



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Efecto antigenotóxico de la
(-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) y su relación con la
apoptosis en ratones Hsd:ICR tratados con cromo hexavalente**

Área: Genética

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA: JOSSELINE CURIEL GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA
RODRÍGUEZ



CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

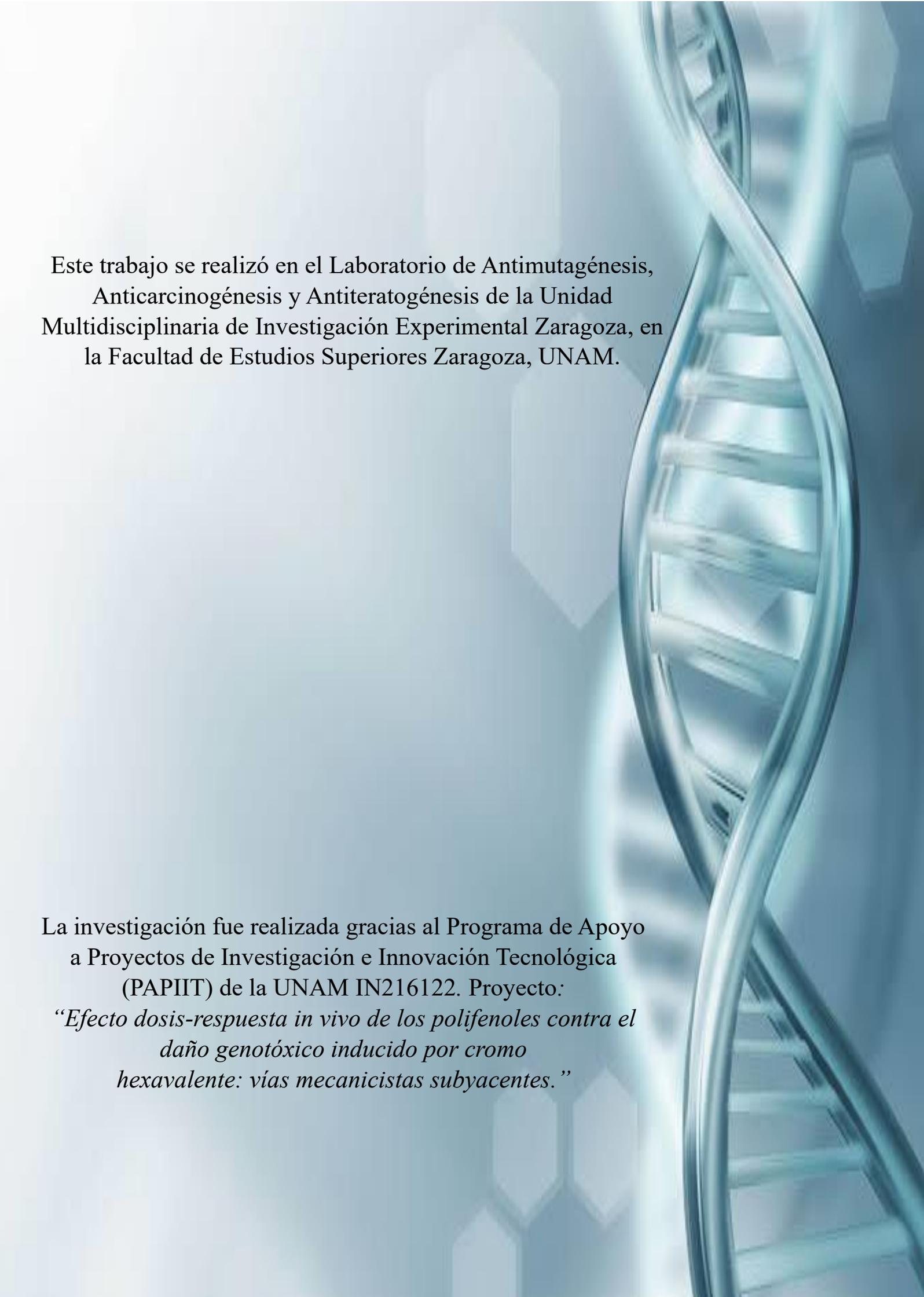


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Antimutagénesis,
Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad
Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, en
la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

La investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo
a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica
(PAPIIT) de la UNAM IN216122. Proyecto:
*“Efecto dosis-respuesta in vivo de los polifenoles contra el
daño genotóxico inducido por cromo
hexavalente: vías mecanicistas subyacentes.”*

AGRADECIMIENTOS

INSTITUCIONALES

Agradezco a la **Dra. María de Carmen García Rodríguez** por la confianza, paciencia y apoyo brindado. Por compartirme sus conocimientos y haberme dado la oportunidad de crecer académicamente con la culminación de mi licenciatura.

Agradezco a los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y aportaciones para el mejoramiento de esta tesis:

Dra. Alberta Lourdes Castillo Granada

M. en C. María Cristina Alvarado Domínguez

M. en C. Reynalda Roldan Pérez

M. en C. Lourdes Montserrat Hernández Cortes

Gracias a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por haberme permitido formarme en ella, a todos los académicos que fueron partícipes de mi desarrollo, ya sea de forma directa o indirecta, gracias a todos ustedes por enseñarme que ser biólogo no es solo saber de plantas y animales, ser biólogo es permitirle a la humanidad conocer su papel en la naturaleza y querer conservarla siempre.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por brindarme la oportunidad de estudiar en una institución de prestigio y excelencia académica, que me ha preparado para enfrentar los desafíos futuros en mi carrera profesional y personal.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a mis padres, **Olga Lidia Gonzalez Jijón** y **Roberto Curiel Mendoza** por todo el amor y sacrificios que han hecho por mí. No tengo palabras para expresar lo agradecida que estoy por tener unos padres como ustedes, les debo todo lo que soy y se los agradeceré siempre, porque no podría haber llegado hasta aquí sin su apoyo incondicional.

A mi hermana Diana Laura Curiel Gonzalez por ser mi confidente y mi cómplice. Gracias por compartir tantos momentos inolvidables conmigo y por ser parte de los recuerdos más preciosos de mi vida. Gracias por ser un ejemplo tan maravilloso para mí.

A mi hermana Odette Curiel Gonzalez por ser una parte fundamental de mi vida, por hacerla más rica y significativa. Siempre me sorprendes con tu ingenio y tu entusiasmo, y me inspiras a ser una persona mejor.

A mis amigos, por compartir conmigo tantos momentos inolvidables, en especial a Gabriela y Karla por estar conmigo desde el inicio y hasta el final de la carrera. Agradezco su amistad sincera y desinteresada, gracias por su apoyo en todo momento, por reír y llorar conmigo. Ustedes son de las personas más maravillosas que me pudo dar esta carrera.

A mis compañeros de laboratorio Lulú, Tona, Amaury y Nancy por la enseñanza que me brindaron, por su compañía y apoyo en la realización de este trabajo. Gracias a Lulú por ser mentora y amiga, por todo el apoyo y la paciencia en el laboratorio.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Genotoxicidad y mutagénesis.....	3
2.2 Metales pesados como inductores de daño genotóxico	4
2.2.1. Cromo	5
2.3. Estrés oxidante	6
2.4. Especies reactivas de oxígeno y radicales libres.....	6
2.5. Evaluación del daño genotóxico	8
2.5.1 Micronúcleos	8
2.5.2. Apoptosis y necrosis	10
2.6. Protección de daño genotóxico.....	13
2.7. Antioxidantes	14
2.8. Polifenoles	14
2.8.1. (-)-epigallocatequina-3-galato	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo general	19
5.2. Objetivos particulares	19
6. MATERIAL Y MÉTODO	20
6.1. Animales	20
6.2. Reactivos	20
6.3. Tratamientos.....	20
6.4. Micronúcleos.....	22
6.5. Apoptosis, necrosis y viabilidad celular.....	22
6.6. Análisis estadístico	22
7. RESULTADOS.....	23
7.1 Evaluación de micronúcleos	23
7.2 Evaluación de apoptosis y necrosis.....	27
7.3 Evaluación de la relación EPC/ENC y la viabilidad celular	36

8.	DISCUSIÓN	42
9.	CONCLUSIÓN Y COMENTARIOS FINALES	46
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

•OH	Radical hidroxilo.
µl	Microlitros.
•O₂⁻	Radical superóxido.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
BrEt	Bromuro de etidio.
Cr	Cromo.
Cr(III)	Cromo trivalente.
Cr(VI)	Cromo hexavalente
CrO₃	Trióxido de cromo.
ECG	(-)-epicatequina-3-galato.
EGC	(-)-epigallocatequina.
EGCG	(-)-epigallocatequina-3-galato.
ENC	Eritrocitos normocromáticos.
EPA	Agencia de Protección Ambiental (del inglés Environmental Protection Agency).
EPC	Eritrocito policromático.
EPC-MN	Eritrocitos policromáticos micronucleados.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
FDA	Administración de Alimentos y Drogas (del inglés Food and Drug Administration).
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno.
i.g.	Intragástrica
i.p.	Intraperitoneal
MN	Micronúcleos.
NA	Naranja de acridina.
OECD	Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (del inglés Organization for Economic Cooperation and Development).
RL	Radicales libres.

RESUMEN

Dentro de los agentes que pueden dañar al ADN mediante el estrés oxidante se encuentran los compuestos de cromo hexavalente (Cr(VI)). Sus efectos han sido asociados con la inducción de algunos tipos de cáncer. Por otro lado, se ha propuesto que los polifenoles como la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) presentan propiedades antioxidantes, antígenotóxicas y actúan sobre moléculas claves en la regulación del crecimiento celular. De ahí que, en el presente estudio se evaluó el efecto antígenotóxico de la EGCG y su relación con la apoptosis en ratones Hsd:ICR tratados con compuestos de Cr(VI). Ocho grupos de cinco ratones hembra fueron tratados de la siguiente manera: a) testigo, solo se administró el vehículo; b) EGCG, a tres grupos se les administró EGCG en diferentes dosis (8, 10 o 12 mg/kg) por vía intragástrica; c) CrO₃, se administró 20 mg/kg de CrO₃ por vía intraperitoneal; d) combinado, a tres grupos se les administró la EGCG en dosis de 8, 10 o 12 mg/kg cuatro horas antes de la aplicación del CrO₃. Se realizaron evaluaciones en muestras de sangre periférica tomadas a las 0, 24 y 48 horas después de los tratamientos. Se corroboró el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃ mediante el aumento de los promedios de MN, la relación EPC/ENC y las células no viables. La administración sola de la EGCG no indujo daño genotóxico ni citotóxico. La administración de EGCG previa al tratamiento del CrO₃ presentó un efecto hormético, ya que la dosis más baja (8 mg/kg) fue la que presentó mayor disminución en los promedios de MN y no hubo apoptosis. La dosis de 12 mg/kg de EGCG incrementó los promedios de las células no viables y apoptóticas, sin embargo, al combinarse con el tratamiento de CrO₃ redujo los promedios, sugiriendo que podría presentar tanto actividad antioxidante como prooxidante. La dosis de 8 mg/kg de EGCG fue la que presentó la mayor protección contra el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃.

1. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos estamos expuestos a agentes químicos que se encuentran en el ambiente como los metales pesados, las radiaciones ionizantes y no ionizantes, asbestos, dioxinas, plaguicidas, arsénicos, aflatoxinas, virus etc. Dentro de los metales pesados, los compuestos de cromo hexavalente (Cr(VI)) han llamado la atención debido a su empleo en diversas industrias como la producción de acero, los cromados, el curtido de cueros, los conservantes de madera, entre otros (1). Además, se ha observado que la exposición ocupacional o ambiental a estos compuestos está asociada con algunos tipos de cáncer, siendo uno de los mecanismos de inducción el estrés oxidante (2). Por otro lado, se ha observado que, en los países mediterráneos, con un alto consumo de aceite de oliva, frutas, verduras y vino, la incidencia de cáncer es menor que en países occidentales donde no llevan este tipo de dieta, atribuyéndose estos beneficios a los antioxidantes y en particular a los compuestos fenólicos, comúnmente conocidos como polifenoles (3,4). Se ha mostrado que, flavonoides del tipo galato como la epigallocatequina-3-galato (EGCG) pueden disminuir el daño al ADN, mediante la reducción de micronúcleos (MN) y la regulación de moléculas clave en el crecimiento celular (5). Sin embargo, ha sido poco estudiada la relación de la apoptosis inducida por Cr(VI), con la protección antígenotóxica de la EGCG en diferentes dosis.

2. ANTECEDENTES

2.1. Genotoxicidad y mutagénesis

El genoma de cualquier organismo vivo es dañado constantemente por agentes endógenos y exógenos que modifican la integridad del ADN, a pesar de los sistemas de reparación que eliminan las lesiones (6). Un agente genotóxico es aquel compuesto de naturaleza química o física que puede inducir, directa o

indirectamente, alteraciones en el material genético de los seres vivos. Así entonces, un mutágeno es un agente capaz de inducir cambios deletéreos heredables en el ADN llamados mutaciones. Cuando los mutágenos logran dañar las células gonadales (óvulos y espermatozoides) se generan mutaciones que se transmitirán a generaciones futuras manifestándose comúnmente en desórdenes genéticos. En contraste, si las células que dañan el mutágeno son somáticas sólo se transmitirán de célula a célula en forma clonar, mecanismo que ocurre con el cáncer, por ejemplo (7). Para referirse a los efectos toxicológicos letales y hereditarios, tanto en las células germinales como somáticas, la ciencia que estudia esos factores y sus efectos genéticos adversos es la genética toxicológica. Su objetivo es conocer los eventos que ocurren en los procesos de interacción de las genotoxinas con el ADN y la expresión del daño genético (8). Entre los agentes a los que estamos expuestos que pueden dañar la estructura del ADN y causar una gran variedad de lesiones se encuentra la contaminación ambiental, posicionada como uno de los más importantes problemas que afectan a la sociedad; específicamente, la contaminación por metales pesados (9).

2.2 Metales pesados como inductores de daño genotóxico

De acuerdo con la tabla periódica, los metales pesados son elementos químicos con alta densidad (mayor a 5 g/cm^3), masa y peso atómico por encima de 20, y son tóxicos en concentraciones bajas (10). Algunos de estos elementos son: arsénico, mercurio, plomo, cromo (Cr), entre otros. Su acción negativa sobre la salud es ocasionada al menos por dos vías; la primera, el transporte en el medio (aire, agua, polvo y comida) y la segunda, por alterar la forma bioquímica de los elementos (11). Varios estudios en los que se han utilizado herramientas de toxicogenómica, han demostrado que los metales pesados son capaces de catalizar el deterioro oxidativo de las biomoléculas (12,13). Uno de los principales mecanismos de toxicidad a nivel molecular es por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) debido a la autooxidación de metales como el ion ferroso o ion cuproso, lo que resulta en la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y del radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) vía reacción de Fenton (14). El $\bullet\text{OH}$ es uno de los más reactivos que se conocen, por su

capacidad de iniciar reacciones en cadena de radicales libres (RL) que ocasionan modificaciones y daño irreversible a compuestos celulares como carbohidratos, ADN, proteínas y particularmente lípidos (15). Lo que hace tóxico a los metales pesados no son sólo sus características químicas, sino las concentraciones en las que pueden presentarse, y más importante aún, el tipo de compuesto o metabolito que forman (16). Otros metales, en cambio, cumplen con una función fisiológica esencial dentro del organismo, dentro de los cuales se encuentran los metales como zinc, cobre y manganeso, que son esenciales para la actividad superóxido dismutasa y el control del estrés oxidante en las células (17).

2.2.1. Cromo

El Cr es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la tabla periódica, con un número atómico de 24 y un peso atómico de 51.996. Es el séptimo elemento más abundante sobre la tierra y normalmente se localiza en rocas, suelos, plantas, animales y emisiones volcánicas. Aunque el Cr existe en estados de oxidación que van de -2 a +6, las formas más estables y abundantes son las especies trivalentes y hexavalente. El cromo trivalente (Cr(III)) es un nutriente esencial para los humanos y la falta de éste puede afectar el corazón y ocasionar trastornos metabólicos y diabetes, pero la toma en exceso también tiene sus efectos sobre la salud, como las erupciones cutáneas (12,18). El Cr(VI) comúnmente está presente en solución formando los oxianiones hidrocromato o cromatos. Dependiendo del pH existe en forma de anión soluble en agua, el cual puede persistir en este ambiente por largos períodos y es considerado como un contaminante importante. Los efectos tóxicos del Cr dependen de su estado de oxidación. En el interior de la célula, la toxicidad del Cr se relaciona principalmente con el proceso de reducción del Cr(VI) a estados de oxidación inferiores (como Cr(V) y Cr(III)). Este proceso puede ocasionar la formación de RL, generando estrés oxidante y en consecuencia diversos efectos tóxicos en el ADN, lípidos y en las proteínas (19). Se considera que el daño oxidativo al ADN es responsable de los efectos genotóxicos causados por el cromato. La exposición ocupacional al cromato se postula como un serio problema toxicológico, pues se ha demostrado que entre los efectos que causa a la salud está el

debilitamiento del sistema inmune, daño en los riñones e hígado, problemas respiratorios, alteración del material genético, malestar de estómago y cáncer de pulmón (11,20).

2.3. Estrés oxidante

El estrés oxidante se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de ERO y la disponibilidad y acción de los antioxidantes. Se ha considerado tradicionalmente en términos negativos debido a su asociación con el daño macromolecular y el desencadenamiento de la muerte celular a través de los efectos de los oxidantes en las vías de transducción de señales (21). Aparece en las células y tejidos cuando existe una perturbación del equilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras (22). La alteración del balance entre prooxidantes y antioxidantes, puede tener diversos grados de magnitud. En el estrés oxidante leve, las defensas antioxidantes bastan para restablecer dicho balance, pero el estrés oxidante grave llega a severas alteraciones en el metabolismo celular. Entre las alteraciones que puede provocar está el daño al ADN que puede causar el rompimiento de hebra sencilla o doble; modificación de bases, en donde, la guanina sea la más susceptible a oxidarse, formando, por la adición de $\bullet\text{OH}$, el aducto 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (23,24).

El daño por estrés oxidante puede ser reversible o irreversible dependiendo de factores como la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, y factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes. La oxidación del ADN que no es reparado conlleva a consecuencias biológicas serias como enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica debido al envejecimiento o muerte celular y transformaciones carcinogénicas (25–27).

2.4. Especies reactivas de oxígeno y radicales libres

El oxígeno se acumuló en la atmósfera terrestre de forma significativa hace 2,500 millones de años, lo que posibilitó el desarrollo de la vida aeróbica en nuestro

planeta. La utilización del oxígeno en la respiración celular permite obtener una cantidad de energía mucho mayor que la que proporciona la vía anaeróbica (28). Sin embargo, la utilización del oxígeno por las células genera ERO las cuales son metabolitos derivados del oxígeno. Se caracterizan por estar parcialmente reducidos, lo que les confiere una alta afinidad para aceptar electrones de otras moléculas, pudiendo afectar la estructura o función de las macromoléculas celulares, interfiriendo así con el funcionamiento celular (29,30). El término especies reactivas hace referencia a moléculas muy reactivas, de las cuales se reconocen dos clases: las de tipo RL y las de tipo no radical. Los RL son todas aquellas especies químicas, que en su estructura atómica presentan un electrón impar en el orbital externo, lo que les da una configuración espacial que genera gran inestabilidad (31). Dentro del grupo de RL se encuentran: el óxido nítrico (NO); el radical superóxido ($\bullet\text{O}_2$), el más abundante; el $\bullet\text{OH}$, producto de la oxidación de moléculas orgánicas y resultado de múltiples procesos metabólicos, el más tóxico entre los radicales; entre otros. Entre las moléculas de tipo no radical, se menciona el H_2O_2 , ya que es el oxidante más estable de todos y reacciona a distancia de su lugar de producción (26).

En 1954 la Doctora Rebeca Gerschman sugirió por primera vez que las ERO eran agentes tóxicos y generadores de patologías, estableciendo tres postulados básicos:

1. Los RL constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radicales ionizantes.
2. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes producían los efectos tóxicos.
3. La producción de RL es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis.

Actualmente estos postulados se mantienen vigentes y son la base para múltiples investigaciones (32,33).

2.5. Evaluación del daño genotóxico

Las evaluaciones de daño genotóxico no solo son indispensables para detectar agentes genotóxicos y sus mecanismos inductores, sino también sustancias con propiedades protectoras o moduladoras de daño al ADN (34). Los principales ensayos recomendados para evaluar daño genotóxico son:

- a) ensayos para evaluar mutaciones (bacterias; prueba de Ames).
- b) ensayos *in vitro*, para evaluar daño cromosómico (frecuencia de aberraciones cromosómicas; células de mamífero).
- c) ensayos *in vivo* (médula ósea o sangre periférica; frecuencia de MN (35–37)).

2.5.1 Micronúcleos

La prueba de MN es un método ampliamente utilizado para la detección del daño genotóxico, mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados. Los MN son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que, por causa de agentes genotóxicos, quedan fuera del núcleo durante la división celular. Produciendo pérdida cromosómica y adquiriendo así, una forma generalmente redonda o almendrada y alcanza un diámetro entre 0.4 a 1.6 micras (Figura 1) (35,38).

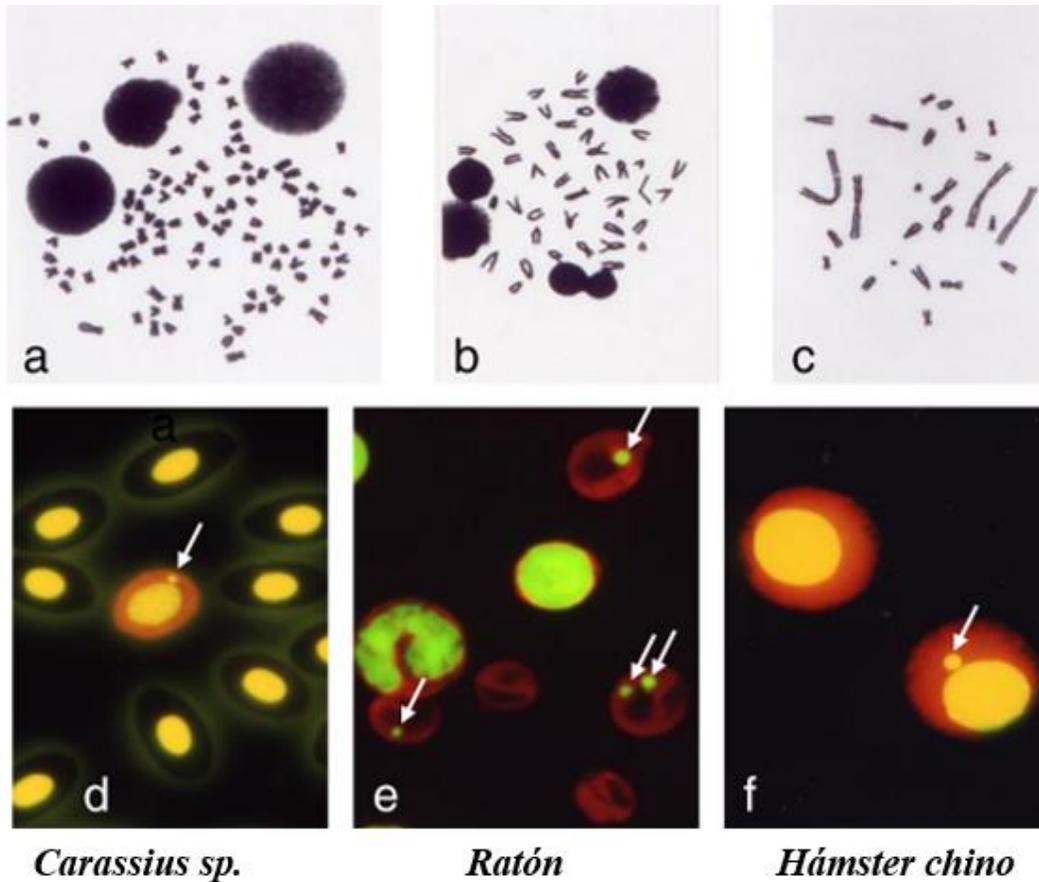


Figura 1. Comparación de la apariencia entre cariotipo y células micronucleadas. Cariotipo y micronúcleo (flecha) de peces de agua dulce (*Carassius sp.*) (a y d), ratón (b y e) y hámster chino (c y f). Los micronúcleos son de estructura simple independientemente de la complejidad del cariotipo de cada especie (Tomada de Hayashi, 2016).

La técnica de MN es un ensayo *in vivo* que se puede realizar en cualquier tejido que esté en proliferación, puede ser en médula ósea o en eritrocitos de sangre periférica de animales donde el bazo no elimine eritrocitos micronucleados (4), sin embargo, los eritrocitos presentan características que le confieren ventajas para analizar. El normoblasto ortocromático, 5 horas después de la última mitosis, expulsa su núcleo al pasar de la médula ósea al torrente circulatorio. Al perder su núcleo, el normoblasto ortocromático se convierte en reticulocito o eritrocito policromático (EPC), que es el eritrocito joven que sale a la circulación. Los EPC tardan aproximadamente 48 horas para convertirse en eritrocitos maduros o eritrocitos

normocromáticos (ENC) (39). Los eritrocitos se pueden diferenciar entre ENC y EPC utilizando diferentes colorantes como May-Gruenwald, Giemsa y naranja de acridina (NA) (38,40).

Utilizando la técnica de tinción con NA, los MN, EPC y ENC se pueden distinguir utilizando un microscopio de fluorescencia. Los EPC presentan color rojo por el ARN que aún contienen, a diferencia de los ENC que no se tiñen (ya perdieron el ARN), y los MN se tiñen de color verde fluorescente por la presencia de ADN (41).

2.5.2. Apoptosis y necrosis

La muerte celular es un evento importante en el desarrollo embrionario, la renovación de los tejidos y el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Este fenómeno puede presentar apoptosis, autofagia y necrosis. La muerte celular por apoptosis o también llamada muerte celular programada (ya que requiere de la activación de genes para que se lleve a cabo este tipo de muerte celular). Es una muerte fisiológica, que se puede presentar, ya sea porque el organismo requiera para su desarrollo de la muerte en particular de una célula, o bien porque la célula sufrió un daño irreparable y muere en beneficio del organismo (42). En este tipo de muerte, la integridad de la membrana plasmática se mantiene intacta hasta que comienza la formación de cuerpos apoptóticos, cuya función es contener el material celular y evitar que éste actúe como desencadenante de la muerte de otras células. Una vez finalizada la apoptosis, otras células especializadas fagocitan los cuerpos apoptóticos (43). Este proceso de muerte celular programada puede activarse de forma general a través de dos vías: una vía intrínseca (mitocondrial) y una extrínseca (por receptores de muerte), que dependen directamente del origen del estímulo de muerte (Figura 2) (44).

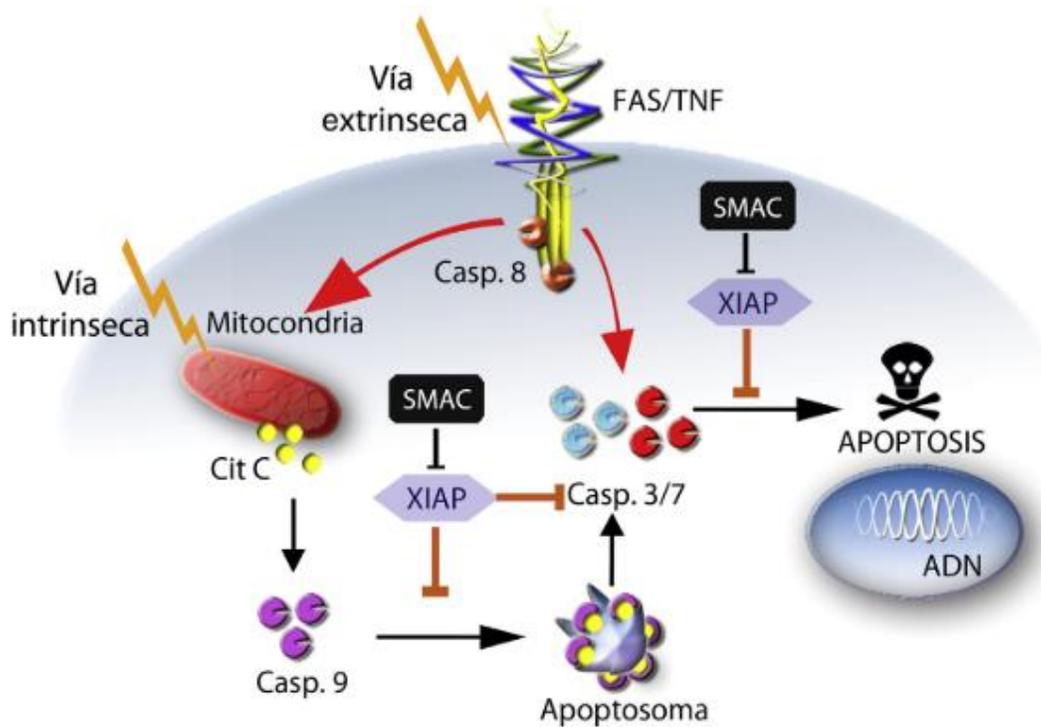


Figura 2. Vías de activación de apoptosis. Vía Intrínseca a través de la mitocondria, mediante la liberación de citocromo, activación de caspasa 9, formación de apoptosoma y posterior inducción de apoptosis a través de la caspasa 3; vía extrínseca a través de receptores de membrana asociados a dominios de muerte, activación de la caspasa 8, y posterior inducción de apoptosis a través de la caspasa 3 (Tomada de Muñoz Cendales & Cuca Suárez, 2016).

Por otra parte, la necrosis es el proceso de muerte que se da cuando una célula presenta un daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana que la lleva a muerte por lisis. En estas circunstancias se libera el contenido celular, lo que *in vivo* favorece la aparición de procesos inflamatorios. Cuando una célula se encuentra en estado necrótico presenta hinchamiento de orgánulos, dilatación del retículo endoplásmico, ruptura temprana de la membrana plasmática y liberación del contenido citoplasmático al espacio extracelular. (46). Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos (47).

El análisis de la muerte celular puede ser llevado a cabo en sistemas *in vivo* e *in vitro*. Existen varios métodos que permiten la adecuada diferenciación entre la muerte por apoptosis y necrosis. Uno de ellos es el método por tinción diferencial con los fluorocromos NA y bromuro de etidio (BrEt). El colorante NA tiene la capacidad de introducirse a las células, tanto viables, como no viables obteniendo una fluorescencia verde al intercalarse dentro del ADN, o bien, una fluorescencia roja-naranja si se une al ARN. El BrEt se introduce únicamente a las células no viables debido a la pérdida de integridad de la membrana plasmática, de tal manera que puede intercalarse en el ADN dando una fluorescencia roja (Figura 3) (48).

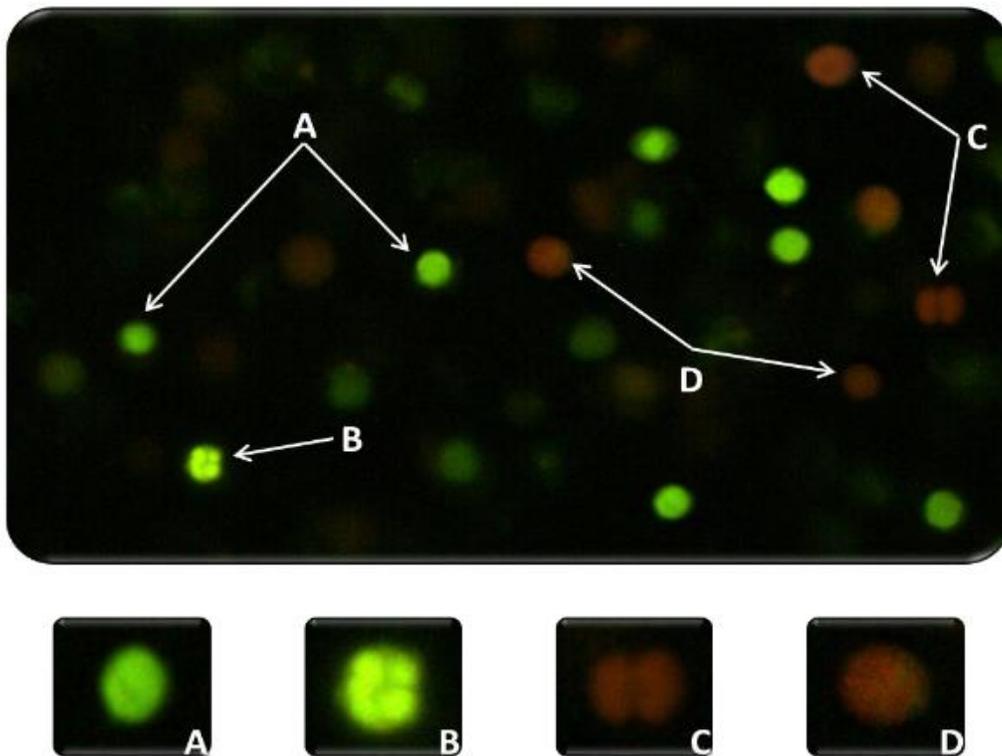


Figura 3. Tinción con fluorocromos NA/BrEt. Células viables se tiñen uniformemente de verde (A). Células apoptóticas tempranas color verde con membrana plasmática intacta con “puntos” internos visibles (B). Células apoptóticas tardías se tiñen de naranja-verde brillante debido a que comienza la condensación de la membrana y el BrEt puede ingresar a la célula (C). Células necróticas se tiñen de color naranja brillante debido a la entrada completa de BrEt en estas células (D) (Tomada de García-Rodríguez et al., 2016.)

2.6. Protección de daño genotóxico

La acción antimutagénica de un compuesto queda definida como “la característica o acción de esta sustancia para disminuir o evitar el daño mutacional en el ADN de la célula” (49). Los antimutágenos pueden ser agrupados en dos grandes categorías: los agentes bloqueadores, que impiden que los carcinógenos alcancen o reaccionen con los sitios diana, y los agentes supresores que previenen la evolución de los procesos neoplásicos (50).

Se ha descrito que dentro de los mecanismos de antimutagénesis se pueden encontrar:

- Desmutagénesis; comprende a la actividad que se presenta en el organismo para excretar los agentes mutagénicos, desactivarlos ya sea por medio de mecanismos físicos o químicos. Inhibir su activación enzimática e inhibir la entrada de éstos a la célula, así como impedir su formación endógena.
- Bioantimutagénesis; consisten en disminuir la frecuencia de mutaciones, mediante la reparación del ADN, inhibición y control de la replicación celular y el control de la expresión génica (49).

En los últimos años se ha demostrado algunos compuestos químicos como los metabolitos secundarios de las plantas presentan actividad como antimutágenos, antibióticos, pesticidas, reguladores de la división celular, entre otros (51). A Los compuestos presentes en plantas y alimentos que pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas incluyendo el cáncer se les llama “quimio-protectores”. La quimio-protección contra el cáncer implica la utilización de productos naturales, sintéticos o biológicos que revierten, suprimen o previenen el desarrollo de tumores. Un grupo de gran interés en este aspecto de la quimio-protección al cáncer, son los polifenoles, compuestos generalmente no tóxicos que presentan una variedad de actividades biológicas (antialérgicos, antiinflamatorios, antioxidantes, actividad antimutagénica, entre otras) (52,53).

2.7. Antioxidantes

Desde hace varios años se ha estudiado en específico a un grupo de compuestos químicos con ciertas propiedades y funciones en común, las cuales se han clasificado en un grupo denominado antioxidantes. Se caracterizan por tener como función primordial impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias, de manera que interactúan con los RL y los neutralizan, lo que les impide causar daño (54). Las sustancias antioxidantes se han clasificado en dos principales sistemas, el sistema enzimático y el sistema no enzimático; también conocidos como endógeno y exógeno, respectivamente. Pueden actuar tanto en el espacio intracelular como en el extracelular. El primer sistema de defensa correspondiente al sistema endógeno está basado en un complejo enzimático de defensa que puede incluir el superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa oxidado (49).

Un antioxidante dietético es una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos (57). Para proteger a la célula en contra de los efectos de la oxidación, los sistemas de defensa antioxidante pueden actuar en conjunto para formar un sistema íntegro en donde la dieta es la mayor fuente de antioxidantes y microelementos para la síntesis de enzimas antioxidantes. En este sentido, se sabe que los compuestos fenólicos son los antioxidantes más abundantes en frutas, verduras y bebidas derivadas de algunas plantas, las cuales actúan como atrapadores de las ERO (58).

2.8. Polifenoles

En el reino vegetal podemos distinguir cuatro grandes grupos de compuestos fitoquímicos: sustancias fenólicas, sustancias terpénicas, sustancias azufradas y sustancias nitrogenadas (alcaloides). Los polifenoles son los que se encuentran de forma general en todos los alimentos de origen vegetal. Son metabolitos secundarios de las plantas que poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo. Pueden ser divididos en

varios subgrupos atendiendo a su estructura básica. Los flavonoides, con estructura básica C6-C3-C6, incluyen a las antocianinas, los flavonoles y flavonas, las flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, las isoflavonas y los flavan-3-oles (59). Desde el punto de vista de su actividad biológica muchos polifenoles tienen propiedades captadoras de RL, lo que les confiere actividad antioxidante. Se ha reportado que inhiben las lipoproteínas de baja densidad. Estudios epidemiológicos, han sugerido que la ingesta de fitoquímicos y en particular polifenoles está asociada con la disminución de enfermedades incluyendo las cardiovasculares, el cáncer y las neurodegenerativas (60). Existen también sustancias con actividad estrogénica (fitoestrógenos), como las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol. Mientras que otros, como los taninos, son capaces de fijar metales y proteínas, lo que afecta a la biodisponibilidad de éstos y puede estar en el origen de algunos efectos inespecíficos (por ejemplo, antimicrobianos), o prevención de enfermedades neurodegenerativas (61). Los compuestos de tipo flavonoide que se encuentran presentes en la mayoría de granos, verduras y frutas, están jugando un papel importante en el descubrimiento de nuevos fármacos menos tóxicos. Esto se debe a sus efectos protectores frente a algunos tipos de cáncer; hecho que los ha convertido en agentes potenciales para el tratamiento de esta enfermedad (51). Por lo tanto, una forma de favorecer la salud es incorporar en nuestra dieta productos naturales que presentan actividades biológicas benéficas (62).

2.8.1. (-)-epigallocatequina-3-galato

La EGCG, es una molécula que, desde el punto de vista estructural, es un polifenol del grupo de los flavonoides, que contiene en su estructura, mayor cantidad de potenciales grupos funcionales (Figura 4). Se ha encontrado abundantemente en el té verde, presente en las uvas y el vino tinto; así como la genistéina en la soya y el selenio en las nueces brasileñas. También, se considera que presenta efectos benéficos, principalmente atribuido a su acción antioxidante (63).

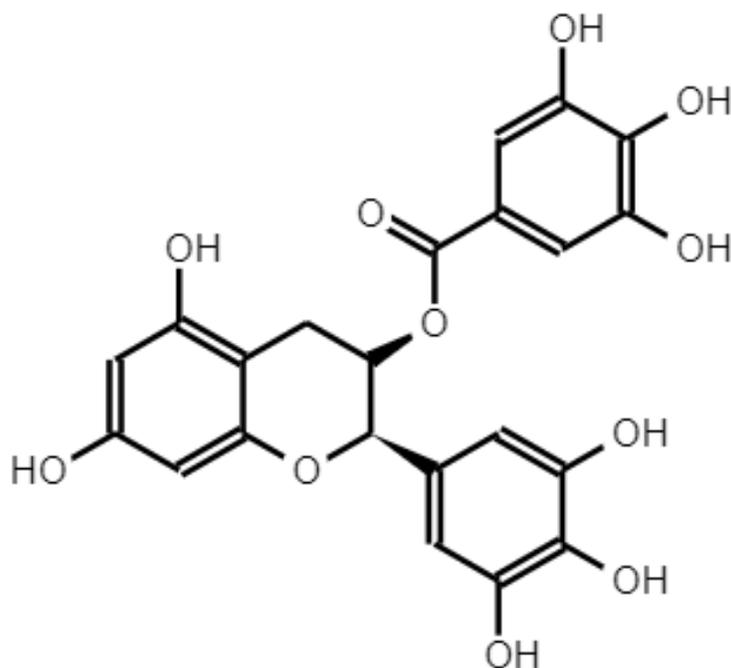


Figura 4. Estructura química de la EGCG ((-)-epigallocatequina 3-galato).

Los efectos antioxidantes de EGCG se manifiestan en la eliminación de RL en el cuerpo y la inhibición de la formación de ERO. Estudios sugieren que la EGCG podría disminuir el riesgo de varios trastornos humanos asociados con el estrés oxidativo (64). Capaz de alterar mecanismos epigenéticos mediante la remodelación de la cromatina y reactivación de genes silenciados por su capacidad de modificar la acetilación y desacetilación de histonas. Estas propiedades de los polifenoles podrían cambiar el epigenoma de las células con cáncer, aunque actualmente son consideradas como una alternativa de prevención (65). Previamente García-Rodríguez, et al. (66) observaron que la administración intraperitoneal (i.p.) *in vivo* de EGCG, quercetina y rutina disminuyen la inducción de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) tras el tratamiento con CrO₃. Estos hallazgos indican que los flavonoides ejercen efectos protectores contra el daño genotóxico inducido por compuestos metálicos como el Cr(VI). Se realizaron experimentos con administración de 10 mg/kg de EGCG por sonda antes de 20

mg/kg de CrO_3 . Esta dosis de EGCG también aumentó el número de células apoptóticas cuando se administró sola o junto con Cr(VI) , lo que sugiere que la inducción de la apoptosis podría contribuir a la eliminación de células atribuidas al daño del ADN inducido por Cr(VI) (34).

Por otro lado, también se sugiere que la EGCG puede presentar efectos prooxidantes significativos. Galati G, et al. (67) incubó hepatocitos con EGCG durante 24 horas, lo que resultó en una reducción de la función de las células hepáticas. Identificó la disminución de lactato deshidrogenasa, un marcador de daño de la membrana celular, sugiriendo que la EGCG puede colapsar el potencial de la membrana mitocondrial e inducir la formación de ERO.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Cr(VI) es ampliamente utilizado en diferentes industrias como producción de acero, cromados, curtido de cueros, conservantes para madera, entre otros. Se ha observado que la exposición ocupacional o ambiental está asociada con la inducción de algunos tipos de cáncer, siendo el estrés oxidante uno de los mecanismos de daño genotóxico. En contraparte, se ha observado que la administración de EGCG puede reducir el daño genotóxico inducido por la exposición a Cr(VI). Además de que, este polifenol es capaz de enviar a apoptosis a las células cancerígenas. De ahí que, es de interés estudiar el efecto dosis-respuesta de la relación de la apoptosis inducida por Cr(VI), con la protección antigenotóxica de la EGCG.

4. HIPÓTESIS

Se ha observado que la EGCG presenta propiedades protectoras contra el daño genotóxico, además de enviar a apoptosis a células cancerígenas. Sin embargo, se han observado efectos antioxidantes y prooxidantes relacionados con la dosis administrada. Por lo tanto, se espera que la administración de EGCG contribuya en la eliminación de células con daño al ADN mediante la inducción dosis-respuesta de apoptosis.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto antigenotóxico de la EGCG y su relación con la apoptosis en ratones Hsd:ICR tratados con Cr(VI).

5.2. Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto dosis-respuesta de la EGCG sobre el daño genotóxico inducido por Cr(VI), mediante el ensayo de MN en sangre periférica de ratón.
2. Analizar el efecto dosis-respuesta de la EGCG sobre el daño citotóxico del Cr(VI), mediante la relación de EPC/ENC y la viabilidad celular en sangre periférica.
3. Evaluar el efecto dosis-respuesta de la EGCG sobre la apoptosis, mediante la cuantificación de células apoptóticas tempranas y tardías en sangre periférica de ratones tratados con Cr(VI).
4. Relacionar el efecto dosis-respuesta de la EGCG sobre el daño genotóxico y la inducción de apoptosis en ratones tratados con Cr(VI).

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. Animales

Se emplearon ratones hembra de la cepa Hsd:ICR con una edad de entre 45 y 60 días, con peso variable entre 27 a 35 g. Se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, con temperatura ambiente controlada (22 ± 2 °C) y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los ratones tuvieron libre acceso al agua y al alimento (Purina-México; comida para roedores pequeños).

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo se establecieron con base en los lineamientos de los programas EPA (Agencia de Protección Ambiental por sus siglas en inglés), la OECD (Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo) y la FDA (Administración de Alimentos y Droga por sus siglas en inglés) (4,68,69). El comité de bioética de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza aprobó los protocolos experimentales en el estudio (número de registro: FESZ-CE/21-118-13).

6.2. Reactivos

Los reactivos empleados en el estudio se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Como colorantes en la técnica de MN y apoptosis se utilizó NA [CAS No. 10127-02-3] y BrEt [CAS No. 1239-45-8]. La catequina del té verde que se utilizó fue EGCG [989-51-5] y como agente inductor de daño al ADN se utilizó trióxido de cromo (CrO_3) [CAS No. 1333-82-0].

6.3. Tratamientos

Los tratamientos de EGCG y CrO_3 se prepararon en una solución mediante su disolución en agua destilada estéril. Se realizaron grupos conformados al azar por cinco ratones hembra en cada grupo y se trataron con base al protocolo que se

muestra en la Figura 5. Al grupo testigo, se les administró sólo el vehículo (0.25 ml de agua destilada estéril). A tres grupos de polifenol se les administró diferentes dosis de EGCG (8, 10 o 12 mg/kg) vía intragástrica (i.g.), respectivamente. Al grupo CrO₃ se administró una dosis de 20 mg/kg por vía i.p., con base en los resultados de estudios previos en los que se observó daño genotóxico (70). A los grupos experimentales se les administró diferentes dosis de EGCG (8, 10 o 12 mg/kg) vía i.g. previamente a la aplicación del CrO₃ vía i.p.

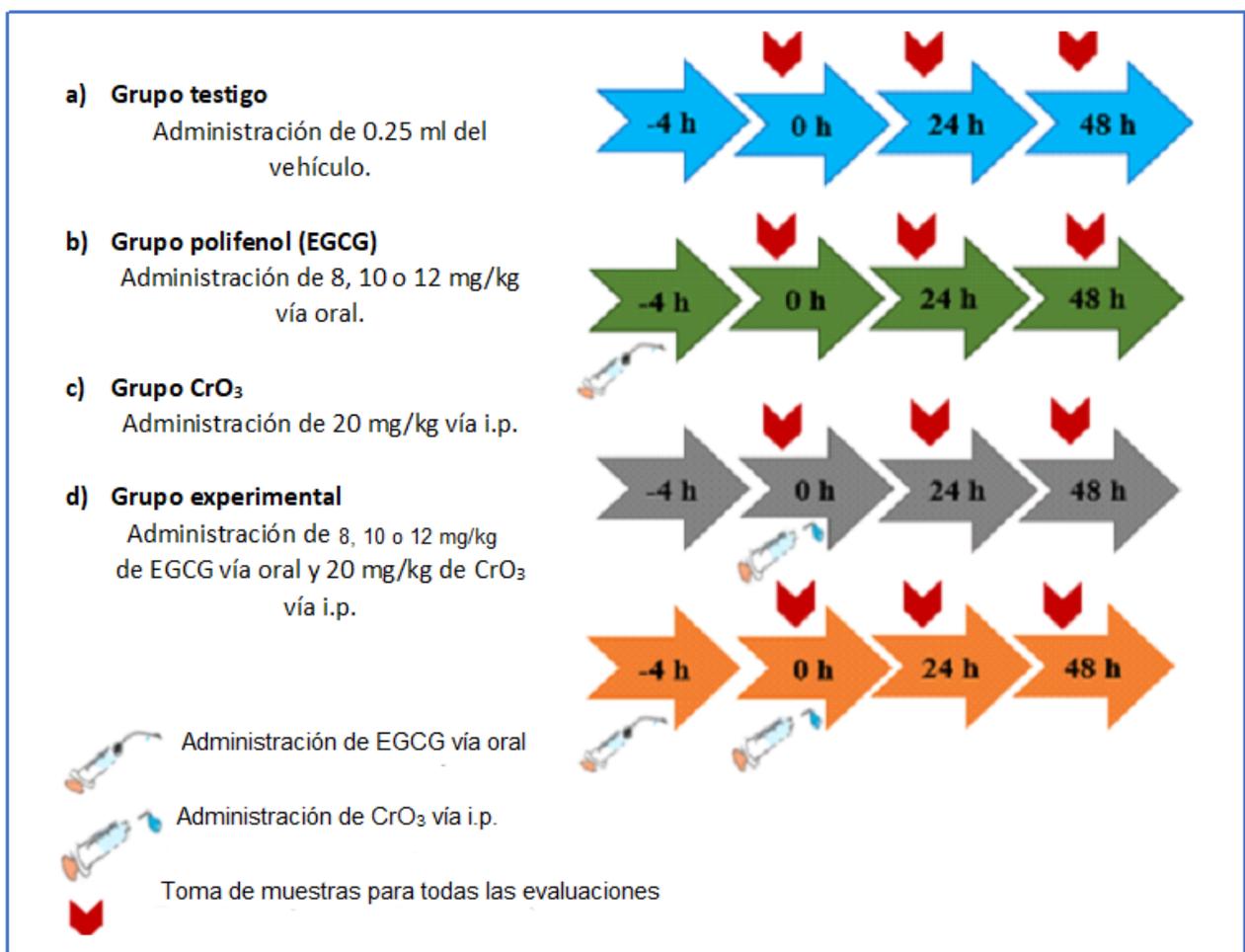


Figura 5. Protocolo para la administración de tratamientos y toma de muestras.

Se tomaron muestras de sangre periférica a las 0, 24 y 48 horas para establecer la cinética de MN, la relación de EPC/ENC, el análisis de la viabilidad celular, apoptosis y necrosis.

6.4. Micronúcleos

Se prepararon laminillas cubiertas con NA, con base en la técnica propuesta por Hayashi, et al. (41). Se colocaron aproximadamente 5 µl de muestra de sangre periférica e inmediatamente se colocó un cubreobjetos (24 x 40 milímetros). La observación de las muestras se realizó con ayuda de un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión amarilla. La evaluación del daño genotóxico se realizó contando 4000 EPC por ratón, entre los cuales se cuantificaron los EPC-MN. Para la evaluación de daño citotóxico, se contaron 2000 eritrocitos totales por ratón, entre los cuales se cuantificó EPC y ENC.

6.5. Apoptosis, necrosis y viabilidad celular

Las células apoptóticas se evaluaron con base al método propuesto por McGahon et al. (48), con modificaciones por García-Rodríguez et al. (71). Se evaluaron 300 células por ratón, de las cuales se cuantificaron las células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas. Para el análisis de viabilidad se contabilizaron únicamente las células viables (sanas + apoptóticas tempranas) y no viables (apoptóticas tardías + necróticas).

6.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se presentan en promedios con su desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey empleando el programa estadístico GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) Para todos los análisis se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de micronúcleos

En la Figura 6 se muestran los eritrocitos de sangre periférica teñidos con NA. Los EPC se tiñeron y mostraron una fluorescencia naranja (Figura 6(a)), mientras que los ENC no se tiñeron, por lo que se observan como una “sombra” (Figura 6(b)). La NA también permitió la identificación de MN en eritrocitos, que se exhibió como una fluorescencia amarilla brillante (Figura 6(c)).

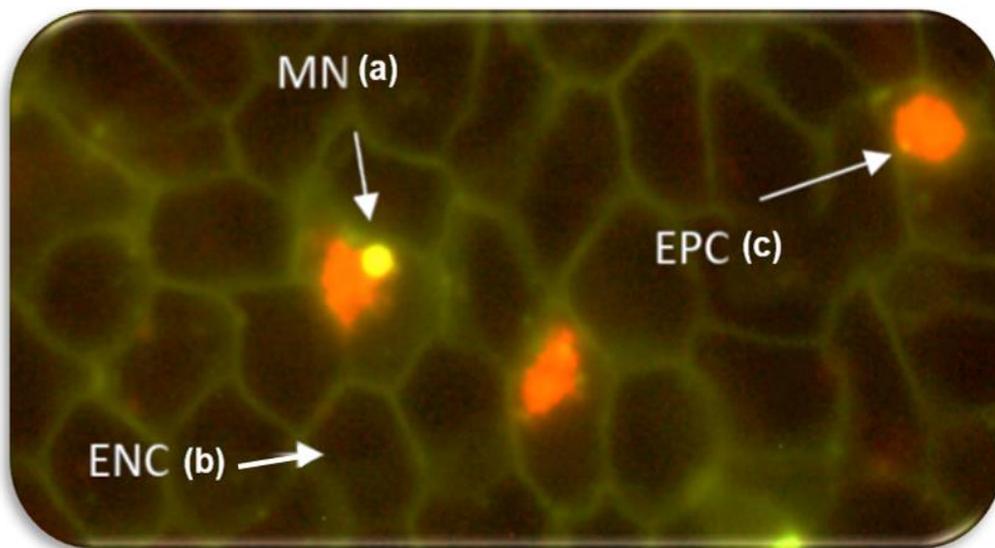
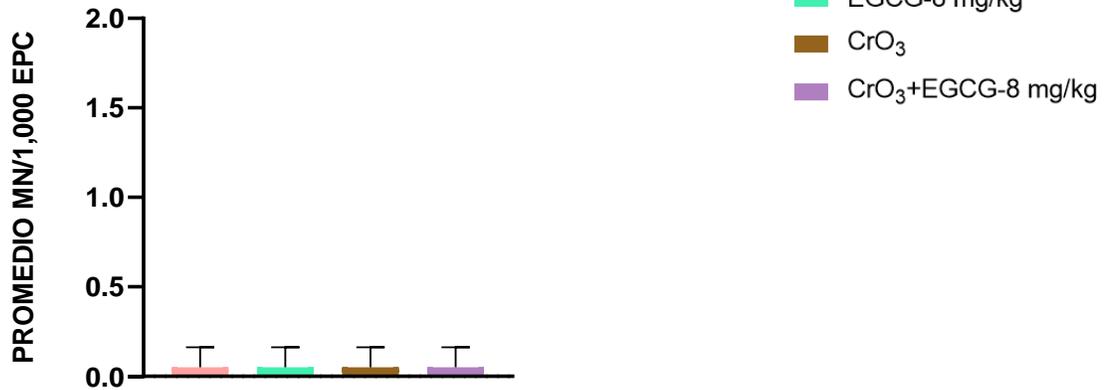


Figura 6. Microfotografía fluorescente (1000x) de células de sangre periférica. (a) Eritrocitos policromáticos, EPC; (b) Eritrocitos normocromáticos, ENC y (c) micronúcleos, MN.

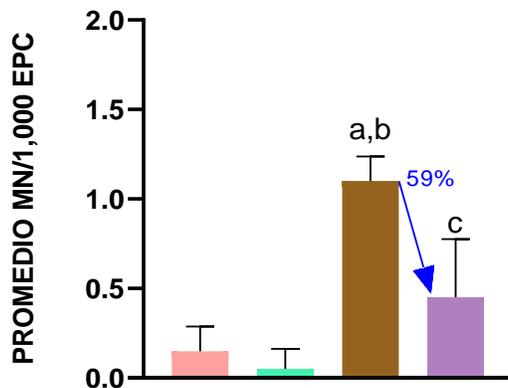
En las figuras 7, 8 y 9 se muestran los promedios de MN evaluados de las 0 a las 48 horas con las diferentes dosis (8, 10 o 12 mg/kg de EGCG). En los grupos tratados únicamente con EGCG no se incrementó los promedios de MN, mientras que el de CrO₃ los incrementó significativamente en comparación con el testigo. Cuando se combinaron los tratamientos de EGCG y CrO₃ (EGCG+CrO₃) se observó una reducción significativa en los promedios de MN a las 24 y 48 horas. La mayor reducción se observó con la dosis de 8 mg/kg (alrededor del 60%) (Figura 7).

EGCG-8 mg/kg

a) 0 HORAS



b) 24 HORAS



c) 48 HORAS

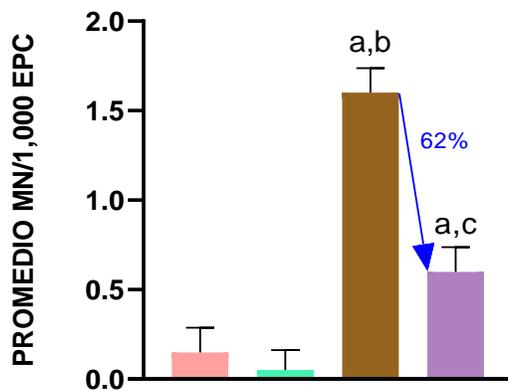
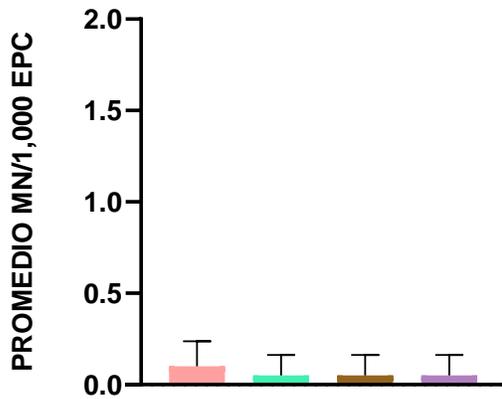


Figura 1. Análisis del efecto de la EGCG-8mg/kg y el CrO₃ sobre la frecuencia de micronúcleos. **a)** tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg, 0 horas; **b)** tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg, 24 horas; **c)** tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg, 48 horas. Se evaluaron un total de 4000 EPC en cada ratón (n=5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Análisis por tratamiento $p < 0.05$: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-8 mg/kg+CrO₃, ^cvs. EGCG-8 mg/kg.

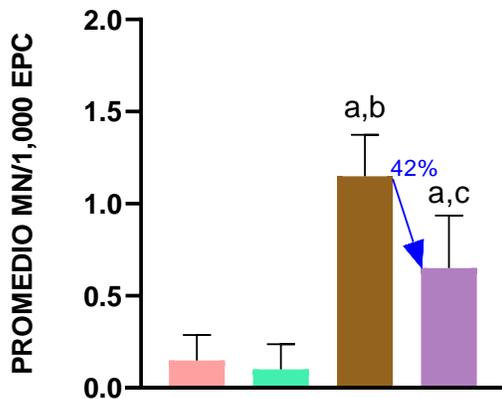
EGCG-10 mg/kg

a) 0 HORAS



Testigo
EGCG-10 mg/kg
CrO₃
CrO₃+EGCG-10 mg/kg

b) 24 HORAS



c) 48 HORAS

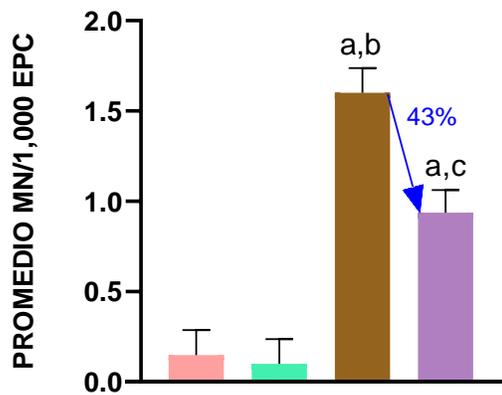
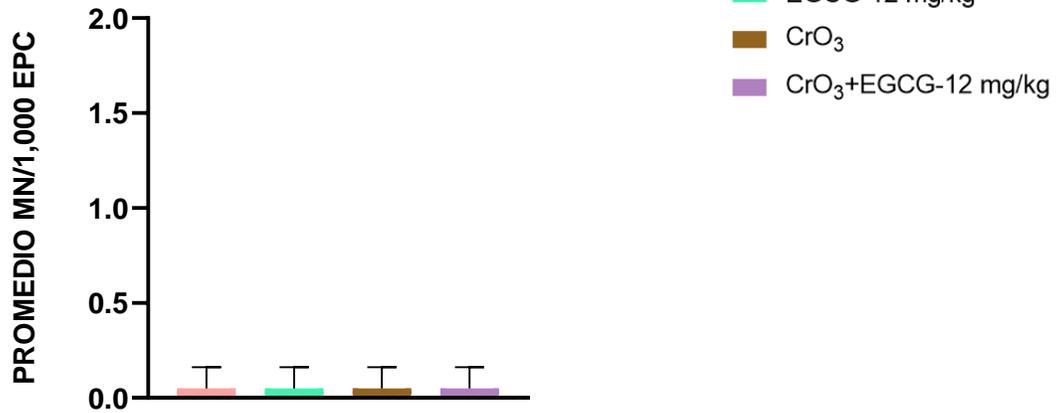


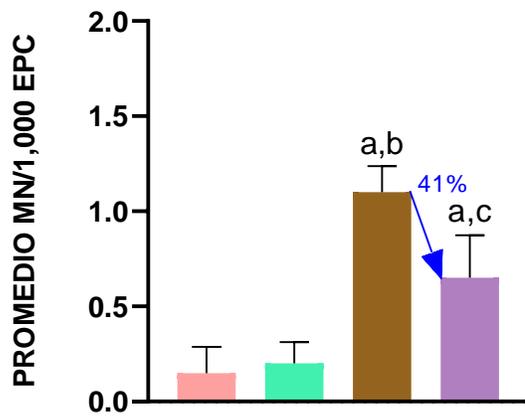
Figura 2. Análisis del efecto de la EGCG y el CrO₃ sobre la frecuencia de micronúcleos. **a)** tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 0 horas; **b)** tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 24 horas; **c)** tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 48 horas. Se evaluaron un total de 4000 EPC en cada ratón (n=5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Análisis por tratamiento p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-10 mg/kg+CrO₃, ^cvs. EGCG-10 mg/kg.

EGCG-12 mg/kg

a) 0 HORAS



b) 24 HORAS



c) 48 HORAS

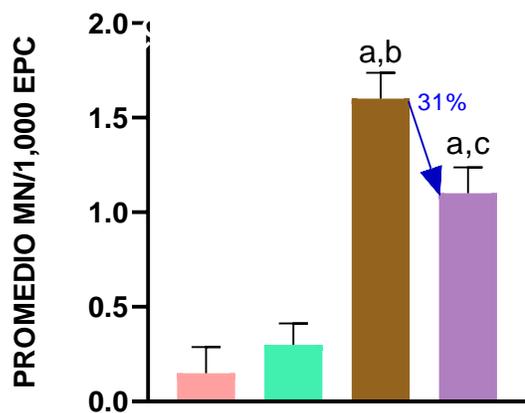


Figura 3. Análisis del efecto de la EGCG y el CrO₃ sobre la frecuencia de micronúcleos. **a)** tratamiento con dosis de EGCG-12 mg/kg, 0 horas; **b)** tratamiento con dosis de EGCG-12 mg/kg, 24 horas; **c)** tratamiento con dosis de EGCG-12 mg/kg, 48 horas. Se evaluaron un total de 4000 EPC en cada ratón (n=5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Análisis por tratamiento p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-12 mg/kg+CrO₃, ^cvs. EGCG-12 mg/kg.

7.2 Evaluación de apoptosis y necrosis

En la figura 10 se muestran células nucleadas evaluadas mediante la tinción diferencial con NA/BrEt. En las células viables el núcleo emite una fluorescencia verde (Figura 10a), en las células apoptóticas tempranas el ADN ha comenzado a fragmentarse, pero aún exhiben núcleos verdes (Figura 10b), las células apoptóticas tardías muestran color rojo con cromatina condensada en los núcleos (Figura 10c) y las células necróticas se tiñen uniformemente de rojo (Figura 10d).

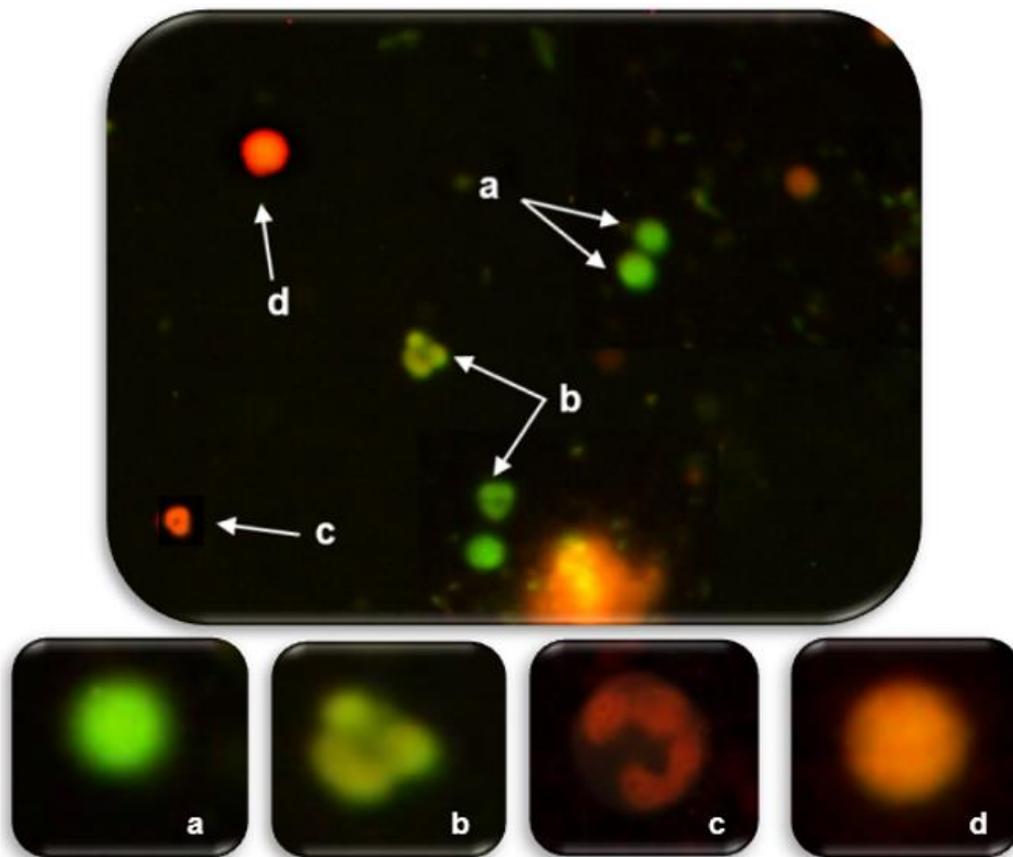
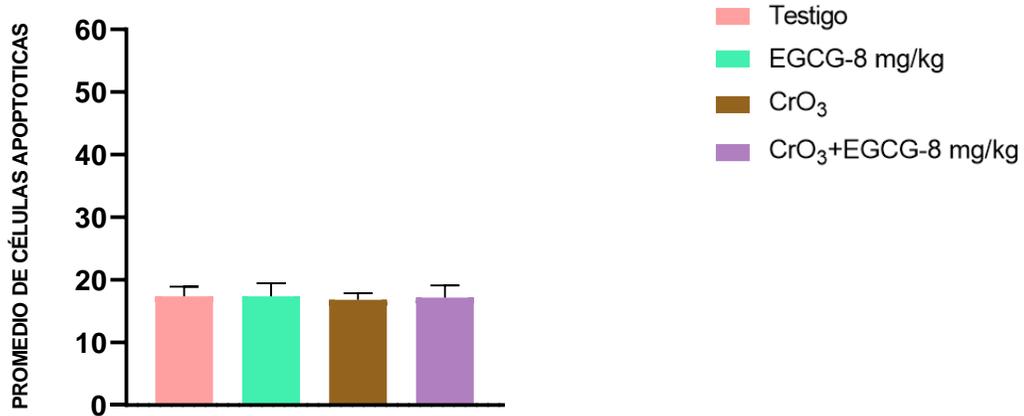


Figura 10. Células teñidas con NA/BrEt. Microfotografía fluorescente (400x) de células nucleadas de sangre periférica de ratón teñidas con NA/BrEt. **a)** Células viables, **b)** Células apoptótica temprana, **c)** Célula apoptótica tardía y **d)** Célula necrótica.

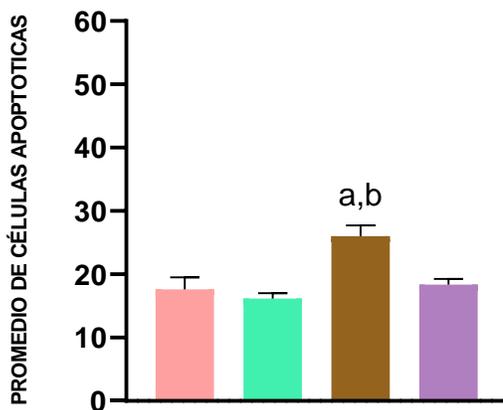
En las figuras 11, 12 y 13 se muestran los promedios de células apoptóticas evaluadas a las 0, 24 y 48 horas con las diferentes dosis (8, 10 o 12 mg/kg de EGCG). Los tratamientos de EGCG-8 y 10 mg/kg no modifican los promedios de células apoptóticas al compararse con el grupo testigo. Sin embargo, la administración de EGCG-12 mg/kg incrementó las células apoptóticas significativamente a las 48 horas. El tratamiento de CrO₃ aumentó los promedios de las células apoptóticas significativamente en ambos tiempos de evaluación después de la administración del tratamiento (24 y 48 horas). En el tratamiento de EGCG y CrO₃ se observó una reducción significativa a las 48 horas en los promedios de las células apoptóticas comparado con el grupo CrO₃. En este mismo grupo solo se redujeron significativamente los promedios de células apoptóticas en las dosis de EGCG-8 y 10 mg/kg a las 24 horas. De manera similar a las reducciones de MN, la dosis de 8 mg/kg de EGCG fue la que presentó el mayor efecto (alrededor de 59%) a las 48 horas (Figura 11).

EGCG-8 mg/kg

a) 0 HORAS



b) 24 HORAS



c) 48 HORAS

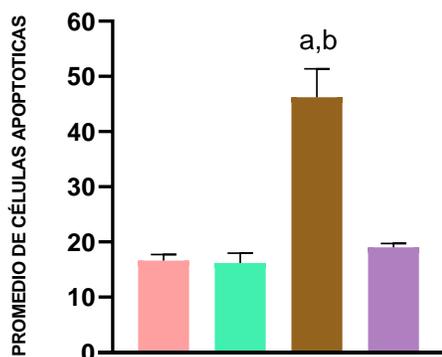
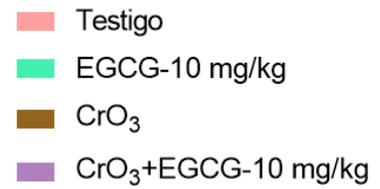
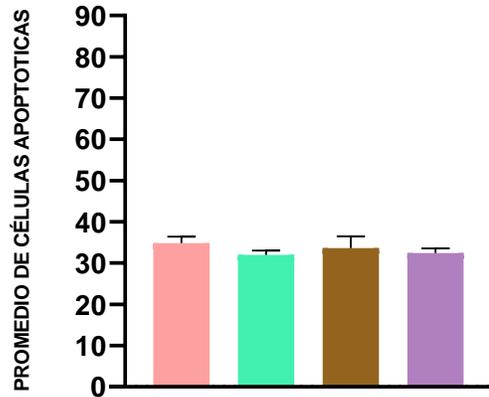


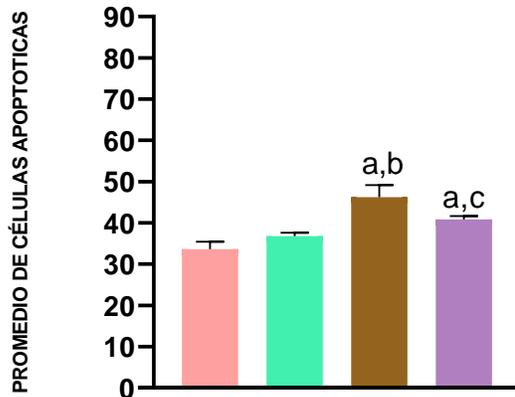
Figura 4. Análisis del efecto de la EGCG-8 mg/kg y el CrO₃ sobre las frecuencias de células apoptóticas. (temprana y tardía) en sangre periférica, evaluadas a las 0, 24 y 48 horas después de los tratamientos. **a)** tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg 0 horas; **b)** tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg, 24 horas; **c)** tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg, 48 horas. Se evaluaron un total de 300 células en cada ratón (n=5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Análisis por tratamiento p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-8 mg/kg+CrO₃.

EGCG-10 mg/kg

a) 0 HORAS



b) 24 HORAS



c) 48 HORAS

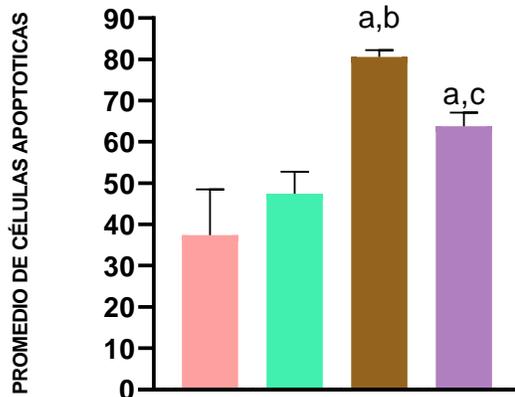
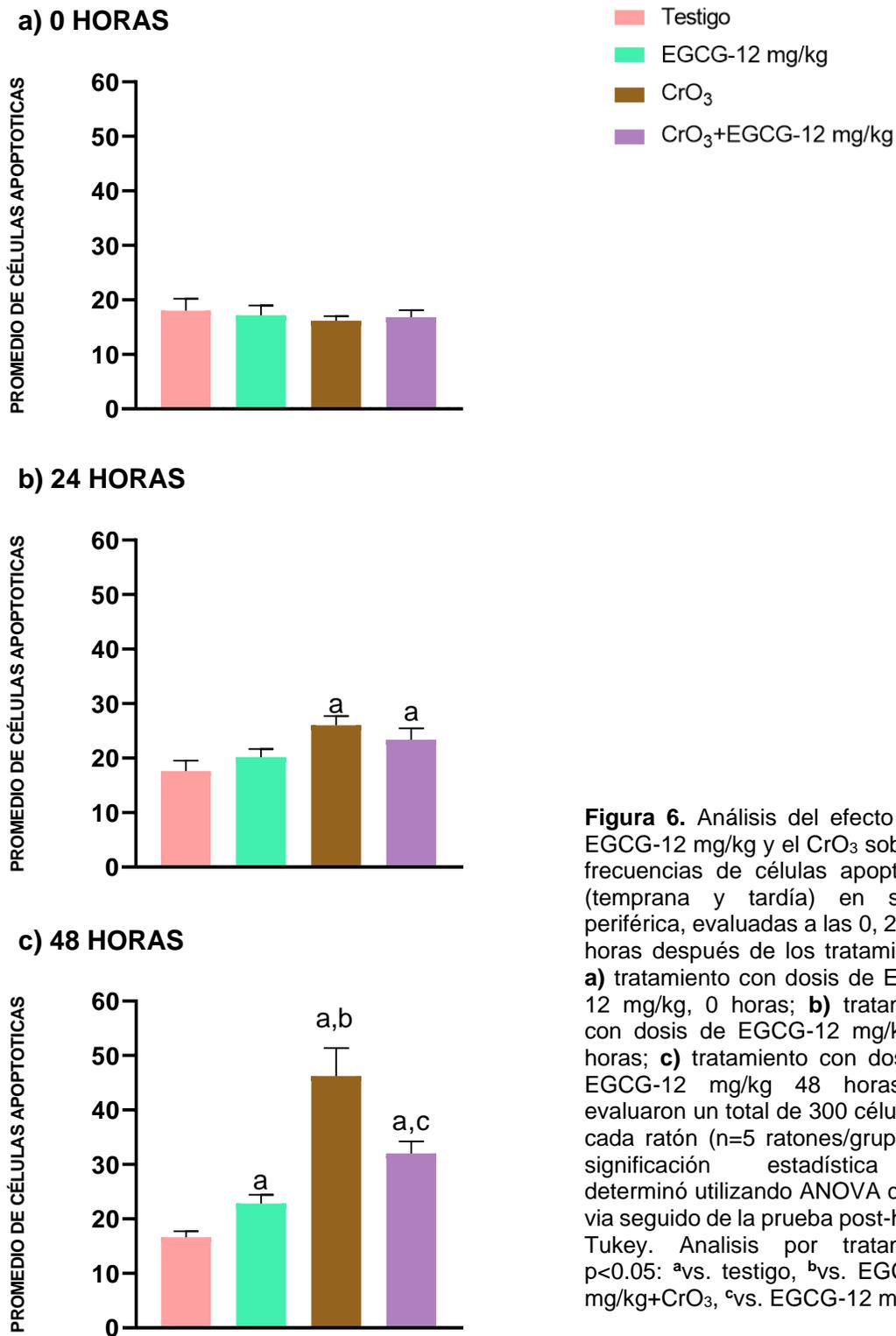


Figura 5. Análisis del efecto de la EGCG-10 mg/kg y el CrO₃ sobre las frecuencias de células apoptóticas (temprana y tardía) en sangre periférica, evaluadas a las 0, 24 y 48 horas después de los tratamientos. a) tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 0 horas; b) tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 24 horas; c) tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 48 horas. Se evaluaron un total de 300 células en cada ratón (n=5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Análisis por tratamiento $p < 0.05$: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-10 mg/kg, ^cvs. EGCG-10 mg/kg+CrO₃.

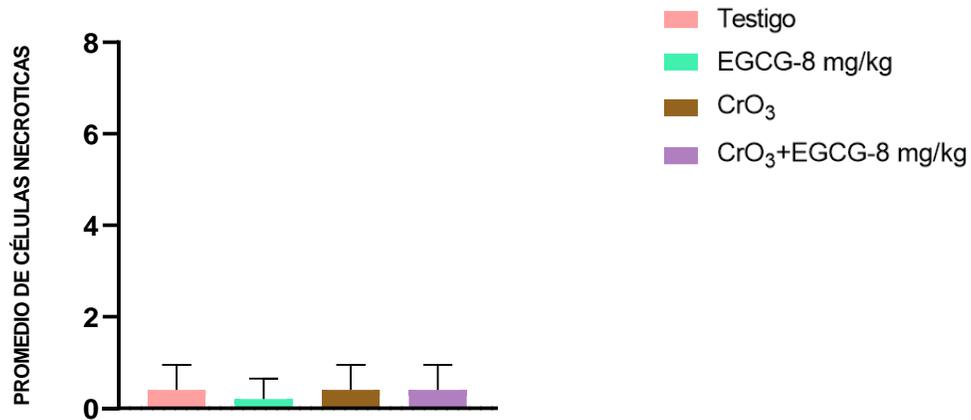
EGCG-12 mg/kg



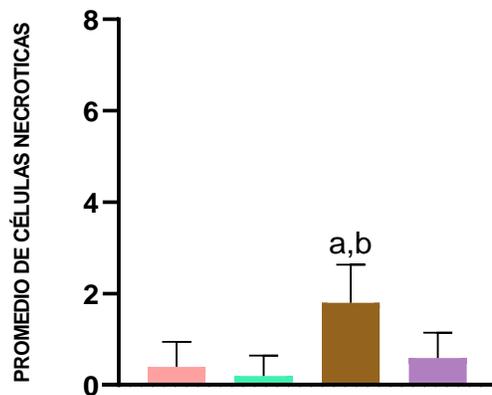
En la figura 14, 15 y 16 se presentan los promedios de células necróticas evaluadas en los mismos tiempos y grupos que las células apoptóticas. Se observó que en el grupo de EGCG no se modificaron los promedios de células necróticas. Mientras que, en el grupo de CrO₃ se incrementaron significativamente los promedios de las células necróticas en comparación con el grupo testigo en ambos tiempos de evaluación después de la administración del tratamiento (24 y 48 horas). Cuando se combinaron los tratamientos, en el grupo de EGCG+CrO₃ se restablecieron los valores en los promedios de las células necróticas en comparación con el testigo. De manera similar a las reducciones de MN y apoptosis la dosis de 8 mg/kg de EGCG fue la que presentó el mayor efecto (alrededor de 86%) a las 48 horas (Figura 14).

EGCG-8 mg/kg

a) 0 HORAS



b) 24 HORAS



c) 48 HORAS

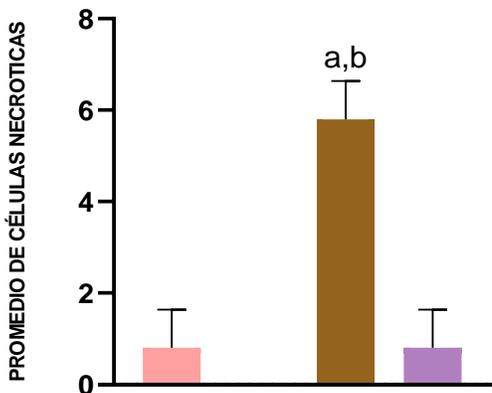
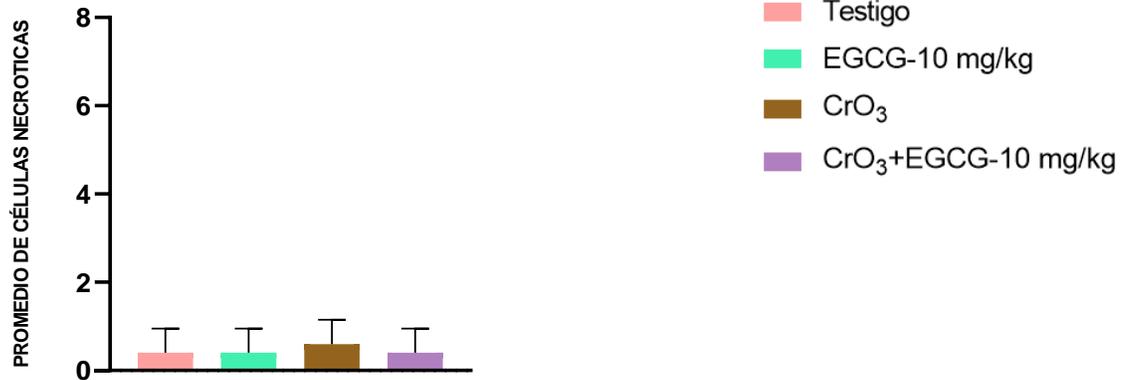


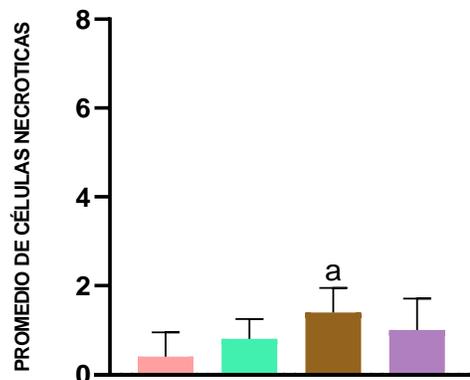
Figura 7. Análisis del efecto de la EGCG-8 mg/kg y el CrO₃ sobre las frecuencias de células necróticas evaluadas a las 0, 24 y 48 horas después de los tratamientos. **a)** tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg, 0 horas; **b)** tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg, 24 horas; **c)** tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg, 48 horas. Se evaluaron un total de 300 células en cada ratón (n=5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Análisis por tratamiento p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-8 mg/kg+CrO₃.

EGCG-10 mg/kg

a) 0 HORAS



b) 24 HORAS



c) 48 HORAS

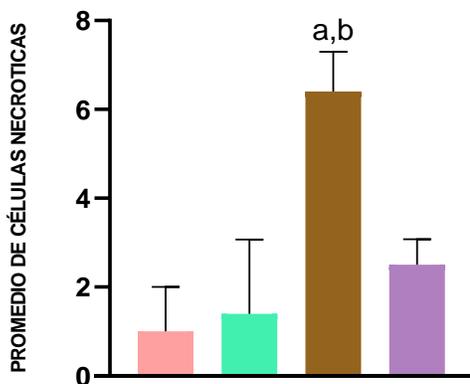
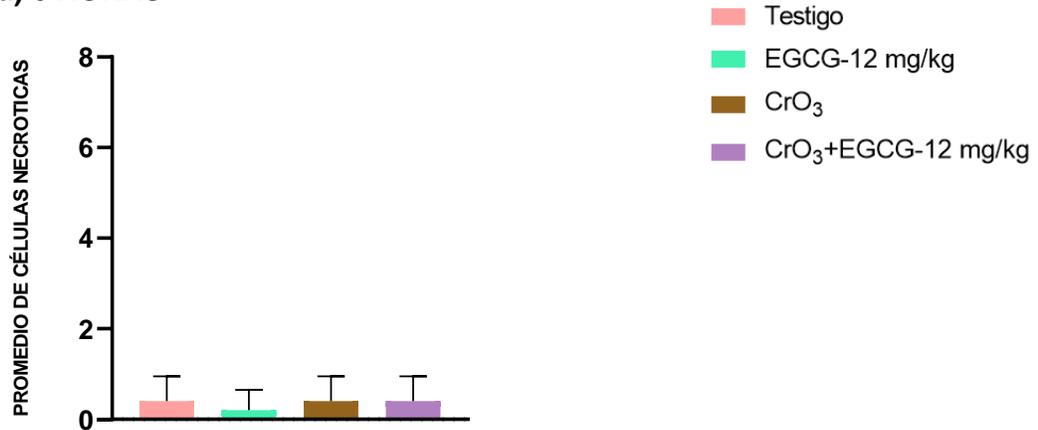


Figura 8. Análisis del efecto de la EGCG-10 mg/kg y el CrO₃ sobre las frecuencias de células necróticas evaluadas a las 0, 24 y 48 horas después de los tratamientos. **a)** tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 0 horas; **b)** tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 24 horas; **c)** tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 48 horas. Se evaluaron un total de 300 células en cada ratón (n=5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Análisis por tratamiento p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-10 mg/kg+CrO₃.

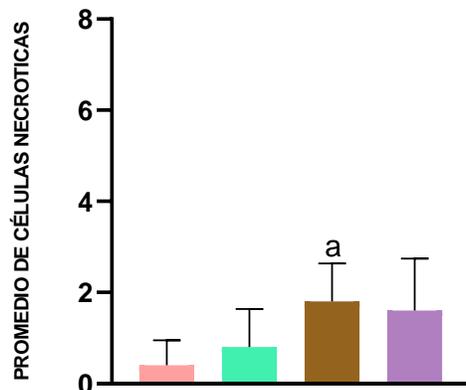
z

EGCG-12 mg/kg

a) 0 HORAS



b) 24 HORAS



c) 48 HORAS

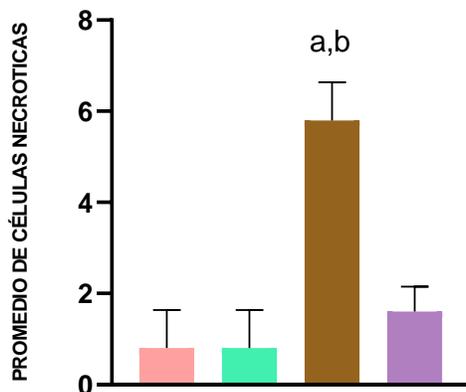


Figura 9. Análisis del efecto de la EGCG-12 mg/kg y el CrO₃ sobre las frecuencias de células necróticas evaluadas a las 0, 24 y 48 horas después de los tratamientos. **a)** tratamiento con dosis de EGCG-12 mg/kg, 0 horas, **b)** tratamiento con dosis de EGCG-12 mg/kg, 24 horas; **c)** tratamiento con dosis de EGCG-12 mg/kg, 48 horas. Se evaluaron un total de 300 células en cada ratón (n=5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Análisis por tratamiento p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-12 mg/kg+CrO₃.

7.3 Evaluación de la relación EPC/ENC y la viabilidad celular

En los cuadros 1, 2 y 3 se muestra la relación EPC/ENC. Estas evaluaciones se realizaron en las mismas muestras y tiempos utilizados para MN. Los promedios de EPC/ENC evaluados en el tratamiento solo de EGCG-8 y 10 mg/kg no resultaron estadísticamente significativos al compararse con el grupo testigo, mientras que el tratamiento de EGCG-12 mg/kg incrementó la relación EPC/ENC significativamente a las 48 horas. El tratamiento de CrO₃ también presentó un aumento significativo a las 48 horas en los promedios de EPC/ENC al compararse con el testigo. En el tratamiento combinado (EGCG+CrO₃) se restablecieron los valores promedio excepto en el tratamiento EGCG-12 mg/kg a las 48 horas.

TRATAMIENTO	HORA	N	EPC/ENC 1000 células ($\bar{x} \pm d.e$)
Testigo	0	5	47.0 \pm 0.5
	24		47.3 \pm 0.8
	48		47.0 \pm 0.9
EGCG-8 mg/kg	0	5	47.4 \pm 0.6
	24		47.6 \pm 0.8
	48		48.1 \pm 0.6
CrO ₃	0	5	47.8 \pm 0.5
	24		53.2 \pm 1.4
	48		54.2 \pm 0.8 ^{a, b}
EGCG-8 mg/kg+CrO ₃	0	5	47.3 \pm 0.9
	24		48.2 \pm 0.8
	48		48.0 \pm 0.9

Cuadro 1. Relación EPC/ENC en sangre periférica de ratones tratados con EGCG-8 mg/kg y CrO₃. Se evaluaron un total de 2000 EPC en cada ratón (n= 5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de dos vías seguida de la prueba post-hoc de Tukey. Análisis por tratamientos donde p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-8 mg/kg+CrO₃, 48 horas.

TRATAMIENTO	HORA	N	EPC/ENC 1000 células ($\bar{x} \pm d.e$)
Testigo	0	5	47.0 \pm 0.5
	24		47.3 \pm 0.8
	48		47.0 \pm 0.9
EGCG-10 mg/kg	0	5	47.1 \pm 0.6
	24		47.9 \pm 0.3
	48		48.0 \pm 0.8
CrO ₃	0	5	47.8 \pm 0.5
	24		53.2 \pm 0.8
	48		54.2 \pm 1.4 ^{a, b}
EGCG-10 mg/kg+CrO ₃	0	5	47.3 \pm 0.8
	24		48.0 \pm 1.2
	48		48.3 \pm 0.5

Cuadro 2. Relación EPC/ENC en sangre periférica de ratones tratados con EGCG-10 mg/kg y CrO₃. Se evaluaron un total de 2000 EPC en cada ratón (n= 5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de dos vías seguida de la prueba post-hoc de Tukey. Análisis por tratamientos donde p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-10 mg/kg+CrO₃, 48 horas.

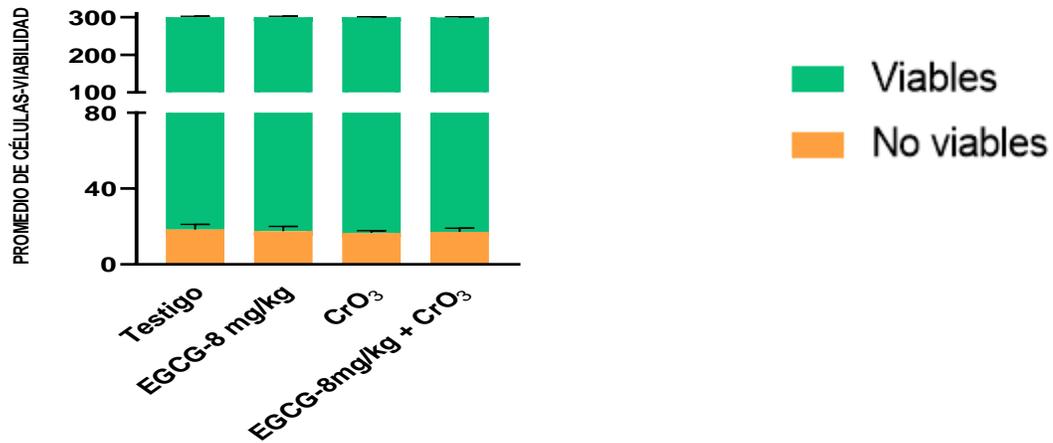
TRATAMIENTO	HORA	N	EPC/ENC 1000 células ($\bar{x} \pm d.e$)
Testigo	0	5	47.0 \pm 0.5
	24		47.3 \pm 0.8
	48		47.0 \pm 0.9
EGCG-12 mg/kg	0	5	47.3 \pm 0.5
	24		47.7 \pm 0.9
	48		49.2 \pm 0.8 ^a
CrO ₃	0	5	47.8 \pm 0.5
	24		53.2 \pm 1.4
	48		54.2 \pm 0.8 ^{a, b}
EGCG-12 mg/kg+CrO ₃	0	5	47.2 \pm 0.7
	24		49.0 \pm 0.8
	48		49.2 \pm 0.8 ^a

Cuadro 3. Relación EPC/ENC en sangre periférica de ratones tratados con EGCG-12 mg/kg y CrO₃. Se evaluaron un total de 2000 EPC en cada ratón (n= 5 ratones/grupo). La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de dos vías seguida de la prueba post-hoc de Tukey. Análisis por tratamientos donde p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-12 mg/kg+CrO₃, 48 horas.

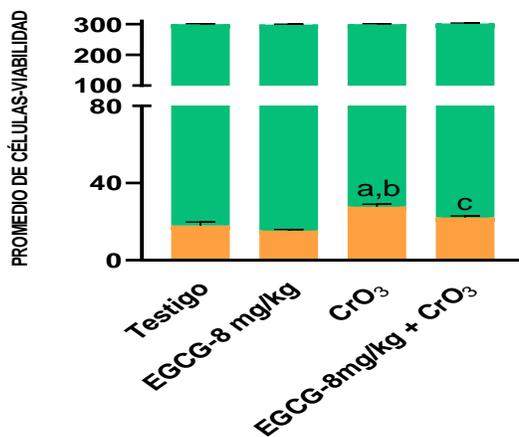
Debido a la variabilidad en la relación EPC/ENC observada en la hora 0, se evaluó la viabilidad celular mediante otro método que identifica la muerte celular a través de la integridad de la membrana. En las figuras 17, 18 y 19 se muestran los promedios de células viables y no viables empleando la tinción diferencial con NA/BrEt (Figura 10). Se observa que en las dosis de 8 y 10 mg/kg de EGCG no se incrementan las células no viables, mientras que, la dosis de 12 mg/kg sí las incrementa significativamente a las 48 horas en comparación con el grupo testigo. En el grupo CrO₃ se aumentaron los promedios de las células no viables significativamente en ambos tiempos de evaluación (24 y 48 horas). Mientras que, en el grupo EGCG-8 mg/kg+CrO₃ se restablecieron los valores promedio de las células no viables. En los tratamientos 10 y 12 mg/kg de EGCG previos a la aplicación del CrO₃ se redujeron las células no viables en comparación con el grupo tratado solo con CrO₃, pero aún resultan significativas comparadas con el grupo testigo.

EGCG-8 mg/kg

a) 0 HORAS



b) 24 HORAS



c) 48 HORAS

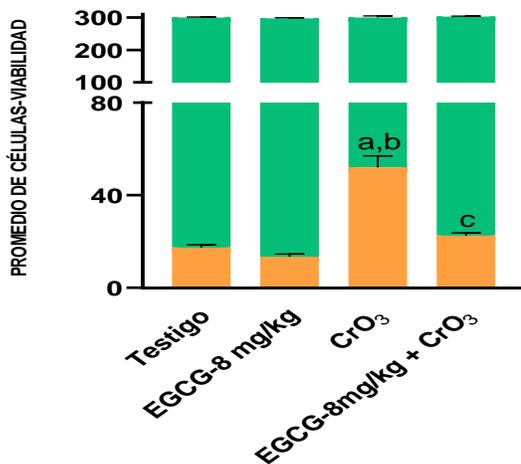
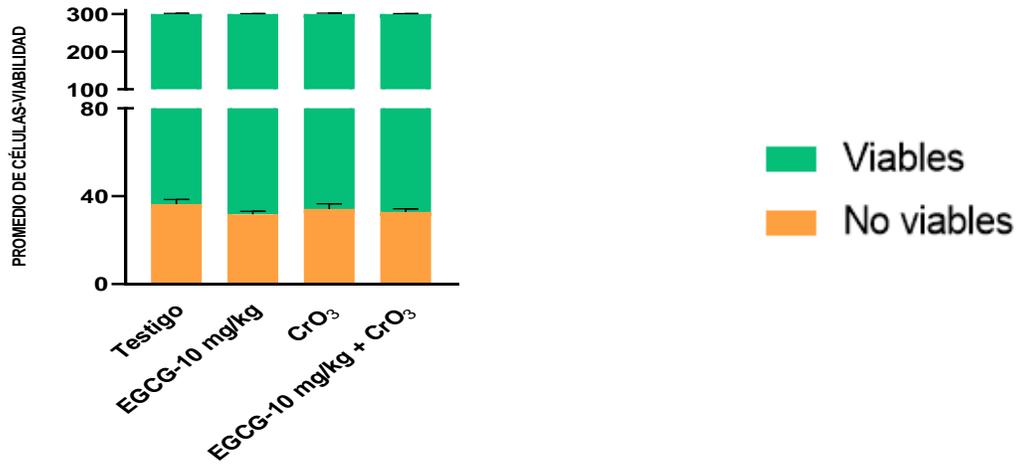


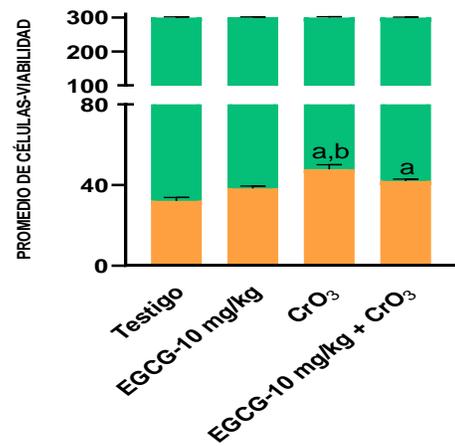
Figura 10. Análisis del efecto de la EGCG-8 mg/kg y el CrO₃ sobre las frecuencias de células viables y no viables en sangre periférica, evaluadas a las 0, 24 y 48 horas después de los tratamientos, a) tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg, 0 horas; b) tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg, 24 horas; c) tratamiento con dosis de EGCG-8 mg/kg, 48 horas. La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Se evaluaron un total de 300 células en cada ratón (n=5 ratones/grupo). Análisis por tratamiento p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-8 mg/kg+CrO₃, ^cvs. EGCG-8 mg/kg.

EGCG-10 mg/kg

a) 0 HORAS



b) 24 HORAS



c) 48 HORAS

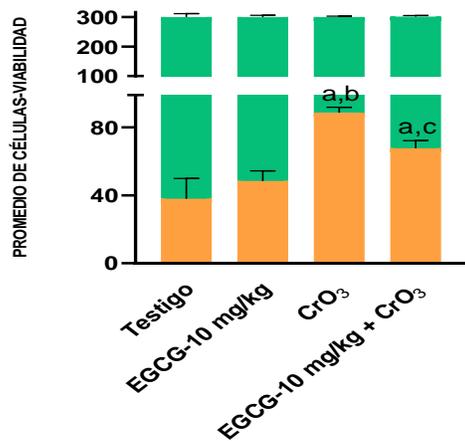
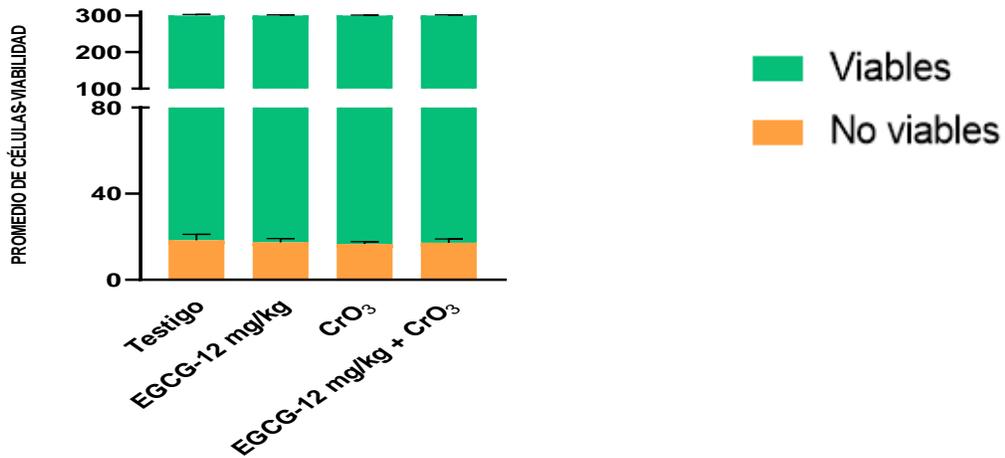


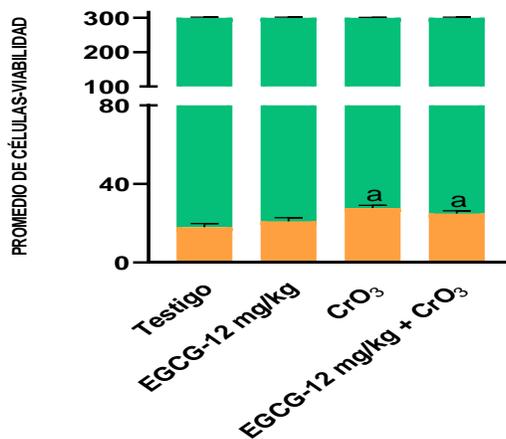
Figura 11. Análisis del efecto de la EGCG-10 mg/kg y el CrO₃ sobre las frecuencias de células viables y no viables en sangre periférica, evaluadas a las 0, 24 y 48 horas después de los tratamientos. **a)** tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 0 horas; **b)** tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 24 horas; **c)** tratamiento con dosis de EGCG-10 mg/kg, 48 horas. La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Se evaluaron un total de 300 células en cada ratón (n=5 ratones/grupo). Análisis por tratamiento p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-10 mg/kg+CrO₃, ^cvs. EGCG-10 mg/kg.

EGCG-12 mg/kg

a) 0 HORAS



b) 24 HORAS



c) 48 HORAS

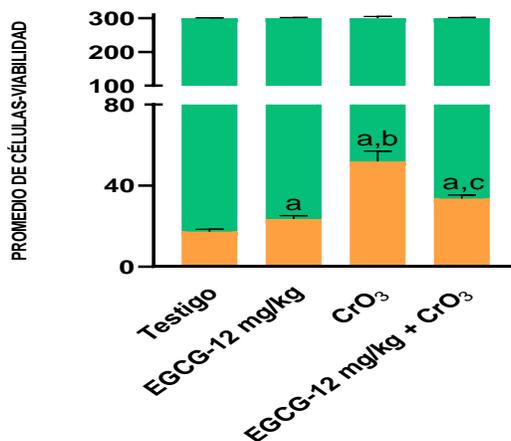


Figura 12. Análisis del efecto de la EGCG-12 mg/kg y el CrO₃ sobre las frecuencias de células viables y no viables en sangre periférica, evaluadas a las 0, 24 y 48 horas después de los tratamientos: **a)** tratamiento con dosis de EGCG-12 mg/kg, 0 horas; **b)** tratamiento con dosis de EGCG-12 mg/kg, 24 horas; **c)** tratamiento con dosis de EGCG-12 mg/kg, 48 horas. La significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Se evaluaron un total de 300 células en cada ratón (n=5 ratones/grupo). Análisis por tratamiento p<0.05: ^avs. testigo, ^bvs. EGCG-12 mg/kg+CrO₃, ^cvs. EGCG-12 mg/kg.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó un efecto dosis-respuesta inverso de la EGCG contra el daño genotóxico y citotóxico inducidos por el CrO_3 . La administración de EGCG por sí sola no indujo genotoxicidad, ya que ninguna de las dosis administradas presentó efectos significativos en los promedios de MN. Esto concuerda con estudios previos, en los cuales se ha encontrado que la administración i.g. de EGCG (2 o 6 mg/kg) presenta efectos neuroprotectores en ratones envejecidos, sin generar daño genotóxico (72,73). Particularmente, dosis de 8 y 10 mg/kg de EGCG, administradas i.g. e i.p., tampoco indujeron MN al ser evaluados en sangre periférica de ratones Hsd:ICR (5,66). El daño genotóxico inducido por el Cr(VI) se corroboró mediante el incremento en los promedios de MN a las 24 y 48 horas después del tratamiento con CrO_3 . El daño genotóxico de este metal ha sido atribuido a la generación de ERO y RL producidos durante su reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) (74). Los estados intermedios de cromo son reactivos y participan en la producción de ERO (75). Durante el proceso de reducción, también se genera el $\bullet\text{OH}$ mediante la reacción de Fenton/Haber-Weiss (74). El $\bullet\text{OH}$ es altamente reactivo y es capaz de dañar al ADN que puede estar relacionado con los MN observados con el tratamiento del CrO_3 .

Cuando se realizó la administración de EGCG cuatro horas antes del tratamiento con el CrO_3 se disminuyeron los promedios de MN, lo que indica que la EGCG presenta efectos protectores o moduladores del daño genotóxico inducido por el CrO_3 . Xu, D et al. (76) respaldan el uso potencial de EGCG como agente natural mediador del estrés oxidante, ya que la exposición a EGCG puede facilitar la expresión significativamente menor de un factor de transcripción del dominio básico de la "cremallera de leucina" que media el estrés oxidante. García-Rodríguez et al. (5,66,77) mencionan que la administración de 8 y 10 mg/kg de EGCG por vía oral antes de 20 mg/kg de CrO_3 resulta en una reducción en la frecuencia de EPC-MN acompañada de un aumento en el número de células apoptóticas y sugieren que es posible que la mayor protección observada de la EGCG esté relacionada con la dosis. El proceso podría estar involucrado en la eliminación de células con daño en

el ADN inducido por Cr(VI). En este estudio, la mayor protección de la EGCG contra el daño genotóxico se observó a las 48 horas en dosis de 8 mg/kg después del tratamiento con CrO₃, reduciendo los promedios de MN en un 62%, mientras que en la dosis más alta (12 mg/kg) únicamente se redujo 31%. Estos resultados sugieren que la EGCG estaría ejerciendo un efecto hormético que implica actuar como prooxidante, generando estrés celular. En estudios previos se ha demostrado que las respuestas a dosis bifásicas de tipo hormético pueden ser una característica común de los efectos biológicos inducidos por el té verde (78). Si bien se ha considerado generalmente que el EGCG muestra propiedades anticancerígenas, Elattar et al. (79) ha identificado 6 líneas de células tumorales humanas en las que las bajas concentraciones de catequinas como la EGCG, la epigallocatequina (EGC), y la epicatequina galato (ECG), mejoraron la proliferación celular, con estos agentes actuando de manera hormética con relación a la dosis. Otros estudios revelan que el té verde y varios de sus componentes principales, especialmente EGCG, inducen una amplia gama de respuestas de dosis hormética generalmente dentro de un contexto biológico *in vitro*. Se menciona que las respuestas a diferentes dosis de EGCG están asociadas a la protección de las células productoras de insulina, la mejora de la neurogénesis y el desarrollo de la resiliencia en múltiples tipos de células (80).

La protección que se ha observado de la EGCG podría estar relacionada con la apoptosis, como un mecanismo para la eliminación de células dañadas genéticamente. La apoptosis, al ser una de las respuestas celulares frente al daño al ADN puede ser considerada como un marcador de daño genotóxico (41,71). Las células fueron evaluadas mediante la tinción diferencial con NA/BrEt, la cual permite determinar si las células están o no en apoptosis y en qué estado, temprano o tardío, además de diferenciar a las células necróticas. Las células viables presentan una membrana intacta y, por lo tanto, se aprecian de color verde fluorescente. Se aprecian células apoptóticas tempranas en las que el ADN ha comenzado a fragmentarse, pero tienen membranas intactas y las células apoptóticas tardías muestran cromatina fragmentada en los núcleos mostrando un color rojo brillante,

debido a que se comienza a perder la integridad de la membrana (48). En este estudio la dosis de EGCG-8 mg/kg y la combinación de los tratamientos (EGCG-8 mg/kg+CrO₃) no indujo apoptosis. Por lo que se propone, que esta dosis de EGCG inhibe el daño al ADN, por lo tanto, se disminuyen las células con daño genético (inducción de MN) y no se incrementan las células apoptóticas. Esto concuerda con estudios que han descrito a la EGCG como la catequina de mayor potencial antioxidante, ya que pueden actuar como agentes preventivos y coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el daño al ADN (81,82). Kim HS et al. (83) menciona que las actividades nucleares de EGCG modulan la expresión génica al inhibir factores de daño que generalmente van acompañadas de un aumento del estrés oxidativo. Previamente, dentro de nuestro laboratorio también se encontró que la administración sola de EGCG incrementa la frecuencia de células apoptóticas, proponiéndose a la apoptosis como un mecanismo de protección, mediante la eliminación de las células dañadas genéticamente (71). Por su parte, la administración de 10 y 12 mg/kg de EGCG sí aumentó el promedio de células apoptóticas. En estudios *in vitro* sobre el metabolismo de la aflatoxina B1 en tejido de hígado e intestino delgado de lechones se ha demostrado que el tratamiento de EGCG, inhibe de manera efectiva el crecimiento de células con daño, sin afectar el crecimiento de las células normales (84). Smith y Dou (85) demostraron que otra de las catequinas, la EGC inhibe el proceso de replicación de ADN e induce la apoptosis de células leucémicas. En el grupo tratado con CrO₃ el incremento de células apoptóticas y necróticas sugiere que el cromo causa daños irreversibles en el ADN, el cual puede conducir a las células hacia apoptosis. Estos datos concuerdan con observaciones realizadas *in vivo* por García-Rodríguez et al. (5), en donde demostraron que una dosis de 10 mg/kg de EGCG es capaz de mandar células genéticamente dañadas a la muerte celular. Sugiriendo que, el daño al ADN y la alteración de los estados oxidantes intracelulares tienen el potencial para desencadenar o sensibilizar una célula a la apoptosis.

Al evaluar la citotoxicidad mediante la relación de EPC con respecto a los ENC, se observó un incremento significativo de los EPC/ENC en el grupo tratado con CrO₃

y en el grupo tratado con 12 mg/kg de EGCG. Lo cual, pudiera ser un indicador de que estos tratamientos están ocasionando un efecto citotóxico. Si bien la OECD (69), indica que al realizar la prueba de MN se determine también la frecuencia de EPC/ENC, este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (40,86). Para corroborar la citotoxicidad se realizó la evaluación de viabilidad celular empleando la tinción diferencial con NA/BrEt en función de la integridad de la membrana, modificada por García-Rodríguez et al. (71). Se observó una disminución significativa en las células viables del grupo tratados con CrO₃, que es consistente con el aumento de células necróticas que se observó en este grupo. Estos eventos corroboran los efectos citotóxicos del Cr(VI) y sugieren que está asociado con daños en el ADN. También se observa una disminución de células viables en el grupo tratado con EGCG-12 mg/kg, lo cual podría indicar que la EGCG a esta concentración está generando actividad prooxidante que pudiera estar causando daño a las células. Por otra parte, la administración de 8 y 10 mg/kg de EGCG no modificó los promedios de células viables, lo que sugiere que en estas dosis el compuesto no induce daño citotóxico. En estudio realizados por Neelima A et al. (87) se observó que la EGCG protege a las células de la citotoxicidad inducida por metales pesados como el Pb al regular la expresión del canal de aniones, el sistema oxidante-antioxidante e inhibe la muerte celular neuronal.

9. CONCLUSIÓN Y COMENTARIOS FINALES

- La administración del CrO_3 induce daño genotóxico y citotóxico, ya que incrementa los promedios de MN, de células necróticas y no viables, además de presentar efectos sobre la relación EPC/ENC.
- La administración del CrO_3 presenta efectos sobre la inducción de apoptosis, ya que incrementa las células apoptóticas.
- La administración sola de EGCG no indujo daño genotóxico, ya que no se incrementaron los promedios de MN. Mientras que, su administración previa a la aplicación del CrO_3 , disminuye el daño genotóxico.
- La disminución en los promedios de MN con los tratamientos de EGCG tuvo un efecto dosis-respuesta inversa, que se podría asociar con un efecto hormético, ya que la dosis más baja (8 mg/kg) fue la que presentó la mayor protección contra el daño genotóxico inducido por el CrO_3 .
- La dosis de 12 mg/kg de EGCG a las 48 horas, incrementó los promedios de las células no viables y apoptóticas en comparación con el testigo. Sin embargo, cuando se administró en combinación con el CrO_3 se redujeron, lo que sugiere un posible efecto prooxidante y antioxidante.
- Con base en los resultados del presente estudio, se resalta la importancia que tienen los alimentos en la salud, así como las dosis en las que son consumidos; siendo relevante dentro de nuestra vida diaria la ingesta de alimentos con alto potencial antioxidante, que pudieran modular procesos biológicos, entre ellos la disminución del daño.

10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García-García N., Pedraza-Garciga., Montalvo J., Martínez M., Leyva J. Evaluación preliminar de riesgos para la salud humana por metales pesados en las bahías de Buenavista y San Juan de los Remedios, Villa Clara, Cuba. *Rev Cuba Química*. 2012;XXIV:126.
2. Nava-Ruíz C., Méndez-Armenta M. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocienc*. 2011;16(3):140–7.
3. Capó M., Frejo M. Toxicogenómica : Una nueva rama de la toxicología. *Med Balear*. 2007;25–9.
4. FDA. Redbook IV: Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Chapter C1.d. Mammalian erythrocyte micronucleus test. June 2000;1-6.
5. García-Rodríguez MDC., Montañó-Rodríguez AR., Altamirano-Lozano MA. Modulation of hexavalent chromium-induced genotoxic damage in peripheral blood of mice by epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its relationship to the apoptotic activity. *J Toxicol Environ Health*. 2016;79(1):28–38.
6. Pierce B. Genética: Un enfoque conceptual. 2ª. ed. Editorial Médica Panamericana S.A., editor. 2009. 711 p.
7. Greenwald P. Cancer chemoprevention. *Bmj*. 2002;324.
8. Mauriz Turrado I., Martínez Pérez JM. Agentes Genotóxicos : Métodos de detección y evaluación. *El rincón la Cienc*. 2014;66:1–11.
9. Quintero MZ., Ruiz Valencia M., Trujillo Ortiz C. Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos G. *Med UPB*. 2009;28(1):33–41.
10. García C., Moreno J., Hernández M., Polo A. Metales pesados y sus implicaciones en la calidad del suelo. *Cienc y medio Ambient CCMA-CSIC*. 2002;125-38.
11. Reyes YC., Vergara I., Torres OE., Díaz M., González EE. Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Rev Ing Investig y Desarro*. 2016;16(1):12.
12. Galaris D., Evangelou A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-

- induced carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;42(1):93–103.
13. Thomann RV. Physio-Chemical and Ecological Modeling the Fate of Toxic Substances in Natural Water Systems. *Dev Environ Model*. 1984;6(C):145–70.
 14. Schutzenhubel A., Polle A. Plant responses to abiotic stresses : heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot*. 2002;53(372):1351–65.
 15. Mithofer A., Schulze B., Boland W. Biotic and heavy metal stress response in plants : evidence for common signals. *Plant Cell Environ*. 2004;27(1):11-22.
 16. Ramírez-Díaz M., Riveros-Rosas H., Campos-García J., Cervantes C. Reducción bacteriana de cromo hexavalente: Mecanismos y aplicaciones. *Inst Investig Químico-Biológicas, Univ Michoacana*. 2009;28(3):73–9.
 17. Maret W. The Metals in the Biological Periodic System of the Elements: Concepts and Conjectures. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):1–8.
 18. Rodríguez-Heredia D. Intoxicación ocupacional por metales pesados. *Medisan*. 2017;21(12):3372–85.
 19. 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):1–40.
 20. Proctor DM., Otani JM., Finley BL., Paustenbach DJ., Bland JA., Speizer N., et al. Is hexavalent chromium carcinogenic via ingestion? A weight-of-evidence review. *J Toxicol Environ Health*. 2002;65(10):701–46.
 21. Zhen-Xian D., Hai-Yan Z., Meng X., Yifu G., Hua-Qin W. Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cells. *BMC Cancer*. 2009;9(1):1–11.
 22. Viada Pupo E., Gómez Robles L., Campaña Marrero IR. Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico*. 2017;21(1):171–86.
 23. Dorado Martínez C., Rugerio Vargas C., Rivas Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *MG Rev Fac Med UNAM*. 2003;46:19-25.
 24. Pisoschi AM., Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015;97:55–74.

25. Díaz-Hung ML., González Fragueta ME. El estrés oxidativo en las enfermedades neurológicas: ¿causa o consecuencia? *Neurología*. 2014;29(8):451–2.
26. Halliwell B., Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed. Oxford University Press. 2015.
27. Olinski R., Gackowski D., Foksinski M., Rozalski R., Roszkowski K., Jaruga P. Oxidative DNA damage: Assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(2):192–200.
28. Abele D. Oxygen: boon yet bane—introducing oxygen toxicity and reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5^a ed. Oxford University Press; 2015. p. 3-21.
29. García Trianal BE., Bernabeull AS., Saldaña García L. El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Haban Cienc Méd*. 2013;2:12.
30. Ziech D., Franco R., Georgakilas AG., Georgakila S., Malamou-Mitsi V., Schoneveld O., et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem Biol Interact*. 2010;188(2):334–9.
31. Lozada SM., García L. Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2009;17:172-9.
32. Ferreira R. Estrés oxidativo y antioxidativo: de las ciencias básicas a la medicina aplicada. *Buenos Aires Hosp Mil Cent*. 1998;24.
33. Mayor Oxilia R. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante . R *Rev Inst Med Trop*. 2010;5(2):23–9.
34. García-Rodríguez MDC., Altamirano-Lozano MA. La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón in vivo. *Bioquímica*. 2007;(1):15–24.
35. Hayashi M. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes Environ*. 2016;38(1):4–9.
36. Mavournin KH., Blakey DH., Cimino MC., Salamone MF., Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A

- report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res Genet Toxicol.* 1990;239(1):29–80.
37. Müller WU., Nüsse M., Miller BM., Slavotinek A., Viaggi S., Streffer C. Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutat Res Genet Toxicol.* 1996;366(2):163-9.
 38. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res Mutagen Relat Subj.* 1975;31(1):9–15.
 39. Zalacain M., Sierrasesúmaga L., Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra Gobierno de Navarra. Departamento de Salud;* 2005 p. 227–36.
 40. Hayashi M., MacGregor JT., Gatehouse DG., Blakey DH., Dertinger SD., Abramsson-Zetterberg L., et al. In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutat Res.* 2007;627(1):10-30.
 41. Hayashi M., Tice RR., MacGregor JT., Anderson D., Blakey DH., Kirsh-Volders M., et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res.* 1994;312(2):293-304.
 42. Cruz-Martín-del-Campo SL., González-Espinosa C., Ruiz-Quiñonez AK., Carranza-Aguilar CJ. Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Resid.* 2020;15(3):97–112.
 43. Saraste A., Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000;45(3):528–37.
 44. Jordán J. Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica.* 2003;22(4):253–75.
 45. Muñoz Cendales DR., Cuca Suárez LE. Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Rev Colomb Cancerol.* 2016;20(3):124–34.
 46. Martínez Salazar M. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev Colomb*

- Biotecnol. 2009;XI(2):152–66.
47. Irachela A. El suicidio y la muerte celular. *Rev Real Acad Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* 2007;101(2):1-33.
 48. McGahon AJ., Martin SJ., Bissonnette RP., Mahboubi A., Shi Y., Mogil RJ., et al. The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro. *Methods Cell Biol.* 1995;46(C):153–74.
 49. Horn RC., Vargas VMF. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the salmonella/microsome assay. *Toxicol Vitro.* 2008;22(4):1043–9.
 50. Reyes S. Mutagénesis y genotoxicidad química. In: *Toxicología Básica.* Primera Ed. Impreso en México: Universidad Autónoma de Aguascalientes; 2006. p. 335.
 51. Martínez-López E., García-García MR., Campos-Pérez WY., González-Becerra K. Genómica nutricional: Conceptos y expectativas. *Rev Endocrinol y Nutr.* 2013;21(1):23–34.
 52. Mitscher LA., Telikepalli H., McGhee E., Shankel DM. Natural antimutagenic agents. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 1996;350(1):143–52.
 53. González de Mejía E. El efecto quimioprotector del té y sus compuestos. *Arch Latinoam Nutr.* 2004;54(1):5.
 54. Zamora SJD. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev Chil Nutr.* 2007;34(1):23.
 55. Coronado HM., Vega León S., Gutiérrez TR., Marcela VF., Radilla VC. Antioxidants: Present perspective for the human health. *Rev Chil Nutr.* 2015;42(2):206–12.
 56. Clarkson PM., Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am Soc Clin Nutr.* 2018;72:637S–46S.
 57. Patthamakanokporn O., Puwastien P., Nitithamyong A., Sirichakwal PP. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J Food Compos Anal.* 2008;21(3):241–8.
 58. Fusco D., Colloca G., Lo Monaco MR., Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging.* 2007;2(3):377–87.

59. Valencia Avilés E., Figueroa II., Sosa Martínez E., Bartolomé Camacho MC., Martínez Flores HE., García Pérez ME. Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Rev Fac Cienc Quim.* 2016;15–29.
60. Barberan T. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Aliment Nutr y Salud.* 2003;10:41–53.
61. Ferruelo A., Romero I., Cabrera PM., Arance I., Andrés G., Angulo JC. Los efectos de resveratrol y otros polifenoles del vino sobre la proliferación, apoptosis y expresión de receptor androgénico en células LNCaP. *Actas Urológicas Españolas.* 2014;38(6):397–404.
62. González-Manzano S., Dueñas M. Applications of Natural Products in Food. *Foods.* 2021;10(2).
63. Yang CS., Ho CT., Zhang J., Wan X., Zhang K., Lim J. Antioxidants: Differing Meanings in Food Science and Health Science. *J Agric Food Chem.* 2018;66(12):3063–8.
64. Cai YZ., Mei Sun., Jie Xing., Luo Q., Corke H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 2006;78(25):2872–88.
65. Rosal K., Useche A., Morán L., López M., Bruges G. La epigallocatequina-3-galato induce apoptosis en plaquetas. *Invest Clin.* 2018;59(2):146–54.
66. García-Rodríguez MDC., 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.* 2014;77(6):324–36.
67. Galati G., Lin A., Sultan AM., O'Brien PJ. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(4):570–80.
68. Heddle JA., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., MacGregor JT., Newell GW., et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1983;123(1):61–118.

69. OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Mammalian erythrocyte micronucleus test. *Guidel Test Chem.* 2016;474.
70. García-Rodríguez MDC., López-Santiago V., Altamirano-Lozano M. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2001;496(1–2):145–51.
71. García-Rodríguez MDC., 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;9.
72. Biasibetti R., Tramontina AC., Costa AP., Dutra MF., Quincozes-Santos A., Nardin P., et al. Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin induced model of dementia. *Behav Brain Res.* 2013;236(1):186–93.
73. Gonçalves PB., Sodero ACR., Cordeiro Y. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) targeting protein misfolding in drug discovery for neurodegenerative diseases. *Biomolecules.* 2021;11(5):767.
74. Shi X., Dalal NS. The role of superoxide radical in chromium(VI)-generated hydroxyl radical: The Cr(VI) haber-weiss cycle. *Arch Biochem Biophys.* 1992 Jan 1;292(1):323–7.
75. Léonard A., Lauwerys RR. Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. *Mutat Res.* 1980;76(3):227–39.
76. Xu D., Peng S., Guo R., Yao L., Mo H., Li H., et al. EGCG Alleviates Oxidative Stress and Inhibits Aflatoxin B1 Biosynthesis via MAPK Signaling Pathway. *Toxins (Basel).* 2021;13(10).
77. García-rodríguez MDC., Serrano-reyes G., Altamirano-lozano M., 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.* 2020;83(15-16):513-

526.

78. Calabrese EJ., Dhawan G., Kapoor R., Mattson MP., Rattan SI. Curcumin and hormesis with particular emphasis on neural cells. *Food Chem Toxicol.* 2019;129:399–404.
79. Elattar TMA., Virji AS. Effect of tea polyphenols on growth of oral squamous carcinoma cells in vitro. *Anticancer Res.* 2000;20(5B):3459–65.
80. Calabrese EJ., Tsatsakis A., Agathokleous E., Giordano J., Calabrese V. Does Green Tea Induce Hormesis? *Dep Environ Heal Sci.* 2020;18(3):13.
81. García-Rodríguez MDC., Hernández-Cortés LM., Arenas-Huertero F. Catequinas del té verde: efectos antígenotóxicos y genotóxicos. Revisión sistemática. *Arch Latinoam Nutr.* 2022;72(3):205–17.
82. Olson KR., Briggs A., Devireddy M., Iovino NA., Skora NC., Whelan J., et al. Green tea polyphenolic antioxidants oxidize hydrogen sulfide to thiosulfate and polysulfides: A possible new mechanism underpinning their biological action. *Redox Biol.* 2020;37:101731.
83. Kim HS., Quon MJ., Kim JA. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol.* 2014;2:187-95.
84. Tulayakul P., Dong KS., Li JY., Manabe N., Kumagai S. The effect of feeding piglets with the diet containing green tea extracts or coumarin on in vitro metabolism of aflatoxin B1 by their tissues. *Int Soc Toxinology.* 2007;50(3):339–48.
85. Smith DM., Dou QP. Green tea polyphenol epigallocatechin inhibits DNA replication and consequently induces leukemia cell apoptosis. *Int J Mol Med.* 2001;7(6):645–52.
86. Krishna G., Nath J., Ong T. Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in mice by vitamin C. *Cancer Res.* 1986;46(6):2670–4.
87. Neelima A., Bandaru LJM., Chetty CS., Dixit PK., Challa S. Mitochondria-Mediated Moderation of Apoptosis by EGCG in Cytotoxic Neuronal Cells Induced by Lead (Pb) and Amyloid Peptides. *Biol Trace Elem Res.* 2022;200(8):3582–93.