioxidant, cytotoxic, genotoxic, and chemopreventive potential. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2020**, *83*, 673–686. [CrossRef]
21. Sousa, H.G.; Uchôa, V.T.; Cavalcanti, S.; de Almeida, P.M.; Chaves, M.H.; Lima Neto, J.S.; Nunes, P.; da Costa Júnior, J.S.; Rai, M.; Do Carmo, I.S.; et al. Phytochemical screening, phenolic and flavonoid contents, antioxidant and cytogenotoxicity activities of *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae). *J. Toxicol. Environ. Health A* **2021**, *84*, 399–417. [CrossRef]
22. Gu, H.F.; Mao, X.Y.; Du, M. Prevention of breast cancer by dietary polyphenols-role of cancer stem cells. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 810–825. [CrossRef]
23. Majolo, F.; Bitencourt, S.; Wissmann Monteiro, B.; Viegas Haute, G.; Alves, C.; Silva, J.; Pinteus, S.; Santos, R.; Torquato, H.; Paredes-Gamero, E.J.; et al. Antimicrobial and antileukemic effects: In vitro activity of *Calyptanthus grandifolia* aqueous leaf extract. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2020**, *83*, 289–301. [CrossRef] [PubMed]
24. Wang, S.; Wang, H.; Wang, Y.; Chen, J.; Liu, J.; He, X.; Huang, D.; Wu, Y.; Chen, Y.; Weng, Z. Protective effects of (-)-epigallocatechin gallate and curcumin against acrylamide toxicity. *Toxicol. Environ. Chem.* **2021**, *103*, 199–218. [CrossRef]
25. Poulsen, H.E.; Nadal, L.L.; Broedbaek, K.; Nielsen, P.E.; Weimann, A. Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 801–808. [CrossRef] [PubMed]
26. García-Rodríguez, M.C.; López-Santiago, V.; Altamirano-Lozano, M.A. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat. Res.* **2001**, *496*, 145–151. [CrossRef]

27. Jomova, K.; Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **2011**, *283*, 65–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hayashi, M.; Sutou, S.; Shimada, H.; Sato, S.; Sasaki, Y.F.; Wakata, A. Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test. The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test/Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan. *Mutat. Res.* **1989**, *223*, 329–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. OECD. *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*; OECD: Paris, France, 2016. [[CrossRef](#)]
30. Pannu, N.; Bhatnagar, A. Resveratrol: From enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *109*, 2237–2251. [[CrossRef](#)]
31. EPA. Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5395. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101). US. 1998. EPA 712-C-98-226. Available online: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0156-0032> (accessed on 1 January 2022).
32. Hu, G.; Long, C.; Hu, L.; Xu, B.P.; Chen, T.; Gao, X.; Zhang, Y.; Zheng, P.; Wang, L.; Wang, T.; et al. Circulating lead modifies hexavalent chromium-induced genetic damage in a chromate-exposed population: An epidemiological study. *Sci. Total Environ.* **2021**, *752*, 141824. [[CrossRef](#)]
33. Maeng, S.H.; Chung, H.W.; Yu, I.J.; Kim, H.Y.; Lim, C.H.; Kim, K.J.; Kim, S.J.; Ootsuyama, Y.; Kasai, H. Changes of 8-OH-dG levels in DNA and its base excision repair activity in rat lungs after inhalation exposure to hexavalent chromium. *Mutat. Res.* **2003**, *539*, 109–116. [[CrossRef](#)]
34. Thompson, C.M.; Fedorov, Y.; Brown, D.D.; Suh, M.; Proctor, D.M.; Kuriakose, L.; Haws, L.C.; Harris, M.A. Assessment of Cr(VI)-induced cytotoxicity and genotoxicity using high content analysis. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e42720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Urbano, A.M.; Ferreira, L.M.; Alpoim, M.C. Molecular and cellular mechanisms of hexavalent chromium-induced lung cancer: An updated perspective. *Curr. Drug Metab.* **2012**, *13*, 284–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wise, S.S.; Wise, J.P.S. Chromium and genomic stability. *Mutat. Res.* **2012**, *733*, 78–82. [[CrossRef](#)]
37. Xia, H.; Ying, S.; Feng, L.; Wang, H.; Yao, C.; Li, T.; Zhang, Y.; Fu, S.; Ding, D.; Guo, X.; et al. Decreased 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (hOGG1) expression and DNA oxidation damage induced by Cr (VI). *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *299*, 44–51. [[CrossRef](#)]
38. Yan, Y.; Yang, J.Y.; Mou, Y.H.; Wang, L.H.; Zhou, Y.N.; Wu, C.F. Differences in the activities of resveratrol and ascorbic acid in protection of ethanol-induced oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 168–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Mikula-Pietrasik, J.; Kuczmarzka, A.; Rubiś, B.; Filas, V.; Murias, M.; Zieliński, P.; Piwocka, K.; Książek, K. Resveratrol delays replicative senescence of human mesothelial cells via mobilization of antioxidative and DNA repair mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 2234–2245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Truong, V.L.; Jun, M.; Jeong, W.S. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors* **2018**, *44*, 36–49. [[CrossRef](#)]
41. Leonard, S.S.; Xia, C.; Jiang, B.H.; Stinefelt, B.; Klandorf, H.; Harris, G.K.; Shi, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309*, 1017–1026. [[CrossRef](#)]
42. García-Rodríguez, M.C.; Serrano-Reyes, G.; Hernández-Cortés, L.M.; Altamirano-Lozano, M.A. Antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its relationship with the endogenous antioxidant system, 8-hydroxydeoxyguanosine adduct repair (8-OHdG), and apoptosis in mice exposed to chromium(VI). *J. Toxicol. Environ. Health A* **2021**, *84*, 331–344. [[CrossRef](#)]
43. O’Flaherty, E.J. A pharmacokinetic model for chromium. *Toxicol. Lett.* **1993**, *68*, 145–158. [[CrossRef](#)]
44. Moras, M.; Lefevre, S.D.; Ostuni, M.A. From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 1076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. García-Rodríguez, M.C.; Carvente-Juárez, M.M.; Altamirano-Lozano, M.A. 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. *Oxidative Med. Cell Longev.* **2013**, *2013*, 486419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Gallardo, M.J.; Suwalsky, M.; Ramirez, D.; Tapia, J.; Sepulveda, B. Antioxidant effect of resveratrol in single red blood cells measured by thermal fluctuation spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *665*, 30–35. [[CrossRef](#)]
47. Nwose, E.U.; Jelinek, H.F.; Richards, R.S.; Kerr, P.G. Erythrocyte oxidative stress in clinical management of diabetes and its cardiovascular complications. *Br. J. Biomed. Sci.* **2007**, *64*, 35–43. [[CrossRef](#)]
48. Zeitz, J.O.; Mohrmann, S.; Fehse, L.; Most, E.; Helmbrecht, A.; Saremi, B.; Eder, K. Tissue and plasma antioxidant status in response to dietary methionine concentration and source in broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2018**, *102*, 999–1011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Wani, P.A.; Hussaini, N.A.; Garba, S.H.; Wahid, S.; Damilola, F.K.; Adeola, A.A.; Wasii, I.A. Prospective of chromium (VI) reduction under in vitro and in vivo conditions and stimulation of antioxidant defense of cowpea under the exposure of Cr (VI). *Appl. Soil Ecol.* **2018**, *132*, 187–193. [[CrossRef](#)]
50. Wang, X.F.; Xing, M.L.; Shen, Y.; Zhu, X.; Xu, L.H. Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology* **2006**, *228*, 16–23. [[CrossRef](#)]

51. Matés, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **2000**, *153*, 83–104. [[CrossRef](#)]
52. Franco, R.; Cidlowski, J.A. Apoptosis and glutathione: Beyond an antioxidant. *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 1303–1314. [[CrossRef](#)]
53. Upadhyay, G.; Singh, A.K.; Kumar, A.; Prakash, O.; Singh, M.P. Resveratrol modulates pyrogallol-induced changes in hepatic toxicity markers, xenobiotic metabolizing enzymes and oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *596*, 146–152. [[CrossRef](#)]
54. Chow, H.H.; Garland, L.L.; Hsu, C.H.; Vining, D.R.; Chew, W.M.; Miller, J.A.; Perloff, M.; Crowell, J.A.; Alberts, D.S. Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. *Cancer Prev. Res.* **2010**, *3*, 1168–1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Li, Y.; Cao, Z.; Zhu, H. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol. Res.* **2006**, *53*, 6–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Rodrigo, R.; Gil-Becerra, D. Implications of polyphenols on endogenous antioxidant defense systems in human diseases. In *Polyphenols in Human Health and Disease*; Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2014; pp. 201–217. [[CrossRef](#)]
57. Yao, J.; Wang, J.Y.; Liu, L.; Li, Y.X.; Xun, A.Y.; Zeng, W.S.; Jia, C.H.; Wei, X.X.; Feng, J.L.; Zhao, L.; et al. Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch. Med. Res.* **2010**, *41*, 288–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Lau, W.L.; Liu, S.M.; Pahlevan, S.; Yuan, J.; Khazaeli, M.; Ni, Z.; Chan, J.Y.; Vaziri, N.D. Role of Nrf2 dysfunction in uremia-associated intestinal inflammation and epithelial barrier disruption. *Dig. Dis. Sci.* **2015**, *60*, 1215–1222. [[CrossRef](#)]
59. Zhuang, Y.; Wu, H.; Wang, X.; He, J.; He, S.; Yin, Y. Resveratrol Attenuates Oxidative Stress-Induced Intestinal Barrier Injury through PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway. *Oxidative Med. Cell Longev.* **2019**, *2019*, 7591840. [[CrossRef](#)]
60. Ungvari, Z.; Orosz, Z.; Rivera, A.; Labinskyy, N.; Xiangmin, Z.; Olson, S.; Podlutzky, A.; Csiszar, A. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *292*, H2417–H2424. [[CrossRef](#)]
61. Krishna, G.; Hayashi, M. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* **2000**, *455*, 155–166. [[CrossRef](#)]
62. Hu, G.; Zheng, P.; Feng, H.; Jia, G. Imbalance of oxidative and reductive species involved in chromium(VI)-induced toxic effects. *React. Oxyg. Species* **2017**, *3*, 1–11. [[CrossRef](#)]
63. Chiu, A.; Shi, X.L.; Lee, W.K.; Hill, R.; Wakeman, T.P.; Katz, A.; Xu, B.; Dalal, N.S.; Robertson, J.D.; Chen, C.; et al. Review of chromium (VI) apoptosis, cell-cycle-arrest, and carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **2010**, *28*, 188–230. [[CrossRef](#)]
64. Wu, Y.H.; Lin, J.C.; Wang, T.Y.; Lin, T.J.; Yen, M.C.; Liu, Y.H.; Wu, P.L.; Chen, F.W.; Shih, Y.L.; Yeh, I.J. Hexavalent chromium intoxication induces intrinsic and extrinsic apoptosis in human renal cells. *Mol. Med. Rep.* **2020**, *21*, 851–857. [[CrossRef](#)]
65. Takashina, M.; Inoue, S.; Tomihara, K.; Tomita, K.; Hattori, K.; Zhao, Q.L.; Suzuki, T.; Noguchi, M.; Ohashi, W.; Hattori, Y. Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on the type of human cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2017**, *50*, 787–797. [[CrossRef](#)]
66. Mirzapour, P.; Khazaei, M.R.; Moradi, M.T.; Khazaei, M. Apoptosis induction in human breast cancer cell lines by synergic effect of raloxifene and resveratrol through increasing proapoptotic genes. *Life Sci.* **2018**, *205*, 45–53. [[CrossRef](#)]
67. Martins, L.A.; Coelho, B.P.; Behr, G.; Pettenuzzo, L.F.; Souza, I.C.; Moreira, J.C.; Borjevic, R.; Gottfried, C.; Guma, F.C. Resveratrol induces pro-oxidant effects and time-dependent resistance to cytotoxicity in activated hepatic stellate cells. *Cell Biochem. Biophys.* **2014**, *68*, 247–257. [[CrossRef](#)]
68. Shaito, A.; Posadino, A.M.; Younes, N.; Hasan, H.; Halabi, S.; Alhababi, D.; Al-Mohannadi, A.; Abdel-Rahman, W.M.; Eid, A.H.; Nasrallah, G.K.; et al. Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2084. [[CrossRef](#)]
69. Sinha, D.; Sarkar, N.; Biswas, J.; Bishayee, A. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.* **2016**, *40–41*, 209–232. [[CrossRef](#)]
70. Yu, M.; Xue, J.; Li, Y.; Zhang, W.; Ma, D.; Liu, L.; Zhang, Z. Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced nephrotoxicity by facilitating arsenic metabolism and decreasing oxidative stress. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87*, 1025–1035. [[CrossRef](#)]
71. Asadi, S.; Moradi, M.N.; Khyripour, N.; Goodarzi, M.T.; Mahmoodi, M. Resveratrol Attenuates Copper and Zinc Homeostasis and Ameliorates Oxidative Stress in Type 2 Diabetic Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **2017**, *177*, 132–138. [[CrossRef](#)]
72. Marques, F.Z.; Morris, J.B. Commentary on resveratrol and hormesis: Resveratrol—A hormetic marvel in waiting? *Hum. Exp. Toxicol.* **2010**, *29*, 1026–1028. [[CrossRef](#)]
73. Petrella, C.; Carito, V.; Carere, C.; Ferraguti, G.; Ciafrè, S.; Natella, F.; Bello, C.; Greco, A.; Ralli, M.; Mancinelli, R.; et al. Oxidative stress inhibition by resveratrol in alcohol-dependent mice. *Nutrition* **2020**, *79–80*, 110783. [[CrossRef](#)]
74. Hayashi, M.; Morita, T.; Kodama, Y.; Sofuni, T.; Ishidate, M., Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* **1990**, *245*, 245–249. [[CrossRef](#)]



Revisión

El papel del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por metales pesados *The role of resveratrol on heavy metal-induced oxidative stress*

Tonancy Nicolás-Méndez¹, Alda Rocío Ortiz-Muñoz², Víctor Manuel Mendoza-Núñez² y María del Carmen García-Rodríguez¹

Unidades de Investigación en ¹Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), y en ²Gerontología. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). CDMX, México. ³Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. UAM. CDMX, México.

Resumen

Introducción y objetivos: el estrés oxidante se considera uno de los principales mecanismos de genotoxicidad y carcinogenicidad de los metales pesados. Por otra parte, el resveratrol posee propiedades antioxidantes y es uno de los polifenoles más estudiados debido a su gran variedad de efectos benéficos para la salud. Sin embargo, no hay revisiones sistemáticas de la literatura científica en las que se analicen los efectos del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por metales pesados.

Métodos: en esta revisión se realizó una búsqueda de artículos mediante las bases de datos PubMed® y ScienceDirect® (1996-2018). Después de aplicar diversos filtros, se consideraron once investigaciones *in vivo* e *in vitro* en las que se estudiaron los efectos del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por el arsénico (As), el cadmio (Cd), el cobre (Cu), el cromo (Cr) y el hierro (Fe).

Resultados: en la revisión se presenta un análisis de los efectos químicos del resveratrol sobre el estrés oxidante asociado a la exposición a compuestos metálicos. Se discute la interacción del resveratrol con la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el sistema antioxidante endógeno, y sus efectos sobre el daño del ADN. A partir de estos estudios se genera un diagrama que muestra las interacciones propuestas para el resveratrol, los metales pesados As, Cd, Cu, Cr y Fe, y el estrés oxidante.

Conclusiones: los estudios analizados muestran que el resveratrol es capaz de modular el estrés oxidante generado por diferentes compuestos de metales pesados como As, Cd, Cu, Cr y Fe.

Palabras clave:

Polifenoles.
Antioxidantes.
Resveratrol. Estrés oxidativo. Metales pesados.

Abstract

Introduction and objectives: oxidative stress is considered one of the main mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity of heavy metals. In contrast, resveratrol has antioxidant properties and is one of the most studied polyphenols due to its wide variety of beneficial health effects. However, there are no systematic reviews of the scientific literature in which the effects of resveratrol on oxidative stress induced by heavy metals are analyzed.

Methods: in this review, articles were searched using the PubMed® and ScienceDirect® databases (1996-2018). After applying various filters, eleven *in vivo* and *in vitro* researches were considered, in which the effects of resveratrol on oxidative stress as induced by arsenic (As), cadmium (Cd), copper (Cu), chromium (Cr) and iron (Fe) were studied.

Results: this review presents an analysis of the chemical effects of resveratrol on the oxidative stress associated with exposure to metal compounds. The interaction of resveratrol with the production of reactive oxygen species (ERO), the endogenous antioxidant system, and the effects on DNA damage are discussed. From these studies a diagram that shows the proposed interactions for resveratrol, heavy metals As, Cd, Cu, Cr and Fe, and oxidative stress is generated.

Conclusions: the studies analyzed show that resveratrol is able to modulate the oxidative stress generated by different heavy metal compounds such as As, Cd, Cu, Cr and Fe.

Keywords:

Polyphenols.
Antioxidants.
Resveratrol. Oxidative stress. Heavy metals.

Recibido: 02/09/2019 • Aceptado: 14/11/2019

Financiación: El estudio forma parte del proyecto PAPIIT-IN224719;IN219216, financiado por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) mediante la DGAPA-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica.

Conflicto de intereses: los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Nicolás-Méndez T, Ortiz-Muñoz AR, Mendoza-Núñez VM, García-Rodríguez MC. El papel del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por metales pesados. Nutr Hosp 2020;37(2):374-383

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.02846>

©Copyright 2020 SENPE y Arán Ediciones S.L. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

Correspondencia:

María del Carmen García-Rodríguez. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN). Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). CDMX, México
e-mail: carmen.garcia@unam.mx

INTRODUCCIÓN

Diversas enfermedades crónicas no degenerativas, como el cáncer, están asociadas al estilo de vida y los factores ambientales (1). En este sentido, los metales pesados han recibido especial atención debido a la exposición creciente de las poblaciones a los mismos por sus usos industriales. Metales como As, Cd, Cu, Cr y Fe se han asociado a procesos inflamatorios y, particularmente, a la inducción de cáncer (hígado, riñón, pulmón, próstata y piel) (1-3). La toxicidad de los metales se presenta cuando estos no son metabolizados por el organismo y se depositan en los tejidos (4). Su acumulación en las células implica la generación de estrés oxidante, al incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres, donde el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) se consideran los más importantes para la mutagénesis y la carcinogénesis (2,5,6). La inducción excesiva de ERO y radicales libres puede sobrepasar la capacidad antioxidante de la célula para mantener el estado reducido (1,7). Por lo tanto, se ha propuesto que una fuente externa de antioxidantes podría ayudar a mantener la homeostasis redox celular y a proteger frente a los efectos deletéreos del estrés oxidante (8-11). En consecuencia, la búsqueda de compuestos no tóxicos con propiedades antioxidantes, como los polifenoles, se ha incrementado en los últimos años, siendo el resveratrol uno de los más estudiados debido a la gran variedad de efectos benéficos para la salud que se han observado y que se han atribuido a sus propiedades antioxidantes (12,13). El resveratrol ha demostrado poseer efectos protectores frente a la diabetes mellitus de tipo 2, los desórdenes cardiovasculares, las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (14). También se ha observado que presenta propiedades reductoras de la glucosa en sangre, antiplaquetarias y antiinflamatorias. De ahí que se considere al resveratrol como un potente agente quimiopreventivo y sea uno de los polifenoles más estudiados (12,13,15-23).

La estructura química del resveratrol consiste en dos anillos aromáticos unidos mediante un doble enlace de metileno, configuración común de los resorcinoles, por la que el resveratrol recibe su nombre y su clasificación dentro de los estilbenos (trans-3,4',5-trihidroxiestilbeno) (24). El resveratrol es un compuesto polifenólico no flavonoide sintetizado por una gran variedad de plantas en respuesta al estrés ambiental. Se encuentra en altas concentraciones en las uvas rojas, las bayas y los cacahuates (24-26). Se ha reportado que la actividad biológica de este polifenol depende principalmente del número y la posición de los grupos hidroxilo (OH), y que esta estructura molecular le permite: eliminar radicales libres, inhibir la oxidación lipídica, reducir la formación de hidroperóxidos e interactuar con el sistema antioxidante endógeno incrementando la actividad catalítica de enzimas como la glutatión-peroxidasa (GPx), la glutatión-reductasa (GR), la catalasa y la superóxido-dismutasa (SOD) (11,13,27,28). También se ha observado la modulación de diversos mecanismos fisiológicos mediante la regulación de la expresión de genes y vías de señalización (29,30) y, aunque en los últimos años las propiedades del resveratrol se han estudiado ampliamente tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, hay poca información sobre sus propiedades

antioxidantes contra los efectos nocivos de los metales pesados. De ahí que el objetivo de este artículo sea presentar una revisión sistemática de la literatura científica referente al efecto del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por metales pesados.

MATERIAL Y MÉTODO

ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Para la elaboración de esta revisión se realizó una búsqueda de artículos a través de las bases de datos PubMed® y ScienceDirect® de mayo a diciembre de 2018. Las palabras clave utilizadas fueron: polifenoles, resveratrol, antioxidante, estrés oxidante, metales pesados, arsénico, cadmio, cobre, cromo y hierro; se realizaron con ellas distintas combinaciones. Del mismo modo, estos términos se utilizaron en inglés: *polyphenols, resveratrol, antioxidant, oxidative stress, heavy metals, arsenic, cadmium, copper, chromium and iron*. La especificidad, la calidad metodológica y la evidencia científica de los estudios se valoraron, para llevar a cabo la selección de los artículos, de acuerdo con el objetivo de esta revisión.

Criterios de inclusión

La evaluación y selección de los artículos se realizó de acuerdo con los siguientes criterios: a) artículos originales (*in vivo* e *in vitro*); b) metodología y resultados específicos para la recopilación de datos; c) evaluación de marcadores de estrés oxidante y d) determinación del daño genotóxico.

Criterios de exclusión

Se excluyeron los artículos de revisión, las tesis, los protocolos, los resúmenes y los libros.

Selección de los estudios

Dos expertos en los temas de estrés oxidante, metales pesados y polifenoles realizaron de manera independiente y por separado la búsqueda y el análisis de los estudios, considerando: título, Resumen, introducción, métodos, resultados y discusión. La información obtenida se sintetizó y ordenó. Finalmente se seleccionaron 11 artículos bajo los criterios de inclusión/exclusión. Las referencias de cada estudio también se evaluaron con la finalidad de localizar información de interés.

RESULTADOS

Aproximadamente, el 34 % de los estudios realizados con polifenoles corresponden al resveratrol. De los estudios realizados

con resveratrol se destacan los de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, así como los de sus efectos contra el cáncer y el estrés oxidante. Recientemente han surgido estudios sobre sus efectos en la diabetes y la obesidad; sin embargo, hay pocos sobre los efectos de metales pesados con propiedades cancerígenas mediadas por el estrés oxidante (Fig. 1). La búsqueda electrónica inicial permitió encontrar un total de 52.521 artículos con las palabras clave *polifenoles, resveratrol, antioxidante, estrés oxidante, metales pesados, arsénico, cadmio, cobre, cromo y hierro*. El primer filtro de selección consistió en descartar los estudios duplicados, eliminándose así 2.626 estudios. A los 49.895 artículos restantes se les aplicó un segundo filtro de elegibilidad que consistió en la revisión del título y el Resumen para corroborar si en el contenido de este se consideraban el resveratrol, el estrés oxidante y los metales pesados; con este segundo filtro se eliminaron 40.244. A los artículos restantes se les realizó un análisis de la metodología, los resultados y la discusión; se consideraron solo aquellos que presentaban una metodología clara y una evaluación de los efectos del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por metales pesados; con este proceso se hizo una selección de 413 estudios. Finalmente se aplicó el último criterio que consistió en excluir aquellos estudios que empleaban suplementos, nanopartículas o encapsulados, así como aquellos en que se administraban complejos resveratrol-metal con la finalidad de estudiar sus efectos sobre líneas celulares.

Después de aplicar estos filtros se consideraron 11 artículos *in vivo* e *in vitro*, en los que se estudiaron los efectos del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por los metales As, Cd, Cu, Cr y Fe (Fig. 2).

En la tabla I se muestra el Resumen sistemático de los artículos seleccionados sobre resveratrol y metales. Se incluyen los siguientes datos: referencia, dosis de resveratrol, dosis de metal y tipo de estudio/diseño experimental. En la tabla II se resume la eficiencia mostrada de las dosis de resveratrol. Las metodologías de los estudios incluyen procedimientos tanto *in vivo* como *in vitro*. La evaluación de los efectos del resveratrol sobre el estrés oxidante generado por compuestos metálicos se determinó mediante distintos biomarcadores tales como la concentración y actividad de antioxidantes endógenos (GSH, GSSG, GPx, SOD y catalasa), los niveles de H_2O_2 , la concentración de malondialdehído (MDA) o ácido tiobarbitúrico (ATB) y la concentración de coactivadores del sistema antioxidante endógeno como la gamma-glutamils-cisteína-sintasa (γ -GCS), el receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma coactivador 1 (PGC-1), el "forkhead box O" (por sus siglas en inglés, FoxO3a) y la sirtuina 3 (Sirt3). Por su parte, el daño del ADN se midió mediante la concentración del aducto 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), la inducción de micronúcleos y los rompimientos de cadena sencilla mediante electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa). Algunos estudios evaluaron también el efecto del tratamiento con resveratrol sobre la concentración de iones metálicos y la inducción de apoptosis.

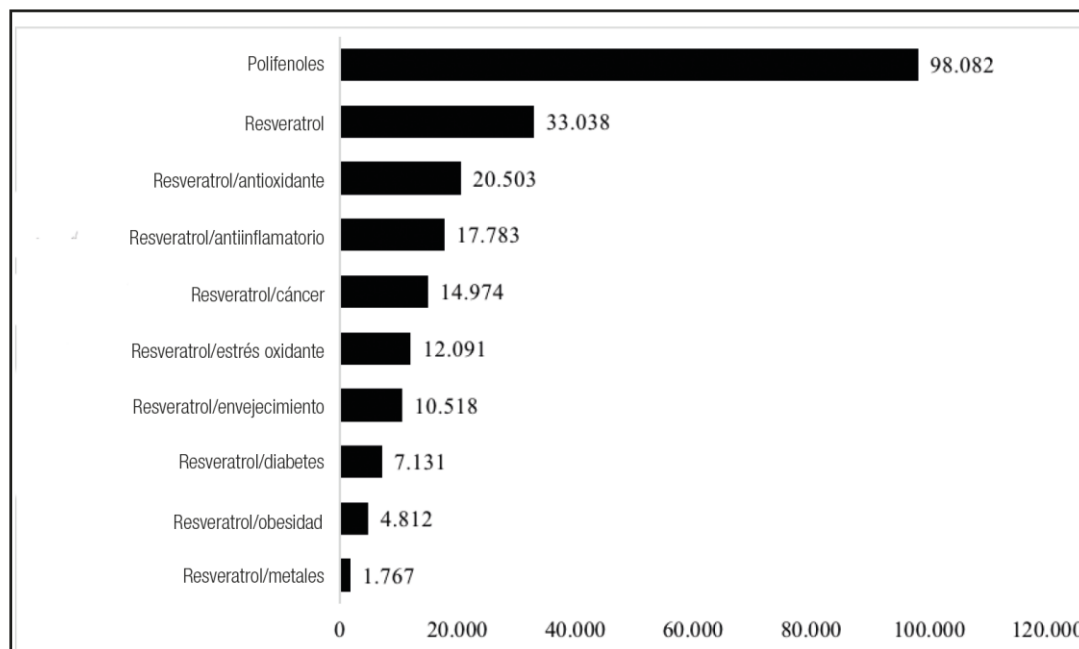


Figura 1.

Artículos relacionados con el estudio de los polifenoles y de las propiedades del resveratrol (del año 1996 al 2018; fuente: PubMed® y ScienceDirect®).

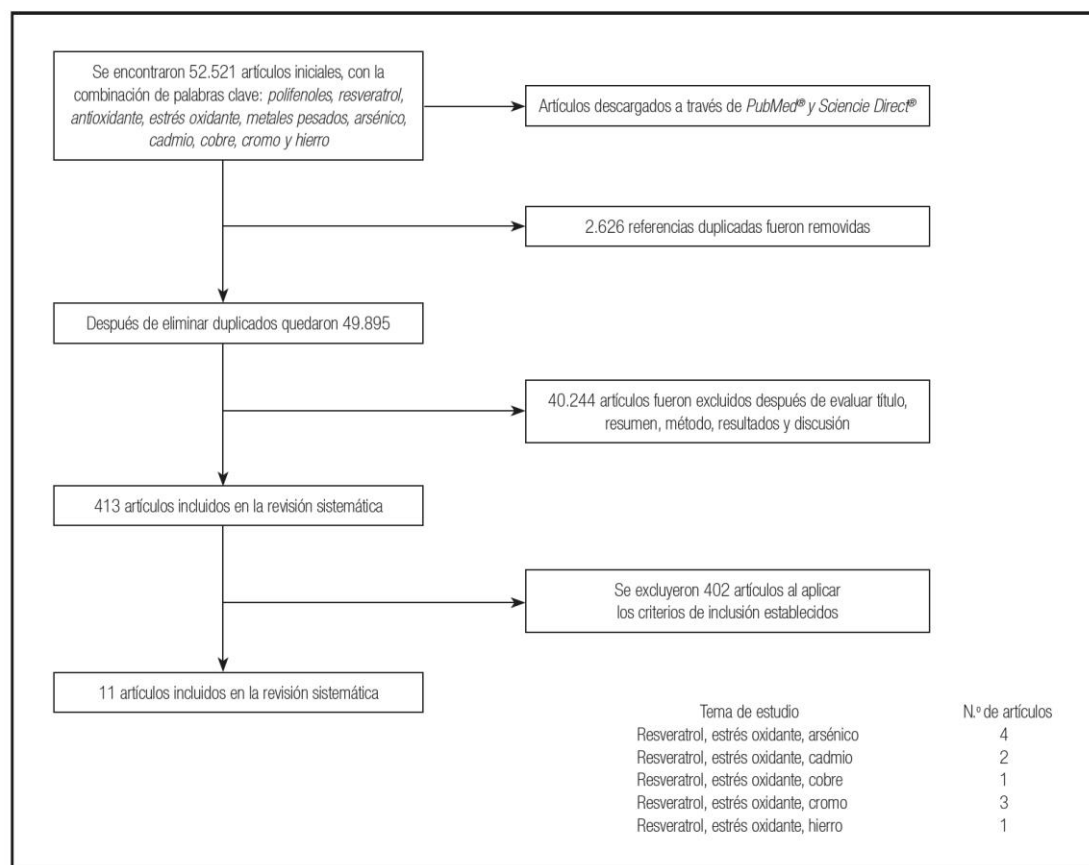


Figura 2.
Diagrama de selección de los estudios incluidos en esta revisión sistemática.

DISCUSIÓN

EFFECTO DEL RESVERATROL SOBRE EL DAÑO OXIDANTE INDUCIDO POR EL ARSÉNICO

El As es un importante contaminante ambiental. Estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición crónica a este metal está asociada a un incremento en la incidencia de diversos tipos de cáncer (pulmón, piel e hígado). Muchos estudios han confirmado la generación de ERO durante el metabolismo del As y se ha relacionado con el daño oxidante a lípidos, proteínas y ADN en las células expuestas a este metal (6,7). En la búsqueda de artículos se encontraron 4 en los que se evaluó el efecto del resveratrol sobre el daño del ADN y el estrés oxidante inducidos por la exposición a arsénico (Tabla I). Zhao y cols. (31) reportan el efecto del resveratrol, *in vivo* e *in vitro*, sobre el estrés oxidante inducido por trióxido de arsénico (As_2O_3). Observaron que la exposición de la línea celular (H9c2) a 0,1-10 μM y el

tratamiento de ratones con 3 mg/kg de resveratrol presentaron efectos benéficos. En ambos modelos se observó una disminución de la actividad de las enzimas GPx, SOD y catalasa, así como un incremento del índice apoptótico con el tratamiento único de As_2O_3 . En cambio, la administración previa de resveratrol restaura significativamente la actividad de las enzimas evaluadas, disminuye el índice de células apoptóticas e incrementa la viabilidad celular. En el modelo *in vitro* también evaluaron la producción de ERO y reportaron su disminución con el tratamiento previo con resveratrol. Asimismo, observaron una regulación de la actividad de la caspasa 3 y una disminución de la concentración de iones Ca^{2+} . Por otra parte, Chen y cols. (32) también observaron efectos del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por arsénico. Evaluaron el efecto del arsenito de sodio ($NaAsO_2$) y del resveratrol en células de carcinoma pulmonar (A549). Midieron la producción de ERO, los niveles de GSH, la actividad de SOD, el daño al ADN, la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la viabilidad celular. Observaron que el tratamiento con 30 μM de $NaAsO_2$ presenta

Tabla I. Resumen sistemático de los artículos analizados (resveratrol y metales) de acuerdo con los criterios establecidos

Referencia	Dosis de resveratrol	Dosis de metal	Tipo de estudio/diseño experimental
31	3 mg/kg 10 μ M	As 1 mg/kg 10 μ M	<i>In vivo</i> /evaluación de la actividad de GPx, SOD y catalasa, y del índice apoptótico <i>In vitro</i> /evaluación de la producción de ERO, viabilidad celular y actividad de caspasa 3
32	1 a 20 μ M	As 30 μ M	<i>In vitro</i> /evaluación de la generación de ERO, los niveles de GSH, la actividad de SOD, el daño del ADN mediante MN y electroforesis unicelular alcalina
33	8 mg/kg	As 3 mg/kg	<i>In vivo</i> /evaluación de los niveles de GSH y GSH/GSSG, y la producción de ERO
34	8 mg/kg	As 3 mg/kg	<i>In vivo</i> /evaluación de la actividad de GPx, SOD y catalasa, así como de los niveles de la relación GSH/GSSG
35	20 mg/kg	Cd 7 mg/kg	<i>In vivo</i> /evaluación de MDA, niveles de GSH, actividad de GPx, catalasa y concentración de Cd
36	10 mg/kg	Cd 2 mg/kg	<i>In vivo</i> /evaluación de la función mitocondrial y la concentración de las proteínas de SOD2, FoxO3a, PGC-1 α y Sirt3
37	100 μ M	Cu 10 μ M	<i>In vitro</i> /medición de los niveles de ATB, GSH, GSSG y GSH/GSSG
38	0,01, 0,05, 0,10, 0,50, 5,0 y 10,0 μ M	Cr (III) 500 μ M	<i>In vitro</i> /evaluación de los niveles de 8-OHdG en el ADN de células aisladas del timo
39	10 mg/kg	Cr (VI) 50 ppm	<i>In vivo</i> /evaluación de los niveles de H ₂ O ₂ , la peroxidación lipídica, la expresión de GPx1, SOD1/2 y catalasa, y el índice apoptótico
11	50 mg/kg	Cr (VI) 20 mg/kg	<i>In vivo</i> /evaluación de la concentración en plasma de 8-OHdG; frecuencia de micronúcleos y células apoptóticas; niveles de GSH y actividad de SOD
40	30, 60 o 90 mg/kg	Fe 100 mg/kg	<i>In vivo</i> /determinación de la actividad de GPx, SOD y catalasa, y de los niveles de MDA

una marcada disminución de la actividad y la concentración de SOD y GSH, respectivamente, así como un incremento de la producción de ERO y la frecuencia de MN y de cometas. Cuando el resveratrol se administró antes de la exposición de las células al arsénico, se observaron dos efectos principales. Los autores reportaron que, cuando se administraron dosis de 1 y 5 μ M de resveratrol antes del tratamiento con NaAsO₂, se incrementaron la concentración de GSH, la actividad de la SOD, la viabilidad y la proliferación celular, mientras que disminuyeron la producción de ERO, la frecuencia de MN y cometas, y la apoptosis. Por otro lado, cuando las células se expusieron a dosis más altas de resveratrol (10 y 20 μ M), se observaron efectos contrarios. Con estos resultados concluyen que el tratamiento previo con resveratrol puede proteger a las células de los efectos tóxicos del NaAsO₂. No obstante, también reportan un efecto dual cuando se incrementan las dosis de resveratrol, enfatizando el efecto antígenotóxico del resveratrol de manera dosis-dependiente. Zhang y cols. (33) sugieren que el pretratamiento con 8 mg/kg de resveratrol por 4 días protege del estrés oxidante inducido en pulmones de ratas expuestas a trióxido de arsénico (As₂O₃), sugiriendo que la suplementación con resveratrol podría disminuir la toxicidad en los individuos expuestos a este metal. Observaron que la exposición a As induce un incremento de la producción de ERO, mientras que disminuye la actividad de γ -GCS, los niveles de GSH y el cociente GSH/GSSG. Sin embargo, cuando administraron el resveratrol antes del tratamiento con As₂O₃, tuvo

lugar una disminución de las ERO, así como un incremento de la actividad de γ -GCS. En su análisis de la concentración de GSH y la relación GSH/GSSG describen que el pretratamiento con resveratrol es capaz de restaurar estos niveles. Para determinar el grado de estrés oxidante también evaluaron el contenido de As del tejido pulmonar y observaron una disminución significativa del mismo con la administración previa de resveratrol, concluyendo que, bajo sus condiciones experimentales, el tratamiento con este polifenol puede atenuar las lesiones pulmonares inducidas por la exposición a As. En una segunda publicación, Zhang y cols. (34) reportan que el pretratamiento con 8 mg/kg de resveratrol puede atenuar la hepatotoxicidad generada por el estrés oxidante inducido por el As₂O₃. Observaron que el tratamiento con resveratrol antes de la exposición a As incrementa significativamente la actividad de GPx, catalasa y SOD con respecto al grupo tratado únicamente con As. También reportaron un incremento de los niveles de GSH/GSSG que corrobora los resultados previamente reportados. Asimismo, el pretratamiento con resveratrol disminuye de manera significativa los niveles de As, concluyendo los autores que también es capaz de prevenir la hepatotoxicidad inducida por As al incrementar la actividad de enzimas antioxidantes y disminuir sus niveles invasivos.

Aunque los trabajos anteriores se conducen por metodologías distintas, reportan resultados similares, es decir, se observan efectos benéficos del pretratamiento con resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por los compuestos de As. En todos

Tabla II. Resumen de la eficiencia de las dosis empleadas de resveratrol

Metal	Referencia	Tipo de estudio	Dosis de resveratrol	Eficiencia
Arsénico	32 31	<i>In vitro</i>	1 a 5 μ M 10 μ M	Incrementa los niveles de GSH y la actividad de SOD Disminuye la frecuencia de MN y cometas (rompimientos de cadena doble de ADN) Restaura la actividad de GPx, SOD y catalasa Disminuye la producción de ERO
	31 33, 34	<i>In vivo</i>	3 mg/kg 8 mg/kg	Incrementa los niveles de GSH y GSH/GSSG Disminuye la concentración de ERO Restaura la actividad de GPx, SOD y catalasa Restaura la relación GSH/GSSG
Cadmio	36 35	<i>In vivo</i>	10 mg/kg 20 mg/kg	Reduce los niveles de ERO mitocondriales mediante la Sirt3, la regulación de FoxO3a y el incremento de PGC-1 α y SOD2 Disminuye la peroxidación lipídica y restaura la actividad de GPx y catalasa No presenta efectos sobre el metabolismo intracelular del Cd No presenta efectos sobre los niveles de GSH
Cobre	37	<i>In vitro</i>	100 μ M	Incrementa la concentración de antioxidantes endógenos como GSH y regula la relación GSH/GSSG
Cromo (III)	38	<i>In vitro</i>	0,01, 0,05, 0,10, 0,50, 5,0 y 10,0 μ M	Disminuye la presencia del aducto 8-OHdG de forma dosis-dependiente
Cromo (VI)	39 11	<i>In vivo</i>	10 mg/kg 50 mg/kg	Disminuye los niveles de H ₂ O ₂ y la peroxidación lipídica Incrementa los niveles de GPx1, SOD1,2 y catalasa Disminuye la apoptosis Protege contra el daño genotóxico inducido por el Cr
Hierro	40	<i>In vivo</i>	30, 60 o 90 mg/kg	Incrementa la actividad de GPx y SOD Disminuye los niveles de MDA.

los artículos se reportaron tanto el restablecimiento de las concentraciones de GSH como la restauración de la actividad de enzimas antioxidantes, GPx, SOD y catalasa. Además, distinguen una disminución del daño del ADN, lo que respalda los efectos propuestos para el resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por compuestos metálicos.

EFFECTO DEL RESVERATROL SOBRE EL DAÑO OXIDANTE INDUCIDO POR CADMIO

La exposición a grandes concentraciones de este metal puede inducir toxicidad, daño oxidante del ADN e inhibición de enzimas antioxidantes, y desencadenar efectos adversos sobre la salud (6,7). Se encontraron dos artículos en los que se evaluó el efecto del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por la exposición a Cd (Tabla I). Eybl y cols. (35) presentan un estudio diseñado para evaluar el efecto del resveratrol sobre el daño oxidante inducido en ratones por la exposición a Cd, y reportan que el tratamiento por tres días con 20 mg/kg de resveratrol antes de

la dosis administrada de cloruro de cadmio (CdCl₂) fue efectivo para disminuir significativamente los niveles de MDA que se incrementaron con la administración única del metal, sugiriendo que el resveratrol puede disminuir la peroxidación lipídica. En cuanto a los niveles de GSH, el pretratamiento con resveratrol no modifica la concentración de este antioxidante; sin embargo, sí restaura significativamente la actividad de GPx y catalasa, mientras que la administración sola del polifenol no induce modificaciones significativas sobre los parámetros medidos. De esta manera se concluye que el tratamiento con resveratrol, en el tiempo y dosis establecidos, protege efectivamente contra la peroxidación lipídica inducida por Cd, además de que puede restaurar la actividad de las enzimas antioxidantes evaluadas. Por otro lado, Fu y cols. (36) reportan un efecto del tratamiento con resveratrol sobre la función mitocondrial de células tubulares renales (TCMK-1). En este estudio observaron que el tratamiento de las células TCMK-1 con Cd incrementa significativamente la producción mitocondrial de ERO disminuyendo también la biogénesis y la función de este organelo mientras que decrece la expresión de SOD2, PGC-1 α y Sirt3, y promueve la acetilación de FoxO3a. Observaron que

con la administración de 10 mg/kg de resveratrol antes del tratamiento con Cd se reducen los niveles de generación de ERO, lo que atribuyeron al incremento de la expresión de Sirt3, SOD2, PGC-1 α y FoxO3a, que estimulan la biogénesis mitocondrial y la actividad de la cadena de transporte de electrones, suprimiendo la producción de ERO y, consecuentemente, protegiendo a la célula del daño oxidante. Los autores proponen la activación de Sirt3/FoxO3a como mecanismo por el cual el resveratrol podría proteger del daño celular inducido por Cd.

EFFECTO DEL RESVERATROL SOBRE EL DAÑO OXIDANTE INDUCIDO POR COBRE

El Cu es un elemento esencial utilizado como cofactor catalítico de muchas enzimas. Sin embargo, la exposición excesiva a este metal incrementa la producción de ERO mediante la reacción de Fenton, lo que daña lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (1). Los compuestos derivados del Cu se utilizan ampliamente en la industria, lo que provoca un incremento de los niveles de este metal en el aire, el agua y los alimentos. De ello se deriva la importancia del posible uso de polifenoles para prevenir o contrarrestar el daño inducido por la exposición a metales. En la revisión realizada se encontró un solo artículo en el que se evalúa el efecto del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por la exposición a Cu (Tabla I). Arnal y cols. (37) evaluaron el efecto del resveratrol sobre cultivos celulares (HepG2 y A-549) expuestos a Cu y reportan que el tratamiento con 100 μ M de resveratrol incrementa los niveles de GSH y GSSG en ambos tipos de células, mientras que la relación GSH/GSSG se mantiene constante en todos los cultivos. Con relación al efecto sobre la peroxidación lipídica, observaron que el tratamiento previo con resveratrol incrementa significativamente los niveles de ATB con respecto a las células expuestas únicamente a Cu, concluyendo que el tratamiento con resveratrol no fue eficiente para proteger a las células de los efectos adversos del Cu.

EFFECTO DEL RESVERATROL SOBRE EL DAÑO OXIDANTE INDUCIDO POR CROMO

Los compuestos de Cr (VI) son frecuentemente utilizados en la industria y son carcinógenos conocidos. Los efectos tóxicos y genotóxicos del Cr (VI) están relacionados con su estado de oxidación y el tiempo de exposición a este metal. El cromo trivalente Cr (III) es esencial para el metabolismo de la glucosa, mientras que el cromo hexavalente Cr (VI) se considera que es carcinógeno para los seres humanos expuestos. Los compuestos de Cr (VI) pueden generar ERO durante su reducción a Cr (III), induciendo daño en biomoléculas tales como el ADN mediante la formación de aductos (8-OHdG) (6). Burkhardt y cols. (38) reportaron el efecto del tratamiento con resveratrol sobre el daño oxidante del ADN inducido por Cr (III). En su estudio *in vitro*, las células se trataron con 500 μ M de cloruro de cromo (CrCl₃) y con 0,01, 0,05, 0,10, 0,50, 5,0 y 10,0 μ M de resveratrol. Observaron que el tratamiento

previo con resveratrol disminuye los niveles de 8-OHdG en el ADN de manera dosis-dependiente. Concluyen que el resveratrol puede reducir el daño oxidante del ADN, proponiendo la eliminación del radical \cdot OH como posible mecanismo. En este estudio se comparó el efecto del resveratrol con el de otros antioxidantes, siendo este polifenol el que presenta mayor efecto en cuanto a disminuir la concentración de 8-OHdG. Banu y cols. (39) reportaron que el tratamiento con resveratrol es capaz de mitigar los efectos adversos del Cr (VI). Miden los efectos sobre el estrés oxidante mediante los niveles de H₂O₂ y la peroxidación lipídica, y observaron que el tratamiento con dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) incrementa significativamente los niveles de peroxidación lipídica y de H₂O₂ medidos en plasma y tejido ovárico, mientras que el tratamiento con 10 mg/kg de resveratrol los reduce. Por otra parte, determinaron los efectos del resveratrol sobre la expresión de GPx1, SOD1, SOD2 y catalasa. La expresión de estas enzimas antioxidantes disminuye con el tratamiento con Cr (VI), mientras que la suplementación con resveratrol inhibe estos efectos. Por otro lado, García-Rodríguez y cols. (11) observaron que el tratamiento con 50 mg/kg de resveratrol antes de la administración de 20 mg/kg de CrO₃ disminuye las frecuencias de MN; también reportan un incremento de las frecuencias de células apoptóticas, sugiriendo que la inducción de apoptosis podría estar involucrada en la eliminación y reducción de las células micronucleadas. Al medir los niveles en plasma sanguíneo de 8-OHdG, observan un incremento de la concentración de este aducto, sugiriendo que el resveratrol podría estar relacionado con el incremento de la eliminación del ADN con daño oxidante. Al evaluar los niveles y la actividad de los antioxidantes endógenos, observan que los niveles de GSH disminuyen mientras que la actividad de SOD se restaura, concluyendo que estos resultados podrían estar relacionados con las propiedades antioxidantes del resveratrol sobre el daño genotóxico inducido por el Cr (VI).

EFFECTO DEL RESVERATROL SOBRE EL DAÑO OXIDANTE INDUCIDO POR HIERRO

El Fe se encuentra en dos estados de oxidación, +2 y +3. Los iones de Fe son solubles en los fluidos biológicos y pueden generar daño en presencia de oxígeno mediante la formación de radicales libres. Este metal es esencial para la vida. Sin embargo, en dosis altas también puede ser tóxico (6,7). Así, se ha relacionado la exposición al Fe con un incremento en la incidencia de carcinogenicidad. En la búsqueda de artículos se encontró un estudio en el que se evalúa el efecto del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por la exposición a Fe (Tabla I). Zhao y cols. (40) miden el efecto de 30, 60 y 90 mg/kg de resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por la exposición a hierro y reportan que el tratamiento con 90 mg/kg de resveratrol restaura la actividad de SOD, catalasa y GPx, mientras que disminuye significativamente los niveles de MDA. Concluyen que el tratamiento con resveratrol puede proteger eficazmente contra el estrés oxidante generado por la exposición a Fe. Cabe mencionar que el objetivo principal de este estudio fue observar los efectos de este polifenol sobre la

pérdida ósea inducida por hierro. Sin embargo, al estar relacionado el estrés oxidante con este proceso degenerativo, es crucial la evaluación del sistema antioxidante endógeno, ya que refleja las condiciones del daño oxidante inducido por la exposición a Fe.

RESVERATROL FRENTE AL DAÑO OXIDANTE INDUCIDO POR METALES PESADOS

Los artículos incluidos en esta revisión sistemática muestran el efecto del resveratrol sobre los efectos negativos de la exposición a los metales As, Cd, Cu, Cr y Fe. Aunque varios de estos metales son importantes para muchos procesos fisiológicos como crecimiento celular, la actividad y la respuesta enzimática, la respuesta inmune, etc., la exposición crónica o a altas concentraciones está relacionada con la inducción de cáncer de pulmón, hígado, páncreas y colon en los seres humanos expuestos de forma ocupacional (1,6). Incluso metales como el Cd y el Cr han sido clasificados entre los principales carcinógenos para los seres humanos por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (por sus siglas en inglés, IARC) (6,35). Otros metales, como el Cu, solo han demostrado ser carcinógenos en modelos *in vitro* (1). El mecanismo común de los efectos tóxicos y carcinogénicos de los metales se ha atribuido a la inducción de estrés oxidante, ya que se ha reportado que incrementan la producción de ERO y radicales libres. En este sentido, los tratamientos con As_2O_3 , Cd, $K_2Cr_2O_7$ y $NaAsO_2$ incrementan de manera significativa la producción de ERO como el H_2O_2 . Sin embargo, cuando se realiza la administración del resveratrol antes del tratamiento con estos metales se observa una disminución de la producción de ERO (31-33,36,39). Solamente un artículo reportó un efecto dual entre el resveratrol y el metal al incrementar la dosis de resveratrol (20 μM), sugiriendo que el potencial benéfico del resveratrol podría depender de la dosis utilizada (32). Cabe mencionar que la medición del $\cdot OH$ y el $O_2\cdot^-$ también se considera relevante, ya que se ha descrito que estos son los principales radicales libres formados durante la reducción intracelular de los metales pesados. Además, se ha observado que el resveratrol es capaz de eliminar estos radicales libres (6,41). A pesar de que las dosis de resveratrol, así como las unidades de medida de la producción de ERO, utilizadas son diferentes, la disminución observada es significativa. Por otro lado, se ha relacionado la producción excesiva de ERO y radicales libres con la alteración del sistema antioxidante endógeno, ya sea en términos de concentración o de actividad. En este sentido, Fu y cols. (36) reportaron una disminución de la expresión de SOD cuando las células se expusieron a Cd. Resultados similares se obtuvieron con las administraciones de As_2O_3 , $CdCl_2$, CrO_3 , Fe y $NaAsO_2$, ya que se observó que la actividad enzimática de SOD disminuye significativamente, así como la actividad de las enzimas catalasa y GPx. Sin embargo, estos efectos fueron contrarrestados por el tratamiento previo con resveratrol, suprimiéndose de esta manera el daño oxidante de estos metales (11,31,32,34,35,40). Este resultado no se observó en todos los estudios, ya que Banu y cols. (39) reportaron que el

tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ reduce la actividad de GPx y catalasa pero incrementa la actividad de SOD. Sin embargo, no reportan información concluyente sobre este comportamiento. Con respecto a la concentración de GSH y la relación GSH/GSSG, se observaron disminuciones significativas con As y Cu (32-34,37), mientras que García-Rodríguez y cols. (11) no reportaron efectos sobre la concentración de GSH con la administración de CrO_3 . En cambio, con el tratamiento previo de resveratrol, los niveles de GSH disminuyen significativamente, concluyendo los autores que este efecto podría estar relacionado con la disminución del daño genotóxico inducido por los compuestos de Cr (VI). Dentro de los efectos de las ERO y los radicales libres se encuentra el daño oxidante de lípidos y ácidos nucleicos. En este sentido, la administración de Cd, Cu, Cr y Fe incrementa los niveles de ATB, peroxidación lipídica y MDA (35,37,39,40). Con respecto a las evaluaciones del daño del ADN, se observó que la administración de $NaAsO_2$ y CrO_3 incrementa de manera significativa la genotoxicidad (11,32). También se observó que el tratamiento con $CrCl_3$ incrementa la formación de 8-OHdG en el ADN (38), mientras que García-Rodríguez y cols. (11) observaron una disminución de la concentración plasmática de este aducto cuando administraron CrO_3 . A este respecto se observó que el tratamiento previo con resveratrol reduce el daño oxidante de lípidos y ADN, atribuyéndose este efecto a la capacidad de reducir la producción de H_2O_2 , $O_2\cdot^-$ y $\cdot OH$. También se propone una interacción con los mecanismos de reparación del ADN. La figura 3 resume las interacciones propuestas entre los metales pesados y el resveratrol: los metales pesados disminuyen la actividad del sistema antioxidante endógeno (R1) e incrementan la producción de ERO y radicales libres (R2), lo que, consecuentemente, induce daño en biomoléculas tales como los lípidos (peroxidación lipídica; R3) y el ADN (formación del aducto 8-OHdG; R4). La apoptosis se inicia por un incremento de los niveles de Ca^{2+} y la actividad de la caspasa 3, y por la disminución de Bcl-2 (R5). Sin embargo, el resveratrol puede regular los efectos del estrés oxidante inducido por As, Cd, Cu, Cr y Fe mediante un incremento de la concentración y la actividad de los antioxidantes endógenos (GSH, GPx, SOD y catalasa; R6), así como de otras enzimas involucradas, como la γ -GCS, que se encarga de la síntesis de GSH (R7). Otro mecanismo, es el incremento de PGC-1 α y Sirt3/FoxO3a (R8), que conlleva un aumento de la actividad de SOD y la regulación mitocondrial, que se ve perjudicada con la exposición a metales pesados y que contribuye al incremento de la producción de ERO y radicales libres, principalmente de H_2O_2 y de los radicales $O_2\cdot^-$ y $\cdot OH$. También se observa una inhibición o eliminación de ERO y radicales libres (H_2O_2 , $O_2\cdot^-$ y $\cdot OH$), mecanismo que contribuye a la disminución de la peroxidación lipídica y el daño del ADN (R9). El resveratrol también es capaz de estimular los mecanismos de reparación del ADN (R10). Por su parte, la disminución de la apoptosis con el tratamiento de resveratrol se atribuye a la restauración de los niveles de Ca^{2+} y de la actividad de la caspasa 3 y Bcl-2 (R11). Finalmente, se ha sugerido que el resveratrol es capaz de disminuir la concentración de los metales (As y Cd) mediante la modulación de la actividad de enzimas antioxidantes que facilitan su expulsión (R12).

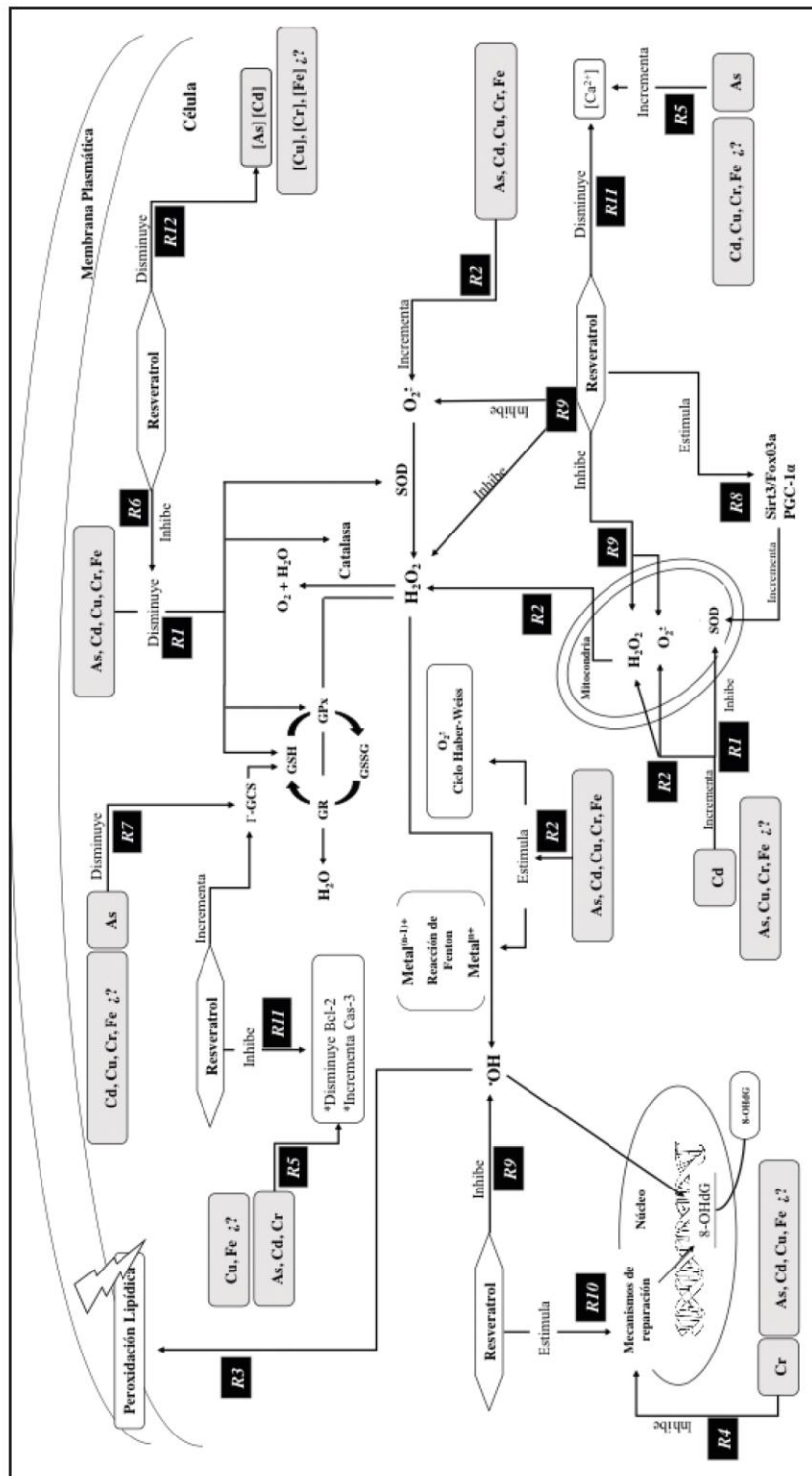


Figura 3. Interacciones propuestas para el resveratrol: los metales pesados As, Cd, Cu, Cr y Fe, y el estrés oxidante.

CONCLUSIÓN

La generación de estrés oxidante es uno de los mecanismos más importantes en la toxicidad y carcinogenicidad inducidas por metales pesados. Si bien en los artículos analizados se utilizan diferentes metodologías, los resultados que presentan concuerdan en que el tratamiento previo con resveratrol es capaz de modular los efectos del estrés oxidante generado por los diferentes compuestos metálicos de As, Cd, Cu, Cr y Fe. Los posibles mecanismos involucrados podrían ser: a) disminución directa de la producción de ERO y radicales libres (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet OH$); b) interacción con el sistema antioxidante endógeno, ya sea modulándolo o estimulándolo (GSH, GSH/GSSG, γ -GCS, GPx, SOD y catalasa, entre otros); c) inhibición de la disfunción mitocondrial (PGC-1 α , Sirt3/FoxO3a); d) estimulación de los mecanismos de reparación del ADN (8-OHdG), y e) inducción de la apoptosis (caspasa 3, Bcl2 y Ca²⁺). Los estudios analizados muestran que el resveratrol es capaz de modular el estrés oxidante generado por diferentes compuestos de metales pesados como As, Cd, Cu, Cr y Fe.

BIBLIOGRAFÍA

- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1-40. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009
- Lee JC, Son YO, Pratheeshkumar P, Shi X. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 2012;53:742-57. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.002
- Laulicht F, Brocato J, Ke Q, Costa M. Carcinogenicity of Metal Compounds. En: K Q, Kazantzis G, Costa M. *Handbook on the Toxicology of Metals 4th*; 2015. p. 351-78.
- Masindi V, Muedi KL. Environmental Contamination by Heavy Metals. En: Hosam El-Din M. *Saleh. Heavy Metals*; 2018. p. 115-33.
- Shi H, Hudson GL, Liu KJ. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Radic Biol Med* 2004;5:582-93. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.012
- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011;283:65-87. DOI: 10.1016/j.tox.2011.03.001
- Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12:1161-208. DOI: 10.2174/0929867053764635
- García-Rodríguez MC, Altamirano-Lozano M, Gordillo-García A. The Role of Green Tea Polyphenols in the Protection from Hexavalent Chromium-Induced Genotoxic Damage, Polyphenols. En: Janica Wong, Editora. *Polyphenols*. UK: IntechOpen; 2018. p. 51-67. DOI: 10.5772/intechopen.76651
- García-Niño WR, Pedraza-Chaverri J. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food Chem Toxicol* 2014;69:182-201. DOI: 10.1016/j.fct.2014.04.016
- Mathieu L, Costa AL, Le Bachelier C, Slama A, Lebre A, Taylor RW, et al. Resveratrol attenuates oxidative stress in mitochondrial Complex I deficiency: Involvement of SIRT3. *Free Radic Biol and Med* 2016;96:190-8. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.027
- García-Rodríguez MC, Nicolás-Méndez T, Retana-Ugalde R, Altamirano-Lozano M. Effects of resveratrol on 8-OHdG levels and endogenous antioxidants evaluated simultaneously with the micronucleus and apoptosis frequencies in peripheral blood of mice treated with hexavalent chromium. *Journal of ISANH* 2017;5:1-4. DOI: 10.18143/ANSNH_v5i2_8
- Brasnyó P, Sümegi B, Winkler G, Wittmann I. Resveratrol and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. En: *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*; 2014. p. 99-109.
- Kuršvietiene L, Staneviciene I, Mongirdiene A, Bernatoniene J. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Kaunas)* 2016;52:148-55. DOI: 10.1016/j.medic.2016.03.003
- Wahl D, Bernier M, Simpson SJ, de Cabo R, Le Couteur DG. Future directions of resveratrol research. *Nutr Healthy Aging* 2018;15:287-90. DOI: 10.3233/NHA-170035
- Kalra N, Roy P, Prasad S, Shukla Y. Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis. *Life Sci* 2008;82:348-58. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.11.006
- Pandey KB, Rizvi SI. Resveratrol may protect plasma proteins from oxidation under conditions of oxidative stress in vitro. *J Braz Chem Soc* 2010;2:909-13. DOI: 10.1590/S0103-50532010000500020
- Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry* 2012;130:797-813. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.08.023
- Haramizu S, Asano S, Butler DC, David A, Stanton DA, Hajira A, et al. Dietary resveratrol confers apoptotic resistance to oxidative stress in myoblasts. *J Nutr Biochem* 2017;50:103-15. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.08.008
- Yousef M, Vlachogiannis IA, Tsiani E. Effects of Resveratrol against Lung Cancer: In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrients* 2017;10:1-14. DOI: 10.3390/nu9111231
- Elshaer M, Chen Y, Wang XJ, Tang X. Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms. *Life Sci* 2018;207:340-9. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.06.028
- Ferreira PEB, Beraldi EJ, Borges SC, Natali MRM, Buttow NC. Resveratrol promotes neuroprotection and attenuates oxidative and nitrosative stress in the small intestine in diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2018;105:724-33. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.06.030
- Haghighatdoost F, Hariri M. Effect of resveratrol on lipid profile: An updated systematic review and meta-analysis on randomized clinical trials. *Pharmacol Res* 2018;129:141-50. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.12.033
- Ahmadi Z, Mohammadinejad R, Ashrafizadeh M. Drug delivery systems for resveratrol, a non-flavonoid polyphenol: Emerging evidence in last decades. *J Drug Deliv Sci Technol* 2019;51:591-604. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.03.017
- Pannu N, Bhatnagar A. Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomed Pharmacother* 2019;109:2237-51. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.11.075
- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:493-506. DOI: 10.1038/nrd2060
- Bastianetto S, Menard C, Quirion R. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:1195-201. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.09.011
- Li W, Ray RM, Gao DL, Fitzgibbons ED, Seixas NS, Camp JE, et al. Occupational risk factors for nasopharyngeal cancer among female textile workers in Shanghai, China. *Occup Environ Med* 2006;63:39-44. DOI: 10.1136/oem.2005.021709
- En-Qin X, Gui-Fang D, Ya-Jun G, Hua-Bin L. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int J Mol Sci* 2010;11:622-46. DOI: 10.3390/ijms11020622
- Arcanjo NMO, Luna C, Madruga MS, Estévez M. Antioxidant and pro-oxidant actions of resveratrol on human serum albumin in the presence of toxic diabetes metabolites: Glyoxal and methyl-glyoxal. *Biochim Biophys Acta Gen Dubi* 2018;1862:938-1947. DOI: 10.1016/j.bbagen.2018.06.007
- Rauf A, Imran M, Butt MS, Nadeem M, Peters DG, Mubarak MS. Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018;58:1428-47. DOI: 10.1080/10408398.2016.1263597
- Zhao XY, Li GY, Liu Y, Chai LM, Chen JX, Zhang Y, et al. Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 2008;154:105-13. DOI: 10.1038/bjp.2008.81
- Chen C, Jiang X, Zhao W, Zhang Z. Dual role of resveratrol in modulation of genotoxicity induced by sodium arsenite via oxidative stress and apoptosis. *Food Chem Toxicol* 2013;59:8-17. DOI: 10.1016/j.fct.2013.05.030
- Zhang W, Yao C, Ge M, Xue J, Ma D, Liu Y, et al. Attenuation of arsenic retention by resveratrol in lung of arsenic trioxide-exposed rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013;36:35-9. DOI: 10.1016/j.etap.2013.02.017
- Zhang W, Xue J, Ge M, Yu M, Liu L, Zhang Z. Resveratrol attenuates hepatotoxicity of rats exposed to arsenic trioxide. *Food Chem Toxicol* 2013;51:87-92. DOI: 10.1016/j.fct.2012.09.023
- Eybl V, Kotyzova D, Koutensky J. Comparative study of natural antioxidants - curcumin, resveratrol and melatonin - in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology* 2006;225:150-6. DOI: 10.1016/j.tox.2006.05.011
- Fu B, Zhao J, Peng W, Wu H, Zhang Y. Resveratrol rescues cadmium-induced mitochondrial injury by enhancing transcriptional regulation of PGC-1 α and SOD2 via the Sirt3/FoxO3a pathway in TCMK-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;486:198-204. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.03.027
- Amal N, Tacconi de Alaniz MJ, Marra CA. Natural polyphenols may ameliorate damage induced by copper overload. *Food Chem Toxicol* 2012;50:415-22. DOI: 10.1016/j.fct.2011.10.037
- Burkhardt S, Reiter RJ, Tan DX, Hardeland R, Cabrera J, Karbownik M. DNA oxidatively damaged by chromium (III) and H2O2 is protected by the antioxidants melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:775-83. DOI: 10.1016/S1357-2725(01)00052-8
- Banu SK, Stanley JA, Sivakumar KK, Arosh JA, Burghardt RC. Resveratrol protects the ovary against chromium-toxicity by enhancing endogenous antioxidant enzymes and inhibiting metabolic clearance of estradiol. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;303:65-78. DOI: 10.1016/j.taap.2016.04.016
- Zhao L, Wang Y, Wang Z, Xu Z, Zhang Q, Yin M. Effects of dietary resveratrol on excess-iron-induced bone loss via antioxidative character. *J Nutr Biochem* 2015;26:1174-82. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.05.009
- Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:1017-26. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.08.105



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO

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

XXII Reunión Internacional de Ciencias Médicas

24-26 Agosto 2022

Reunión en formato híbrido con enfoque multidisciplinario
Auditorio Jorge Ibargüengoitia
Sede Fórum del Campus León

Inscripción

Modalidad Presencial

Profesionistas \$750.00 M.N.

Estudiantes con credencial \$300.00 M.N.

Modalidad Virtual

Profesionistas \$600.00 M.N.

Estudiantes con credencial \$300.00 M.N.

Fecha límite de envío de trabajos de
investigación y casos clínicos

30 de junio de 2022



@reunionciencias



Regístrate e infórmate en:

www.reunioncienciasmedicasugto.org.mx

Efecto del Resveratrol sobre la Apoptosis y la Viabilidad Celular en Ratones Expuestos a Cromo Hexavalente

Tonancy Nicolás-Méndez¹, Alda Rocío Ortiz-Muñoz², Víctor Manuel Mendoza-Núñez³, y María del Carmen García-Rodríguez^{1*}.

¹Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis Ambiental. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM. CDMX, México. ²Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, UAM. CDMX, México. ³Unidad de Investigación en Gerontología. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM. CDMX, México.*Tel: +56230772; e-mail: carmen.garcia@unam.mx

Introducción. La creciente exposición de las poblaciones humanas a compuestos metálicos cancerígenos como los compuestos de cromo hexavalente [Cr(VI)] representa un problema de salud cada vez más grave. Se ha descrito que, el Cr(VI) genera estrés oxidante durante su reducción intracelular. Mientras que, el resveratrol posee propiedades citoprotectoras y quimiopreventivas atribuidas a su potencial antioxidante.

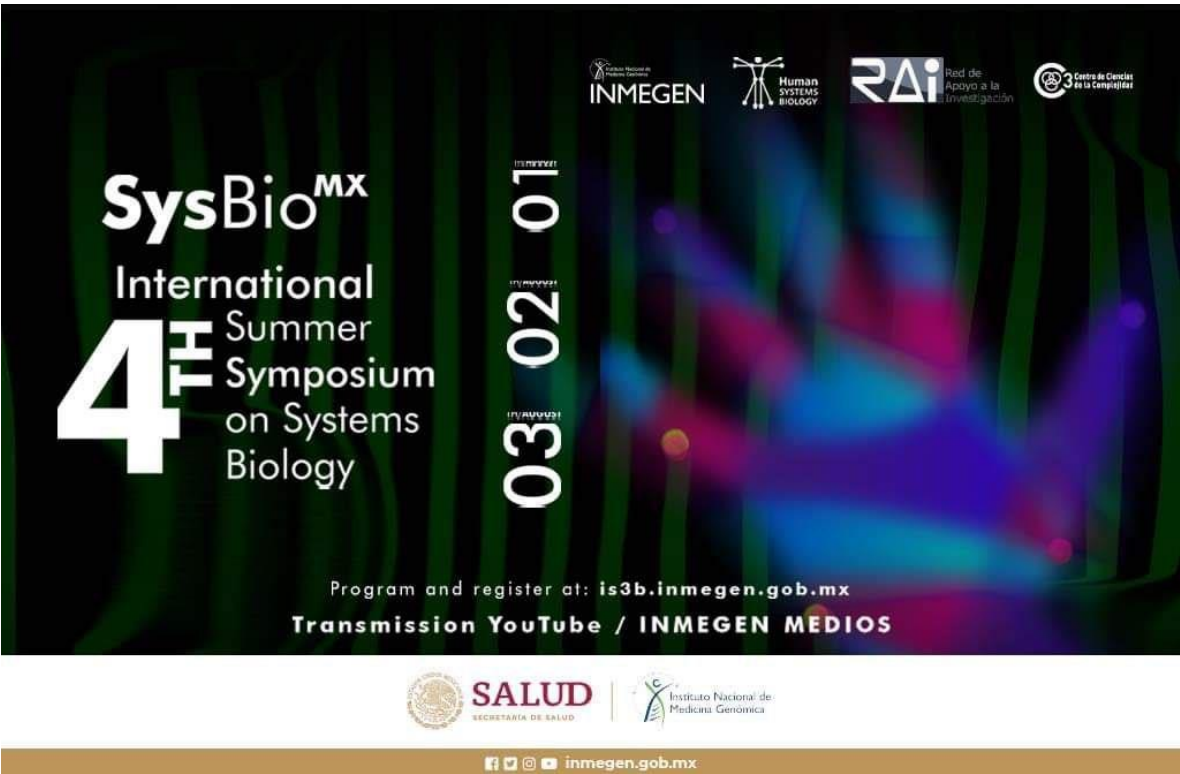
Objetivo. Evaluar el efecto del resveratrol sobre la apoptosis y la viabilidad celular en ratones expuestos a compuestos de Cr(VI).

Material y Métodos. Grupos de cinco ratones machos Hsd:ICR fueron divididos y tratados de la siguiente manera: (i) Control 1, se les administró agua destilada por vía intraperitoneal (ip); (ii) Control 2, se les administró etanol al 30% intragastricamente; (iii) resveratrol (diluido en etanol al 30%), 50 mg/kg vía intragástrica; (iv) Cr(VI), se les administró 20 mg/kg de CrO₃ vía ip; y (v) resveratrol+CrO₃, se les administró el resveratrol 4 horas antes del tratamiento con CrO₃. La evaluación de la apoptosis y la viabilidad celular se realizó en células nucleadas de sangre periférica a las 48 horas después de la administración de los tratamientos¹.

Resultados. La administración sola del resveratrol disminuyó las células apoptóticas totales y tempranas. Mientras que, el CrO₃ incrementó las células apoptóticas totales, tempranas y tardías, así como las células necróticas. De manera similar, en este grupo se disminuyó la viabilidad celular, lo que corroboró la citotoxicidad descrita para los compuestos de Cr(VI). Cuando se administró el resveratrol cuatro horas previas al tratamiento con CrO₃, se recuperó la viabilidad celular. Sin embargo, se incrementaron de forma significativa la frecuencia de células apoptóticas totales y tempranas, incluso, el efecto fue mayor que el observado en el grupo tratado solo con CrO₃.

Conclusión. Los resultados sugieren que el resveratrol contribuye en la disminución de la citotoxicidad inducida por compuestos de Cr(VI) y en la eliminación de las células con daño en el ADN. *Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN224719; IN216122.*

¹García-Rodríguez, M.C., et al. (2013). Oxid. Med. Cell Longev. 2013:1-9.





SysBio^{MX}
International
4TH Summer
Symposium
on Systems
Biology

03 02 01

Program and register at: is3b.inmegen.gob.mx
Transmission YouTube / INMEGEN MEDIOS

INMEGEN Human SYSTEMS BIOLOGY RAI Red de Apoyo a la Investigación Centro de Ciencias de la Computación

 **SALUD** SECRETARÍA DE SALUD |  Instituto Nacional de Medicina Genómica

[f](https://www.facebook.com/inmegen.gob.mx) [i](https://www.instagram.com/inmegen.gob.mx) [y](https://www.youtube.com/inmegen.gob.mx) inmegen.gob.mx

Protection of hexavalent chromium-induced genotoxic damage in peripheral blood of mice by resveratrol and its relationship to the apoptotic activity

Tonancy Nicolás-Méndez¹, Sam Kacew², Alda Rocío Ortiz-Muñiz³,
Víctor Manuel Mendoza-Núñez¹ and María del Carmen García-Rodríguez^{1,*}

¹ Facultad de Estudios Superiores—Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, CDMX, 09230, Mexico.

² McLaughlin Centre for Population Health Risk Assessment, University of Ottawa, Ottawa, ON, K2G 3G8, Canada.

³ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Mexico City, CDMX, 09310, Mexico.

*Correspondence: carmen.garcia@unam.mx

Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene) it has high antioxidant potential associated with beneficial health effects in the context of neurodegenerative and cardiovascular diseases, as well as some types of cancer, diabetes, and obesity-related disorders. The antioxidant effects of resveratrol have been attributed to its ability to scavenge reactive oxygen species, and notably, resveratrol has been found to prevent DNA damage. Although the effects of resveratrol on toxicity induced by metals (e.g., arsenic and copper) has been studied, there are no studies evaluating the effects of this polyphenol on hexavalent chromium [Cr(VI)] compound-induced genotoxicity. The aim of the present study was to examine the protective effects of resveratrol against Cr(VI)-induced genotoxicity *in vivo* and the underlying processes of the apoptosis, which may be involved in preventing Cr(VI)-induced DNA damage. Hsd:ICR male mice are divided into groups of the following five individuals each: (a) control 1, distilled water; (b) control 2, ethanol 30%; (c) resveratrol, 50 mg/kg by gavage; (d) CrO₃, 20 mg/kg intraperitoneally; (e) resveratrol+CrO₃, resveratrol administered 4 h prior to CrO₃. The genotoxic damage caused by Cr(VI) was evaluated with the micronuclei (MN) assay in erythrocytes of peripheral blood using acridine orange-coated slides. Apoptotic and necrotic cells were evaluated using differential acridine orange/ethidium bromide staining. The assessment is performed on peripheral blood. Micronuclei kinetics are measured from 0 to 72 h, while apoptosis were quantified at 48 h. In the CrO₃ group, an increase of about 7, 10, and 5 MN was observed at 24, 48, and 72 h, respectively, which was significantly higher than the control C1 ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, and $p < 0.015$, respectively). The group treated with resveratrol and CrO₃ had lower MN frequency than the CrO₃ only treatment at all times examined. When comparing the effect of treatments on apoptosis, resveratrol reduced the frequency of total and early apoptotic cells compared to control groups ($p < 0.022$ and $p < 0.015$, respectively), while CrO₃ induced an increased number of total, early, late apoptotic, and necrotic cells compared to control groups ($p < 0.0001$). In the resveratrol+CrO₃ mice, there were fewer late apoptotic and necrotic cells compared to the CrO₃ group ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively) and an increase in total and early apoptotic cells compared to the control group ($p < 0.0001$) and the resveratrol group. The increase in apoptotic cells and the decrease in necrosis further confirmed that resveratrol effectively blocks the actions of Cr(VI). Financial support was obtained from DGAPA-UNAM PAPIIT IN216122.



Volume 159, November 1, 2020

ISSN 0891-5849

FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE

Editor in Chief: Kelvin J. A. Davies

Founding Editors: Kelvin J. A. Davies, William A. Pryor



An official Journal of the Society for Redox
Biology and Medicine



An official Journal of the Society for
Free Radical Research-Europe



An Affiliate Journal of the International
Society for Free Radical Research (SFRR)

Effect of Resveratrol on SOD, GPx and Catalase Activity and Genotoxic Damage in Mice Treated with Chromium(VI)

Tonancy Nicolás-Méndez¹, Alda Rocío Ortiz-Muñoz², Victor Manuel Mendoza-Nuñez¹, María del Carmen García-Rodríguez¹

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, ²Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico

Hexavalent chromium [Cr (VI)] is an environmental pollutant and a potent toxic to humans. Cr (VI) compounds generate reactive oxygen species (ROS) during their reduction to Cr (III) that cause DNA damage, such as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Meanwhile, resveratrol is a polyphenol that has a pleiotropic biological effect, which includes antioxidant activities. In this study, the effect of resveratrol on superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase activity, and genotoxic damage in Cr (VI) -treated mice were evaluated. Groups of five Hsd-ICR mice were divided and treated as follows: i) vehicle only; ii) resveratrol (50 mg / kg) by gavage; iii) CrO₃ (20 mg / kg) intraperitoneally; and iv) resveratrol in addition to CrO₃. Evaluations were made at 0, 24, 48 and 72 h after the treatments. No significant changes were observed in the frequencies of micronuclei (MN) and apoptosis in the group treated with only resveratrol; although the levels of 8-OHdG and the activity of SOD, GPx and catalase were modified. Treatment with CrO₃ increases the frequencies of MN and apoptotic cells, and the activity of GPx and catalase; while SOD activity and 8-OHdG levels decreased. Administration of resveratrol before CrO₃ Treatment increased the frequency of apoptotic cells and the levels of 8-OHdG, suggesting that these may play a role in the elimination and reduction of micro-nucleated cells. While, the decrease in the activity of GPx and catalase, and the recovery of SOD, could be related to the properties of suppression of oxidative stress. Therefore, resveratrol can be used effectively to protect the genotoxic effects of Cr (VI).

doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.091>

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



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

XX Reunión Internacional de Ciencias Médicas

14-16 octubre 2020

EVENTO
VIRTUAL
GRATUITO

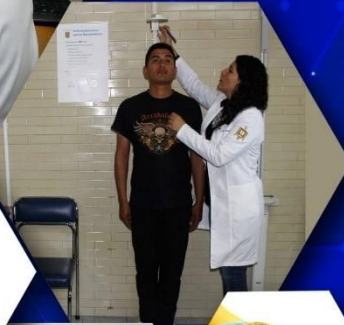
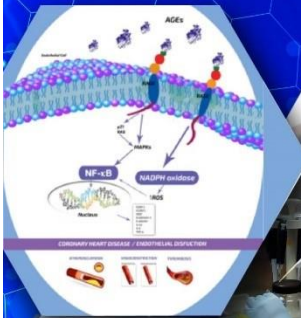
Informes:

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

www.reunioncienciasmedicasugto.org.mx



@reunionciencias



104. Efecto del Resveratrol sobre el daño Genotóxico y Sistema Antioxidante-Enzimático de Ratones Tratados con Cr(VI)

Tonancy Nicolás-Méndez¹, Alda Rocío Ortiz-Muñiz², Víctor Manuel Mendoza-Núñez³, y María del Carmen García-Rodríguez^{1*}. ¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM. ²Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, UAM. ³Unidad de Investigación en Gerontología. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM. CDMX, México.*Tel: +56230772; e-mail: carmen.garcia@unam.mx

Introducción. En diversos estudios se han descrito propiedades quimiopreventivas y anticancerígenas para el resveratrol, las cuales se atribuyen principalmente a su actividad antioxidante. Por otro lado, compuestos con propiedades cancerígenas como los del cromo hexavalente [Cr(VI)] pueden inducir daño al ADN mediante el estrés oxidante que se genera durante su reducción intracelular a cromo trivalente [Cr(III)].

Objetivo. De ahí que, en el presente estudio se evaluó el efecto del resveratrol sobre el daño genotóxico y el sistema antioxidante enzimático.

Materiales y Métodos. Grupos de cinco ratones Hsd:ICR fueron tratados con: i) vehículo (agua o etanol al 30%); ii) resveratrol (50 mg/kg) vía intragástrica; iii) CrO₃ (20 mg/kg) vía intraperitoneal; y iv) resveratrol-CrO₃. El daño genotóxico se evaluó mediante el análisis de micronúcleos (MN) y el sistema antioxidante enzimático mediante la cuantificación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa empleando kits comerciales (Cayman®). Se tomaron muestras de sangre periférica a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la administración de los tratamientos.

Resultados. En los grupos en los que se administró solo el resveratrol no se observaron cambios significativos en las frecuencias de MN, sin embargo, el tratamiento de CrO₃ los incrementó significativamente en todas las horas evaluadas. Cuando el resveratrol se administró previo al tratamiento del CrO₃, se observó una disminución en las frecuencias de MN en comparación con el grupo CrO₃. En las evaluaciones del sistema antioxidante se observó que el tratamiento con resveratrol incrementa la actividad de todas las enzimas, mientras que la administración de CrO₃ disminuye la actividad SOD e incrementa la actividad de GPx y catalasa. Cuando se administró el resveratrol previo al CrO₃ se revirtieron los efectos observados en el grupo tratado solo con CrO₃.

Conclusión. Los resultados sugieren que la protección del resveratrol sobre el daño genotóxico inducido por el tratamiento de Cr(VI) en ratones puede estar relacionado con la modulación del sistema antioxidante endógeno. *Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN224719.*

VII Congreso de Especies Reactivas de Oxígeno en Biología y Medicina
VIII Taller Internacional de Aspectos Comparativos del Estrés Oxidante en Sistemas Biológicos
 RAMA DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA

9, 10 y 11 de septiembre de 2019
 CIUDAD DE MÉXICO

Conferencistas:

Dra. Victoria Chagoya
 Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México

Dra. Phyllis Dennery
 Society for Redox Biology and Medicine, Estados Unidos

Dr. Daniel Menéndez
 National Institute of Environmental Health Sciences, Estados Unidos

Dra. Roxana Torres
 Instituto de Ecología, UNAM, México

Dra. Holly Van Remmen
 Oklahoma Medical Research Foundation, Estados Unidos

Fecha límite

Inscripción y envío de resúmenes
 30 de julio de 2019

SEDE: Instituto de Investigaciones Biomédicas, circuito Mario de la Cueva, Ciudad Universitaria, CDMX.

Cuota de inscripción al congreso*:

	Antes del 1 de agosto / Después del 1 de agosto	Antes del 1 de agosto / Después del 1 de agosto
Socios de la SMB	\$ 2,000	\$ 2,500
No socios	\$ 2,500	\$ 3,000
Estudiantes socios	\$ 1,000	\$ 1,500
Estudiantes no socios	\$ 1,200	\$ 1,700

*Incluye comida

Dudas y aclaraciones: ero@smb.org.mx





Simultaneous Evaluations of Genotoxic Damage, GSH Levels, GPx and Catalase Activity in Mice Treated with Chromium(VI) and Resveratrol

Tonancy Nicolás-Méndez¹, Alda Rocío Ortiz-Muñoz², Víctor Manuel Mendoza-Núñez³, María del Carmen García-Rodríguez^{1*}

¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM. ²Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, UAM. ³Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM. CDMX, México. *Tel: +56230772; e-mail: carmen.garcia@unam.mx

Resveratrol has received much attention due to its ability to reduce stress-induced cellular injury. In fact, the compounds of hexavalent chromium [Cr(VI)] generate oxidative stress during its reduction to trivalent chromium [Cr(III)] leading to DNA damage. In this study, the effect of resveratrol on genotoxic damage was evaluated simultaneously with glutathione (GSH) levels, glutathione peroxidase (GPx) and catalase activity. Groups of five Hsd-ICR mice were treated as follows: *i*) only vehicle (water or ethanol 30%); *ii*) resveratrol (50 mg/kg) by gavage; *iii*) CrO₃ (20 mg/kg) intraperitoneally; and *iv*) resveratrol in addition to CrO₃. The genotoxic damage was evaluated by analysis of micronuclei (MN) according to the method proposed by Hayashi *et al.* (1990)¹ and apoptosis according to the technique modified by García Rodríguez *et al.* (2013)². The determinations of GSH-levels and activities of GPx and catalase were made using a commercial kit specific for each antioxidant. Evaluations were performed at 0, 24, 48 and 72 h after treatments. No significant changes in MN and apoptosis frequencies were observed when resveratrol was administrated alone. However, when the treatment of resveratrol was administered prior to CrO₃ a decrease in MN frequencies and an increase of apoptotic cells were observed compared to the CrO₃ group. When the evaluations of endogenous antioxidants were performed, increases of GSH-levels, activities of GPx and catalase were observed in the resveratrol and CrO₃ groups. However, when the treatment of resveratrol was administered prior to CrO₃, a significant decrease in the levels and activity of endogenous antioxidants was observed. The results suggest that resveratrol can protect against genotoxic damage induced by Cr(VI) compounds, modulate the endogenous antioxidant system and induce apoptosis.

Financial support was obtained from DGAPA-UNAM PAPIIT-IN224719.

Reference:

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

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

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 Ibarguengoitia 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 (+)-catequina-CrO₃, ya que se observó un incrementó 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 CB-SEP-CONACyT 853816