



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Efecto de la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre la inducción de micronúcleos y de apoptosis en ratones tratados con trióxido de cromo por vía oral e intraperitoneal”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

ANA ROSA MONTAÑO RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

OCTUBRE DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **MONTAÑO RODRÍGUEZ ANA ROSA**, con número de cuenta **306308602**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **22** del mes de **octubre** de 2013 a las **14:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
- VOCAL** DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ
- SECRETARIO** Q. MARÍA DEL CARMEN NIÑO DE RIVERA OYARZABAL
- SUPLENTE** BIÓL. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ
- SUPLENTE** M. en C. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de la (-)-epigalocatequina-3-galato sobre la inducción de micronúcleos y de apoptosis en ratones tratados con trióxido de cromo por vía oral e intraperitoneal.**

Opción de titulación: tesis.

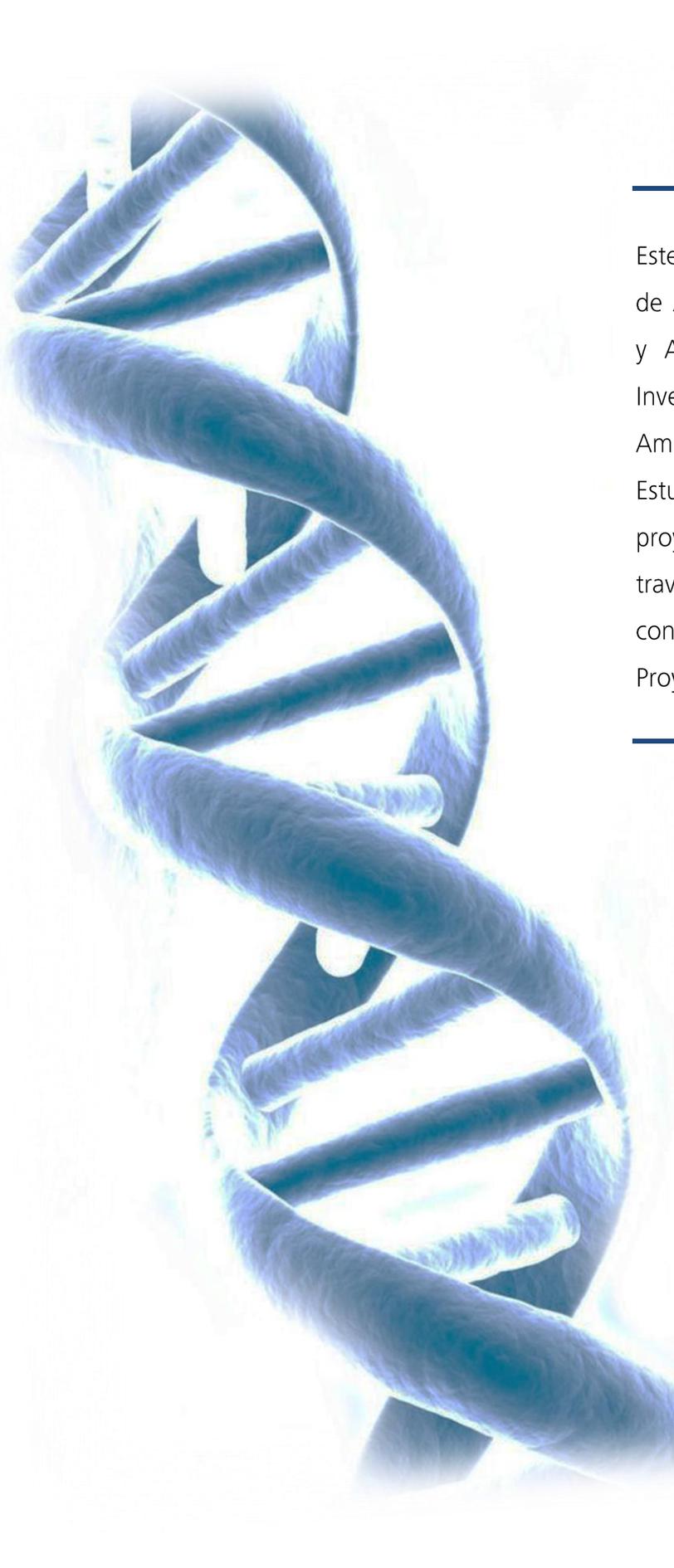
Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 27 de septiembre de 2013

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. El proyecto fue financiado por la DGAPA a través del programa PAPIIT, y se contó con beca para elaboración de la tesis. Proyecto PAPIIT-IN217712.

Dedicatorias

A Dios

Por poner en mi camino a todas y cada una de las personas que forman parte de mi vida. Por seguir iluminando mi camino y sosteniendo mi mano cuando más lo necesito. Por todas las bendiciones, oportunidades y regalos que me ha dado. Pero también por las lecciones que me han servido para crecer como ser humano.

A mi madre

Por darme la vida, en todos los sentidos. Por estar siempre ahí, en la manera que mis hermanos y yo necesitamos, a pesar de lo que pase alrededor. Por inspirarme a través de tus acciones a dar lo mejor de mí a las personas que quiero, con amor te dedico el esfuerzo puesto en este trabajo.

A mi padre

Por darnos todo y procurar lo mejor para mí y mis hermanos. Porque con tu ejemplo me enseñaste a no darme por vencida a pesar de las circunstancias. Porque me has mostrado que una persona puede llegar a ser tan grande como se lo proponga. A ti dedico con amor este trabajo, fruto de lo que de ti he aprendido.

A mi hermano

Porque tu llegada iluminó mi vida y la llenó de la mayor alegría. Porque eres la estrella más grande que guía mi camino y mi inspiración para ser mejor cada día. Basta verte sonreír para saber que vale la pena seguir a pesar de las dificultades. Te amo, mi niño.

A mi hermana

Por acompañarme a lo largo de estos veintidós años, en los cuales hemos pasado tantas cosas. Porque a pesar de ser menor que yo, me has enseñado demasiado. Te admiro, no cambiaría un segundo de mi vida a tu lado. Te amo.

A mi abuelita

Por estar siempre conmigo, apoyándome incondicionalmente. Porque eres una persona que deja una huella enorme en el corazón y en la vida de quien te conoce. Eres una mujer admirable en muchos sentidos, un gran ejemplo para mí. Te amo, abue.

A mis tías

Cointa y Rebeca

Por apoyarme de muchas formas sin pedir nada a cambio. Por seguir ahí a pesar de las circunstancias, sosteniéndome a mi y a mis hermanos para poder salir adelante. No tengo manera de agradecerles todo lo que han hecho por nosotros. A ustedes dedico este trabajo, el cual sin su apoyo no habría sido posible. Las quiero mucho, mucho.

Pati

Porque has buscado siempre la manera de estar al lado mio y de mis hermanos. Por apoyarnos de una y mil maneras, no importando si ello te pone en aprietos. A pesar de la distancia, tienes un lugar especial en mi corazón. Te quiero mucho, jamás lo olvides.

In memoriam C.S.S.

Porque aunque ya no puedo verte, se que estas muy cerca de mi y que me cuidas desde donde estás. Porque sigues y seguirás siendo parte de mi vida a pesar del tiempo. Un pequeño homenaje a quien endulzó mi infancia con las granadas del jardín.

Agradecimientos

A la

Universidad Nacional Autónoma de México

Por haberme permitido formarme como profesionista en sus aulas, y porque en ellas conocí personas que ahora son una parte muy importante de mi vida.

A mi directora de tesis

Dra. María del Carmen García Rodríguez

Por abrirme las puertas de su laboratorio desde mucho antes que iniciara la tesis. Por su apoyo no solo para la elaboración de este trabajo, sino por brindarme la oportunidad de incrementar mi experiencia como investigadora y por buscar siempre la manera de apoyarme para realizar mis proyectos a futuro.

A los miembros del jurado

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dra. María del Carmen García Rodríguez

Q. María del Carmen Niño de Rivera Oyarzabal

M. en C. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

Por contribuir con sus acertadas observaciones al mejoramiento de esta tesis dedicando gran parte de su tiempo.

A todos los profesores que compartieron sus conocimientos y experiencia durante la carrera, particularmente a aquellos que de distintas formas, me impulsaron a ser mejor:

Carlos Castillejos Cruz, Enrique Gil Flores, Lucila Álvarez Barrera, Eva Aguirre Hernández, María de los Ángeles Galván Villanueva, José Ponce Guerrero, María Elena Ayala Escobar, Samuel Campos Lince, Rosalva Rangel Corona.

Gracias especialmente a mi familia y amigos, pues cada uno ha influido en mi persona para llegar a ser quien soy

A mi abuelo

Leoncio Montaña

Por pasar conmigo y mis hermanos una de las etapas más bonitas. Por compartir con nosotros momentos que siempre recordaré. Te quiero, abuelo.

A mis primos

Gabi y Miguel Rivas Rodríguez

Porque lo que nos une no es solo el parentesco, sino todos los momentos que hemos pasado juntos. Aunque tal vez pocos, los recuerdo y atesoro en mi corazón. Son una parte muy importante de mí. Los quiero mucho.

A mi tío y padrino

Mario A. Rodríguez Cuéllar

Por darnos todo cuanto has podido a mi, a mis hermanos y a mis primos. Por estar cerca de nosotros en los momentos más importantes.

A mis amigas

Lashmi L. G. e Itzel C. A.

Por acompañarme a lo largo de tantas aventuras, por escucharme y apoyarme siempre sin condición alguna. Porque a pesar de la distancia y el tiempo, siguen conmigo. Ocho años son el comienzo, nos espera mucho más.

A mis amigos

Violeta, Rogelio, Karen, Ruth, Giovanni, Mauricio, Jesús, Carlos, Alex, Aldo, Oscar, Flor, Héctor, Ale, Viry, Yuri, Gloria y Jani

Por todos los momentos que hemos compartido a lo largo de la carrera, muchos buenos, otros no tanto, pero todos igualmente importantes en mi vida tanto personal como profesional. Gracias por todas las aventuras, las vivencias, los recuerdos. Por creer en mí y darme ánimos en cada prueba, por seguir conmigo a pesar de las ausencias. Les estimo a cada uno.

A mis compañeras del laboratorio de antimutagénesis

Jani, Paulina Pilar y Megumi

Por todo el apoyo que me brindaron durante la realización de los experimentos, en los seminarios y en las salidas a congresos. Pero sobre todo porque con su compañía hicieron que mi estancia en el laboratorio fuera más placentera.

Kiitos myös niille, jotka muuttivat elämäni monessa suhteessa.

Kiitos sydämestäni muistutuksesta, että elämä on ihanaa, aivan kuten mä olin alkanut unohtaa.



“[...] Eludir el camino que todos conocemos. Seguir hacia adelante
ruta de los que intentan lo que nunca pensaron y se sienten felices
porque hay algo distinto, porque se desvanece de pronto lo que
sobra y no existe el vacío si queremos colmarlo.”

Ernestina de Champourcín, *Carta al vacío*



Índice

Resumen.....	i
Índice de abreviaturas.....	ii
1. Introducción.....	1
1.1 Genotoxicidad y mutagénesis.....	1
1.2 Estrés oxidante.....	2
1.2.1 Daño oxidante al ADN.....	3
1.3 Respuesta celular al daño genotóxico.....	4
1.3.1 Apoptosis y necrosis.....	5
1.4 Metales como inductores de daño genotóxico.....	8
1.5 Cromo.....	9
1.5.1 Exposición al cromo.....	9
1.5.2 Carcinogénesis y genotoxicidad.....	12
1.5.3 Mecanismos de inducción de daño genotóxico.....	13
1.5.4 Inducción de muerte celular.....	16
1.6 Antimutagénesis.....	17
1.7 Componentes de la dieta como protectores del daño al ADN.....	18
1.7.1 Polifenoles.....	19
1.8 El té verde.....	21
1.9 La (-)-epigallocatequina-3-galato.....	23
1.9.1 Actividad antioxidante.....	23
1.9.2 Actividad antimutagénica.....	24
1.9.3 Propiedades antiproliferativas y apoptóticas de la EGCG.....	25
1.9.4 Propiedades antitumorales.....	25
1.9.5 Biodisponibilidad y metabolismo.....	25
1.10 Pruebas y ensayos para evaluar genotoxicidad.....	26
1.11 Micronúcleos (MN).....	27
1.12 Evaluación de la muerte celular por apoptosis y necrosis.....	29
2. Planteamiento del problema.....	31
3. Hipótesis.....	32
4. Objetivos.....	33

4.1	General.....	33
4.2	Particulares.....	33
5.	Material y Método.....	34
5.1	Animales	34
5.2	Reactivos.....	34
5.3	Tratamientos.....	34
5.4	Establecimiento de las dosis de EGCG y CrO ₃	36
5.5	Tiempos de evaluación.....	36
5.6	Evaluación de la inducción de MN y citotoxicidad.....	40
5.6.1	<i>Preparación de laminillas</i>	40
5.6.2	<i>Toma de muestras</i>	40
5.6.3	<i>Evaluación de muestras</i>	40
5.7	Evaluación de viabilidad, apoptosis y necrosis.....	41
5.7.1	<i>Preparación de colorantes</i>	41
5.7.2	<i>Toma de muestras</i>	41
5.7.3	<i>Evaluación de muestras</i>	42
5.8	Análisis estadístico	43
6.	Resultados.....	44
6.1	Efecto de la EGCG sobre la inducción de MN por CrO ₃	44
6.2	Efecto de la EGCG y el CrO ₃ sobre la relación entre EPC y ENC.....	53
6.3	Efecto de la EGCG y el CrO ₃ sobre la viabilidad celular	55
6.4	Efecto de la EGCG y el CrO ₃ sobre la apoptosis y necrosis.....	56
7.	Discusión	58
8.	Conclusiones y comentarios finales	68
9.	Referencias.....	70
10.	Anexos.....	85

Resumen

La exposición a agentes xenobióticos se ha relacionado con efectos nocivos para la salud, ya que son capaces de inducir daño en el material genético que puede jugar un papel importante en la patogénesis de algunas enfermedades crónico-degenerativas, tales como la aterosclerosis, la diabetes, enfermedades cardíacas e incluso algunos tipos de cáncer. En contraparte se ha observado que existe una relación inversa entre el consumo de vegetales en la dieta y la incidencia de algunos tipos de cáncer. Dentro de los compuestos que pueden ser responsables de la modulación del daño genético se encuentran los compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, tales como la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG). En este estudio se evaluaron los efectos de la EGCG al ser administrada por vía intraperitoneal (i.p.) y oral (sonda intragástrica, i.g.), sobre el daño genotóxico y la apoptosis inducidos por trióxido de cromo (CrO_3). Grupos de 5 ratones macho de la cepa CD-1 fueron divididos al azar en: a) grupo testigo, tratado solo con el vehículo, b) grupo tratado con EGCG (10 ó 20 mg/kg) por vía i.p.; c) grupo tratado con EGCG (10 mg/kg) por vía i.g.; d) grupo tratado con CrO_3 (20 mg/kg) por vía i.p.; e) grupo tratado con EGCG (10 ó 20 mg/kg) por vía i.p. y CrO_3 (20 mg/kg) por vía i.p. y f) grupo tratado con EGCG (10 mg/kg) por vía i.g. y CrO_3 (20 mg/kg) por vía i.p. Para la evaluación del daño genotóxico se empleó el ensayo de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos (EPC) de sangre periférica, las muestras se tomaron de la vena caudal a las 24, 48 y 72 horas después de la administración de los tratamientos. También se evaluaron las frecuencias de EPC respecto a los eritrocitos normocromáticos (ENC) en estas mismas muestras. Para el análisis de apoptosis y viabilidad celular se empleó la tinción diferencial con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BrEt), las muestras de sangre se tomaron solo a las 48 horas (grupo testigo, EGCG, CrO_3 y EGCG- CrO_3). Los resultados mostraron que la administración de EGCG no incrementa de forma significativa las frecuencias de MN, mientras que la administración de CrO_3 incrementa los MN en todas las horas evaluadas. La administración previa de 20 mg/kg EGCG por vía i.p. incrementa las frecuencias de MN inducidas por el CrO_3 a las 24 horas, pero a las 48 y 72 horas las disminuye; no obstante, indujo muerte en dos de los ratones después de la hora 48. Al reducir la dosis de EGCG a 10 mg/kg administrada por la misma vía se incrementaron las frecuencias de MN en los tres tiempos evaluados, lo que sugiere un efecto pro-oxidante. Sin embargo, la administración de EGCG por vía i.g. disminuye las frecuencias de MN inducidas por el CrO_3 en todos los tiempos evaluados, lo que sugiere que la EGCG también tiene un efecto antioxidante. Por otra parte, los tratamientos con EGCG y CrO_3 no modificaron la relación de EPC con respecto a los ENC al comparar con los grupos testigos. Al analizar la viabilidad celular se observó que la EGCG no induce muerte celular, a diferencia del tratamiento con CrO_3 . Los análisis de apoptosis mostraron que la administración tanto de EGCG como de CrO_3 induce apoptosis y que la combinación de ambos tratamientos la incrementa aún más, lo que sugiere que este pudiera ser el mecanismo por el cual se disminuyen las MN inducidos por el CrO_3 .

Índice de abreviaturas

AC	Aberraciones cromosómicas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFB1	Aflatoxina B1
Apaf-1	Factor 1 de activación de la apoptosis
ATP	Adenosin trifosfato
ATSDR	"Agency for Toxic Substances and Disease Registry"
BrEt	Bromuro de etidio
CaCrO ₄	Cromato de calcio
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(IV)	Cromo tetravalente
Cr(V)	Cromo pentavalente
Cr(VI)	Cromo hexavalente
CrO ₃	Trióxido de cromo
Cu(I)	Cromo monovalente
Cu(II)	Cromo divalente
DIF	"Differential Induction Frequency"
ECETOC	"European Centre for Ecotoxicology of Chemicals"
EGC	(-)-Epicatequina-3-galato
EGC	(-)-Epigalocatequina
EGCG	(-)-Epigalocatequina-3-galato
ENC	Eritrocitos normocromáticos
EPA	"Environmental Protection Agency"
EPC	Eritrocitos policromáticos
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FADD	Dominio Fas Asociado a Muerte
FasL	Ligando Fas
FDA	"Food and Drug Administration"
Fe(II)	Fierro divalente
Fe(III)	Fierro trivalente
GC	(+)-Galocatequina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
i.g.	Intragástrico
i.p.	Intraperitoneal
IARC	"International Agency for Research on Cancer"
ICH	Intercambio de Cromátidas Hermanas
ICH4	"International Conference on Harmonization"
IQ	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f] quinolina

$K_2Cr_2O_7$	Dicromato de potasio
K_2CrO_4	Cromato de potasio
LD50	Dosis letal media
MN	Micronúcleos
MNU	N-nitroso-N-metilurea
NA	Naranja de acridina
Na_2CrO_4	Cromato de sodio
NIF	"Net Induction Frequency"
NNK	4-(metilnitrosamino)-1-(3 piridil)-1-butanona
NRC	"National Research Council"
$O_2^{\bullet-}$	Anión superóxido
PARP	Poli-ADP-ribosa polimerasa
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
RL	Radicales Libres
rmp	Revoluciones por minuto
ROO^{\bullet}	Radical peroxilo
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TPA	12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRADD	Dominio de muerte asociado a tumor
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis asociado a TNF
$^{\bullet}OH$	Radical hidroxilo
4NQO	4-nitroquinolina-1-oxido
6TG	6-tioguanina
8-OHdG	8-hidroxideoguanosina

1. Introducción

El desarrollo tecnológico, el crecimiento demográfico, la industrialización y el uso de nuevos métodos de agricultura tecnificada son factores que contribuyen a que entren continuamente al ambiente, cantidades crecientes de un gran número de sustancias químicas que si no son manejadas apropiadamente pueden presentar efectos en la salud humana y el ambiente. Los efectos relacionados con la salud pueden abarcar desde intoxicación aguda hasta efectos de largo plazo, tales como defectos de nacimiento, desórdenes neurológicos, trastornos hormonales e incluso cáncer (Albert, 1998; UNEP, 2003). En el ambiente además de los agentes químicos, también se encuentran agentes físicos como el ruido, el calor, las radiaciones α , β , γ y X, y agentes biológicos como los virus, bacterias y hongos, por lo que estamos hablando de una exposición compleja y constante (Clarkson *et al.*, 1988; Albert, 1998).

Dentro de los contaminantes químicos considerados como peligrosos se encuentran los metales pesados. Algunos de ellos son considerados como micronutrientes y se encuentran en casi todos los seres vivos; tal es el caso del hierro (Fe), cadmio (Cd), zinc (Zn), arsénico (As), vanadio (V), cobre (Cu) y el cromo (Cr) entre otros. También son componentes del sistema enzimático y redox (Ortiz-Monasterio *et al.*, 1987; Friberg y Nordberg, 1990; Gillespie *et al.*, 1990; EPA, 2010). Sin embargo, algunos compuestos de los metales pesados pueden inducir daño genotóxico y teratógeno, el cual es dependiente de sus propiedades químicas, su estado de oxidación y su solubilidad (Newman e Intosh, 1991).

1.1 Genotoxicidad y mutagénesis

El término *genotoxicidad* fue usado por primera vez para establecer la relación entre la inducción de cáncer y daño genético. Posteriormente, la "Comisión Internacional para la Protección contra los Mutágenos y Carcinógenos Ambientales", redefinió este término y estableció que sólo sea considerado para aquellos agentes que son capaces de interactuar con el ADN (Ames, 1989). Los agentes genotóxicos pueden ser capaces de inducir cambios perjudiciales en el material genético de un organismo (mutaciones) que pueden a su vez conducir al desarrollo de diversas enfermedades, entre ellas la aterosclerosis, enfermedades del corazón y el cáncer (Teaf y Middendorf, 2000).

Los mutágenos potenciales, tanto ambientales como ocupacionales pueden ser agentes físicos, biológicos o químicos. Muchas de las características de las mutaciones inducidas por agentes físicos como la radiación, son comunes a las de las mutaciones inducidas por agentes químicos. Un claro ejemplo de esto, son las moléculas conocidas como radicales libres (RL), los cuales se pueden formar tanto en eventos de radiación como durante el metabolismo de algunas sustancias químicas (Teaf y Middendorf, 2000).

Se han relacionado más de 3 500 enfermedades con mutaciones en humanos. En el caso de algunos tipos de cáncer, un cambio en el genotipo de una célula resulta en un cambio fenotípico que es definido, a groso modo, por una división celular rápida acompañada de un proceso de desdiferenciación. Las generaciones celulares subsecuentes eventualmente pueden formar un crecimiento tumoral en el tejido afectado. Esta secuencia simplificada ha sido denominada la *teoría del cáncer de la mutación celular somática*. Aunque no todos los tipos de cáncer inducidos por químicos pueden ser explicados por esta hipótesis, la teoría de la mutación somática es soportada por los siguientes puntos:

- La mayoría de los mutágenos químicos demostrados, han sido comprobados como carcinogénicos en estudios en animales.
- Los complejos carcinógeno-ADN (aductos) comúnmente pueden ser aislados de células tratadas con carcinógenos.
- Los defectos heredables en la capacidad de reparación del ADN, predispone a los individuos afectados a desarrollar cáncer.
- Las células tumorales pueden ser "iniciadas" por carcinógenos pero pueden permanecer en un estado latente por muchas generaciones celulares.
- Las células cancerígenas generalmente muestran anormalidades cromosómicas.
- Las células cancerígenas muestran una expresión génica alterada (Teaf y Middendorf, 2000).

1.2 Estrés oxidante

El estrés oxidante se define como un desbalance entre los pro-oxidantes y los antioxidantes, que resulta en daño macromolecular y en la alteración de la señalización y el control redox. Esta definición proporciona un marco conceptual para una valoración clínica significativa del estrés

oxidante y el desarrollo de terapias antioxidantes específicas para cada padecimiento, basadas en los mecanismos de alteración específicos de cada órgano o vía de señalización (Jones, 2006; Sies y Jones, 2007).

El daño macromolecular es considerado usualmente en términos de los mecanismos oxidantes de los RL. Estos pueden definirse como moléculas o fragmentos moleculares, capaces de existir de manera independiente, que contienen un electrón desapareado. La presencia de electrones desapareados usualmente les confiere un grado considerable de reactividad, lo que hace que sean capaces de dañar a otras moléculas. Los radicales derivados del oxígeno representan la clase más importante de las especies generadas de manera normal en los sistemas vivos (Sun, 1990; Valko *et al.*, 2006; Sies y Jones, 2007).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) incluyen radicales y no radicales. Sin embargo estas especies pueden transformarse en RL, lo que les confiere la característica de ser compuestos dañinos para las biomoléculas (Ramos *et al.*, 2010). Estas son producidas en las células durante los procesos metabólicos normales que involucran al oxígeno. Durante las reacciones metabólicas endógenas, las células aeróbicas producen ERO tales como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), y radicales peroxilo (ROO^{\bullet}) como productos de la reducción biológica del oxígeno molecular (Reuter *et al.*, 2010). La presencia de ERO puede incrementarse significativamente a través de la exposición a diferentes tóxicos ambientales producidos por la actividad antropogénica (Azqueta *et al.*, 2009).

1.2.1 Daño oxidante al ADN

La producción de RL cerca de la molécula de ADN puede generar la modificación de su estructura. Los radicales $^{\bullet}OH$ pueden reaccionar con las bases nitrogenadas, tanto purinas como pirimidinas, o con la estructura de la desoxirribosa, para producir bases dañadas o rompimientos de cadena. Los radicales ROO^{\bullet} están involucrados en la escisión del ADN, además de que pueden potenciar sinérgicamente la inducción de daño al ADN por el radical $O_2^{\bullet-}$. Algunas de estas modificaciones en las bases del ADN tienen un potencial considerable para dañar la integridad del genoma (Olinski *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006).

Una consecuencia de las lesiones persistentes en el ADN pueden ser las mutaciones, las cuales como se ha descrito, desempeñan un papel importante en el desarrollo de diversas enfermedades.

1.3 Respuesta celular al daño genotóxico

La reparación del ADN es un mecanismo importante para proteger el genoma. El fallo en la reparación completa antes de la replicación o la segregación de los cromosomas puede llevar a la fijación de mutaciones en el genoma, o a rompimientos cromosómicos irreparables. Por lo tanto, la integridad del genoma se encuentra preservada en parte por mecanismos que aseguran que la progresión del ciclo celular se retrase hasta que se hayan eliminado los daños en el ADN (Norbury y Hickson, 2001). Los diferentes tipos de daño al ADN que resultan de la acción de los agentes, son rápidamente detectados mediante la activación de una extensa red de vías de señalización conocidas como *la respuesta al daño al ADN*. Esta es un proceso jerárquico que culmina con la activación de los puntos de control del ciclo celular y las vías apropiadas de reparación del ADN. En general, el daño al ADN es detectado por proteínas *sensor* que reconocen tanto las lesiones por sí mismas como las alteraciones en la cromatina que pueden producirse por daño causado al ADN; posteriormente los *transductores* son llevados al sitio del daño para transmitir la señal hacia los *efectores* (Barzilai y Yamamoto, 2004). Los puntos de control conforman vías regulatorias que controlan la habilidad de las células para detener el ciclo celular en respuesta al daño, y dar tiempo para su reparación. Estos mecanismos pueden conducir al retraso del ciclo celular en las fases G1, S o G2 además de controlar la activación de las vías de reparación del ADN, la activación de la transcripción y el mantenimiento de los telomeros (Figura 1). Un mecanismo alternativo para resolver los problemas causados por el daño al ADN, involucra la conducción de la célula a una vía de muerte celular por apoptosis (Zhou y Elledge, 2000; Norbury y Hickson, 2001).

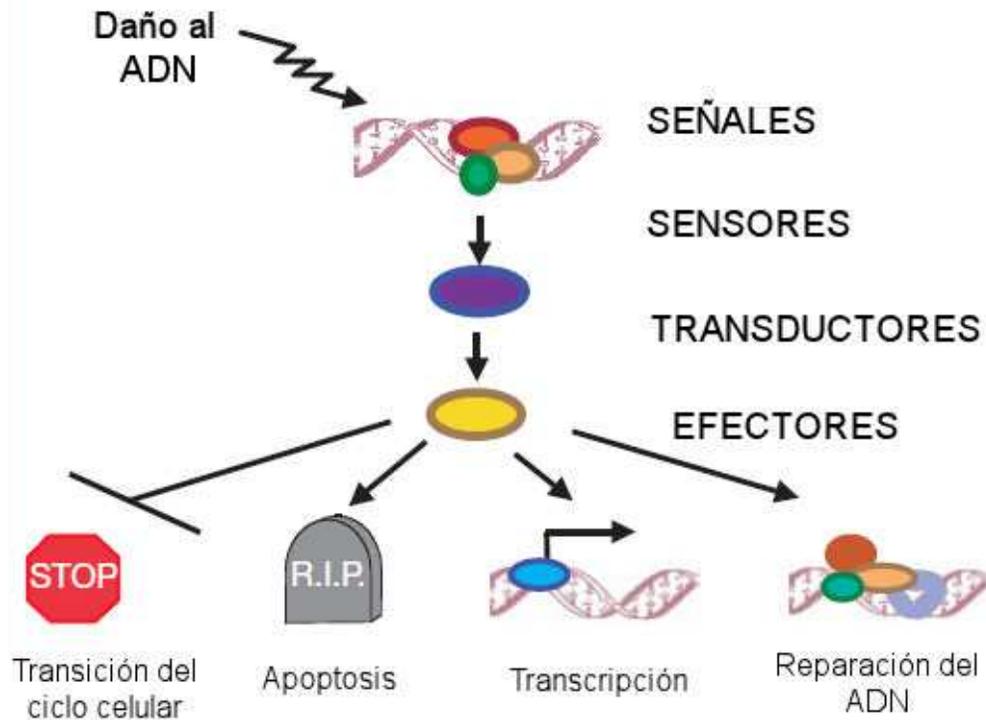


Figura 1. Activación de la respuesta al daño del ADN. Las flechas representan los eventos de activación y las líneas con terminaciones perpendiculares representan eventos de inhibición (Modificado de Zhou y Elledge, 2000).

1.3.1 Apoptosis y necrosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que regula el desarrollo normal y la homeostasis de los organismos multicelulares. Uno de los propósitos de la apoptosis a nivel celular es la auto-desintegración de células innecesarias o senescentes. Sin embargo este tipo de muerte también es considerada un mecanismo de eliminación de daño celular irreparable que de otra forma, podría comprometer la salud de todo el organismo (Norbury y Hickson, 2001; Blankenberg, 2008).

La apoptosis se caracteriza por una serie de eventos tanto morfológicos como bioquímicos, típicos de este tipo de muerte celular (Blankenberg, 2008).

Bioquímicamente, la apoptosis implica una serie de cascadas de señalización que llevan a los cambios morfológicos. El tiempo entre la exposición a los factores que la desencadenan y el

tiempo en el cual se pueden observar los signos morfológicos es altamente variable y dependen en gran medida en el tipo celular, el tipo de estímulo, la intensidad, exposición y las condiciones ambientales locales de la célula. Sin embargo, la mayoría de las vías apoptóticas convergen en una cascada común de cistein-proteasas conocidas como *caspasas*. Las caspasas comúnmente agrupadas en iniciadoras (caspasas 8 y 10) y ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7). La activación de las caspasas ejecutoras ocurre tanto en la vía extrínseca como en la vía intrínseca. La vía apoptótica extrínseca está mediada por receptores de muerte que se unen a ligandos específicos, entre ellos el factor de necrosis tumoral (TNF), TRAIL, y FasL. La asociación del ligando a su receptor conduce al reclutamiento de moléculas adaptadoras tales como FADD (dominio de muerte asociado a FAS) o TRADD (dominio de muerte asociado a tumor), activando así a las caspasas iniciadoras 8 y 10 que en su momento activarán a las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7. La vía apoptótica intrínseca o *mitocondrial* integra las señales apoptóticas causadas por varios agentes citotóxicos, la expresión aberrante de oncogenes y p53. El punto de control de esta vía es la liberación del citocromo c de la mitocondria hacia el citosol. El citocromo c interactúa con Apaf-1 (factor 1 de activación de la apoptosis), adenosin trifosfato (ATP), y la procaspasa 9 para formar una estructura conocida como apoptosoma. El apoptosoma activa entonces a la caspasa 9, que conduce a la actividad de las caspasas 3, 6 y 7 estimulando la apoptosis. Tras la activación de la caspasa 3, comienzan los eventos morfológicos de la apoptosis resultando en un rompimiento de las proteínas celulares incluyendo el citoesqueleto y la matriz nuclear, y la activación de poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), la cual facilita la degradación nuclear del ADN (Saraste y Pulkki, 1999; Blankenberg, 2008).

Morfológicamente, el inicio de la apoptosis está caracterizado por la contracción de la célula y el núcleo, además de la condensación de la cromatina en masas bien delineadas que comienzan a marginarse contra las membranas nucleares. Más tarde, el núcleo se condensa y se rompe (cariorexix). La célula posteriormente se separa del tejido circundante y sus bordes comienzan a formar extensiones, las cuales se separan y se fusionan para formar una membrana independiente alrededor del material celular sólido que se ha desprendido, formando así los *cuerpos apoptóticos* que contienen los organelos celulares y fragmentos del núcleo. Posteriormente, estos son fagocitados rápidamente por las células próximas, incluyendo macrófagos y células parenquimales. Si la célula fragmentada no es fagocitada, ésta puede iniciar su degradación en un proceso llamado necrosis (Saraste y Pulkki, 1999).

La necrosis es un tipo de muerte celular alterno a la apoptosis, la cual es considerada como un proceso tóxico en el cual la célula es una víctima pasiva y sigue una muerte independiente de energía (Elmore, 2007). Este tipo de muerte está caracterizada por el hinchamiento de la célula debido a la acumulación de agua y electrolitos, la ruptura temprana de la membrana plasmática, y la alteración de los organelos celulares, incluyendo las mitocondrias. La formación de cuerpos apoptóticos es ausente y la cromatina se agrupa de manera irregular. El escape del contenido celular induce una respuesta inflamatoria. La morfología exacta de la célula necrótica es muy variable, ya que depende de las características del agente causante, sin embargo existen particularidades que distinguen a la célula necrótica de una célula muerta por apoptosis, Tabla 1 (Allen *et al.*, 1997; Saraste y Pulkki, 1999).

Tabla 1. Comparación de las características de la apoptosis y necrosis (Tomado de Allen *et al.*, 1997).

	APOPTOSIS	NECROSIS
Ocurrencia	Células aisladas y dispersas	Daño tisular masivo
Citoplasma	Contracción: condensado y deshidratado; organelos normales	Se hincha el retículo endoplásmico y las mitocondrias
Núcleo	La cromatina se condensa en masas adyacentes a la envoltura nuclear	Mal definido, disperso al azar, masas pequeñas de cromatina, lisis
Membrana plasmática y nuclear	Intensas circunvoluciones; cuerpos apoptóticos conteniendo: organelos citoplasmáticos normales; cromatina nuclear	Daño en la membrana/lisis; escape del contenido intracelular
Rompimiento del ADN	Internucleosomal; activación génica; endonucleasas	Degradación aleatoria, incluyendo histonas
Repuesta de los tejidos	Sin inflamación; fagocitosis de los cuerpos apoptóticos	Inflamación

Aunque los mecanismos y la morfología de la apoptosis y necrosis difieren, existen coincidencias entre estos dos procesos (Figura 2). La evidencia indica que ambas representan expresiones morfológicas de una red bioquímica compartida. Por ejemplo, dos factores que convierten un proceso apoptótico en uno necrótico incluyen la disminución en la disponibilidad de caspasas y de ATP intracelular. Si una célula muere por necrosis o apoptosis depende en parte de la naturaleza de la señalización de muerte de la célula, el tipo de tejido, el estado de desarrollo del tejido y del ambiente fisiológico (Elmore, 2007).

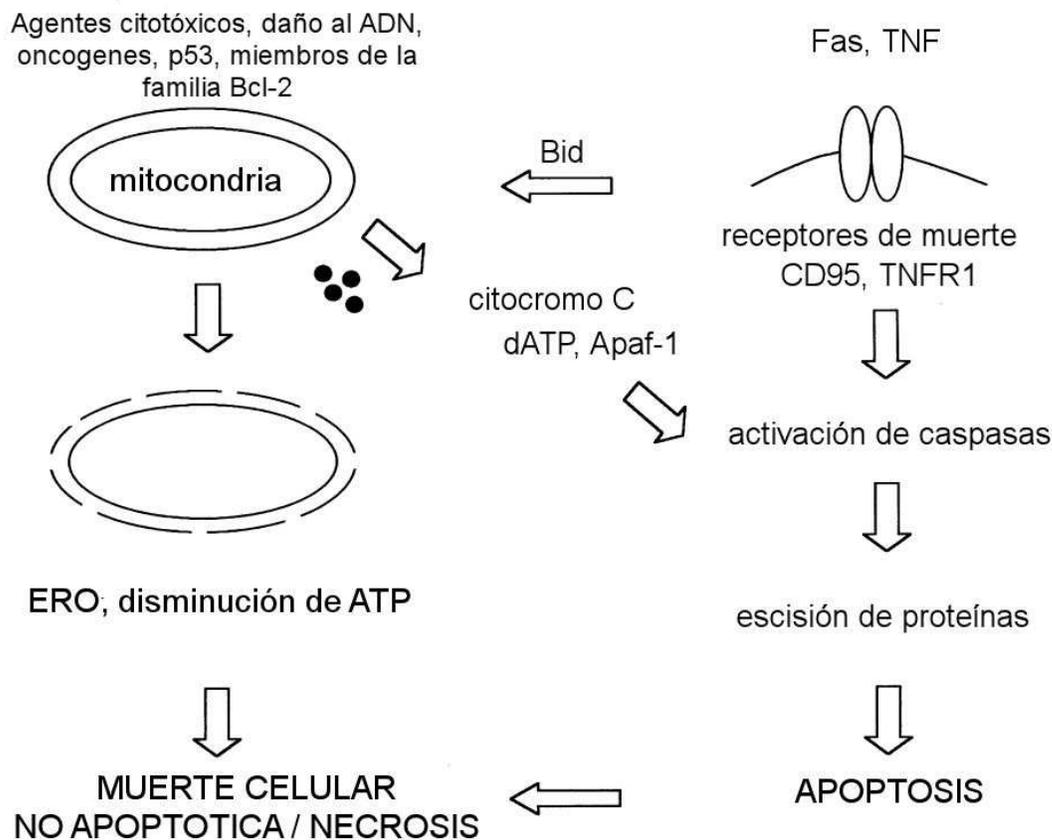


Figura 2. Principales vías apoptóticas y la relación entre la muerte apoptótica y no apoptótica (Modificado de Saraste y Pulkki, 1999).

1.4 Metales como inductores de daño genotóxico

Algunos metales son considerados como micronutrientes y se encuentran en todos los seres vivos; tal es el caso del hierro (Fe), cadmio (Cd), zinc (Zn), arsénico (As), vanadio (V), cobre (Cu) y el cromo (Cr) entre otros. Sin embargo, algunos compuestos de los metales pesados pueden inducir daño genotóxico y teratógeno, el cual es dependiente de sus propiedades químicas, su estado de oxidación y su solubilidad (Newman e Intosh, 1991).

Uno de los metales que ha llamado más la atención para su estudio es el Cr, debido a que es empleado ampliamente en la industria y se le ha asociado con diferentes alteraciones en la salud como la aparición de defectos de nacimiento o la inducción de algunos tipos de cáncer (Doll y Peto, 1981; De Flora, 1998). Además ha mostrado efectos genotóxicos y teratógenos en diferentes sistemas biológicos de prueba (Hartwin, 1995; Mirsalis *et al.*, 1996).

1.5 Cromo

El Cr es un elemento que se encuentra de manera natural en rocas, animales, plantas, suelos y en gases y cenizas volcánicas (ATSDR, 2008). Los estados de oxidación en los que se encuentra van desde el 2^+ al 6^+ , de los cuales las formas trivalente (III), y hexavalente (VI) son las más importantes biológicamente. El Cr elemental no existe naturalmente en el ambiente. La forma divalente es oxidada fácilmente al estado trivalente, que es más estable. Aunque el estado hexavalente (incluyendo los cromatos) es más estable que el estado divalente, es raramente encontrado en la naturaleza, sin embargo es producido durante diversas actividades antropogénicas (O'Brien *et al.*, 2003). Dentro de los compuestos que contienen Cr, los que se han estudiado principalmente son aquellos que contienen Cr(III) y (VI), y de estos los de Cr(VI) son considerados los más tóxicos (ATSDR, 2008)

1.5.1 Exposición al cromo

La población general se encuentra expuesta al Cr (III y VI principalmente) a través del agua, aire, consumo de alimentos o suplementos alimenticios contaminados. También puede ocurrir exposición dérmica a través del contacto de la piel con compuestos o productos que contienen Cr, tales como preservativos para la madera, el cemento y algunos materiales de limpieza (Nickens, 2010). Se ha descrito que las poblaciones humanas estamos expuestas a los compuestos de Cr por las emisiones de los automóviles y el humo de los cigarrillos. La *International Agency for Research on Cancer* (IARC) ha estimado que los cigarrillos producidos en Estados Unidos contienen Cr en cantidades de entre 0.24 y 6.3 mg Cr/kg (IARC, 1997).

Las fuentes de contaminación por Cr principalmente son aquellas relacionadas con el ambiente ocupacional. Las industrias con la mayor contribución a la producción de Cr incluyen el procesamiento de metales, las instalaciones de curtido, la producción de cromatos, la soldadura de acero inoxidable y la producción de pigmentos de Cr, entre otras (ATSDR, 2008).

Los principales compuestos de Cr que se encuentran en el ambiente son el óxido crómico y el sulfato crómico (trivalentes), así como el trióxido crómico, el ácido crómico y los dicromatos (hexavalentes) (Galvão y Corey, 1987). En la Figura 3, se muestran diferentes vías por las cuales el Cr puede ingresar al organismo. Entre ellas se encuentran: a) la vía respiratoria; en donde es depositado en el pulmón y eliminado posteriormente por medio de la orina, b) la vía cutánea;

donde el Cr es absorbido a través de la piel de tal manera que puede llegar a la sangre, y c) la vía oral; vía mediante la cual el Cr puede llegar al tracto gastrointestinal y eliminarse por medio de las heces fecales (Miranda, 1992). Una vez que los compuestos de Cr ingresan al organismo pueden distribuirse en los tejidos u órganos donde pueden inducir toxicidad o bien ser eliminados ya sea por orina o por heces fecales (Clarkson *et al.*, 1988).

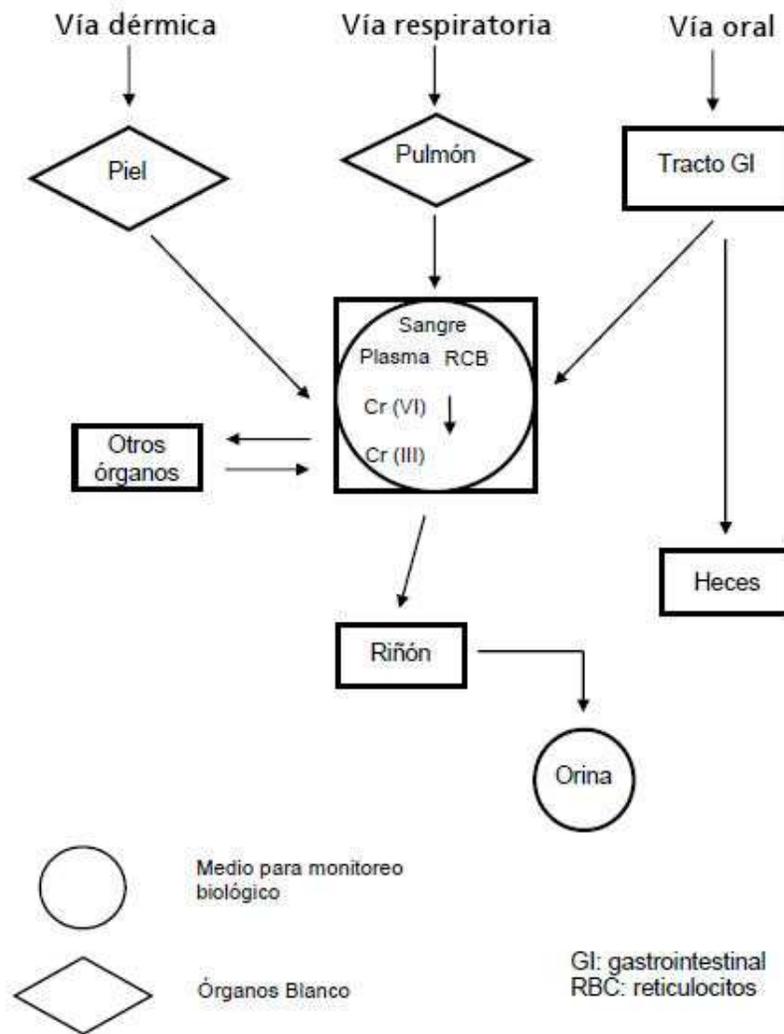


Figura 3. Vías de exposición al Cr (Modificada de Clarkson *et al.*, 1988).

El Cr(III) es un nutriente esencial requerido para el metabolismo energético normal. El Instituto de Medicina del *National Research Council* (NRC) determinó una ingesta adecuada de 20 a 45 μg de Cr(III) al día para adolescentes y adultos. Sin embargo, aunque sea considerado un mineral

esencial en estas cantidades, al poseer una alta afinidad con el ADN, puede inducir daño en el material genético cuando se produce en cantidades mayores (ATSDR, 2008; Wang *et al.*, 2006).

Por otro lado, la exposición a Cr(VI) se ha relacionado con efectos adversos a la salud. Estudios epidemiológicos han reportado que la exposición ocupacional a los compuestos de Cr(VI), está relacionada con un alto riesgo de enfermedades respiratorias, fibrosis, perforación del tabique nasal, trastornos reproductivos e inmunológicos y la inducción de cáncer. Se ha observado que particularmente la exposición ocupacional a trióxido de cromo (CrO₃) produce irritación nasal y atrofia de la mucosa, además de una disminución en la función pulmonar (ATSDR, 2008; Nickens *et al.*, 2010). De acuerdo con la *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR, 2008), aunque el problema de salud más común en trabajadores expuestos al cromo implica el tracto respiratorio, también se ha observado daño en los espermatozoides y en el sistema reproductor de hombres expuestos al Cr(VI).

En México está documentado un caso de toxicidad por exposición a compuestos de Cr. En 1958 se estableció en San Francisco Chilpan, Tlaxiaco, Estado de México, una empresa llamada "Cromatos de México", encargada de procesar la cromita para obtener Na₂CrO₄ y K₂CrO₄. Los procesos de producción se llevaban a cabo a cielo abierto, sin mantener un control sobre las emisiones de polvos y la eliminación de residuos, por lo que los desechos sólidos se acumulaban en los patios de la empresa. Estos desechos fueron empleados durante varios años por las autoridades municipales para el relleno de las calles de dicha zona. En 1977 se reportaron casos de obreros con tabique nasal perforado, mucosa nasal hiperémica, irritación conjuntival, dermatosis y cáncer. También se documentaron casos de recién nacidos con defectos de nacimiento (Ortíz-Monasterio *et al.*, 1987; García-Rodríguez, 2006).

La diferencia entre los efectos del Cr(VI) y el Cr(III) se deben principalmente a su estado de oxidación, ya que se ha sugerido que una de las razones por las cuales el Cr(VI) induce efectos tóxicos es su reducción intracelular durante la cual se generan ERO y RL las cuales son capaces de dañar al organismo. Además, el Cr(VI) tiene una mayor capacidad para atravesar la membrana plasmática a través de canales iónicos no específicos, debido principalmente a su semejanza con los iones de sodio y potasio, mientras que el Cr(III) tiene una menor permeabilidad a la membrana (O'Brien *et al.*, 2003; Jomova y Valko; 2011).

1.5.2 Carcinogénesis y genotoxicidad

El Cr(VI) fue asociado con la inducción de cáncer en 1890, en un reporte de caso sobre un trabajador de una empresa de pigmentos con adenocarcinoma en el hueso nasal. Desde ese reporte inicial, numerosos estudios epidemiológicos han indicado que la exposición ocupacional al Cr(VI) causa un incremento en el riesgo de padecer cáncer de pulmón (Wise *et al.*, 2002). Actualmente la IARC clasifica a los compuestos que contienen Cr(VI) como carcinógenos humanos del Grupo 1 (IARC, 1997).

El mecanismo para la carcinogenicidad del Cr todavía no es clara, sin embargo existe información que evidencia la mutagenicidad y genotoxicidad del Cr(VI) *in vivo* e *in vitro*. Estudios en los que se ha evaluado la exposición ocupacional en humanos muestra evidencias de rompimientos de cadena de ADN, aberraciones cromosómicas (AC), incremento en el intercambio de cromátidas hermanas (ICH), síntesis no programada de ADN, y entrecruzamientos ADN-proteína (ATSDR, 2008).

En la Tabla 2 se muestran algunos estudios en los que se ha observado que la exposición a diferentes compuestos de Cr(VI) es capaz de generar daño al material genético.

Tabla 2. Estudios sobre la genotoxicidad de compuestos de Cr(VI) (Modificado de García-Rodríguez, 2006).

Compuesto estudiado	Sistema de prueba	Dosis	Resultado	Referencia
K ₂ CrO ₄	Médula ósea de ratón <i>in vivo</i>	30, 40, 50 mg/kg	Clastogenicidad	Trivedi <i>et al.</i> , 1989
K ₂ Cr ₂ O ₇	Células de roedores <i>in vitro</i>	10-3 mM	Incrementa ICH	Bianchi <i>et al.</i> , 1980
K ₂ Cr ₂ O ₇	Células de ratón <i>in vitro</i>	10 µM	Inhibe la síntesis de ADN	Nishio y Uyeki, 1985
K ₂ Cr ₂ O ₇ CrO ₃ CaCrO ₄	Células <i>in vitro</i>	1, 10, 100 µg/ml	Inhibe la síntesis del ADN, induce ICH	Bianchi <i>et al.</i> , 1980; Gómez-Arroyo <i>et al.</i> , 1981
K ₂ Cr ₂ O ₇	Ratas <i>in vivo</i>	2.5 mg/kg	Estrés oxidativo y daño en los tejidos	Bagchi <i>et al.</i> , 1997
CrO ₃	<i>Vicia faba</i>	0.001, 0.01, 0.05, 1-3%	Alteraciones cromosómicas, anomalías en el huso mitótico y MN	Villagómez, 1981 Gómez-Arroyo <i>et al.</i> , 1987
CrO ₃	Sangre periférica de ratón <i>in vivo</i>	20 y 25 mg/kg	Inducción de MN	García-Rodríguez <i>et al.</i> , 1998; 2000; 2001
K ₂ Cr ₂ O ₇	Linfocitos de sangre periférica <i>in vitro</i>	50, 200, 400, 600 and 1000 µM	Rompimientos de cadena del ADN	Błasiak y Kowalik, 2000
K ₂ Cr ₂ O ₇	Linfocitos de ratón <i>in vivo</i>	25 y 50 mg/kg	Rompimientos de cadena del ADN	Wang <i>et al.</i> , 2006
K ₂ Cr ₂ O ₇	<i>Oreochromis niloticus</i>	0,2, 0,4 y 0,8 ppm	Inducción de MN	Prieto <i>et al.</i> , 2008

1.5.3 Mecanismos de inducción de daño genotóxico

Todos los cromatos, Cr(VI), a diferencia de los compuestos de Cr(III), pueden atravesar fácilmente la membrana celular a través de los canales aniónicos no específicos, o mediante el proceso de fagocitosis en el caso de cromatos insolubles (Valko *et al.*, 2006; Jomova y Valko, 2011). El Cr(VI) entra a la célula como un oxianion, y posteriormente es reducido a Cr(V), Cr(IV) y finalmente a su forma trivalente (III). Aunque el Cr(VI) no reacciona directamente con el ADN aislado, las formas

reducidas del Cr muestran una alta reactividad con la molécula de ADN. El Cr(V) y (III) muestran una alta afinidad por las bases nitrogenadas y los grupos fosfato, lo cual conduce a la formación de monoadductos Cr-ADN, entrecruzamientos de ADN y aductos ternarios como Cr-ascorbato-, Cr-cisteína-, Cr-histidina y Cr-glutation-ADN. Particularmente el Cr(V) puede oxidar directamente las bases nitrogenadas y las moléculas de desoxirribosa mediante la sustracción de un átomo de hidrógeno, lo cual produce rompimientos de la cadena de ADN. El Cr(III) es la última forma reactiva del Cr y es crítica para la formación de monoadductos, entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteína (O'Brien *et al.*, 2003).

Además, durante el proceso de reducción del Cr, se generan ERO, las cuales desencadenan reacciones tóxicas que pueden dañar a las proteínas y al ADN (Valko *et al.*, 2006; Nickens *et al.*, 2010; Jomova y Valko, 2011). A pH fisiológico, la reducción es facilitada por la acción de una gran cantidad de moléculas como el ascorbato, el glutatión (GSH), la cisteína, el ácido lipóico, el H₂O₂, el NAD(P)H, la fructosa y la ribosa. La respectiva disponibilidad celular y tasa de reacción con el Cr(VI) determina cual es el principal agente reductor; sin embargo, hay estudios que indican que el ascorbato es el reductor biológico cinéticamente dominante, responsable de alrededor del 90% del metabolismo del Cr(VI) *in vivo* (Nickens *et al.*, 2010). En la Figura 4, se muestra la vía de acceso del Cr(VI) a la región intracelular y las principales rutas involucradas en las lesiones genéticas.

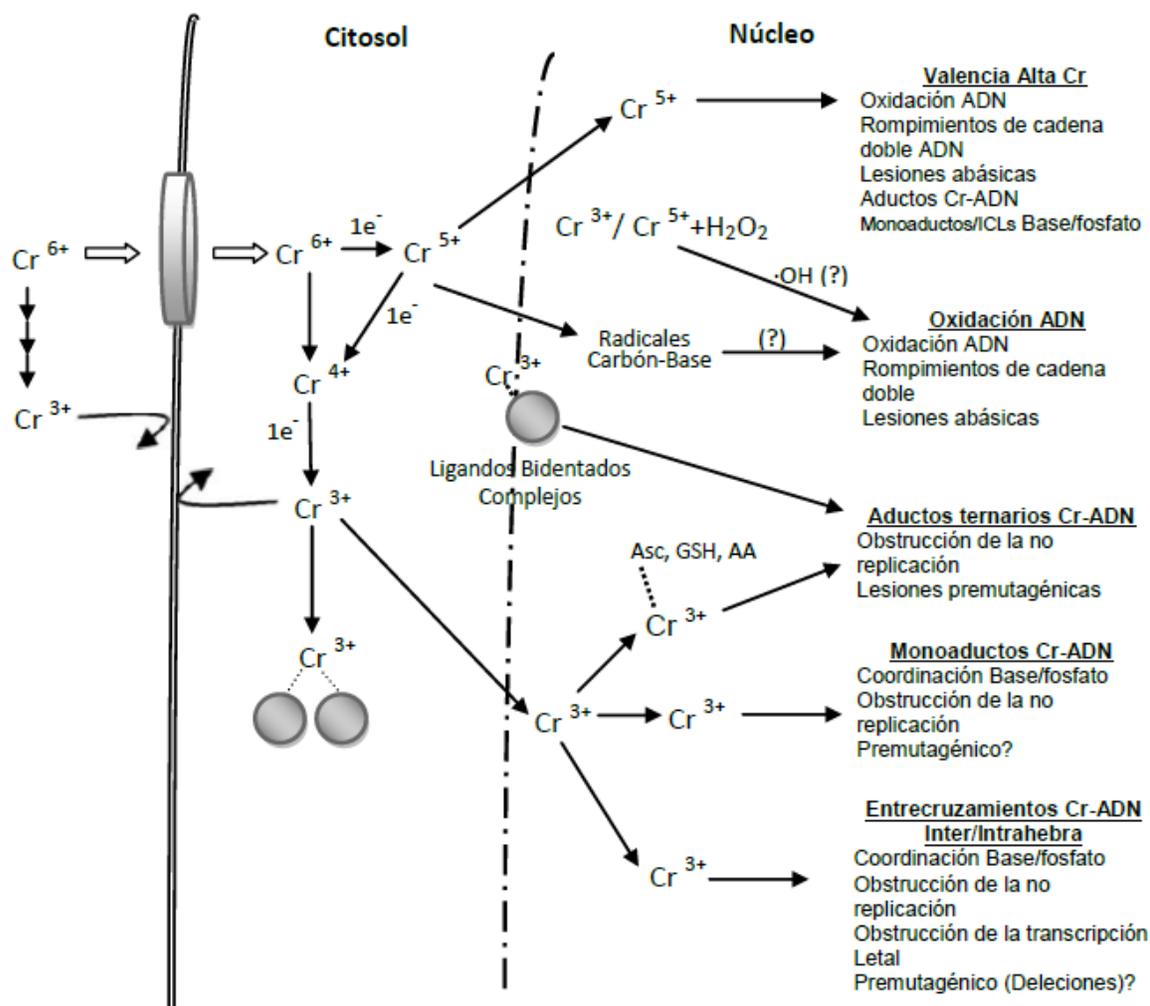


Figura 4. Vía de acceso del Cr(VI) al interior celular y principales rutas involucradas en las lesiones genéticas (Modificada de O'Brien *et al.*, 2003).

El mecanismo más importante para la producción de ERO y RL por metales de transición, involucra el ciclo de Haber-Weiss, donde se genera el radical $\bullet\text{OH}$ (Figura 5). Cuando el Cr(VI) entra a la célula, el glutatión forma rápidamente un complejo con este, seguido de una lenta reducción del Cr(VI) a Cr(V). Una vez formado, el Cr(V) puede reaccionar con H_2O_2 a través de la reacción de Fenton para formar un radical $\bullet\text{OH}$, el cual es capaz de causar daño al ADN. El ion $\text{O}_2\bullet^-$ también puede reducir el Cr(VI) a Cr(V), lo que puede catalizar la descomposición de H_2O_2 produciendo el radical $\bullet\text{OH}$ (Shi y Dalal, 1992; Valko *et al.*, 2006).

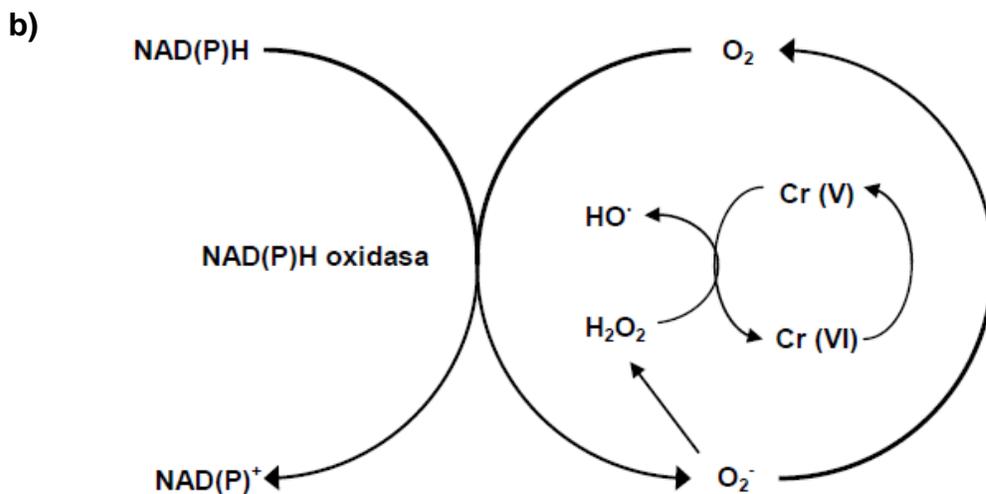
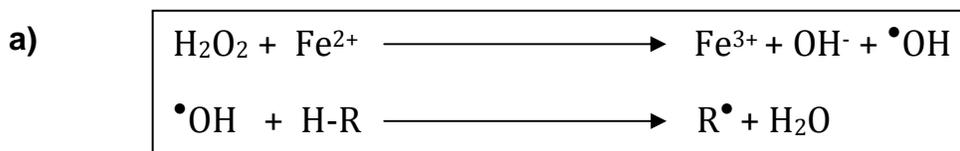


Figura 5. a) Reacción de Fenton; b) Ciclo de Haber-Weiss y reacción de Fenton para el Cr(VI) (Tomado de Shi y Dalal, 1992).

1.5.4 Inducción de muerte celular

Después de la exposición a compuestos de Cr(VI), se inicia una detención del ciclo celular. Como consecuencia del daño genético irreparable, la célula dañada es eliminada de la población en proliferación por medio de la activación de mecanismos de muerte celular (Nickens *et al.*, 2010). Se ha establecido que los compuestos de Cr inducen apoptosis como modo primario de muerte celular y que estos eventos pueden ser dependientes o independientes de p53 (Carlisle *et al.*, 2000). En algunos estudios se ha observado que el Cr(VI) induce la activación de p53 en epitelio pulmonar humano y en fibroblastos pulmonares (Wang *et al.*, 2000; Wang y Shi, 2001).

Se ha observado que las ERO desempeñan un papel importante en la vía de señalización del proceso apoptótico, ya que estas especies son capaces de generar daño al ADN, lo que induce a una activación de cinasas que fosforilan a p53. Wang *et al.* (2006) correlacionaron el aumento en el daño al ADN y muerte celular por apoptosis con un incremento en la presencia de ERO en un estudio *in vivo* empleando ratones Swiss. En otros estudios *in vitro*, también se ha observado la

relación entre el aumento de ERO y la inducción de apoptosis (Bagchi *et al.*, 2001; Vasant *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2004).

Es claro que p53 desempeña un papel importante en la inducción de apoptosis por Cr, pero la inducción de ERO por Cr puede desencadenar el proceso apoptótico por otras vías (Rana, 2008). Las vías independientes de p53 incluyen a la mitocondria. En este caso, el Cr(VI) puede iniciar la vía apoptótica intrínseca a través de la liberación de ERO, los cuales promueven la inestabilidad mitocondrial. Esto conduce a la disminución del potencial de la membrana mitocondrial y a la liberación del citocromo C. Sin embargo, los mecanismos precisos por los cuales el Cr(VI) induce apoptosis todavía no son claros (Rana, 2008).

1.6 Antimutagénesis

Dado que los compuestos ambientales están ampliamente relacionados con el desarrollo de diversas enfermedades incluyendo el cáncer, su eliminación o neutralización es de vital importancia para contribuir a la prevención de tales padecimientos. La modulación o protección del cáncer y de otras enfermedades relacionadas con mutaciones pueden ser inducidas mediante factores protectores o fortaleciendo los mecanismos fisiológicos de defensa (De Flora, 1998; Arencibia-Arebola *et al.*, 2003).

Existe evidencia creciente de que ciertas sustancias provenientes de las plantas tienen efectos protectores contra agentes mutágenos tanto ambientales como endógenos (Bhattacharya, 2011). Es por ello que el estudio de sustancias con propiedades protectoras o moduladoras del daño al ADN, surge como una opción complementaria a los estudios de genotoxicidad, ya que al conocer los mecanismos de protección se pueden generar alternativas para contrarrestar los efectos de los agentes inductores de daño (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007).

El término *antimutagénesis* se refiere al proceso mediante el cual se reduce la frecuencia de mutaciones espontáneas o inducidas (Kada, 1984). De acuerdo con Wattenberg (1981), los antimutágenos pueden ser agrupados en agentes bloqueadores, que impiden que los mutágenos reaccionen con los órganos blanco, y en agentes supresores, los cuales previenen la evolución de los procesos mutagénicos. Dentro de los agentes antimutágenos, se pueden encontrar dos tipos:

1. Desmutágenos: son aquellas sustancias que pueden inactivar a los mutágenos de manera parcial o total mediante la interacción enzimática o química antes de que el mutágeno afecte el genoma.
2. Bio-antimutágenos: son aquellos que suprimen el proceso de mutagénesis después de que los genes han sido dañados por los mutágenos. Estos pueden actuar a través de la activación de mecanismos de reparación resultando en una disminución de la frecuencia de mutaciones (Kada *et al.*, 1982)

1.7 Componentes de la dieta como protectores del daño al ADN

La exposición de las poblaciones humanas a diferentes agentes xenobióticos ha generado un considerable interés en la composición de la dieta, pues se ha encontrado que las dietas ricas en granos, frutas y verduras pueden reducir la incidencia de enfermedades relacionadas con el daño al material genético como algunos tipos de cáncer (Waladkhani y Clemens, 2001; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007).

Estos efectos protectores de los vegetales se han relacionado con sus componentes con actividad antioxidante. Particularmente, los polifenoles presentan un alto potencial antioxidante relacionado con la disminución de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer, además poseen propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, inmunomoduladoras, antibacterianas, antivirales, anti-fibróticas y neuroprotectoras. Los polifenoles se encuentran de manera natural en las frutas y los vegetales, así como en el vino tinto, la cerveza e infusiones del té verde (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Piegiorgio *et al.*, 2003). Se ha encontrado que el té verde (*Camellia sinensis*) contiene por lo menos 12 derivados de polifenoles, entre ellos las catequinas y la miricetina (flavonoides), que son las que le confieren su principal potencial antioxidante (Kondo *et al.*, 2001; Nie *et al.*, 2002; Sugisawa *et al.* 2004; Babich *et al.*, 2007; García-Rodríguez *et al.*, 2012).

1.7.1 Polifenoles

Los compuestos fenólicos o polifenoles son productos del metabolismo secundario de las plantas. Constituyen uno de los más numerosos y ampliamente distribuidos grupos de sustancias en el reino vegetal, y generalmente están involucradas en la defensa contra las radiaciones o los patógenos (Manach *et al.*, 2004; Iwasaki *et al.*, 2011). Estos compuestos pueden ser clasificados en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los grupos funcionales que se unen a ellos (Manach *et al.*, 2004). Entre ellos se distinguen los siguientes: ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), flavonoides, estilbenos y lignanos (Figura 6).

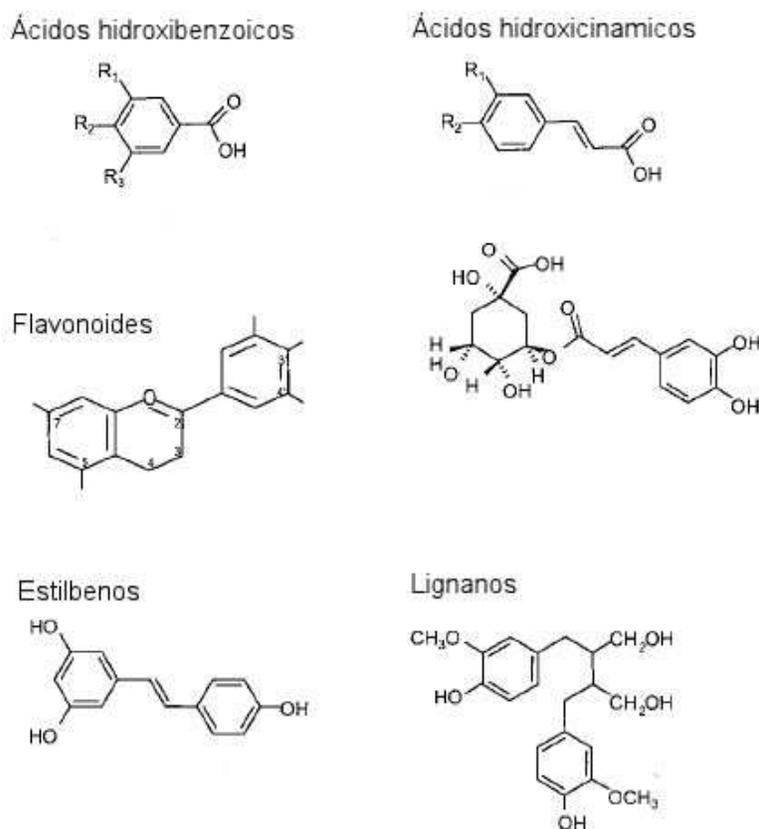


Figura 6. Estructuras químicas de los polifenoles (Modificado de Manach *et al.*, 2004).

Dentro de los compuestos polifenólicos más estudiados se encuentran los flavonoides, los cuales son una clase de compuestos ubicuos en las plantas, que usualmente se encuentran en su forma glicosilada. Estos contienen numerosos grupos funcionales OH⁻ ubicados en estructuras

en forma de anillo, las cuales consisten en 2 anillos aromáticos denominados A y B, que se unen mediante tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado, el anillo C (Figura 7). Las variaciones estructurales dentro de los anillos permiten la subdivisión de los flavonoides en diferentes familias:

- Flavonoles: son aquellos que tienen un anillo 3-hidroxipiran-4-ona; e.g. quercetina y el kamferol.
- Flavonas: carecen del grupo 3-hidroxil; e.g. luteolina, apigenina y crisina.
- Flavanoles: carecen de la doble ligadura en la posición 2-3 y de la estructura 4-ona; e.g. catequina.
- Isoflavonas: en las cuales los anillos B se localiza en la posición 3 del anillo C; e.g. genisteina.

Estos flavonoides se presentan generalmente como glicosidos, ya que la glicosilación le confiere estabilidad a las moléculas, de tal manera que los hace menos reactivos frente a los RL y permite su solubilidad en agua, posibilitando su almacenamiento en las vacuolas (Rice-Evans *et al.*, 1997).

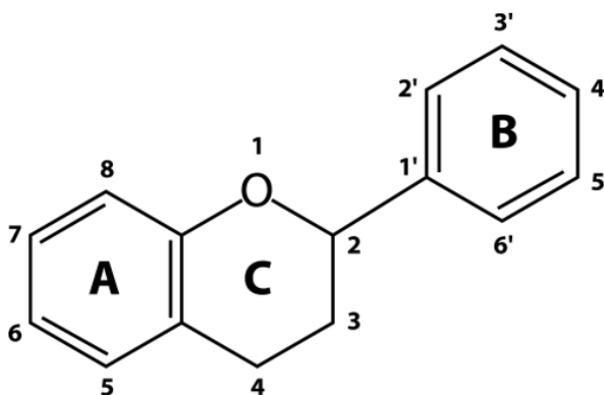


Figura 7. Estructura básica de los flavonoides (Modificado de Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Los flavonoides exhiben propiedades antioxidantes típicas que han sido deducidas por diferentes técnicas bioquímicas. Se ha sugerido que los grupos funcionales unidos al esqueleto difenilpropano y otras características determinan las funciones antioxidantes de los flavonoides. La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos se refiere a su habilidad para prevenir el daño causado por las ERO o bien la producción de estas (Iwasaki *et al.*, 2011).

Los flavanoles existen tanto en su forma monomérica (catequinas) y polimérica (proantocianidinas). Se encuentran en muchos tipos de frutas (los albaricoques contienen la fuente más rica de catequinas entre las frutas, con alrededor de 250 mg/kg de fruta), y también se encuentran en bebidas como el vino rojo (300 mg/L), pero el chocolate y el te verde son las fuentes más ricas. Una infusión de te verde contiene más de 200 mg de catequinas. En contraste con otros flavonoides, los flavanoles no se encuentran glicosilados en los alimentos (Manach *et al.*, 2004).

1.8 El té verde

El té verde (*Camellia sinensis*), pertenece a la familia Teaceae. Se denomina generalmente como té de la India, oolong o té negro, en referencia al producto resultante de la preparación diferencial de las hojas (Duarte y Menarim, 2006). La infusión de las hojas de *Camellia sinensis* es una bebida muy popular principalmente en Europa y en el Oriente, siendo la más común después del agua (Narotzki *et al.*, 2011). Entre las tres variedades del té, el té verde constituye alrededor del 20% del té fabricado en el mundo, el té oolong alrededor del 2% y el té negro el resto (Katiyar *et al.*, 2001; Gupta, 2002).

El té ha atraído la atención recientemente, tanto en la comunidad científica como en la de consumo debido a los beneficios en la salud para una gran variedad de enfermedades, desde la pérdida de peso hasta el tratamiento del cáncer. Esto ha llevado al incremento en el consumo del té verde por los pacientes y la población en general, y a la inclusión de su extracto como un ingrediente en gran número de suplementos nutricionales, incluyendo suplementos multivitamínicos. Varios estudios epidemiológicos y en modelos experimentales han mostrado que el té verde puede proporcionar protección contra diversos tipos de cáncer tales como el de piel, mama, próstata y pulmón. Además de sus propiedades quimiopreventivas, se ha demostrado la actividad anti-angiogénica y anti-mutagénica especialmente de uno de sus polifenoles (EGCG), (García-Rodríguez *et al.*, 2012).

Los efectos benéficos del té verde son atribuidos a los compuestos polifenólicos presentes en él, particularmente las catequinas que conforman el 30% del peso seco de las hojas (Zaveri, 2006). Estas catequinas están presentes en mayores cantidades en el té verde que en el té negro o el té oolong, debido a las diferencias en el procesamiento de las hojas del té después de su cosecha.

Para el té verde, las hojas frescas de la planta son cocidas al vapor y secadas para inactivar la enzima polifenol oxidasa, un proceso que mantiene esencialmente los polifenoles en sus formas monoméricas. El té negro, por otra parte, es producido por la fermentación extendida de las hojas del té que resulta en compuestos poliméricos, tearubiginas y teaflavinas. El té oolong es el producto parcialmente fermentado y contiene una mezcla de polifenoles monoméricos y teaflavinas de mayor peso molecular. Las tres variedades del té contienen cantidades significativas de cafeína (3-6%) que no es afectada por los diferentes métodos de procesamiento (Zaveri, 2006; Duarte y Menarim, 2006). Las principales catequinas en el té verde son la EGCG, la (-)-epicatequina-3-galato (ECG), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-epicatequina (EC), (+)-galocatequina (GC) y (+)-catequina (Zaveri, 2006) (Figura 8).

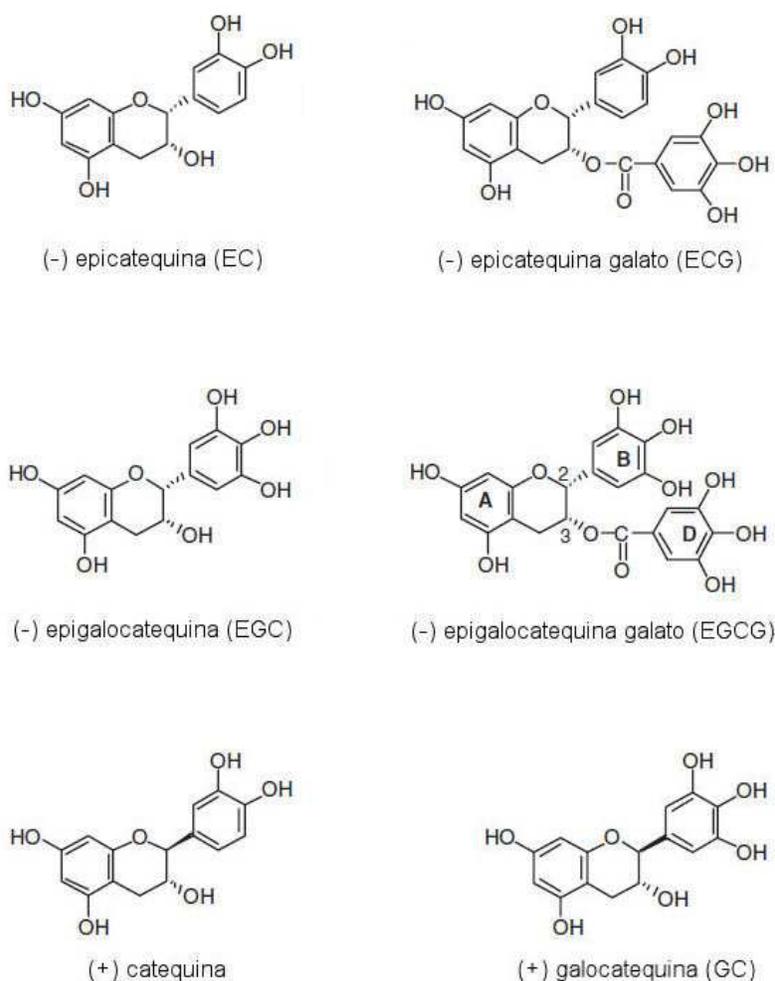


Figura 8. Principales catequinas encontradas en el té verde (Modificado de Zaveri, 2006).

1.9 La (-)-epigallocatequina-3-galato

La EGCG es el más abundante de los compuestos polifenólicos pertenecientes a las catequinas en el té verde, comprendiendo aproximadamente el 60% de éstas. Una taza de té verde puede contener de 200 a 300 mg de EGCG, mientras que el té negro contiene menos de 70 mg (Kuroda y Hara, 1999; Singh *et al.*, 2011). La EGCG también puede encontrarse en otros vegetales como las manzanas, las moras, los duraznos y las nueces, sin embargo la principal fuente es el té verde (Harnly *et al.*, 2006).

Se ha observado que la EGCG posee propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y anticarcinogénicas (Kuroda y Hara, 1999). Posiblemente, el potente efecto antioxidante de la EGCG se debe a que posee dos grupos trifenólicos en su estructura, (anillos B y D), Figura 9 (Wu *et al.*, 2012).

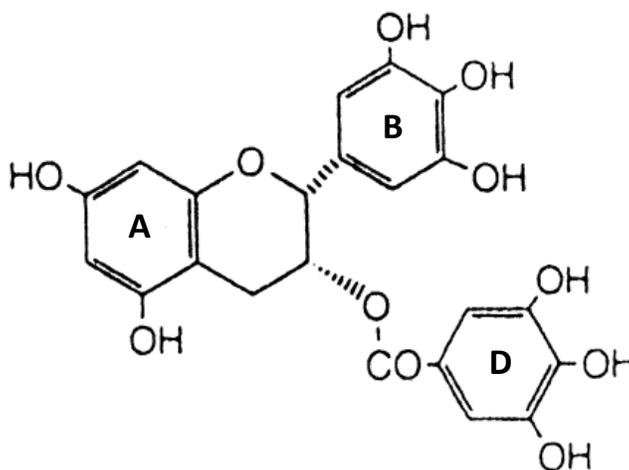


Figura 9. Estructura molecular de la EGCG (Modificado de Zaveri, 2006).

1.9.1 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los polifenoles del té verde ha sido considerada como una de sus propiedades más importantes, ya que debido a su gran capacidad de capturar RL pueden prevenir el daño generado por la interacción de estas especies con moléculas biológicas como el ADN (Yen y Chen, 1995; Zaveri, 2006; Wu *et al.*, 2012). La actividad antioxidante de las catequinas se debe principalmente a los grupos hidroxilo contenidos en sus grupos fenólicos. La EGCG

posee ocho grupos hidroxilo distribuidos en sus anillos A y B y en su grupo galato, lo cual le confiere un alto potencial antioxidante, incluso comparable con el de otras catequinas del té verde (Johnson y Loo, 2000; Zaveri, 2006; Singh *et al.*, 2011). Se ha identificado que el anillo B es el principal sitio para las reacciones antioxidantes de la EGCG (Valcic *et al.*, 1999). En general, los antioxidantes fenólicos interfieren con la oxidación de lípidos y otras moléculas, como el ADN, mediante la rápida donación de átomos de hidrógeno a los radicales estabilizándolos y por tanto, evitando su interacción con otras moléculas. Como resultado se genera una molécula oxidante que es relativamente estable, por lo que no promueve reacciones adicionales como radical (Valko *et al.*, 2006).

Muchos estudios han demostrado que la EGCG puede proteger contra el estrés oxidante en sistemas *in vitro* (Choi *et al.*, 2002; Nie *et al.*, 2002; Koh *et al.*, 2004; Sheng *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2008). En células Jurkat tratadas con 12-*o*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), la EGCG es un eficiente secuestrador de radicales $\bullet\text{OH}$ con una tasa reactiva constante comparable con varios antioxidantes bien reconocidos, tales como el ascorbato, el GSH y la cisteína. Además, también se ha observado que la EGCG es secuestradora de radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ y puede inhibir el daño al ADN inducido por Cr(VI) *in vitro* mediante la captura de radicales $\bullet\text{OH}$ (Shi *et al.*, 2000).

1.9.2 Actividad antimutagénica

La actividad antimutagénica de la EGCG ha sido probada contra la mutagenicidad de la aflatoxina B1 (AFB1), la 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f] quinolina (IQ) y la *N*-nitroso-*N*-metilurea (MNU) mediante el ensayo de MN en ratones (Šmerák *et al.*, 2006). En cultivos de células de mamífero, se ha observado que la EGCG tiene efectos inhibitorios contra las mutaciones resistentes a 6-tioguanina (6TG) inducidas por 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) en células V79 de hámster Chino. En este trabajo, la actividad antimutagénica de la catequina fue encontrado únicamente cuando las células fueron post-tratadas con la catequina durante el tiempo de expresión de la mutación después del tratamiento con 4NQO (Kuroda, 1996). En un estudio realizado por García-Rodríguez *et al.*, 2012, se evaluó la administración por vía oral del té verde sobre el daño genotóxico inducido por CrO_3 [Cr(VI)], mediante la cuantificación de MN en EPC y se observó un efecto protector del té verde contra el daño al material genético, sugiriendo que sus componentes antioxidantes son los que tienen un efecto quimiopreventivo sobre el estrés oxidante generado por el Cr(VI) durante su reducción intracelular.

1.9.3 Propiedades antiproliferativas y apoptóticas de la EGCG

Se ha descrito que la EGCG posee un efecto pro-apoptótico en células tumorales. En estudios previos se ha mostrado que la EGCG afecta un gran número de factores asociados con la progresión del ciclo celular y la inducción de muerte, entre ellos se ha propuesto la inhibición de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), la inactivación del factor NF κ B y la inducción de la expresión de p21 y p27 (Singh *et al.*, 2011). Además, Nakazato *et al.* (2005) observaron que la EGCG induce apoptosis de células B malignas a través de la producción de ERO. También Gupta *et al.* (2001) encontraron que el tratamiento de células de cáncer de próstata DU145 y LNCaP con EGCG resultó en la inducción de apoptosis de forma dosis-dependiente. Liang *et al.* (1999), reportaron que la EGCG bloqueó la progresión del ciclo celular en fase G1 de células MCF-7 de carcinoma mamario, posiblemente mediante la inhibición de las CDK 2 y 4.

1.9.4 Propiedades antitumorales

Se ha sugerido que la EGCG y otras catequinas del té verde suprimen la promoción tumoral mediante la inhibición de TNF- α , el cual parece estar involucrado en la promoción y progresión tumoral de células iniciadas, así como células premalignas (Fujiki *et al.*, 2000). Además, la EGCG ha mostrado reducir la unión específica entre los promotores tumorales como el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) a sus receptores (Fujiki *et al.*, 1999).

1.9.5 Biodisponibilidad y metabolismo

El metabolismo de los polifenoles ocurre mediante una vía común. Las formas agliconas pueden ser absorbidas en el intestino delgado. Sin embargo, la mayoría de los polifenoles se encuentran en los alimentos en la forma de esterés, glicosidos o polímeros que no pueden ser absorbidos en su forma nativa. Estas sustancias deben ser hidrolizadas por enzimas intestinales o por la microflora antes de poder ser absorbidas. Durante el curso de la absorción, los polifenoles se conjugan en el intestino delgado, y más tarde en el hígado. Este proceso incluye principalmente la metilación, sulfatación y glucuronidación. Este es un proceso metabólico de detoxificación, común para muchos xenobióticos, que restringe los potenciales efectos tóxicos y facilita su eliminación urinaria mediante el aumento de su solubilidad en agua (Manach *et al.*, 2004).

1.10 Pruebas y ensayos para evaluar genotoxicidad

En términos generales, los ensayos de prueba para la detección de daño genotóxico se agrupan dependiendo del tipo de alteración que detectan y pueden ser:

a) Mutaciones génicas; entendidas como sustituciones de pares de bases, adiciones o supresiones. Estas modificaciones pueden llegar a inactivar un gen, aunque normalmente permiten al individuo sobrevivir y reproducirse, con lo cual las mutaciones génicas se pueden establecer y heredar a las siguientes generaciones. Se detectan mediante procesos de secuenciación de muestras de ADN (Cole y Skopek, 1994).

b) Alteraciones en la integridad del ADN; son lesiones premutagénicas, como la formación de aductos, ligamientos cruzados intra e interbanda y rompimientos de una o dos hebras. Estas alteraciones pueden ser reparadas enzimáticamente, por lo que si esto ocurre no constituyen mutaciones heredables. Algunas de las pruebas que las detectan son la determinación de aductos en el ADN y la electroforesis unicelular alcalina (Hemmink *et al.*, 1994).

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

Dentro de las principales pruebas recomendadas para evaluar daño genotóxico se encuentran; a) ensayos para evaluar mutaciones (bacterias; prueba de AMES), b) ensayos *in vitro*, para evaluar daño cromosómico (frecuencia de AC); células de mamífero) y 3) ensayos *in vivo* (medula ósea o sangre periférica; frecuencia de MN) (Mavournin, 1990; Krishna y Hayashi, 2000; Müller, *et al.*, 1999). Las pruebas para evaluar genotoxicidad no sólo son indispensables para evaluar el daño que puede producir un agente al material genético, sino también, es una herramienta necesaria para determinar el mecanismo de acción.

1.11 Micronúcleos (MN)

El ensayo de MN ha sido recomendado como batería de prueba para la evaluación genotóxica en la *International Conference on Harmonization (ICH4) of Genotoxicity Guidelines*, así como otras agencias reguladoras tales como la *Environmental Protection Agency (EPA)*, la *Food and Drug Administration (FDA)* y la IARC. El propósito del ensayo es identificar sustancias que causan daño citogenético, originado por clastogénesis o aneuploidogénesis (Mavournin, 1990; Krishna y Hayashi, 2000; Müller, *et al.*, 1999).

La técnica de MN fue desarrollada por Schmid y Boller en 1970, y es utilizada como ensayo de corto plazo. Detecta daño citogenético asociado con la frecuencia de AC, evalúa el daño en cromosomas enteros o en fragmentos y también puede identificar daño citotóxico (Schmid y Von Ledebur, 1973; Krishna y Hayashi, 2000).

Los MN son pequeños cuerpos de cromatina que se originan de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que no son incorporados dentro del núcleo después de la mitosis, por lo que se identifican en el citoplasma como pequeños núcleos adicionales (Schmid y Von Ledebur, 1973).

Los MN pueden tener su origen en alguno de los siguientes eventos:

- a) Daño a nivel de las proteínas involucradas, directa o indirectamente, en la segregación de cromosomas, esto incluye la inhibición en el ensamble o desensamble de microtúbulos, remoción de cinetocoros, daños al centriolo, centrómero inactivado etc. (daño aneuploidógeno; Figura 10-A).

- b) AC que llevan a la formación de fragmentos acéntricos (daño clastógeno; Figura 10-B).

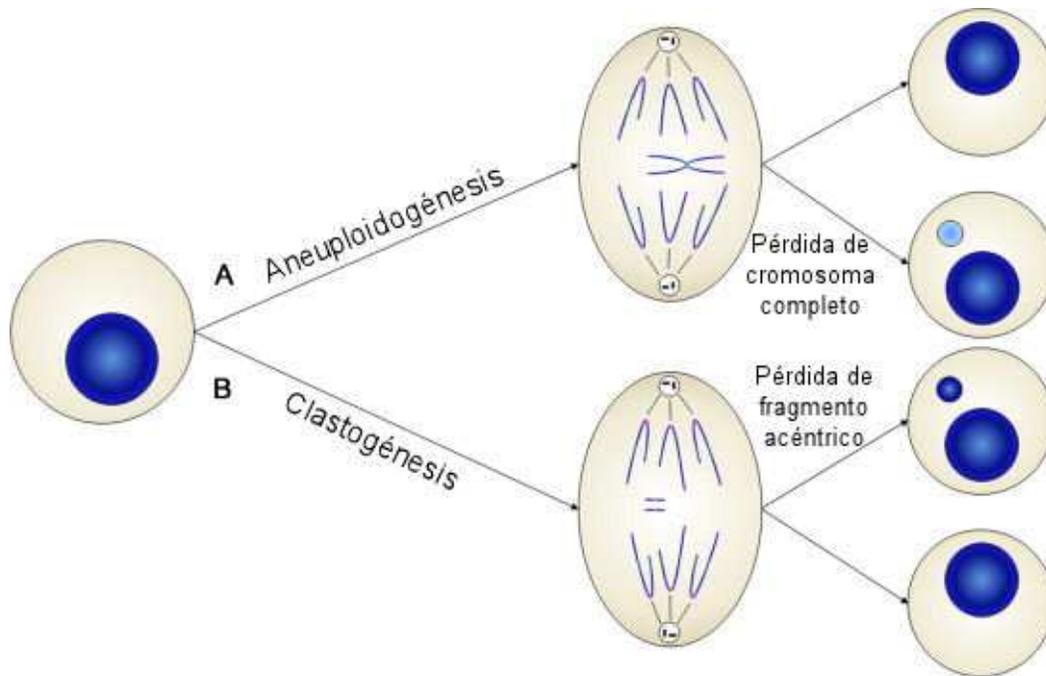


Figura 10. Mecanismos de formación de MN (Modificado de Terradas *et al.*, 2010).

Los MN pueden ser evaluados en diferentes tipos celulares, por ejemplo: los mieloblastos, mielocitos, medula ósea de ratón (eritrocitos) o en eritrocitos de sangre periférica, células binucleadas (linfocitos) inducidas mediante citocalacina B, así como también células uroteliales y exfoliadas de la mucosa bucal y nasal. De igual manera, se han realizado estudios en eritrocitos de hígado y de sangre periférica fetal (Schmid y Von Ledebur, 1973; Heddle *et al.*, 1983). Los MN pueden ser fácilmente detectados, ya que son de forma redonda con un diámetro de alrededor de 1/20 a 1/5 de un eritrocito (Mavournin, 1990). Un incremento en la frecuencia de MN en animales tratados con agentes químicos, indica que estos agentes son inductores de daño cromosómico (Krishna y Hayashi, 2000). En las células eritroides se distinguen claramente a los eritrocitos jóvenes y a los maduros. Los EPC (eritrocitos jóvenes), todavía contienen ARN, son basófilos y el núcleo principal es expulsado; si un MN se ha formado permanece en el citoplasma anucleado. Los EPC, con el tiempo, pierden el ARN y se convierten en ENC (eritrocitos maduros), más pequeños que los EPC y son acidófilos. Partiendo de esto, los eritrocitos se pueden diferenciar entre ENC y EPC utilizando diferentes colorantes como May-Gruenwald, Giemsa y NA (Schmid y Von Ledebur, 1973; Hayashi *et al.*, 1990).

La técnica de NA, desarrollada por Hayashi *et al.* (1990) permite distinguir fácilmente a los EPC, ya que al contener ARN se tiñen de un color naranja fluorescente, mientras que los ENC, no son teñidos y se observan de un color oscuro. Los MN se observan como puntos de color verde-amarillo fluorescente, debido a la presencia de ADN (Figura 11).

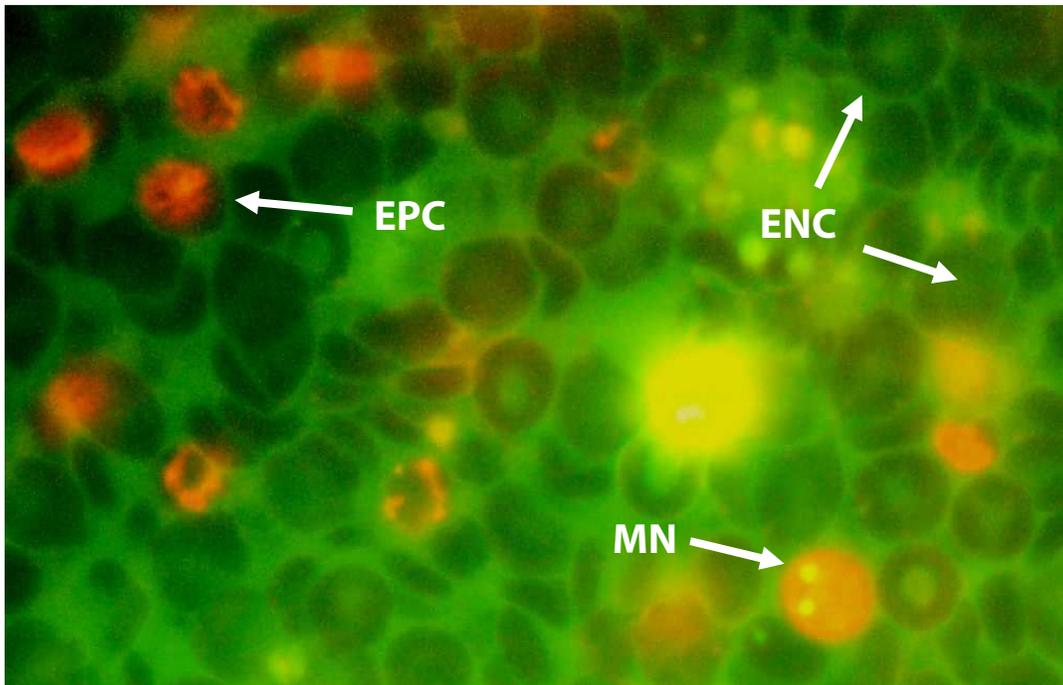


Figura 11. Eritrocitos de sangre periférica de ratón teñidos con la técnica de NA. Se observan los ENC, EPC, y un EPC con dos MN.

1.12 Evaluación de la muerte celular por apoptosis y necrosis

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

Uno de los métodos más utilizados para el análisis de la apoptosis es la tinción diferencial con fluorocromos, utilizando una mezcla de los colorantes NA y BrEt. El colorante NA tiene la

capacidad de introducirse a las células, tanto viables, como no viables mostrando una fluorescencia verde al intercalarse dentro de un ácido nucleico de doble cadena (ADN), o bien mostrando fluorescencia roja-naranja si se une a un ácido nucleico de cadena sencilla (ARN). El BrEt se introduce únicamente a las células no viables debido a la pérdida de integridad de la membrana plasmática, de tal manera que puede intercalarse en el ADN mostrando una fluorescencia roja (Baskic *et al.*, 2006).

A través de este método se pueden distinguir cuatro tipos de células de acuerdo al tipo de emisión fluorescente y al aspecto morfológico del núcleo celular, los cuales son:

1. Células vivas con núcleos normales: la cromatina se observa con una fluorescencia verde uniforme, con estructura organizada.
2. Células apoptóticas tempranas: se observa el núcleo teñido de color verde fluorescente; la cromatina se observa condensada.
3. Células apoptóticas tardías: tienen núcleo rojo o naranja, con fragmentos condensados de cromatina.
4. Células necróticas: tienen un color naranja-rojo uniforme, con estructura organizada (McGahon *et al.*, 1995; Baskic *et al.*, 2006).

2. Planteamiento del problema

Algunos compuestos de Cr(VI) son conocidos como carcinógenos, por lo que representan un riesgo para la salud. En estudios previos en ratones se ha mostrado el efecto genotóxico *in vivo* del CrO₃ al ser administrado por vía i.p., ya que se incrementan las frecuencias de MN, por lo que se ha sugerido que el daño genotóxico que induce el Cr(VI) se debe a su reducción intracelular mediante la generación de ERO y RL que pueden interaccionar directa o indirectamente con biomoléculas como el ADN. También el daño inducido por los compuestos de Cr(VI) puede desencadenar un proceso de muerte celular. En contraparte, se ha observado que sustancias con propiedades antioxidantes como los polifenoles, son capaces de prevenir o disminuir el daño genotóxico inducido por diferentes agentes mutágenos, por lo que la búsqueda de agentes con capacidad protectora o preventiva es actualmente objeto de investigación científica considerable.

El té verde es uno de los componentes de la dieta más populares en el mundo. Se ha encontrado que su alto contenido de polifenoles es lo que le confiere sus principales propiedades antioxidantes, siendo la EGCG uno de las sustancias con mayor potencial antioxidante. De ahí que la EGCG resulta una opción interesante para su estudio sobre la posible prevención del daño causado por el estrés oxidante y dado que se ha planteado que uno de los mecanismos de la inducción del daño genético producido por CrO₃ es mediante la generación de ERO y RL tras su reducción intracelular, en este estudio se planteó evaluar el efecto de la EGCG, sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃, para lo cual se evaluaron las frecuencias de MN y la apoptosis, así como la viabilidad celular y las frecuencias de EPC con relación a los ENC en sangre periférica de ratones de la cepa CD-1.

3. Hipótesis

Si el daño genotóxico producido por los compuestos de Cr(VI) se debe a la producción intracelular del estrés oxidante que se genera durante la reducción del Cr(VI) a Cr(III) y se ha observado que el CrO₃ induce daño genotóxico mediante el incremento en la frecuencia de MN en sangre periférica de ratón al ser administrado por vía i.p., aunado a que el daño genotóxico puede desencadenar muerte celular, entonces debido a que el polifenol EGCG tiene un alto potencial antioxidante y ha mostrado ser un eficiente secuestrador de RL, en el presente estudio se espera que la EGCG sea capaz de proteger del daño genotóxico inducido por CrO₃ disminuyendo la frecuencia de MN en EPC y que induzca apoptosis como mecanismo de control del daño genotóxico sin incrementar la frecuencia de células muertas con respecto al tratamiento de CrO₃.

4. Objetivos

4.1 General

Evaluar el efecto de la EGCG administrada por vía oral e i.p. sobre la inducción de MN y apoptosis, así como su efecto sobre la viabilidad celular en ratones tratados con CrO₃.

4.2 Particulares

1. Establecer la dosis no genotóxica de la EGCG, mediante el análisis de las frecuencias de MN en eritrocitos de sangre periférica de ratón.
2. Evaluar el efecto genotóxico de la administración de CrO₃, mediante el análisis de las frecuencias de MN en eritrocitos de sangre periférica de ratón.
3. Evaluar el efecto de la EGCG sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃, mediante el análisis de las frecuencias de MN en eritrocitos de sangre periférica de ratón.
4. Evaluar la apoptosis en leucocitos de sangre periférica de ratón tratados con EGCG empleando la tinción diferencial de NA/BrEt.
5. Evaluar la apoptosis en leucocitos de sangre periférica de ratón tratados con CrO₃ empleando la tinción diferencial de NA/BrEt.
6. Evaluar el efecto de ambos compuestos, EGCG y CrO₃, sobre la apoptosis en leucocitos de sangre periférica de ratón empleando la tinción diferencial de NA/BrEt.
7. Establecer la dosis no citotóxica de la EGCG, mediante el análisis de la viabilidad celular y la relación de EPC con relación a los ENC de sangre periférica de ratón.
8. Evaluar el efecto citotóxico de la administración de CrO₃, mediante el análisis de la viabilidad celular y la relación de EPC con relación a los ENC de sangre periférica de ratón.
9. Evaluar el efecto de la administración de EGCG y CrO₃ sobre la viabilidad celular y la relación de EPC con respecto a los ENC de sangre periférica de ratón.

5. Material y Método

5.1 Animales

Se emplearon ratones macho de la cepa CD-1, de 2 a 3 meses de edad y con un peso entre 30 y 40 g, provenientes del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Los ratones fueron aclimatados en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, donde se mantuvieron bajo condiciones ambientales de temperatura y circulación de aire controladas, con fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad y bajo una dieta a base de alimento comprimido (NUTRI-CUBOS, Purina^{MR}) y agua a libre acceso. Para los experimentos, los animales fueron divididos en grupos de 5 ratones cada uno.

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

5.2 Reactivos

Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Naranja de Acridina [CAS No. 10127-02-3]; Bromuro de Etidio [CAS No. 1239-45-8]; EGCG [CAS No. 989-51-5]; CrO₃ [CAS No. 1333-82-0].

5.3 Tratamientos

La EGCG y el CrO₃ fueron preparados en una solución mediante su disolución en agua destilada estéril. Una vez preparados los reactivos se administraron inmediatamente en un volumen de aproximadamente 0.25 ml por ratón de acuerdo a cada protocolo (Figuras 12-14).

Efecto de la administración de EGCG por vía i.p. sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃
(Protocolo 1)

Los grupos de experimentación fueron administrados con los siguientes tratamientos:

- a) Grupo Testigo: no fue tratado
- b) Grupo EGCG: tratado con una sola dosis de 20 mg/kg de EGCG por vía i.p.
- c) Grupo EGCG: tratado con una sola dosis de 10 mg/kg de EGCG por vía i.p.
- d) Grupo CrO₃: tratado con una sola dosis de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p.
- e) Grupo EGCG+CrO₃: tratado con una dosis de 20 mg/kg de EGCG por vía i.p. 4 horas previas a la administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p.
- f) Grupo EGCG+CrO₃: tratado con una dosis de 10 mg/kg de EGCG por vía i.p. 4 horas previas a la administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p.

Efecto de la administración de EGCG por vía i.g. sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃
(Protocolo 2)

Los grupos de experimentación fueron administrados con los siguientes tratamientos:

- a) Grupo Testigo: tratado únicamente con el vehículo por vía i.g.
- b) Grupo EGCG: tratado con una sola dosis de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g.
- c) Grupo CrO₃: tratado con una sola dosis de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p.
- d) Grupo EGCG+CrO₃: tratado con una dosis de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g. 4 horas previas a la administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p.

Efecto de la administración de EGCG por vía i.g. y de CrO₃ sobre la viabilidad celular y la inducción de apoptosis y necrosis (Protocolo 3)

Los grupos de experimentación fueron administrados con los siguientes tratamientos:

- a) Grupo Testigo: tratado únicamente con el vehículo por vía i.g.
- b) Grupo EGCG: tratado con una sola dosis de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g.
- c) Grupo CrO₃: tratado con una sola dosis de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p.
- d) Grupo EGCG + CrO₃: tratado con una sola dosis de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g. 4 horas previas a la administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p.

5.4 Establecimiento de las dosis de EGCG y CrO₃

La dosis empleada para los tratamientos con CrO₃ fue seleccionada con base en resultados obtenidos previamente, en los cuales se observó que la administración de CrO₃ por vía i.p. en una dosis de 20 mg/kg de peso corporal es inductora de daño genotóxico (García-Rodríguez *et al.*, 2001). Las dosis empleadas para los tratamientos con EGCG fueron seleccionadas con base en estudios previos, en los que se observó que la administración de EGCG por vía oral e intravenosa no induce daño genotóxico (Isbrucker *et al.*, 2006-a); por el contrario, en un estudio *in vivo*, la administración de 10 mg/kg de EGCG por tres días consecutivos por vía oral resultó antimutagénica contra tres diferentes mutágenos de referencia (AFB1, IQ2, y MNU; Šmerák *et al.*, 2006). Adicionalmente, se realizaron estudios previos en los cuales se administraron dosis de 10 y 20 mg/kg de EGCG por vía i.p y 10 mg/kg de EGCG por vía i.g., en los cuales no se observaron efectos genotóxicos.

5.5 Tiempos de evaluación

Una vez seleccionadas las dosis de EGCG y CrO₃, y establecidas las condiciones de trabajo, se administraron las dosis de acuerdo a los protocolos. La EGCG fue administrada 4 horas antes de la administración del CrO₃ ya que de acuerdo con la farmacocinética de los polifenoles del té verde, estos se encuentran distribuidos por completo aproximadamente 4 horas después de su administración (Chen, 1997). Posteriormente se evaluó el daño genotóxico mediante el análisis de la frecuencia de MN y la citotoxicidad mediante la frecuencia de EPC con respecto a la de ENC, con muestras obtenidas de sangre periférica. Además se evaluó la viabilidad celular y la inducción de apoptosis en el grupo de estudio en el cual la dosis administrada de EGCG fue capaz de modular el daño genotóxico inducido por CrO₃.

Protocolo 1

A dos grupos de 5 ratones de la cepa CD1 se les administró una dosis de 20 mg/kg de EGCG, mientras que a otros dos grupos se les administraron 10 mg/kg de EGCG por vía i.p. Cuatro horas después se administró a tres grupos de 5 ratones una dosis de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p., dos de ellos previamente administrados con EGCG (10 y 20 mg/kg). El tiempo de administración del CrO₃ se consideró como la hora 0. Un grupo más fue empleado como testigo, por lo que no se administró ningún tratamiento. Posteriormente se tomaron muestras de sangre periférica cada 24 horas desde la hora 0 hasta la hora 72 para la evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad por el método de MN (Figura 12).

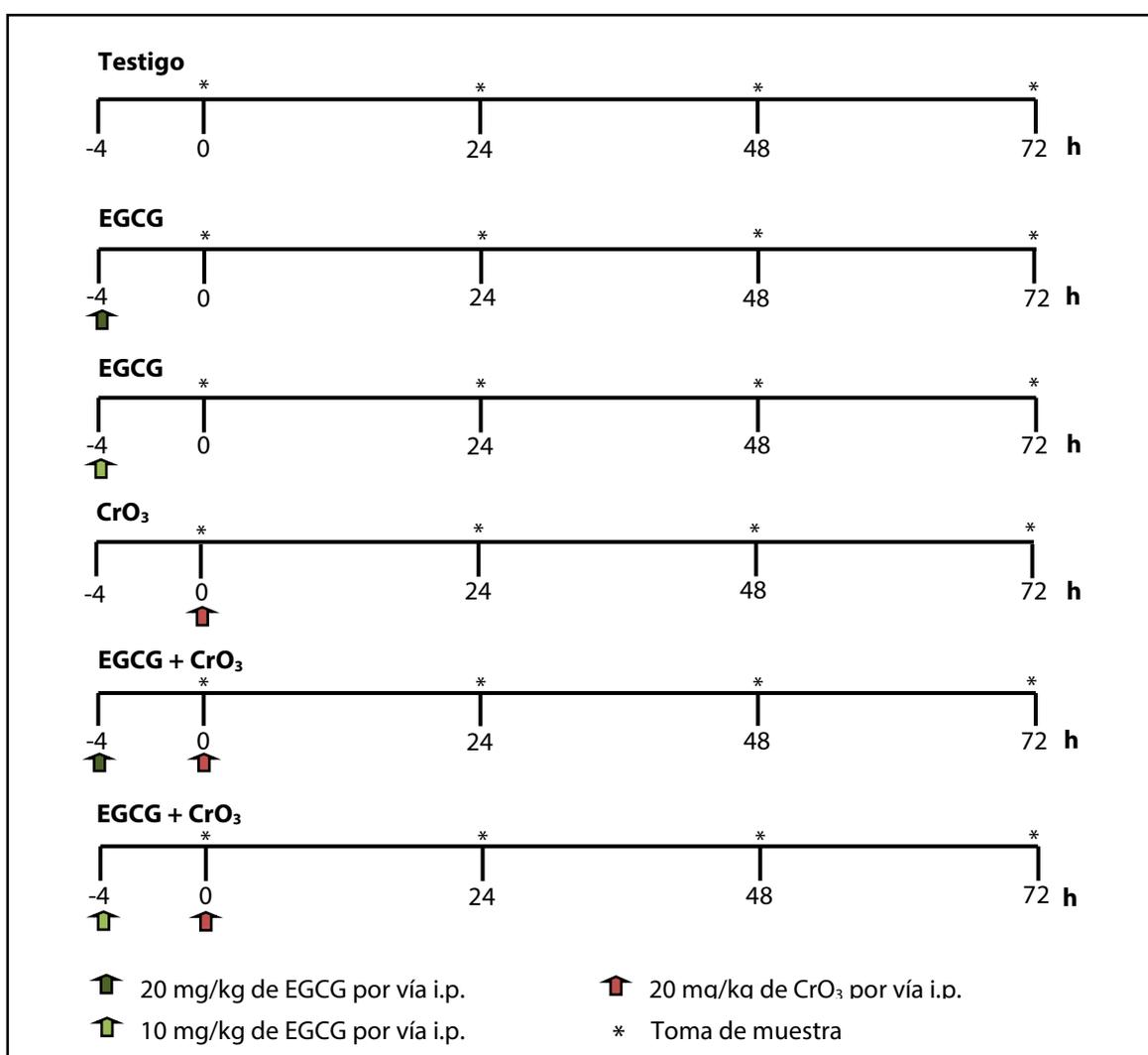


Figura 12. Protocolo para la administración del tratamiento con EGCG y CrO₃ por vía i.p. y toma de muestras.

Protocolo 2

A dos grupos de 5 ratones de la cepa CD1 se les administró una dosis de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g. Cuatro horas después se administró a dos grupos de 5 ratones una dosis de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p., uno de ellos previamente administrado con EGCG. El tiempo de administración del CrO₃ se consideró como la hora 0. Un grupo más fue empleado como testigo, por lo que no se administró ningún tratamiento. Posteriormente se tomaron muestras de sangre periférica cada 24 horas desde la hora 0 hasta la hora 72 para la evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad por el método de MN (Figura 13).

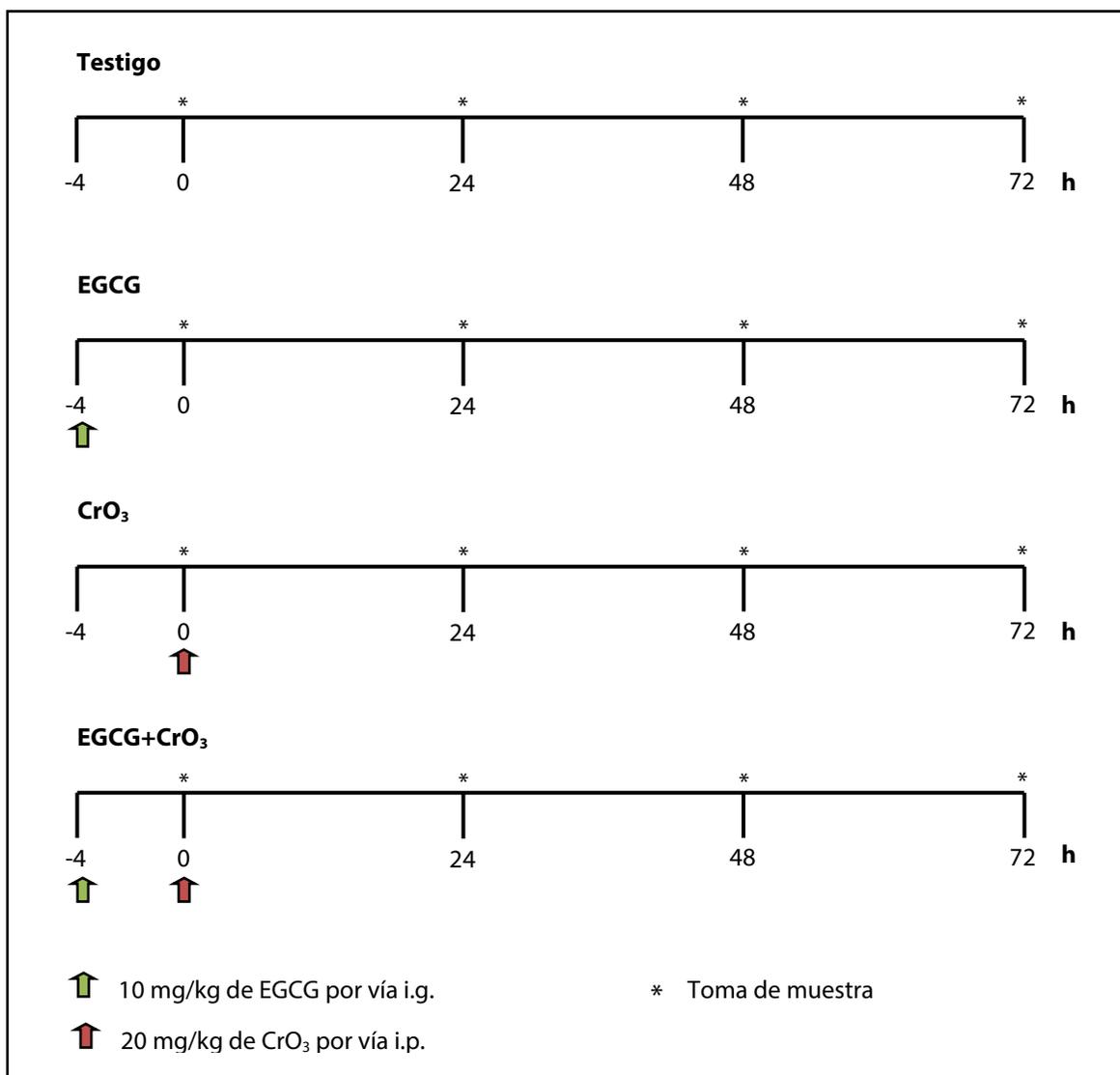


Figura 13. Protocolo para la administración del tratamiento con EGCG por vía i.g. y CrO₃ por vía i.p. y toma de muestras.

Protocolo 3

A dos grupos de 5 ratones de la cepa CD1 se les administró una dosis de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g. Cuatro horas después se administró a dos grupos de 5 ratones una dosis de 20 mg/kg de CrO_3 por vía i.p., uno de ellos previamente administrado con EGCG. El tiempo de administración del CrO_3 se consideró como la hora 0. Un grupo más fue empleado como testigo, por lo que no se administró ningún tratamiento. Posteriormente se tomaron muestras de sangre periférica a la hora 48, para la evaluación de la viabilidad celular, e inducción de apoptosis y necrosis (Figura 14).

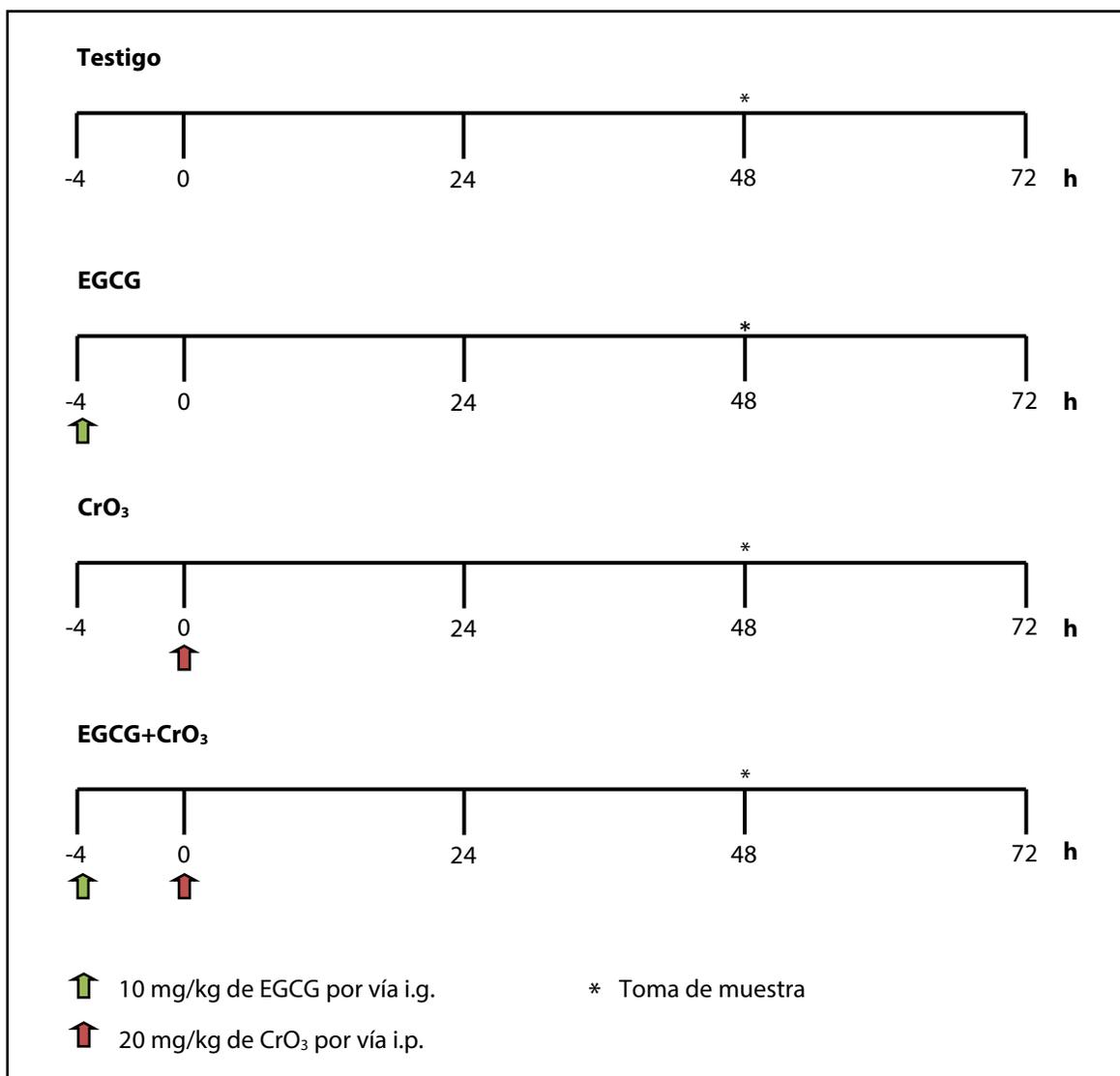


Figura 14. Protocolo para la administración de los tratamientos con EGCG por vía i.g y CrO_3 por vía i.p. y toma de muestras.

5.6 Evaluación de la inducción de MN y citotoxicidad

5.6.1 Preparación de laminillas

Las laminillas fueron preparadas previamente a la toma de muestras. Para ello se preparó una solución de NA en agua desionizada a una concentración de 1 mg/ml. Se tomaron 10 μ l de esta solución y se colocaron sobre laminillas limpias precalentadas a 70°C aproximadamente y con ayuda de otra laminilla se extendió el colorante. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron en la oscuridad hasta su uso de acuerdo con la técnica establecida por Hayashi *et al.* (1990).

5.6.2 Toma de muestras

Posteriormente a la administración de los tratamientos, se obtuvieron muestras de sangre periférica de los ratones a los tiempos de evaluación establecidos. Las muestras fueron obtenidas realizando un corte a la punta de la cola de los ratones con ayuda de tijeras de punta fina. Se colocaron alrededor de 10 μ l de sangre directamente sobre las laminillas preparadas previamente con NA. Inmediatamente después se colocaron cubreobjetos sobre las muestras y se sellaron con silicón líquido. En cada toma de muestra se prepararon 2 laminillas por ratón (Figura 15). Las preparaciones se depositaron en cajas de plástico y fueron mantenidas en la oscuridad a una temperatura aproximada de 4°C hasta su evaluación. El análisis de las muestras se llevó a cabo después de al menos 24 horas de su preparación, procurando no exceder de 8 días.

5.6.3 Evaluación de muestras

Las evaluaciones se realizaron mediante la observación de las muestras bajo un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión de luz amarilla (Olympus Fluoled). La evaluación del daño genotóxico se evaluó mediante el análisis de 2000 EPC por ratón, entre los cuales se cuantificaron los EPC con MN. Para la evaluación del daño citotóxico, se

analizaron una cantidad de 1000 eritrocitos totales por ratón, entre los cuales se cuantificaron los EPC, con el fin de determinar la relación EPC/ENC.

5.7 Evaluación de viabilidad, apoptosis y necrosis

5.7.1 Preparación de colorantes

La mezcla de colorantes fue preparada un día antes de la toma de muestras. Se preparó una solución con 10 µg/ml de NA + 10 µg/ml de BrEt utilizando solución amortiguadora de fosfatos (PBS) como diluyente, de acuerdo a la técnica descrita por McGahon *et al.*, (1995), con modificaciones. La mezcla se almacenó en un frasco ambar en la oscuridad hasta su uso al día siguiente.

5.7.2 Toma de muestras

Después de la administración de los tratamientos establecidos en el protocolo 4, se obtuvieron muestras de sangre periférica de los ratones únicamente a la hora 48, debido a que es la hora de mayor inducción de daño genotóxico por el CrO₃. Las muestras fueron obtenidas realizando un corte a la punta de la cola de los ratones con ayuda de tijeras de punta fina. La sangre fue extraída directamente con ayuda de una jeringa heparinizada, en un volumen de aproximadamente 100 µl. Las muestras fueron colocadas en tubos para microcentrífuga y se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm. Se retiró el sobrenadante e inmediatamente después se agregó la mezcla de colorantes en una proporción de 5 µl de colorante por cada 25 µl de muestra, y se resuspendió. Posteriormente se colocaron 10 µl de la muestra teñida sobre laminillas limpias y se cubrieron con cubreobjetos. Las preparaciones fueron evaluadas inmediatamente después de su elaboración (Figura 15).

5.7.3 Evaluación de muestras

Las evaluaciones se realizaron mediante la observación de las muestras bajo un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión de luz amarilla (Olympus Fluoled). Se evaluaron 300 leucocitos por ratón; para la evaluación de la viabilidad se contabilizaron las células vivas y muertas, mientras que para el análisis de apoptosis y necrosis se cuantificaron las células apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas. Posteriormente se calcularon los valores porcentuales de viabilidad, apoptosis y necrosis de cada grupo estudiado.

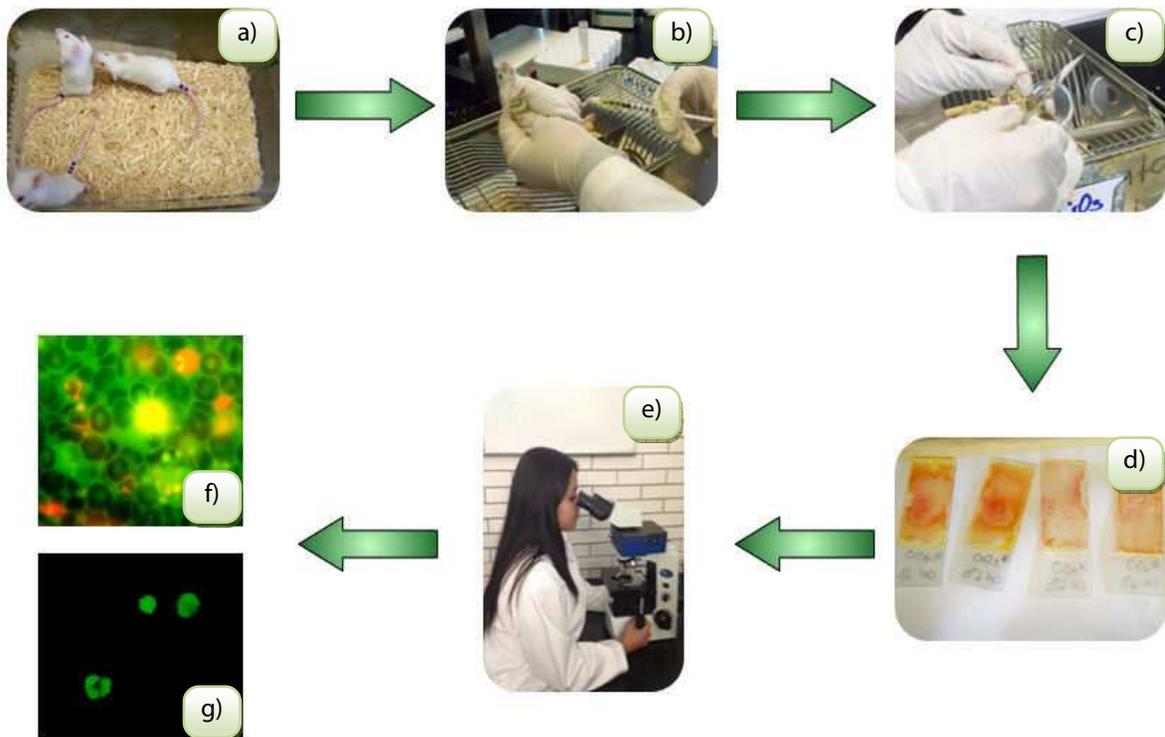


Figura 15. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico: a) grupos de 5 ratones; b) administración de tratamientos; c) obtención de muestras; d) preparación de laminillas; e) observación bajo el microscopio de fluorescencia; f) evaluación del daño genotóxico y citotóxico mediante el método de MN; g) evaluación de la viabilidad, apoptosis y necrosis mediante tinción diferencial con NA/BrEt.

5.8 Análisis estadístico

A los datos obtenidos en los experimentos de MN se les aplicó un análisis de varianzas (ANOVA) seguido de una prueba Tukey para determinar la significancia entre las medias de cada grupo, mediante el paquete estadístico SPSS. Para la inducción de MN se calculó la Frecuencia Neta de Inducción de MN (NIF por sus siglas en inglés) para descartar la inducción espontánea basal de los grupos (hora 0). Además se calculó la Frecuencia Diferencial de Inducción de MN (DIF por sus siglas en inglés) lo que permitió descartar la posibilidad de que el efecto observado fuera producto de la manipulación de los animales durante los experimentos (García-Rodríguez *et al.*, 2001). Los datos obtenidos de los análisis del NIF y DIF y los resultados del ensayo de apoptosis y necrosis se analizaron mediante una prueba chi-cuadrada utilizando el paquete Statistica V6 (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001). Para todos los casos, se tomaron los datos con una $p < 0.05$ como significativos estadísticamente (Adler *et al.*, 1998).

6. Resultados

6.1 Efecto de la EGCG sobre la inducción de MN por CrO₃

En la Tabla 3 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluadas de las 0 a las 72 horas cuando se administraron los tratamientos de EGCG (20 y 10 mg/kg por vía i.p.), el de CrO₃ (20 mg/kg por vía i.p.) y la combinación de los tratamientos de EGCG y de CrO₃. Los resultados muestran que las dosis de EGCG no incrementaron los promedios de MN en los tiempos evaluados, sino por el contrario, redujeron el promedio de MN a las 72 horas después del tratamiento (alrededor del 50%). La administración de 20 mg/kg de CrO₃ incrementó de forma significativa el promedio de MN a las 48 horas (alrededor de 6 MN). Cuando se combinaron los tratamientos de EGCG y CrO₃ se observó un efecto dual en el grupo tratado con 20-20 mg/kg EGCG-CrO₃ ya que a las 24 horas se incrementó el promedio de MN y a las 48 horas se observa una disminución (alrededor de 2 MN) en comparación con el grupo tratado sólo con CrO₃. En este grupo se registró la muerte de 2 animales a la hora 72. Mientras que, en el grupo tratado con 10-20 mg/kg EGCG-CrO₃ se incrementaron los promedios de MN en comparación con el grupo tratado solo con el CrO₃.

Debido a que las frecuencias basales de MN de todos los grupos fueron variables (de 0.4 a 2 MN) se calculó la Frecuencia Neta de la Inducción de MN (NIF). Este cálculo parte de la premisa de que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que al restarle el número de MN evaluados en la hora 0 a las siguientes horas, se asume que se obtiene la inducción "neta" de MN (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

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

Donde:

a = grupo

X_i = tiempo de evaluación

X₀ = tiempo 0

Tabla 3. Promedios de las frecuencias de MN en ratones tratados con EGCG, CrO₃ y la combinación de los tratamientos.

Grupo	Dosis (mg/kg)	N	Hora	MN /2000 EPC $\bar{x} \pm d. e.$
Testigo	0	5	0	1.2 ± 1.3
		5	24	0.8 ± 0.8
		5	48	0.0 ± 0.0
		5	72	1.4 ± 0.9
EGCG_{ip}	20	5	0	1.6 ± 0.5
		5	24	1.6 ± 1.1
		5	48	2.2 ± 1.1
		5	72	0.8 ± 1.3
EGCG_{ip}	10	5	0	1.2 ± 1.1
		5	24	1.0 ± 1.0
		5	48	1.0 ± 1.2
		5	72	0.6 ± 0.9
CrO₃	20	5	0	2.0 ± 1.0
		5	24	3.2 ± 1.8
		5	48	8.0 ± 6.0 ^{a,b,c,d}
		5	72	3.2 ± 3.1
EGCG_{ip} + CrO₃	20 + 20	5	0	1.2 ± 0.4
		5	24	5.2 ± 2.9
		5	48	5.8 ± 1.5 ^a
		3	72 [†]	2.0 ± 0.0
EGCG_{ip} + CrO₃	10 + 20	5	0	0.4 ± 0.5
		5	24	2.2 ± 1.3
		5	48	9.2 ± 7.2 ^{a,d,e}
		5	72	2.6 ± 3.1

Significancia estadística con p<0.05; ^a: vs Testigo; ^b: vs CrO₃ hora 0; ^c: vs EGCG 20 mg/kg; ^d: vs EGCG 10 mg/kg; ^e: vs EGCG-CrO₃ (10-20 mg/kg) h0.

†: muerte de 2 animales.

En la Figura 16 se muestra el análisis por tiempo y por grupo del NIF calculado para 10 000 EPC cuando se administraron las diferentes dosis de EGCG, CrO₃ y la combinación de los tratamientos de EGCG y CrO₃. Tras el análisis se corroboró el aumento de las frecuencias de MN a la hora 48 en el grupo tratado con CrO₃. Por otro lado, en el grupo tratado únicamente con 20 mg/kg de EGCG, se observa un aumento en la frecuencia de MN a la hora 48 que resulta significativo respecto al grupo testigo. En el grupo tratado con EGCG y CrO₃ (20-20 mg/kg) se observa un aumento de alrededor de 14 MN (233%) a la hora 24 respecto al grupo tratado solo con CrO₃. Mientras que a las horas 48 y 72 la frecuencia de MN disminuye alrededor de 23% y 33% respectivamente, aunque las frecuencias de MN todavía resultan significativas al compararse con el grupo testigo. En el grupo tratado con EGCG y CrO₃ (10-20 mg/kg) se observa un aumento de la frecuencia de MN a las 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos con respecto al grupo tratado únicamente con CrO₃ (50%, 47% y 83% respectivamente).

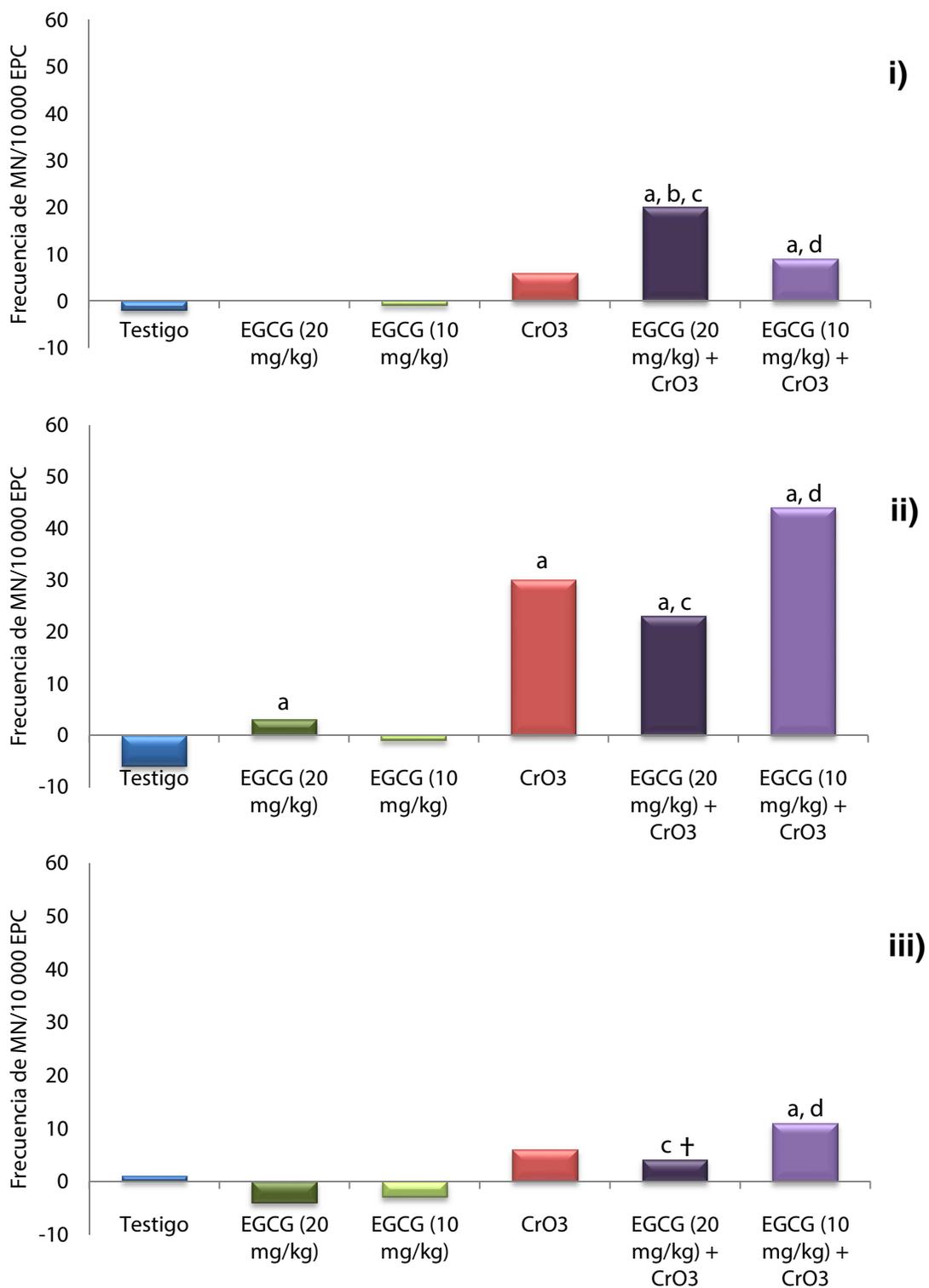


Figura 16. Análisis del NIF de MN calculado por grupo para 10 000 EPC, en los diferentes tiempos evaluados: i) hora 24, ii) hora 48 y iii) hora 72. Estadísticamente significativo con $p < 0.05$: ^a: vs Testigo; ^b: vs CrO₃; ^c: vs EGCG (20 mg/kg); ^d: vs EGCG (10 mg/kg); ^t: muerte de 2 animales.

Con el fin de descartar los MN inducidos por el manejo de los ratones durante el experimento, se calculó la Frecuencia Diferencial de Inducción de MN (DIF). El análisis consistió en restar los valores de MN obtenidos en todas las horas del grupo testigo a sus correspondientes horas de los grupos tratados con EGCG, CrO₃ y EGCG-CrO₃, de tal manera que se observaran los MN inducidos únicamente por los tratamientos.

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

Donde:

a = grupo

X_i = tiempo de evaluación

t = grupo testigo

En la Figura 17 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN al realizar el análisis del DIF. Se observa que los grupos tratados con 20 mg/kg y 10 mg/kg de EGCG presentan un comportamiento similar, sin variaciones significativas en las frecuencias de MN con respecto a sus frecuencias basales. En el grupo CrO₃ se observan incrementos de las frecuencias basales de MN en las horas 24, 48 y 72. En el grupo tratado con 20 mg/kg de EGCG y 20 mg/kg de CrO₃, se observa a la hora 24 un primer pico de inducción de MN, y posteriormente a la hora 48 se observa un segundo pico, mayor que el primero, sin embargo, a la hora 72 hay una disminución significativa de la frecuencia de MN. En el grupo tratado con 10 mg/kg de EGCG + 20 mg/kg de CrO₃ se observa un aumento significativo en la frecuencia basal de MN a las horas 24, 48 y 72. El comportamiento de la frecuencia de MN en este grupo es similar al que presenta el grupo CrO₃, sin embargo a la hora 48 se observa un incremento mayor en la frecuencia de MN.

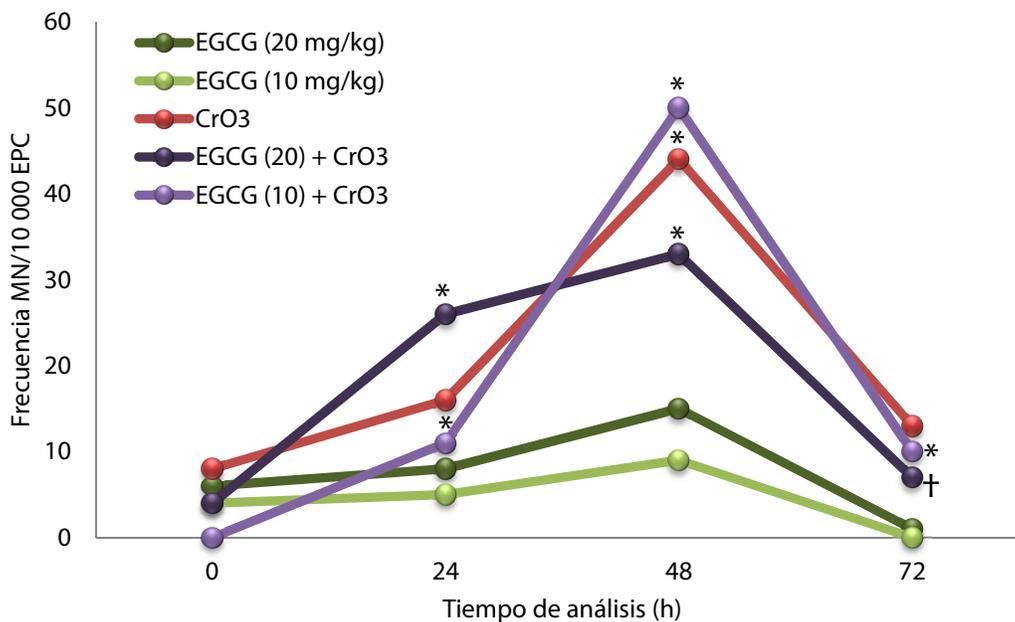


Figura 17. DIF absoluto de MN calculado por tiempo y grupo para 10 000 EPC. *: $p < 0.05$ vs hora 0 de cada tratamiento; †: muerte de 2 animales.

Debido a que los tratamientos con EGCG si bien no indujeron un aumento en el número de MN al administrarse solos, pero sí presentaron efectos al combinarse con el tratamiento de CrO_3 , se cambió la vía de administración de la EGCG a oral (vía sonda i.g.). Para ello se seleccionó la dosis de 10 mg/kg de EGCG.

En la Tabla 4 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluadas de las 0 a las 72 horas cuando se administraron los tratamientos de EGCG (10 mg/kg por vía i.g.), el de CrO_3 (20 mg/kg por vía i.p.) y la combinación de ambos tratamientos. Los resultados corroboran el incremento en el promedio de MN en el grupo tratado con CrO_3 . Cuando se combinaron los tratamientos de EGCG- CrO_3 , se disminuyeron los promedios de MN en todas las horas evaluadas, al compararse con el grupo tratado con CrO_3 .

Tabla 4. Promedios de las frecuencias de MN en ratones tratados con EGCG por vía i.g., CrO₃ y la combinación de los tratamientos.

Grupo	Dosis (mg/kg)	N	Hora	MN /2000 EPC $\bar{x} \pm d. e.$
Testigo	0	5	0	0.4 ± 0.5
		5	24	0.4 ± 0.5
		5	48	1.6 ± 1.3
		5	72	0.8 ± 1.7
EGCG_{ig}	10	5	0	0.0 ± 0.0
		5	24	0.6 ± 0.9
		5	48	0.6 ± 0.9
		5	72	0.8 ± 1.1
CrO₃	20	5	0	1.2 ± 1.3
		5	24	3.0 ± 1.5
		5	48	10.2 ± 5.6 ^{a,b,c,d}
		5	72	3.2 ± 2.8
EGCG_{ig} + CrO₃	10 + 20	5	0	1.0 ± 1.0
		5	24	2.2 ± 2.3
		5	48	3.6 ± 1.5
		5	72	0.4 ± 0.5

Significancia estadística con $p < 0.05$; ^a: vs Testigo; ^b: vs CrO₃ hora 0; ^c: vs EGCG; ^d: vs EGCG + CrO₃.

Al realizar el análisis del NIF (Figura 18) se observa una disminución en las frecuencias de MN en el grupo tratado con EGCG-CrO₃ a las 24, 48 y 72 horas después de la administración de los tratamientos (33%, 71% y 130% respectivamente), al compararse con el grupo tratado solo con CrO₃.

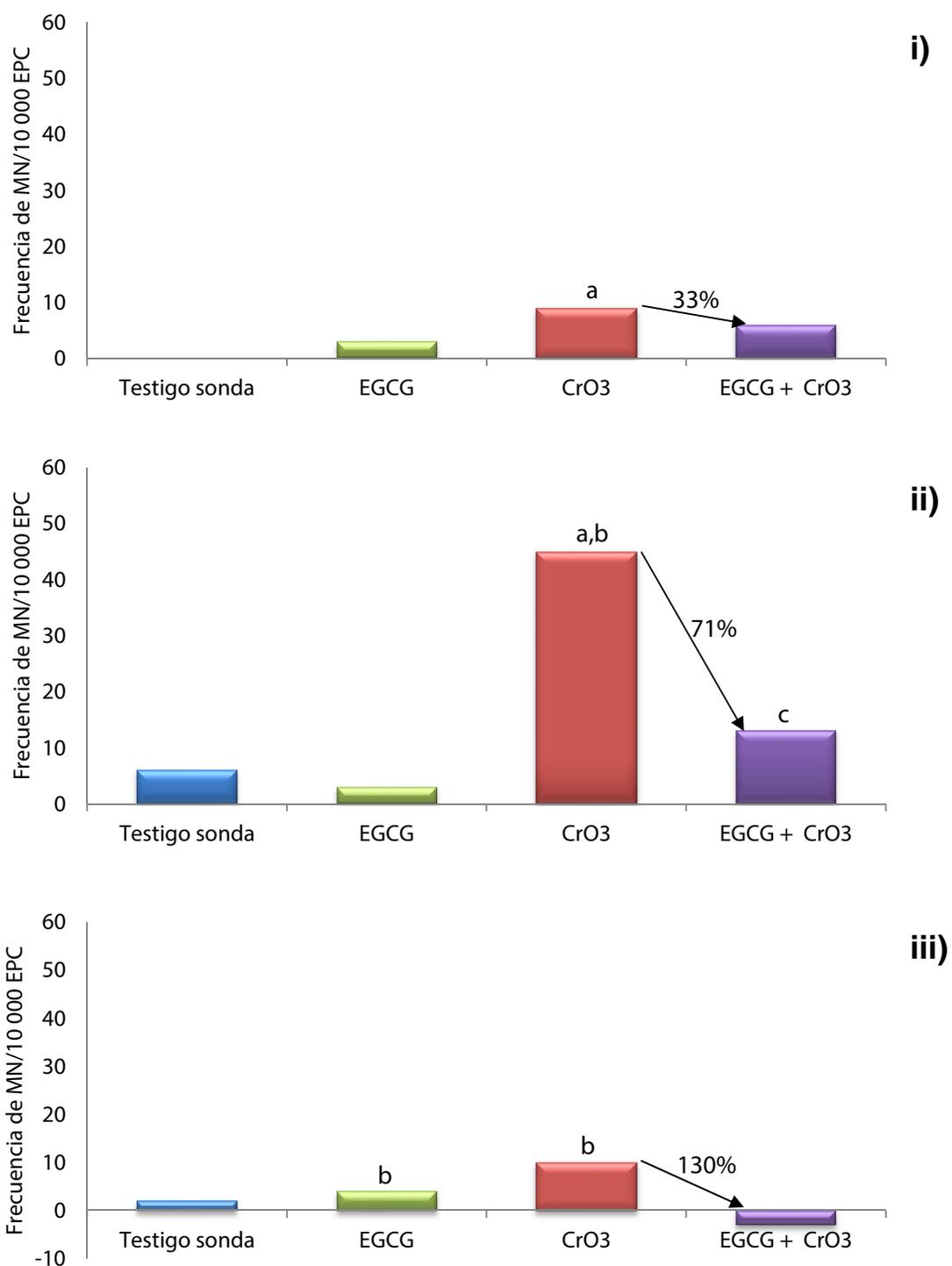


Figura 18. Análisis del NIF de MN calculado por grupo para 10 000 EPC en los diferentes tiempos de evaluación: i) hora 24, ii) hora 48 y iii) hora 72. Estadísticamente significativo con $p < 0.05$: ^a vs Testigo; ^b: vs EGCG + CrO₃; ^c: vs EGCG.

En la Figura 19 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN al realizar el análisis del DIF. Se observa que el grupo combinado no muestra incrementos significativos en las frecuencias de MN, por el contrario, la frecuencia de MN observada a la hora 72 es menor que su frecuencia basal. El análisis corrobora que la administración de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g. disminuye la frecuencia de MN inducidos por el CrO₃.

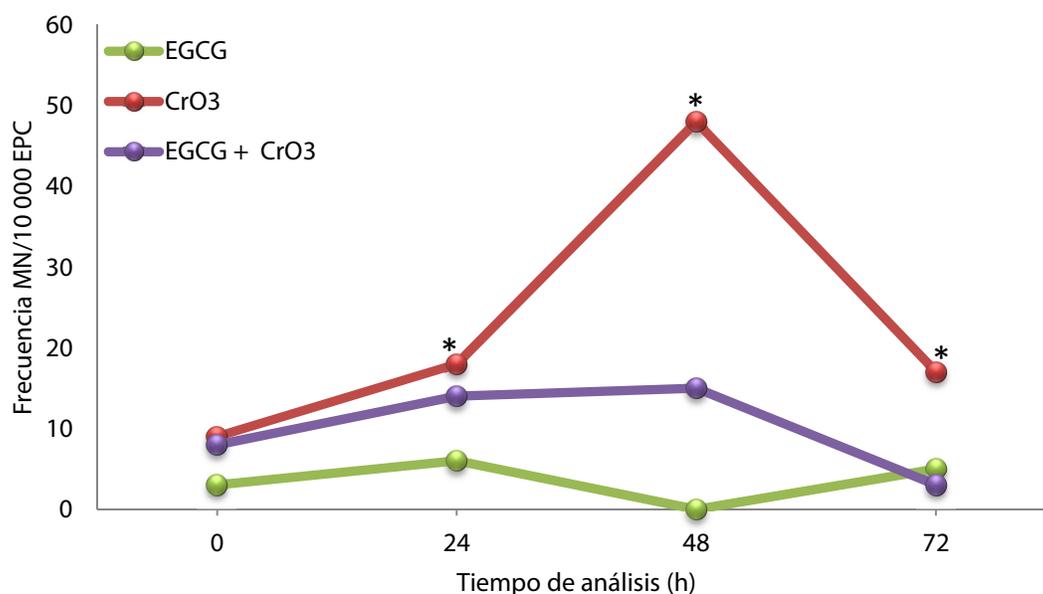


Figura 19. DIF absoluto de MN calculado por tiempo y grupo para 10 000 EPC. *: $p < 0.05$ vs hora 0 de cada tratamiento.

6.2 Efecto de la EGCG y el CrO₃ sobre la relación entre EPC y ENC

En las Tablas 5 y 6 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC (1000 células totales) cuando se administraron los tratamientos de EGCG, CrO₃ y EGCG-CrO₃. Debido a que los resultados muestran una alta variabilidad en la relación de EPC con respecto a los ENC en todos los grupos, se realizó el análisis de la viabilidad celular en leucocitos mediante el método descrito por McGahon *et al.* (1995), el cual proporciona datos más precisos sobre la citotoxicidad de los tratamientos.

Tabla 5. Promedio de las frecuencias de EPC con respecto a ENC en ratones tratados con EGCG, CrO₃ y la combinación de los tratamientos.

Grupo	Dosis (mg/kg)	N	Hora	EPC /1000 células $\bar{x} \pm d.e.$
Testigo	0	5	0	76.4 ± 16.7
		5	24	126.4 ± 101.4
		5	48	88.8 ± 94.0
		5	72	51.8 ± 30.7
EGCG_{ip}	20	5	0	66.0 ± 27.2
		5	24	81.2 ± 25.4
		5	48	91.6 ± 33.3
		5	72	99.8 ± 17.2
EGCG_{ip}	10	5	0	68.8 ± 25.4
		5	24	112.4 ± 71.3
		5	48	130.2 ± 51.8
		5	72	198.0 ± 89.5
CrO₃	20	5	0	73.6 ± 18.0
		5	24	71.8 ± 26.7
		5	48	116.8 ± 51.9
		5	72	92.6 ± 44.9
EGCG_{ip} + CrO₃	20 + 20	5	0	84.2 ± 12.8
		5	24	70.0 ± 32.3
		5	48	75.4 ± 17.1
		3 [†]	72	68.7 ± 10.5
EGCG_{ip} + CrO₃	10 + 10	5	0	91.0 ± 54.6
		5	24	56.2 ± 10.0
		5	48	131.2 ± 87.6
		5	72	76.2 ± 45.3

Tabla 6. Promedio de las frecuencias de EPC con respecto a ENC en ratones tratados con EGCG por vía i.g., CrO₃ y la combinación de los tratamientos.

Grupo	Dosis (mg/kg)	N	Hora	EPC /1000 células $\bar{x} \pm d.e.$
Testigo	0	5	0	77.6 ± 12.6
		5	24	46.4 ± 13.1
		5	48	70.6 ± 28.6
		5	72	104.8 ± 27.6
EGCG_{ig}	10	5	0	72.8 ± 24.1
		5	24	59.6 ± 12.6
		5	48	81.2 ± 28.9
		5	72	95.0 ± 17.7
CrO₃	20	5	0	72.8 ± 11.6
		5	24	71.8 ± 26.8
		5	48	79.0 ± 23.5
		5	72	83.6 ± 43.0
EGCG_{ig} + CrO₃	10 + 20	5	0	68.2 ± 18.9
		5	24	79.4 ± 17.2
		5	48	76.4 ± 23.0
		5	72	89.2 ± 31.9

6.3 Efecto de la EGCG y el CrO₃ sobre la viabilidad celular

En la Figura 20 se muestran los porcentajes de células vivas y células muertas en los grupos tratados con EGCG (10 mg/kg por vía i.g.), con CrO₃ (20 mg/kg por vía i.p.) y la combinación de los tratamientos de EGCG-CrO₃. Se observa que el tratamiento con EGCG no modificó significativamente la viabilidad celular, mientras que el tratamiento con CrO₃ redujo la viabilidad en un 16%. Cuando se combinaron los tratamientos de EGCG-CrO₃, se observó un mayor porcentaje de células vivas en comparación con el grupo tratado solo con el CrO₃ pero aún se observa muerte celular en comparación con el grupo testigo (Figura 20 a y b).

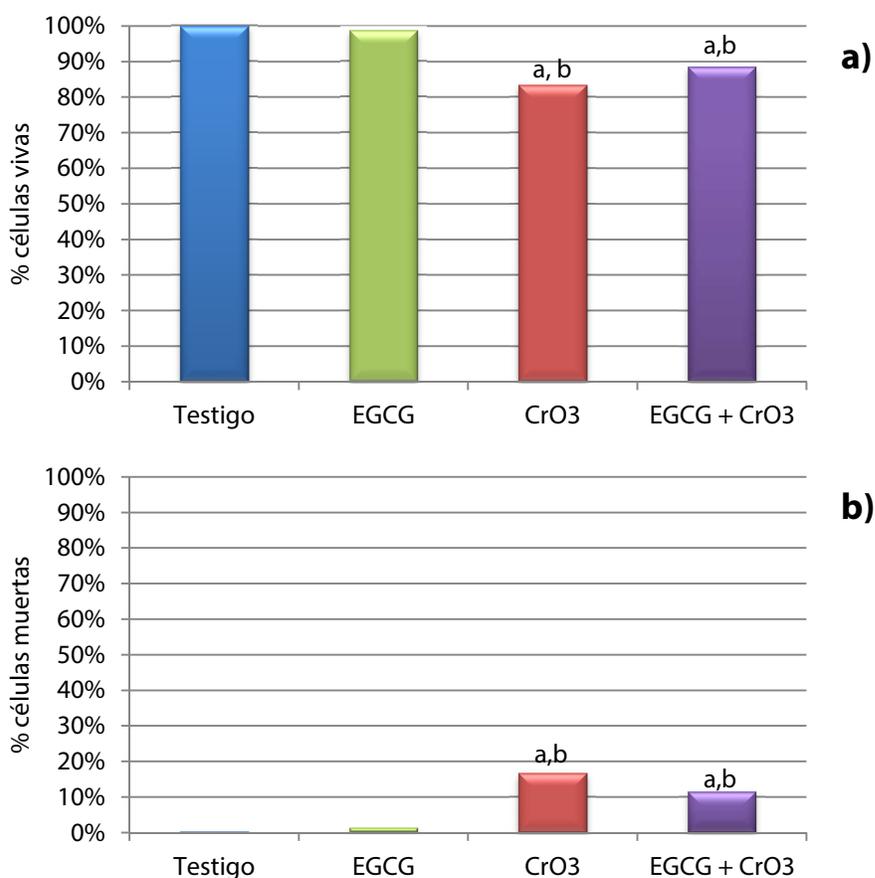


Figura 20. Porcentaje de células vivas y muertas en los grupos tratados con EGCG, CrO₃ y la combinación de los tratamientos. Estadísticamente significativo con $p < 0.05$; a: vs Testigo; b: EGCG.

6.4 Efecto de la EGCG y el CrO₃ sobre la apoptosis y necrosis

El análisis morfológico nuclear de leucocitos de sangre periférica fue llevado a cabo a las 48 horas después de la administración de los tratamientos, que fue la de mayor inducción de MN del CrO₃ (Tabla 3, Figura 16). La administración de EGCG fue en todos los casos por vía i.g. Se evaluó y calculó el porcentaje de las células apoptóticas tempranas (con membrana intacta; Figura 21-b) y apoptóticas tardías (con membrana alterada; Figura 21-c) observadas en cada grupo tratado para realizar una comparación cuantitativa (Tabla 7). Los resultados muestran que el grupo tratado únicamente con EGCG presentó un incremento en las células apoptóticas tempranas, el cual resultó mayor que el observado en el grupo CrO₃, mientras que el porcentaje de células apoptóticas tardías fue mayor en el grupo tratado con CrO₃. Sin embargo, en el grupo tratado con EGCG y CrO₃ (10-20 mg/kg) se observó una mayor proporción de células apoptóticas, tanto tempranas como tardías, respecto a los grupos EGCG y CrO₃.

Tabla 7. Porcentaje de células apoptóticas tempranas y tardías en los grupos tratados con EGCG, CrO₃ y la combinación de los tratamientos.

Grupo	Dosis (mg/kg)	N	% Células apoptóticas tempranas*	% Células apoptóticas tardías*
Testigo	0	5	0.33	0.06
EGCG	10	5	9.60 ^a	0.02
CrO ₃	20	5	7.86 ^a	0.20
EGCG + CrO ₃	10 + 20	5	26.73 ^{a,b,c}	7.86 ^{a,b,c}

Estadísticamente significativo con $p < 0.05$; ^a: vs Testigo; ^b: vs CrO₃; ^c: vs EGCG.

* 300 células evaluadas

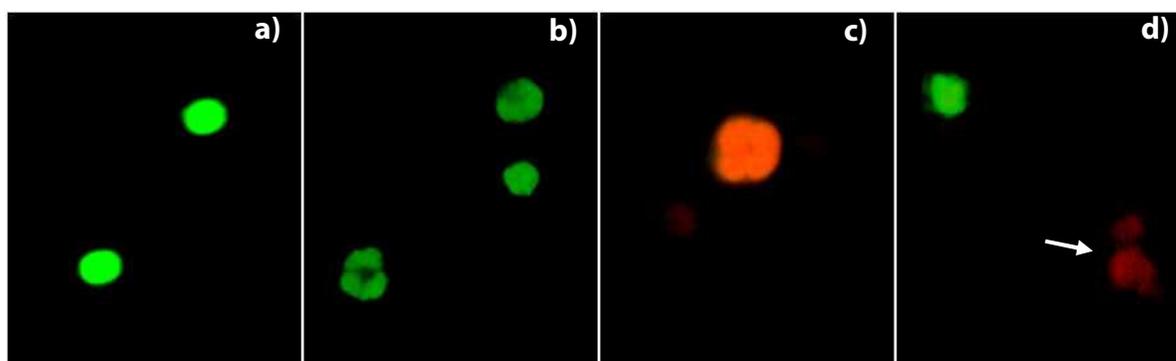


Figura 21. Análisis de apoptosis y necrosis en linfocitos de sangre periférica: a) células vivas sin daño; b) células apoptóticas tempranas; c) célula apoptótica tardía; d) célula necrótica (flecha).

En la Figura 22 se muestra el cálculo de los porcentajes de apoptosis (temprana y tardía) y necrosis (Figura 21-d; flecha roja) en cada grupo evaluado. El grupo tratado sólo con EGCG mostró un aumento en el porcentaje de apoptosis, el cual resultó mayor que el porcentaje observado en el grupo CrO_3 . Por otra parte el grupo CrO_3 presentó un porcentaje de necrosis mayor que el grupo tratado sólo con EGCG. Sin embargo, en el grupo combinado se observó el mayor incremento de muerte celular al compararse con los grupos EGCG y CrO_3 . En todos los grupos, las células apoptóticas se presentaron en mayor proporción que las células necróticas.

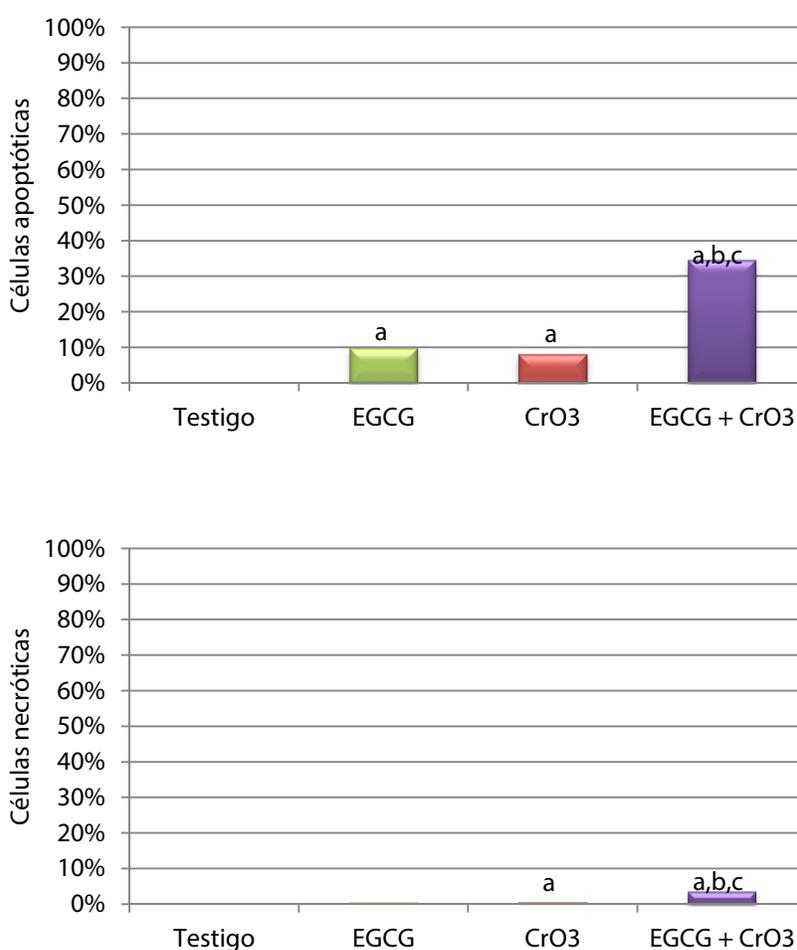


Figura 22. Porcentaje de células apoptóticas y necróticas en los grupos tratados EGCG, CrO_3 y la combinación de los tratamientos. Estadísticamente significativo con $p < 0.05$; ^a: vs Testigo; ^b: vs CrO_3 ; ^c: vs EGCG.

7. Discusión

En la actualidad nos encontramos expuestos a diversos agentes xenobióticos, cuyos efectos para la salud son perjudiciales. Existe evidencia de que las alteraciones en el material genético pueden jugar un papel importante en la patogénesis de algunas enfermedades crónico-degenerativas como la aterosclerosis y enfermedades del corazón, e incluso están involucradas en el proceso de carcinogénesis (De Flora *et al.*, 1996; Teaf y Middendorf, 2000). En contra parte, datos epidemiológicos han mostrado una relación inversa entre el consumo de vegetales en la dieta y la incidencia de estas enfermedades. Recientemente al té verde se le ha atribuido un efecto preventivo contra diversas enfermedades crónico-degenerativas. Se han propuesto diversos mecanismos para la actividad preventiva del té verde en modelos de enfermedades relacionadas con daño al ADN, sin embargo las propiedades antioxidantes de sus polifenoles se han citado como algunas de las más importantes para su actividad antimutagénica (Frei y Higdon, 2003). Evidencia reciente indica que la EGCG es uno de los polifenoles más abundantes y con mayor actividad antioxidante del té verde (Nagle *et al.*, 2006; Zaveri, 2006; Yang *et al.*, 2009). Por ello, en este estudio se evaluó el efecto de la administración de EGCG, sobre daño genotóxico inducido por compuestos carcinogénicos (CrO_3), mediante la evaluación de la inducción de MN y de muerte celular en un modelo *in vivo*.

Los resultados del estudio muestran que la administración de 20 y 10 mg/kg de EGCG por vía i.p. y de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g. no produjeron efectos tóxicos aparentes. En estudios anteriores se ha realizado la evaluación de la toxicidad de la EGCG, en los cuales se ha observado que aunque la administración oral aguda de 2000 mg/kg de EGCG a ratas produce toxicidad y en algunos casos la muerte de los animales, la administración de 200 mg/kg de EGCG por la misma vía no induce signos clínicos de toxicidad (Isbrucker *et al.*, 2006-b). En el presente estudio se administraron dosis de 20 y 10 mg/kg de EGCG por vía i.p. e i.g., las cuales representan el 10% y 5% respectivamente, de la dosis no tóxica reportada por Isbrucker *et al.* (2006-b). Asimismo, las dosis administradas corresponden aproximadamente al 1% y 0.5% de la LD50 reportada para la administración oral de EGCG en ratones (2170 mg/kg; NLM, 1999). En otro estudio, Gokulakrisnan *et al.* (2010) evaluaron el efecto de la administración oral de EGCG, en el cual no encontraron efectos tóxicos, por el contrario, la EGCG fue capaz de atenuar el daño oxidante cardíaco en ratas. Por otra parte, Fiorini *et al.* (2005) evaluaron el efecto de la administración por vía i.p. de 85 mg/kg de EGCG y tampoco observaron efectos tóxicos, por el contrario, la EGCG redujo la esteatosis hepática y protegió contra el daño hepático por isquemia/reperfusión en

ratones esteatósicos. En estudios en humanos, se ha observado que la administración de dosis de 200 a 800 mg/kg es bien tolerada por los sujetos de prueba y no induce efectos secundarios (Chow *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que la administración de EGCG no tiene efectos tóxicos sobre el organismo, si no que por el contrario, puede disminuir el daño generado por agentes endógenos como el estrés oxidante.

En cuanto a la actividad genotóxica, los resultados muestran que la administración de 20 y 10 mg/kg de EGCG por vía i.p. y de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g., no incrementa significativamente las frecuencias de MN en ninguna de las horas evaluadas, por lo que no presentó efectos genotóxicos. Esto coincide con estudios previos que han evaluado la genotoxicidad de este compuesto, los cuales han mostrado que la administración intravenosa (10, 25 y 50 mg/kg) y oral (500, 1000 y 2000 mg/kg) de una preparación de EGCG (Teavigo™) carece de efectos genotóxicos en ratón (Isbrucker *et al.*, 2006-a). En otro estudio realizado por Ogura *et al.* (2008), la administración de 500, 1000 y 2000 mg/kg por dos días consecutivos, de un extracto de té verde con altas cantidades de catequinas, tampoco se encontraron efectos genotóxicos utilizando el ensayo de MN en médula ósea de ratón. En otros estudios en los que se han administrado diferentes dosis de EGCG tampoco se ha encontrado inducción de daño genotóxico por parte de la catequina, por el contrario, se ha observado que es capaz de disminuirlo cuando se administran diferentes compuestos inductores de daño (Šmerák *et al.*, 2006). También *in vitro* se ha observado que la EGCG presenta actividad antimutagénica contra compuestos mutágenos de referencia (Kuroda, 1996; Hour *et al.*, 1999). Sin embargo, también se ha observado que la EGCG es capaz de inducir por sí misma o incrementar el daño genotóxico inducido por agentes mutágenos, sobre todo cuando se emplean dosis elevadas (Imanishi *et al.*, 1991; Weisburger, 1996; Ohshima *et al.*, 1998; Sugisawa *et al.*, 2004).

La administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. indujo un incremento significativo en la frecuencia de MN, lo cual corrobora el daño genotóxico reportado previamente para los compuestos de Cr(VI) (De Flora, 1990; Błasiak y Kowalik, 2000; Codd *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009; EPA, 2010) y particularmente para el CrO₃ (García-Rodríguez *et al.*, 2001; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007). En el presente estudio, la evaluación del daño genotóxico inducido por CrO₃, se realizó mediante el análisis de la cinética de MN, dentro de las 72 horas siguientes a la administración del compuesto. Nuestros resultados muestran que las frecuencias de MN se incrementan en todas las horas de evaluación, no obstante, la mayor inducción de MN se observa a las 48 horas. Esto puede deberse a la farmacocinética del CrO₃, ya

que se ha reportado que en general la mayor distribución y biotransformación de los agentes químicos se presenta entre las 24 y 48 horas después de su administración; y por otra parte, al ciclo de eritropoyesis en el ratón, ya que la inducción de MN se observa generalmente después de las 12 horas de la administración del compuesto de estudio (Hayashi *et al.*, 1990; Krishna y Hayashi, 2000; Heddle *et al.*, 2011). La genotoxicidad del Cr(VI) se ha relacionado con el estado de oxidación del Cr, ya que los cromatos poseen una similitud con algunos iones fisiológicos de sulfatos y fosfatos, lo cual permite que el Cr(VI) pueda entrar fácilmente a las células a través de canales iónicos no específicos, o a través del proceso de fagocitosis en el caso de los cromatos insolubles (Valko *et al.*, 2006). Cuando el Cr(VI) se encuentra en el interior de las células, se lleva a cabo su reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(V), Cr(IV) y Cr(III), los cuales tienen mayor capacidad de interaccionar con el ADN debido a que tienen afinidad con las bases nitrogenadas y los grupos fosfato, formando aductos Cr-ADN. Además, durante el proceso de reducción del Cr(VI), se generan ERO y RL que pueden inducir daño al ADN mediante rupturas de cadena, oxidación de bases, sitios abásicos y entrecruzamientos catenarios (O'Brien *et al.*, 2003; Nickens *et al.*, 2010; Jomova y Valko, 2011). Estos eventos pueden conducir a la formación de MN y AC (Levis y Majone, 1979; Ito y Shimada, 1996; García-Rodríguez *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2008).

Cuando se administraron 20 mg/kg de EGCG por vía i.p., cuatro horas previas a la administración del CrO₃, se observó un efecto dual: a las 24 horas se observa un incremento de alrededor del 200% en la frecuencia de MN al compararse con el grupo administrado solo con CrO₃, por lo que se sugiere que la EGCG presenta un efecto sinérgico sobre el daño genotóxico producido por el CrO₃, lo que podría estar relacionado con un efecto pro-oxidante de la EGCG; por otro lado, a las horas 48 y 72 se observa una disminución de las frecuencias de MN en un 23% y 33% respectivamente, por lo que se sugiere un efecto protector por parte de la catequina contra el daño inducido por CrO₃ (efecto anti-oxidante). Sin embargo la administración de esta dosis indujo la muerte de 2 ratones a las 72 horas, lo que sugiere que la combinación de la dosis empleada de EGCG con CrO₃ podría haber provocado efectos tóxicos sistémicos.

Cuando se administraron 10 mg/kg de EGCG por vía i.p. cuatro horas previas a la administración de CrO₃, se observó que las frecuencias de MN se incrementan en todas las horas de evaluación al compararse con el grupo administrado únicamente con CrO₃ (50%, 47%, 83%; hora 24, 48 y 72 respectivamente). En este caso no se registró la muerte de ninguno de los animales, por lo que los resultados en conjunto sugieren un efecto potenciador del efecto genotóxico inducido por el CrO₃. Esto puede estar relacionado con el potencial pro-oxidante de la catequina, ya que se ha

reportado en estudios recientes, que la EGCG, considerada como un potente antioxidante, puede conducir también a la generación de daño oxidante. En las últimas décadas, se ha observado que existen estudios contradictorios en cuanto al efecto antioxidante y protector de la EGCG. Los resultados de un estudio epidemiológico, mostraron que el consumo de té verde, aumentó 2.7 veces el riesgo de padecimiento de cáncer de pulmón en mujeres en Hong Kong (Tewes *et al.*, 1990). Otra publicación, reporta que la catequina puede potenciar la carcinogénesis de colon en ratas (Hirose *et al.*, 2001). Posteriormente, Kanadzu *et al.* (2006), evaluaron el efecto de la EGCG en linfocitos de sangre periférica humana mediante el ensayo cometa, en el cual encontraron que la EGCG suprimía los rompimientos de cadena de ADN a concentraciones de 10^{-8} a 10^{-5} M, mientras concentraciones de 10^{-3} M las inducían por sí mismas. En otros estudios, se ha encontrado que la EGCG puede inducir la modificación covalente de proteínas a través de su auto-oxidación (Ishii *et al.*, 2008). Además se ha encontrado que la EGCG es capaz de inducir entrecruzamientos de proteínas de membrana, a través de su producto de oxidación catecol-quinona, generando RL durante este proceso (Chen *et al.*, 2011). Se ha observado que la oxidación de la EGCG puede ser catalizada por metales de transición. Furukawa *et al.* (2003) realizaron un estudio *in vitro* en que observaron que la EGCG induce daño al ADN en presencia de Fe(III) EDTA y Cu(II), mediante la producción de ERO. En 2004, Azam *et al.* (2004) evaluaron el potencial pro-oxidante de los polifenoles del té verde, encontrando que la EGCG era el pro-oxidante más efectivo; además observaron que era el reductor más eficiente de Cu(II) a Cu(I), cuya reacción lleva a la formación de ERO, tales como el radical $\bullet\text{OH}$. Durante la reducción del metal por acción de la EGCG, ésta se oxida produciendo ERO y RL (Zhou y Elias, 2013), los cuales pueden interaccionar con el ADN causando daño oxidante (O'Brien *et al.*, 2003). Esto es consistente con los resultados observados en el presente estudio, ya que no se observó un efecto genotóxico al administrar el tratamiento sólo de EGCG, sino únicamente al combinarlo con el tratamiento de CrO_3 .

Debido a que la administración combinada de EGCG y CrO_3 por vía i.p. mostró un incremento del daño genotóxico, se cambió la ruta de administración de la EGCG (Dedrick y Flessner, 1997). Los resultados mostraron que al administrar la EGCG por vía i.g. previamente a la administración de 20 mg/kg de CrO_3 , se observó una disminución significativa del daño genotóxico inducido por el CrO_3 , en todas las horas de evaluación. Esto puede deberse al efecto antioxidante previamente descrito para la EGCG. Nuestros resultados concuerdan con lo descrito previamente por Shi *et al.* (2000), quienes encontraron que la EGCG puede proteger contra el daño genotóxico producido

por Cr(VI) ($K_2Cr_2O_7$) en células Jurkat. Sus resultados mostraron también que esta protección se debe principalmente al efecto antioxidante de la catequina, ya que la EGCG fue capaz de capturar eficientemente radicales $\cdot OH$ y $O_2\cdot^-$ producidos por la presencia del cromato. En un estudio realizado por Johnson y Loo (2000), se reporta que la EGCG es capaz de inhibir el daño al ADN inducido por H_2O_2 y 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1, un generador de peroxinitrito) en células Jurkat, a través de la captura de RL. Sugisawa *et al.* (2004), realizaron un análisis del efecto antígenotóxico de la EGCG y otras catequinas galatadas y no galatadas del té verde en células WIL2-NS, en el cual encontraron que la EGCG y la ECG evitaron el daño cromosómico inducido por H_2O_2 y por ter-butilhidroperóxido, lo cual no fue observado al emplear catequinas no galatadas, por lo que reportaron la presencia del grupo galato como necesario para observar el efecto protector. En estudios *in vivo* también se ha demostrado la relación entre los efectos antimutagénicos de los polifenoles del té verde, y su capacidad antioxidante. Hasegawa *et al.*, (1995) administraron a ratas una infusión de un extracto de polifenoles por un período de 2 semanas, y las trataron posteriormente con 2-nitropropano (inductor de daño oxidante al ADN), mostrando una significativa disminución en los niveles hepáticos de aductos de 8-hidroxideoguanosina (8-OHdG). En otro estudio, se demostró la reducción de aductos de 8-OHdG y tumores de pulmón inducidos por 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), en ratones que consumían té verde o EGCG (Xu *et al.*, 1992). La actividad antioxidante de los polifenoles ha sido considerada como una de sus propiedades más importantes, ya que debido a su gran capacidad de capturar RL pueden prevenir el daño generado por la interacción de estas especies con moléculas biológicas como el ADN, cuyas modificaciones (mutaciones) se han relacionado con procesos de carcinogénesis y el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (Yen y Chen, 1995; Zaveri, 2006; Wu *et al.*, 2012). La actividad antioxidante de las catequinas se debe principalmente a los grupos hidroxilo contenidos en sus grupos fenólicos. Particularmente la EGCG posee ocho grupos hidroxilo distribuidos en sus anillos A y B y en su grupo galato, lo cual explica su gran potencial antioxidante comparable con el de otras catequinas contenidas en el té verde (Johnson y Loo, 2000; Zaveri, 2006; Singh *et al.*, 2011). Se ha identificado que el anillo B es el principal sitio para las reacciones antioxidantes de la EGCG (Valcic *et al.*, 1999). En general, los antioxidantes fenólicos interfieren con la oxidación de lípidos y otras moléculas, como el ADN, mediante la rápida donación de átomos de hidrógeno a los radicales estabilizándolos y por tanto, evitando su interacción con otras moléculas. Como resultado se genera una molécula oxidante que es relativamente estable, por lo que no promueve reacciones adicionales como radical (Valko *et al.*, 2006). Por otro lado, también se ha

reportado que la EGCG puede actuar como modulador de la capacidad antioxidante total y conservar la actividad enzimática antioxidante endógena, además de inducir el incremento de antioxidantes endógenos (Simos *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011). Además se ha encontrado que su capacidad quelante puede contribuir en gran medida a su actividad antioxidante (Zaveri *et al.*, 2006).

El hecho de que la EGCG haya aumentado el daño genotóxico cuando fue administrada por vía i.p. y disminuido el daño cuando fue administrada por vía i.g., puede deberse a:

1. La concentración de la EGCG en plasma. En general, se ha observado que la EGCG puede actuar como antioxidante sobre todo cuando se emplean dosis bajas, y por el contrario, puede actuar como pro-oxidante a dosis elevadas (Kanadzu *et al.*, 2006; Zhou y Elias, 2013). En el presente estudio, se empleó una misma dosis de EGCG (10 mg/kg); no obstante, la vía de administración jugó un papel importante en su biodisponibilidad, ya que se ha demostrado que la administración de fármacos por vía i.p. puede incrementar considerablemente su concentración en plasma en comparación con vías de administración enterales (Dedrick y Flessner, 1997). La vía de administración i.p. es considerada apropiada para este tipo de compuestos ya que permite tener un máximo control de la dosis real de la sustancia recibida por el organismo ofreciendo un 100% de biodisponibilidad ya que sobrepasa el efecto primario del hígado, e intestinos (Simos *et al.*, 2011). En este sentido, la administración i.p. genera una gran ventaja, sin embargo, los resultados demuestran que probablemente la dosis administrada por vía i.p. permite la absorción y distribución de una mayor concentración de EGCG, la cual como se describió previamente, probablemente permitió su interacción con los iones metálicos del Cr(VI) produciendo altos niveles de estrés oxidante, conduciendo al daño genotóxico en los ratones. Por el contrario, la administración de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g. disminuyó la biodisponibilidad del compuesto, de tal manera que las concentraciones de EGCG en plasma no son las suficientes para generar genotoxicidad, por el contrario, son capaces de contrarrestar los efectos pro-oxidantes derivados de la presencia del CrO₃.
2. El pH del medio. Se ha observado que el pH es un factor determinante en el comportamiento de la EGCG como antioxidante o como pro-oxidante (Takumi-Kobayashi *et al.*, 2008; Zhou y Elias, 2012). En este estudio, la administración oral de la EGCG implica la entrada al tracto digestivo, donde el pH ácido promueve su oxidación

celular (Zhou y Elias, 2012). Esto podría indicar que la transformación de la EGCG por las enzimas y los ácidos gástricos, disminuyeron la concentración de la EGCG en forma pura, lo cual podría estar relacionado con la disminución de la biodisponibilidad de los compuestos administrados por vía oral, lo cual no ocurre al administrarse por vía i.p. Por otro lado, esto podría contribuir al efecto regulador de la capacidad antioxidante total, por parte de la EGCG, descrito enseguida.

3. Capacidad de la EGCG para elevar los antioxidantes en plasma. Se ha propuesto que la generación de ERO mediada por EGCG puede ser la base de su habilidad para inducir antioxidantes endógenos (Sing *et al.*, 2011). En este sentido, la oxidación de la EGCG en el sistema digestivo pudo haber originado la liberación de ERO, las cuales iniciaron una respuesta antioxidante endógena, evitando el daño oxidante generado por el CrO₃.
4. Metabolitos de la EGCG con acción antioxidante. Se ha reportado en estudios previos que la oxidación de la EGCG conduce a la formación de metabolitos con capacidad antioxidante, los cuales también podrían contribuir a la actividad antígeno-tóxica observada en nuestro estudio (Qi, 2010).

Al evaluar el efecto citotóxico de los tratamientos, mediante las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, se observó una alta variabilidad en las frecuencias de EPC. Se ha descrito que el daño citotóxico puede determinarse por la disminución de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, sin embargo la evaluación de este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (Krishna *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 2000). De ahí que, se evaluó la viabilidad celular y la inducción de apoptosis en los grupos tratados con 10 mg/kg de EGCG por vía i.g., el tratado con 20 mg/kg de CrO₃ y en el grupo tratado con ambos, EGCG y CrO₃. Las evaluaciones de cada grupo se llevaron a cabo a las 48 horas después de la administración de los tratamientos, debido a que esta es la hora en la cual el CrO₃ induce el mayor número de MN. El hecho de que se haya optado por evaluar la muerte celular en leucocitos, se debe a que al igual que los eritrocitos, conforman uno de los tipos celulares encontrados en el tejido hemático, sin embargo los leucocitos tienen la característica de presentar núcleo lo cual permite la observación de los cambios morfológicos nucleares. Los resultados del análisis mostraron que la administración sola de EGCG induce un incremento en el porcentaje de células apoptóticas tempranas. Esto puede estar relacionado con el efecto pro-oxidante de la catequina, descrito previamente, ya que ha observado que cuando se altera el

estado oxidante intracelular, se puede desencadenar un proceso apoptótico (Wang *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha descrito que la EGCG posee un efecto pro-apoptótico en células tumorales. Se ha mostrado que la EGCG afecta un gran número de factores asociados con la progresión del ciclo celular y la inducción de muerte, entre ellos se ha propuesto la inhibición de las CDK, la inactivación del factor NFκB y la inducción de la expresión de p21 y p27 (Singh *et al.*, 2011), por lo que probablemente los resultados del presente estudio puedan estar relacionados con la regulación génica por parte de la EGCG, sin embargo es necesario realizar estudios posteriores que puedan proporcionar evidencia del mecanismo de inducción de apoptosis por la EGCG. Conjuntamente, es importante señalar que las células apoptóticas tempranas todavía presentan una estabilidad en la membrana, por lo cual algunos autores consideran que la célula apoptótica temprana es una célula viva (Squier y Cohen, 2000).

El grupo administrado con CrO₃, también mostró un aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas. Esto puede estar relacionado con la liberación de ERO durante el proceso de reducción de Cr(VI) a Cr(III), ya que, como se ha descrito previamente, el aumento en la concentración de ERO en el interior celular, es uno de los factores que pueden desencadenar la muerte celular, particularmente la muerte por apoptosis. Estos resultados coinciden con lo reportado previamente por Wang *et al.* (2006), quienes observaron que la administración oral de Cr(VI) indujo daño al ADN y muerte celular por apoptosis. En su estudio reportaron que la administración de Cr(VI) causó un aumento significativo de ERO en hígado. En otros estudios, se ha reportado que el Cr(VI) puede inducir apoptosis en cultivos celulares (Carlisle *et al.*, 2000; Bagchi *et al.*, 2001; Vasant *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2004), y que las ERO desempeñan un papel importante en la vía de señalización del proceso apoptótico. Sin embargo, también se ha reportado que el Cr(VI) puede intervenir en procesos de regulación génica los cuales también pueden desencadenar la muerte por apoptosis (regulación de p53, sobreexpresión de la caspasa-3, regulación a la baja de bcl-2, entre otras; Sing, 2008). En el presente estudio se observó un mayor porcentaje de células apoptóticas tempranas (7.8%) que de células apoptóticas tardías (0.2 %), lo cual podría estar relacionado con lo reportado por Ye *et al.* (1999), quienes observaron que la generación de ERO generada por la reducción del Cr(VI) era responsable de los estadios tempranos de la apoptosis, mientras que p53 contribuye a los estadios tardíos de la apoptosis; sin embargo la evaluación de los cambios morfológicos nucleares de las células es considerada como uno de los pasos a seguir para la identificación del tipo de muerte celular, ya que se ha recomendado complementar la evaluación morfológica de

este proceso mediante el uso de métodos más precisos como la cuantificación de la expresión génica y de marcadores moleculares como bcl-2, p53, p21, caspasas, entre otros (Kroemer *et al.*, 2008). Por otra parte, se observó que la administración de CrO₃ aumentó también el porcentaje de células necróticas, sin embargo las células apoptóticas se presentaron en un mayor porcentaje. Esto es consistente con estudios previos en los que se ha observado que los compuestos de Cr(VI) inducen apoptosis como forma primaria de muerte celular (Wu *et al.*, 2012).

Cuando se administraron los tratamientos combinados de EGCG y CrO₃, se observó un aumento en el porcentaje de células apoptóticas, mayor al observado en el grupo tratado únicamente con CrO₃. Esto contrasta con los resultados reportados por Wu *et al.*, 2012, quienes al evaluar el efecto de la EGCG contra la toxicidad inducida por Cr(VI) en células BEAS-2B y EBV-BL, encontraron que la catequina era capaz de proteger contra la muerte celular. El hecho de que en el presente estudio la administración de EGCG haya incrementado el porcentaje de células apoptóticas, puede deberse a la generación de ERO, y a la regulación de la expresión génica previamente descrita.

De manera complementaria a la evaluación de la citotoxicidad y de la inducción de muerte celular por apoptosis, se realizó un análisis de la viabilidad celular, mediante los resultados obtenidos del ensayo de apoptosis. En este análisis se tomaron en cuenta las células viables y las células apoptóticas tempranas como células vivas, y las células apoptóticas tardías y no apoptóticas como células muertas. El análisis mostró que el tratamiento con EGCG no modifica significativamente la viabilidad celular, por lo que se sugiere que la EGCG no afecta la estabilidad celular. Por el contrario, se observó que la administración de CrO₃ disminuye significativamente la viabilidad celular, lo que indica un efecto citotóxico notable. Al administrar los tratamientos combinados, se observa un aumento de la viabilidad celular con respecto al grupo tratado con CrO₃, por lo que aunque la EGCG induce un aumento de muerte celular por apoptosis, probablemente también esté actuando bajo su mecanismo antioxidante, evitando daños en la estabilidad celular producidos por el Cr(VI).

Los resultados en conjunto sugieren que la administración de EGCG en dosis bajas, puede disminuir el daño genotóxico inducido por la administración de CrO_3 , probablemente debido a:

1. El efecto antioxidante de la EGCG. A través de la captura directa de RL generados por la reducción de Cr(VI) a Cr(III), o bien a través del incremento de los antioxidantes endógenos en plasma.
2. El efecto pro-apoptótico de la EGCG. A través de la eliminación de las células con daño en el material genético, mediante la inducción de muerte celular por apoptosis.

8. Conclusiones y comentarios finales

- La administración de 10 y 20 mg/kg EGCG por vía oral e i.p. no induce daño genotóxico, ya que no incrementa de manera significativa la frecuencia de MN.
- La administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. induce daño genotóxico, ya que incrementa significativamente la frecuencia de MN.
- La administración de 20 mg/kg de EGCG y 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. inducen daño genotóxico a las 24 horas después del tratamiento. Mientras que la administración previa de 10 mg/kg de EGCG por vía i.p. incrementa el daño genotóxico inducido por el tratamiento de CrO₃ de las 24 a las 72 horas después de los tratamientos, lo que se sugiere que la EGCG presenta un efecto pro-oxidante.
- La administración de 20 mg/kg de EGCG y 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. disminuyen el daño genotóxico a las 48 y 72 horas después del tratamiento, lo que sugiere un efecto antioxidante.
- La administración previa de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g. protege del daño genotóxico inducido por el tratamiento de CrO₃, ya que disminuyó las frecuencias de MN en el siguiente orden: hora 24 (33%) < hora 48 (71%) < hora 72 (130%).
- La administración de los tratamientos de EGCG y CrO₃ no modificaron la relación de EPC con respecto a los ENC al comparar con los grupos testigos, sin embargo, estos datos deben tomarse con reserva.
- La administración de 10 mg/kg de EGCG por vía i.g. no disminuye la viabilidad celular, ya que no incrementa significativamente el porcentaje de células muertas.
- La administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. disminuye la viabilidad celular, ya que incrementa significativamente el porcentaje de células muertas.
- La administración de 10 mg/kg de EGCG por vía oral previa al tratamiento de CrO₃ disminuye la frecuencia de células muertas en comparación con el tratamiento solo de CrO₃.

- La administración de 10 mg/kg de EGCG por vía oral y de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. inducen apoptosis.
- La administración de 10 mg/kg de EGCG por vía oral previa al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ incrementan el porcentaje de apoptosis, por lo que se sugiere que este es el posible mecanismo de reducción de las frecuencias de MN de la EGCG.
- La administración de 20 mg/kg de EGCG y 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. indujeron muerte en dos ratones después de las 48 horas, lo que sugiere un efecto tóxico sistémico.

9. Referencias

- Adler ID, Bootman J, Favor J, Hook G, Schriever G, Welzl G, Whorton E, Yoshimura I, Hayashi M. 1998. Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat Res.* 417:19-30.
- Albert L. 1998. Curso Básico de Toxicología Ambiental. 2ª edición. Limusa. México. pp 311.
- Allen RT, Hunter WJ III, Agrawal DK. 1997. Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis. *J Pharmacol Toxicol.* 37:215-228.
- Ames B. 1989. Mutagens and carcinogens: endogenous and exogenous factors. *Environ Mol Mutag.* 14:66-77.
- Arencibia-Arrebola DF, Rosario-Fernández LA, López-Feria Y, Díaz-Rivero D. 2003. Las plantas, fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. *Retel.* 21:37-51.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2008. Toxicological Profile for Chromium. September. PHS. US Department of Health and Human Services.
- Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. 2004. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol in Vitro.* 18:555-561.
- Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR. 2009. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res.* 674:101-108.
- Babich H, Zuckerbraun H, Weinerman S. 2007. In vitro cytotoxicity of (-)-catechin gallate, a minor polyphenol in green tea. *Toxicol Lett.* 171:171-180.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ. 2001. Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biochem.* 222:149-158.
- Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassoun E, Tran MN, Tang L, Stohs SJ. 1997. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate [chromium VI] and cadmium chloride [cadmium II] to rats. *Free Radical Biol Med.* 22 (3):471-478.

- Barzilai A, Yamamoto K-I. 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair*. 3:1109-1115.
- Baskic D, Popovic S, Ristic P, Arsenijevic NN. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int*. 30:924-932.
- Bender M. 1980. Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production, en: Generoso W, Shelby F, De Serres F. *DNA repair and mutagenesis in eukaryotes*. Plenum. New York. pp. 245-265.
- Bhattacharya S. 2011. Natural Antimutagenesis: A Review. *Res J Med Plant*. 5(2):116-126.
- Bianchi V, Dal TR, Debetto P, Gino LA, Luciani S, Majone F, Tamino G. 1980. Mechanism of chromium toxicity in mammalian cell cultures. *Toxicology*. 17:219-224.
- Blankenberg FG. 2008. In Vivo Detection of Apoptosis. *J Nucl Med*. 49:815-955.
- Błasiak J, Kowalik J. 2000. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutat Res*. 469:135-145.
- Carlisle DL, Pritchard DE, Singh J, Patierno SR. 2000. Chromium(VI) induces p53-dependent apoptosis in diploid human lung and mouse dermal fibroblasts. *Mol Carcinogen*. 28:111-118.
- Chen L, Lee MJ, Li H, Yang CS. 1997. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos*. 25 (9):1045-1050.
- Chen R, Wang J-B, Zhang X-Q, Ren J, Zeng C-M. 2011. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) induced intermolecular cross-linking of membrane proteins. *Arch Biochem Biophys*. 507:343-349.
- Chen TL, Wise SS, Holmes A, Shaffiey F, Wise JPSr, Thompson WD, Kraus S, Wise JPSr. 2009. Citotoxicity and genotoxicity of hexavalent chromium in human and North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) lung cells. *Comp Biochem Phys C*. 150:487-494.

- Choi JY, Park CS., Kim DJ, Cho MH, Jin BK, Pie JE, Chung WG. (2002). Prevention of nitric oxide-mediated 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease in mice by tea phenolic epigallocatechin 3-gallate. *Neurotoxicology*. 23 (3):367–374.
- Chow H-HS, Cai Y, Alberts DS, Hakim I, Dorr R, Shahi F, Crowell JA, Yang CS, Hara Y. 2001. Phase I Pharmacokinetic Study of Tea Polyphenols following Single-dose Administration of Epigallocatechin Gallate and Polyphenon E. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10:53-58.
- Clarkson WT, Friberg L, Norberg FG, Sager RP. (1988). Biological Monitoring of Toxic Metals. Ed. Plenum Press., New York. p.p. 369-382.
- Codd R, Dillon CT, Levina A, Lay PA. 2001. Studies on the genotoxicity of chromium: from the test tube to the cell. *Coordin Chem Rev*. 216:537-582.
- Cole J, Skopek T. 1994. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogenesis, working paper 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat Res*. 304:33-106.
- De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zancacchi P. 1990. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res*. 238: 99-172.
- De Flora S, Izzotti A, Rancerath K, Randerath E, Lertas J. 1996. DNA adducts and chromo degenerative disease-pathogenic relevance and implications in prevents mediome. *Mutat Res*. 366:197-238.
- De Flora S. 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*. 402: 151-158.
- De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zancacchi P. 1990. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res*. 238:99-172.
- Dedrick RL, Flessner MF. 1997. Pharmacokinetic Problems in Peritoneal Drug Administration: Tissue Penetration and Surface Exposure. *J Natl Cancer I*. 89 (7):480-487.
- Doll R, Peto R. 1981. The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. *J Natl Cancer I*. 66 (6):1192-1308.

- Duarte MN, Menarim DO. 2006. Morfodiagnose da anatomia foliar e caulinar de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. *Rev Bras Farmacogn.* 16 (4):545-551.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35 (4):495-516.
- EPA. Environmental Protection Agency. 1984. Health Assessment Document for Chromium. Environmental Assessment and Criteria Office. Research Triangle Park, NW.
- EPA. Environmental Protection Agency. 2010. Toxicological Review of Hexavalent Chromium. CAS No. 18540-29-9. Washington, DC.
- FDA. Food and Drug Administration. 2000. Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. USA.
- Fiorini RN, Donovan JL, Rodwell D, Evans Z, Cheng G, May HD, Milliken CE, Markowitz JS, Campbell C, Haines JK, Schmidt G, Chavin KD. 2005. Short-Term Administration of (-)-Epigallocatechin Gallate Reduces Hepatic Steatosis and Protects Against Warm Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Steatotic Mice. *Liver Transplant.* 11 (3):298-308.
- Frei B, Higdon JV. 2003. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. Proceedings of the Tird International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet. *American Society for Nutritional Sciences.* Supplement: 3275S-3284S.
- Friberg L, Nordberg GF. 1990. Handbook on the toxicology of metals, 2ª ed, Elsevier. Science Publishers BV. Vol. II:185-205.
- Furukawa A, Oikawa S, Murata M, Hiraku Y, Kawanishi S. 2003. (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochem Pharmacol.* 66:1769-1778.
- Galvão LAC, Corey G. 1987. Cromo. Serie Vigilancia 5. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS. OMS. México. pp. 66
- García-Rodríguez MC, 2006. Estudios de los efectos de la clorofilina sobre la acción genotóxica y teratógena del cromo VI. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, FES Zaragoza, UNAM. pp. 26.

- García-Rodríguez MC, Altamirano-Lozano M. 2001. Sales de sodio y cobre de la clorofila; usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígena. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas*, 4 (2):77-86.
- García-Rodríguez MC, Altamirano-Lozano MA. 2007. La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón in vivo. *Bioquímica*. 32 (1):15-24.
- García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. 1998. Estudio de la cinética de MN-PCE por CrO₃ en sangre periférica de ratón, usando la técnica de naranja de acridina. *Genet Mol Biol*. 21:146.
- García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano MA. 2000. Effect of chlorophyllin on the MN-PCE induction in peripheral blood of mice exposed to chromium trioxide in vivo. *Environ Mol Mutag*. 35 Suppl. 31.
- García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. 2001. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res*. 496:145-151.
- García-Rodríguez MC, Vilches-Larrea RE, Nicolás-Méndez T, Altamirano-Lozano MA. 2012. El té verde en la quimioprevención in vivo del daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (cromo[VI]). *Nutr Hosp*. 27 (4):1204-1212.
- Gokulakrishnan A, Vinayagam MM, Rahman LAA, Thirunavukkarasu C. 2010. Attenuation of cardiac oxidative stress by (-)-epigallocatechin-gallate (EGCG). *Biomed Pharmacother*. doi:10.1016/j.biopha.2010.09.025.
- Gómez-Arroyo S, Altamirano M, Villalobos R. 1981. Sister-chromatid exchanges induced by some chromium compounds in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res*. 90:425-431.
- Gómez-Arroyo S, Villagómez MA, Villalobos-Pietrini R. 1987. Effects induced by chromium trioxide on root tip chromosomes of *Vicia faba*. *Rev Int Contam Ambie*. 3(1):55-61.
- Guillespie JR, Hymphreys AD, Baird CA, Robinson AE. 1990. Química. Ed. Reverté, España. p.p. 1139.

- Gupta S, Ahmad N, Nieminen AL, Mukhtar H. 2000. Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 164:82-90.
- Gupta S, Saha B, Kiri AK. 2002. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: A review. *Mutat Res.* 512:37-65.
- Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwat S, Gebhardt S. 2006. Flavonoid Content of U.S. Fruits, Vegetables, and Nuts. *J Agric Food Chem.* 54:9966-9977.
- Hartwin A. 1995. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals.* 8:3-11.
- Hasegawa R, Chujo T, Sai-Kato K, Umemura T, Tanimura A, Kurokawa Y. 1995. Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane. *Food Chem Toxicol.* 33 (11):961-965, 967-970.
- Hayashi M, MacGregor J, Gatehouse D, Adler I, Blaker D, Dertinger S, Krishna G, Morita T, Ruso A, Suto S. 2000. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II: Some aspects of protocol design including repeated treatment, integration with toxicity testing and automated scoring. *Env Mol Mutagen.* 35:234-252.
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate MJr. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res.* 245:245-249.
- Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M, Oleson FB Jr., Pacchierotti F, Romagna F, Shimada H, Soutu S, Vannier B. 1994. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res.* 312:293-304.
- Hayashi Y, Kondo T, Zhao Q-L, Ogawa R, Cui Z-G, Feril LB Jr., Teranishi H, Kasuya M. 2004. Signal transduction of p53-independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells. *Toxicol Appl Pharm.* 197 (2):96-106.
- Heddle JA, Fenech M, Hayashi M, MacGregor JT. 2011. Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis.* 26 (1):3-10.

- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. 1983. The induction of the micronuclei as a measure of genotoxicity. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 123:61-118.
- Hemmink K, Dipple A, Shuker D, Fadlubar F, Segerback D, Bartsch H. 1994. Adducts identification and biological significance. International Agency for Research on Cancer Lyons. IARC Scientific Publications 125:478.
- Hirose M, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Nakamura A, Akagi K, Shirai T. 2001. Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2-Dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in male F344 rats. *Cancer Lett.* 168:23-29.
- Hour T-C, Liang Y-C, Chu I-S, Lin J-K. 1999. Inhibition of Eleven Mutagens by Various Tea Extracts, (-)Epigallocatechin-3-gallate, Gallic Acid and Caffeine. *Food Chem Toxicol.* 37:569-579.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. 1997. Chromium, Nickel and Welding: Summary of Data Reported and Evaluation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. November. WHO. Vol.49. pp. 257.
- Imanishi H, Sasaki YF, Ohta T, Watanabe M, Kato T, Shirasu Y. 1991. Tea tannin components modify the induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in mutagen-treated cultured mammalian cells and mice. *Mutat Res.* 259:79-81.
- Isbrucker RA, Baush J, Edwards JA, Wolz E. 2006-a. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: Genotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 44:626-635.
- Isbrucker RA, Edwards JA, Wolz E, Davidovich A, Bausch J. 2006-b. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: Dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food Chem Toxicol.* 44:636-650.
- Ishii T, Mori T, Tanaka T, Mizuno D, Yamaji R, Kumazawa S, Nakayama T, Akagawa M. 2008. Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. *Free Radical Bio Med.* 45:1384-1394.
- Itoh S, Shimada H. 1996. Micronucleus induction by chromium and selenium, and suppression by metallothionein inducer. *Mutat Res.* 367:233-236.

- Iwasaki Y, Hirasawa T, Maruyama Y, Ishii Y, Ito R, Saito K., Umemura T, Nishikawa A, Nakazawa H. 2011. Effect of interaction between phenolic compounds and copper ion on antioxidant and pro-oxidant activities. *Toxicol in vitro*. 25:1320-1327.
- Johnson MK, Loo G. 2000. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res*. 459:211-228.
- Jomova K, Valko M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283:65-87.
- Jones, DP. 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Sign*. 8 (9-10):1865-1879.
- Jung JY, Han CR, Jeong YJ, Kim HJ, Lim HS, Lee KH, Park HO, Oh WM, Kim SH, Kim WJ. 2007. Epigallocatechin gallate inhibits nitric oxide-induced apoptosis in rat PC12 cells. *Neurosci Lett*. 411:222-227.
- Kada T, Inoue T, Namiki N. 1982. Environmental desmutagens and antimutagens, en: Klokowski EJ (Ed), *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger, New York. pp.137-151.
- Kada T. 1984. Environmental desmutagens and antimutagenic agents. *Environ Mut*. 240:135-151.
- Kanadzu M, Lu Y, Morimoto K. 2006. Dual function of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes. *Cancer Lett*. 241:250-255.
- Katiyar SK, Bergamo BM, Praveen K, Elmets CA. 2001. Green tea polyphenols: DNA photodamage and photoimmunology. *J Photoch Photobio B*. 65:109-114.
- Koh SH, Kwon H, Kim KS, Kim J, Kim MH, Yu HJ, Kim M, Lee KW, Do BR, Jung HK, Yang KW, Appel SH, Kim SH. 2004. Epigallocatechin gallate prevents oxidative-stress-induced death of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase (G93A) motoneuron cells by alteration of cell survival and death signals. *Toxicology*. 202:213-225.
- Kondo K, Kurihara M, Fukuhara K. 2001. Mechanism of antioxidant effect of catechins. *Methods Enzymol*. 335:203-217.
- Krishna G, Hayashi M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*. 455:155-166.

- Krishna G, Nath J, Ong T. 1986. Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C inhibition. *Cancer Res.* 46:2670-2674.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Placentini M, Zhivotovsky B, Melino G. 2008. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 1-9.
- Kuroda Y, Hara Y. 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat Res.* 436:69-97.
- Kuroda Y. 1996. Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res.* 361:179-186.
- Levis AG, Majone F. 1979. Cytotoxic and clastogenic effects of soluble chromium compounds on mammalian cell cultures. *Br J Cancer.* 40: 523-533.
- Liang Y-C, Lin-Shiau S-Y, Chen C-F, Lin JK. 1999. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast cancer carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem.* 75:1-12.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79:727-747.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 109(XVII):271-278.
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 239:29-80.
- McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. 1995. The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in vitro, en: *Methods in Cell Biology.* Vol 46. pp. 153-185.

- Miranda HJ. 1992. Estudio del comportamiento físico y químico del cromo en aguas profundas del municipio de Tultitlán, Estado de México; Tesis FES Zaragoza, UNAM, 85.
- Mirsalis C, Hamilton MC, Patierno S. 1996. Chromium (VI) in plausible drinking water concentrations is not genotoxic in vivo bone marrow micronucleus or liver unscheduled DNA synthesis assay. *Environ Mol Mutagen.* 2:60-63.
- Müller L, Kikuchi Y, Probst G, Shechtman L, Shimada H, Sofuni T, Tweats D. 1999. ICH harmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat Res.* 436:195-225.
- Nagle DG, Ferreira D, Zhou Y-D. 2006. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry.* 67:1849-1855.
- Nakazato T, Ito K, Ikeda Y, Kizaki M. 2005. Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin Cancer Res.* 11(16):6040-6049.
- Narotzki B, Reznick AZ, Aizenbud D, Levy Y. 2011. Green tea: A promising natural product in oral health. *Arch Oral Biol.* Doi:10.1016/j.archoralbio.2011.11.017.
- Newman MC, Intosh AW. 1991. Metal Ecotoxicology: Concepts & Applications. Ed. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. pp. 395.
- Nickens KP, Patierno SR, Ceryak S. 2010. Chromium genotoxicity: A double-edged sword. *Chem-Biol Interact.* 188:276-288.
- Nie G, Jin C, Cao Y, Shen S, Zhao B. 2002. Distinct effects of tea catechins on 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptosis in PC12 Cells. *Arch Biochem Biophys.* 397:84-90.
- Nishio A, Uyeki E. 1985. Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *J Toxicol Env Health.* 15:237-244.
- NLM. National Library of Medicine. 1999. RTECS. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances. Bethesda, MD. Consulta: Febrero, 2012. RTECS No. KB5200000.

- Norbury CJ, Hickson ID. 2001. Cellular Responses to DNA Damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:367-401.
- O'Brien TJ, Ceryak S, Patierno SR (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res.* 533:3-36.
- Ogura R, Ikeda N, Yuki K, Morita O, Saigo K, Blackstock C. 2008. Genotoxicity studies on green tea catechin. *Food Chem Toxicol.* 46:2190-2200.
- Olinski R, Gackowski D, Rozalski R, Foksinski M, Bialkowski R. 2003. Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? *Mutat Res.* 531:177-190.
- Ortiz-Monasterio PF, Cortinas de Nava C, Maffey GL. 1987. Manejo de los desechos industriales peligrosos en México. Universo Veintiuno, México. pp. 235
- Oshima H, Yoshie Y, Auriol S, Gilbert I. 1998. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: Effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxy nitrite, and nitroxyl anion. *Free Radical Biol Med.* 25 (9):1057-1065.
- Piegiorgio P, Gardana C, Pietta A. 2003. Flavonoids in Herbs; En Flavonoids in Health and Disease. 2a ed. Marcel Dekker. USA. pp. 43-70.
- Prieto Z, León-Incio J, Quijano-Jara C, Fernández R, Polo-Benites E, Vallejo-Rodríguez R, Villegas-Sanchez L. 2008. Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (tilapia). *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 25(1):51-58.
- Qi X. 2010. Reactive oxygen species scavenging activities and inhibition on DNA oxidative damage of dimeric compounds from the oxidation of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate. *Fitoterapia.* 81:205-209.
- Ramos M, Batista C, Gómez B, Zamora A. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Inv Salud.* VIII (1):7-15.
- Rana SVS. 2008. Metals and apoptosis: Recent developments. *J Trace Elem Med Bio.* 22:262-284.

- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal, BB. 2010. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked? *Free Radical Bio Med.* 40:1163-1616.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2 (4):152-159.
- Saraste A, Pulkki K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 45:528-537.
- Schmid W, Von Ledebur M. 1973. The micronucleus test methodological aspects. *Mutat Res.* 19:109-117.
- Shi X, Dalal NS. 1992. The role of superoxide radical in the chromium (VI)-generated hydroxyl radical: The Cr(VI) Haber-Weiss cycle. *Arch Biochem Biophys.* Vol. 292:323-327.
- Shi X, Ye J, Leonard SS, Ding M, Vallyathan V, Castranova V, Rojasanakul Y, Dong Z. 2000. Antioxidant properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its inhibition of Cr(VI)-induced DNA damage and Cr(VI)- or TPA-stimulated NF-KappaB activation. *Mol Cell Biochem.* 206:125-132.
- Sies H, Jones DP. 2007. Oxidative stress, en: Fink G (Ed.). *Encyclopedia of Stress.* 2nd edition. pp. 45-48.
- Simos Y, Karkabounas S, Verginadis L, Charalampidis P, Filiou D, Charalabopoulos K, Zioris I, Kalfakakou V, Evangelou A. 2011. Intra-peritoneal application of catechins and EGCG as in vivo inhibitors of ozone-induced oxidative stress. *Phytomedicine.* 18:579-585.
- Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 82:1807-1821.
- Šmerák P, Šestáková H, Polívková Z, Štětina R, Langová M, Bárta I, Turek B, Bártová J. (2006). Antimutagenic Effect of Epigallocatechin Gallate and its Effect on the Immune Response in Mice. *Food Sci.* 24 (4):180-192.
- Squier MK, Cohen JJ. 2000. Assays of apoptosis en: *Methods in Molecular Biology.* J.S. Elce (Ed.) Vol. 144:327-337.

- Sugisawa A, Kimura M, Fenech M, Umegaki K. 2004. Anti-genotoxic effects of tea catechins against reactive oxygen species in human lymphoblastoid cells. *Mutat Res.* 559 (1-2):97-103.
- Sun Y. 1990. Free Radicals, Antioxidant Enzymes, and Carcinogenesis. *Free Radical Bio Med.* 8:583-599.
- Takumi-Kobayashi A, Ogura R, Morita O, Nishiyama N, Kasamatsu T. 2008. Involvement of hydrogen peroxide in chromosomal aberrations induced by green tea catechins in vitro and implications for risk assessment. *Mutat Res.* 657:13-18.
- Teaf CM, Middendorf PJ. 2000. Mutagenesis and Genetic Toxicology, en: Williamps P, James P, Roberts SM. *Principles of Toxicology. Environmental and Industrial Applications.* 2nd edition. New York, USA. pp. 239-264.
- Terradas M, Martín M, Tusell L, Genescà A. 2010. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat Res.* 705 (1):60-67.
- Tewes FJ, Koo LC, Mesgen TJ, Rylander R. 1990. Lung cancer risk and mutagenicity of tea. *Environ Res.* 52 (1):23-33.
- Trivedi B, Saxena DK, Murthy RC, Chamdra SV. 1989. Embryotoxicity and fetotoxicity of orally administrated hexavalent chromium in mice. *Reprod Toxicol.* 3:275-278.
- UNEP. United Nations Environment Programme. 2003. Harmful substances [en línea]: Introduction. Background on Harmful Substances and Hazardous Waste (HSHW). [fecha de consulta: 23 Junio 2012]. Disponible en: <<http://www.unep.org/hazardoussubstances/Introduction/tabid/258/Default.aspx>>.
- Valcic S, Muders A, Jacobsen NE, Liebler DC, Timmermann BN. 1999. Antioxidant Chemistry of Green Tea Catechins. Identification of Products of the Reaction of (-)-Epigallocatechin Gallate with Peroxyl Radicals. *Chem Res Toxicol.* 12:382-386.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact.* 160:1-40.

- Vasant C, Rajaram R, Ramasami T. 2003. Apoptosis of lymphocytes induced by chromium (VI/V) is through ROS-mediated activation of Src-family kinases and caspase-3. *Free Radical Bio Med.* 35(9):1082-1100.
- Villagómez MM. 1981. Efectos producidos por el trióxido de cromo sobre los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de Vicia faba. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM. pp. 50.
- Waladkhani AR, Clemens MR. 2001. Effects of dietary phytochemicals on Cancer Developmet. In vegetables, fruits and herbs in Healt Promotion. Editado por RR Watson. CRC Press London pp. 3-12.
- Wang S, Leonard SS, Ye J, Ding M, Shi X. 2000. The role of hydroxyl radical as a messenger in Cr(VI)-induced p53 activation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279:C868-C875.
- Wang S, Shi X. 2001. Mechanisms of Cr(VI)-induced p53 activation: the role of phosphorylation, mdm2 and ERK. *Carcinogenesis.* 22(5):757-762.
- Wang X-F, Xing M-L, Shen Y, Zhu X, Xu L-H. 2006. Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology.* 228:16-23.
- Wattenberg LW. 1981. Inhibitors of chemical carcinogens, en: Burchenal JH, Oettgen HF. *Cancer: Achievements, Challenges and Prospects for the 1980s*, Grune and Stratton, New York, USA. pp.517-540.
- Weisburger JH. 1996. Tea antioxidants and health, en: Cadenas E, Packer L (Eds.). *Handbook of Antioxidants*. Marcel Dekker, New York. pp. 469-486.
- Wise JPSr, Wise SS, Little JE. 2002. The cytotoxicity and genotoxicity of particulate and soluble hexavalent chromium in human lung cells. *Mutat Res.* 517:221-229.
- Wu F, Sun H, Kluz T, Hailey AC, Kiok K, Costa M. 2012. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity in vitro. *Toxicol Appl Pharm.* 258:166-175.
- Xu Y, Ho C-T, Amin SG, Han C, Chung F-L. 1992. Inhibition of Tobacco-specific Nitrosamine-induced Lung Tumorigenesis in A/J Mice by Green Tea and Its Major Polyphenol as Antioxidants. *Cancer Res.* 52:3875-3879.

- Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC. 2009. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer*. 9 (6):429-439.
- Yao K, Ye PP, Zhang L, Tan J, Tang, XJ, Zhang YD. 2008. Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria dependent apoptosis in human lens epithelial cells. *Mol Vis*, 14:217-223.
- Yen G-C, Chen H-Y. 1995. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J Agric Food Chem*. 43:27-32.
- Zaveri NT. 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer an noncancer applications. *Life Sci*. 78:2073-2080.
- Zhou B-B S, Elledge SJ. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 408:433-439.
- Zhou L, Elias RJ. 2013. Antioxidant ant pro-oxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: Influence of pH and phenolic concentration. *Food Chem*. 138:1503-1509.

10. Anexos

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

académicos:

i) X Foro de Investigación Escolar. Carrera de Biología. FES Zaragoza, UNAM.

Iztapalapa, México D.F. Celebrado del 8 al 10 de agosto de 2012.

Título del trabajo: Efecto de la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre la inducción de micronúcleos en ratones tratados con CrO₃.

Autores: Montaña-Rodríguez A. R., Altamirano-Lozano M. A. y García-Rodríguez M. C.

ii) Society for Free Radical Research International 16th Biennial Meeting.

Londres, Reino Unido. Celebrado del 6 al 9 de septiembre de 2012.

Título del trabajo: Pro-oxidant effect of EGCG on genotoxicity of hexavalent chromium in mice *in vivo*.

Autores: García-Rodríguez MC, Montaña-Rodríguez AR y Altamirano-Lozano MA

iii) Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de México, Iztapalapa.

Iztapalapa, México D.F. Celebrado del 17 al 19 de septiembre de 2012.

Título del trabajo: Evaluación de la cinética *in vivo* de las frecuencias de micronúcleos en ratones de la cepa CD-1 tratados con (-)-epigallocatequina-3-galato.

Autores: Montaña-Rodríguez Ana Rosa, Altamirano-Lozano Mario A. y García-Rodríguez María del Carmen

iv) Congreso Nacional de Genética 2012 de la Sociedad Mexicana de Genética.

Mazatlán, Sinaloa. Celebrado del 3 al 5 de octubre de 2012.

Título del trabajo: Efecto de la administración del cromo (VI) en estudios a corto y largo plazo sobre la genotoxicidad empleando el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón.

Autores: García-Rodríguez MC, Montaña-Rodríguez AR y Altamirano-Lozano MA

v) II Simposio Antioxidantes y Salud. Organizado por el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán y la UNAM.

Tlalpan, México D.F. Celebrado el 4 y 5 de octubre de 2012.

Título del trabajo: Efecto genotóxico de la (-)-epigallocatequina-3-galato (antioxidante del té verde) y del trióxido de cromo en ratones de la cepa CD-1.

Autores: García-Rodríguez M.C., Montaña-Rodríguez A.R. y Altamirano-Lozano M.A.

vi) IV Congreso de Especies Reactivas del Oxígeno en Biología y Medicina. Sociedad Mexicana de Bioquímica.

Jurica, Querétaro. Celebrado del 19 al 22 de marzo de 2013.

Título del trabajo: In vivo effect of green tea flavonoids (epigallocatechin-3-gallate and quercetin) on the genotoxicity of hexavalent chromium: antioxidant and prooxidant.

Autores: García-Rodríguez MC, Montaña-Rodríguez AR, Nicolás-Méndez T y Altamirano-Lozano MA.

vii) XIII Reunión de Ciencias Médicas, Universidad de Guanajuato.

León, Guanajuato. Celebrado del 24 al 26 de abril de 2013.

Título del trabajo: Efecto de la administración in vivo de componentes antioxidantes de la dieta humana sobre el daño al material genético inducido por la exposición a metales pesados con potencial cancerígeno (Cromo[VI]).

Autores: Ma. del Carmen García Rodríguez, Ana Rosa Montaña Rodríguez, Gabriela Serrano Reyes y Mario Altamirano Lozano.

viii) Congreso Nacional de Genética 2013 de la Sociedad Mexicana de Genética.

Manzanillo, Colima. Celebrado del 2 al 4 de octubre de 2013.

Título del trabajo: Estudio de las frecuencias de micronúcleos en sangre periférica de ratón CD-1 tratados con trióxido de cromo, sulfato de talio y pentóxido de vanadio *in vivo*.

Autores: Altamirano-Lozano MA, Montaña-Rodríguez AR, García-Cárdenas GP, Peralta-García P y García-Rodríguez MC.



X Foro de Investigación Escolar

Carrera de Biología

Solicitud de registro de trabajo

8, 9 y 10 de agosto de 2012



Título:

EFFECTO DE LA (-)-EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO SOBRE LA INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN RATONES TRATADOS CON CrO₃

Autores:

Montaño-Rodríguez A. R.¹, Altamirano-Lozano M. A.² y García-Rodríguez M. C.²

Modalidad Ciclo

x	Oral		Básico
	Cartel		Intermedio
	Video	x	Terminal

Resumen:

La (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) es el más abundante de los compuestos polifenólicos pertenecientes a las catequinas del té verde, comprendiendo aproximadamente el 60% de éstas. Este compuesto puede actuar como capturador de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y como inhibidor de la actividad enzimática. En este estudio se investigaron los efectos de la administración a ratones por vía intraperitoneal (i.p.) de la EGCG sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃. Grupos de 5 ratones fueron tratados por vía i.p. con EGCG (10 mg/kg); CrO₃ (20 mg/kg) o con ambos tratamientos (EGCG y CrO₃). Se obtuvieron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la administración de los tratamientos. El daño genotóxico se evaluó mediante el análisis de micronúcleos (MN) utilizando la técnica de naranja de acridina en eritrocitos policromáticos (EPC). Los resultados muestran que la administración sola de EGCG no modifica la frecuencia de MN. Mientras que, el tratamiento con CrO₃ induce un incremento en la frecuencia de MN a las 48 horas, que resultó estadísticamente significativo; lo que corrobora su efecto genotóxico. Cuando se administró la EGCG previamente al tratamiento con CrO₃ no se disminuyeron las frecuencias de MN inducidas por el tratamiento de CrO₃, lo que sugiere que el tratamiento con la EGCG no es capaz de bloquear los efectos genotóxicos inducidos por CrO₃. Esto contrasta con resultados obtenidos en estudios previos en los que se ha observado que polifenoles como la EGCG son capaces de proteger del daño oxidante inducido por metales pesados como los compuestos de Cr (VI).

[Proyecto financiado por PAPIIT-IN217712].

Palabras clave: (3-5 palabras)

Epigallocatequina-3-galato, antioxidante, micronúcleos, especies reactivas de oxígeno



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



CONSTANCIA

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través de la Carrera de Biología

a: Montaña-Rodríguez A. R.¹, Altamirano-Lozano M. A.²
y García-Rodríguez M. C.²

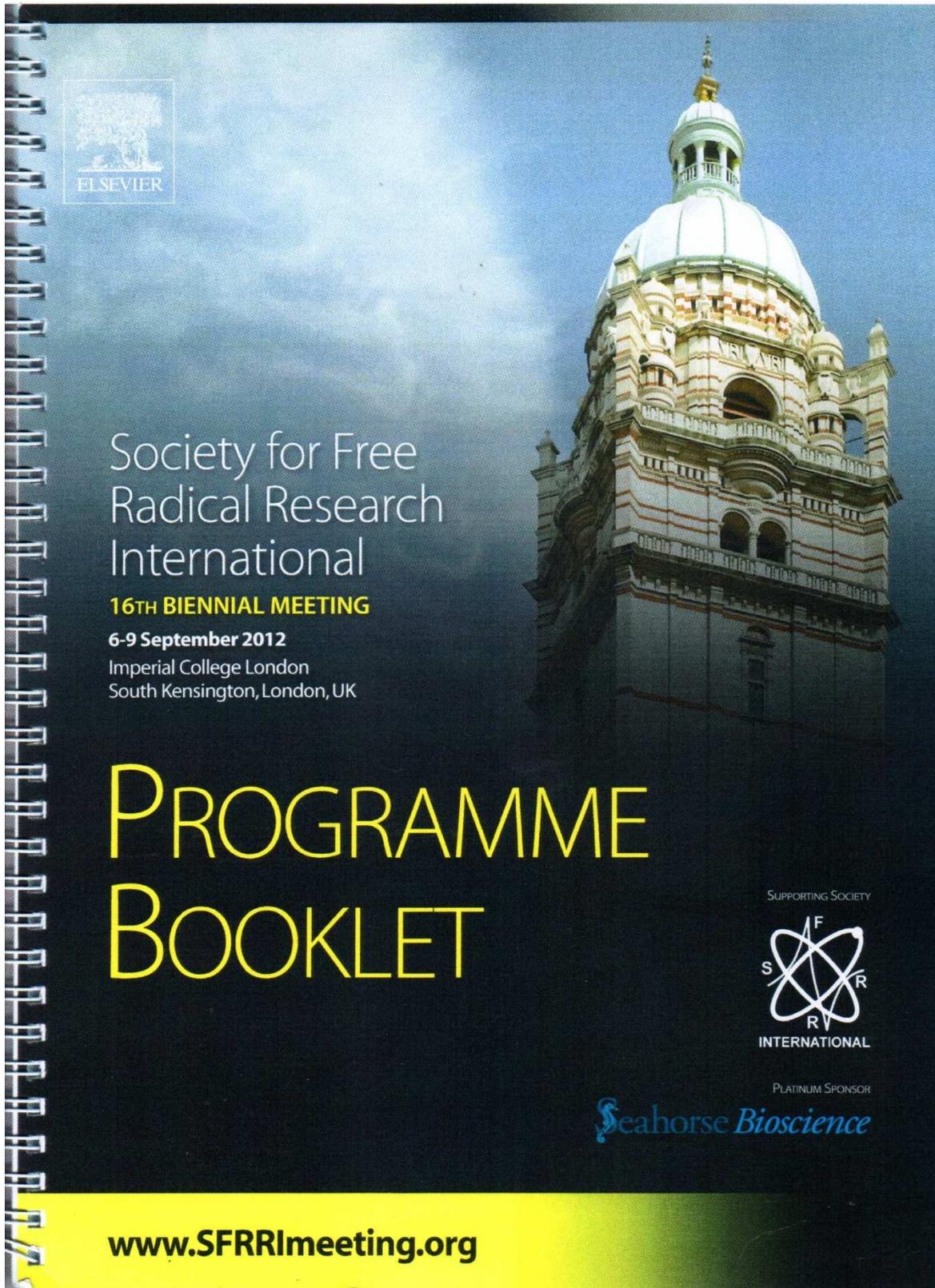
1 alumno 2 docente

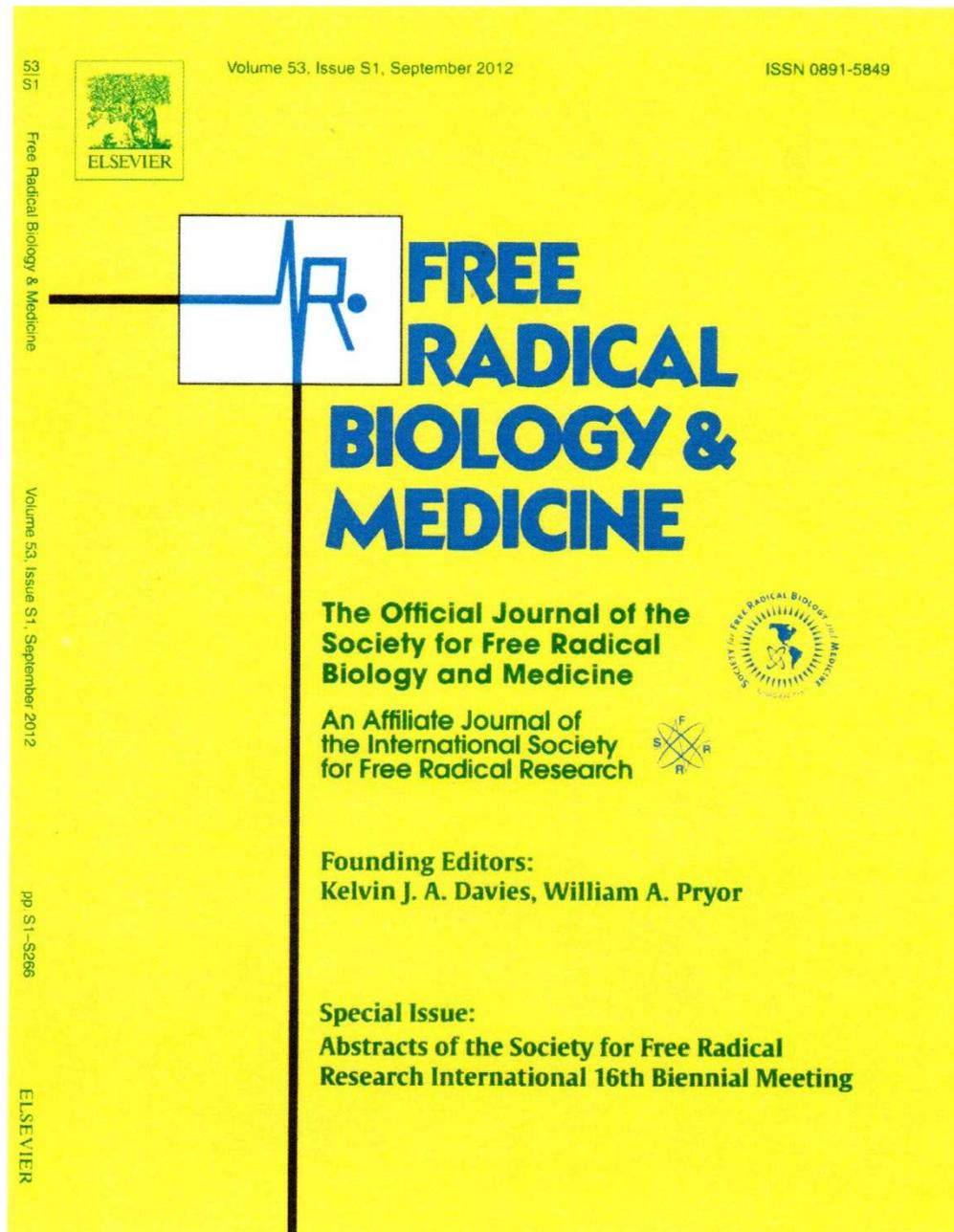
Por la presentación del trabajo: EFECTO DE LA (-)-
EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO SOBRE LA INDUCCIÓN DE
MICRONÚCLEOS EN RATONES TRATADOS CON CrO₃

X FORO DE INVESTIGACION ESCOLAR

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 10 de agosto de 2012.

Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez
Director





30µM. Mt1a and Mt2a transcripts were significantly up-regulated at the highest concentrations of 10µM and 30µM, while Sod1 was up-regulated only at 30µM. The other antioxidant genes were not significantly altered, but Cat showed an increasing trend. All mitochondrial genes were up-regulated at 1µM and further decreased below the control values at 30µM implicating increased amount of mitochondria at 1µM. Our study suggests that cells cope with lower concentrations of CdCl₂ such as 1µM, while 10µM is destructive. Further investigations on signaling pathways are ongoing, and will reveal more clues to better understand what decides to 'die' or 'not to die'.

Keywords: Cadmium, Oxidative stress, proximal tubule, mitochondria

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.456

[0223]

DNA radical detection using immunoblotting

F.A. Summers*, R.P. Mason, M. Ehrenshaft
National Institute of Environmental Health Sciences,
USA

Radical damage to DNA has been implicated in cell death, cellular dysfunction and cancer. A recently developed method for detecting DNA radicals uses the nitron spin trap DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) to trap radicals. The trapped radicals then decay into stable nitron adducts detectable with anti-DMPO antibodies and quantifiable by ELISA or dot blot assays. However, the sequences of DNA that are damaged are likely to be as important as the total level of damage. Therefore, we have developed immunoblotting methods for detection of DNA nitron adducts on electrophoretically separated DNA, comparable to western blotting for proteins. These new techniques not only allow the assessment of relative radical adduct levels, but can reveal specific DNA fragments, and ultimately nucleotides, as radical targets. Moreover, we have determined that denaturation of samples into single-stranded DNA enhances the detection of DNA-DMPO adducts in our new blotting methods and also ELISA assays. These techniques are currently being applied to identifying sequences of DNA damaged during oxidative stress in the cytosolic peroxiredoxin-null *Saccharomyces cerevisiae* strain (*tsa1Δtsa2Δ*). Peroxiredoxins can reduce a wide range of peroxides via a peroxidase activity, act as molecular chaperones in response to oxidative stress and have been implicated in maintenance of genome stability. The strain *tsa1Δtsa2Δ* accumulates more DMPO adducts compared to wildtype in response to oxidative stress [1].

[1] Ogusucu, R. et al., J. Bio. Chem. 284:5546-5556; 2009.

Keywords: DNA, oxidation, immuno-spin trapping, peroxiredoxin

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.457

[0229]

Pro-oxidant effect of EGCG on genotoxicity of hexavalent chromium in mice in vivo

M.C. García-Rodríguez*, A.R. Montaña-Rodríguez, M. Altamirano-Lozano
UNAM, Mexico

The relevant system for the prevention of carcinogenesis in vivo includes the modulation of drug metabolism. Epigallocatechin gallate (EGCG) has strong antioxidant properties and is one of the four major green tea catechins. This compound may act as scavenger of reactive oxygen species (ROS) and as inhibitor of the enzyme activity. It is known that many dietary flavonoids have poor bioavailability, undergo extensive biotransformation and the potential biological activity of their metabolites needs to be further investigated using direct routes of administration such as intra-peritoneal (i.p.). This study was designed to evaluate the effects of direct administration of EGCG in vivo against genotoxic damage induced by CrO₃ in peripheral blood polychromatic erythrocytes (PCE). Mice were treated with EGCG (10 mg/kg); CrO₃ (20 mg/kg) or with EGCG and CrO₃ by i.p. route. DNA damage was evaluated by analysis of micronucleus (MN) using the acridine orange technique. Blood samples were obtained from the tail vein at 0, 24, 48 and 72 h after treatment. The results showed that the treatment with EGCG did not modify MN frequency. CrO₃ treatment resulted in a significantly increases MN frequency at 48 h after the injection, whereas the treatment with EGCG, prior to CrO₃, increased MN frequency compared with the group treated only with CrO₃. These results indicate that the increase of MN by CrO₃ is not blocked by the EGCG, but rather has a possible pro-oxidant effect. Our results contrast with recent studies in which the EGCG protects BEAS-2B cultured cells from Cr(VI)-induced cell death including apoptosis in a dose-dependent manner, as well as significantly decreased intracellular levels of ROS induced by Cr(VI) and dose-dependently reduces DNA-protein cross-links^[1]. Financial support was obtained from DGAPA-UNAM IN217712.

[1] Wu F., Sun H., Kluz T., Clancy H.A., Kiok K. and Costa M. Toxicol. Appl. Pharmacol. 258 (2012) 166-175.

Keywords: EGCG, Chromium (VI), Micronucleus, Pro-oxidant

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.458

[0239]

Accumulation of Si/SiO₂ quantum dots in liver and kidney modulates the antioxidant defense system of *Carrasius auratus gibelio*

A.I. Serban^{*1,2}, L. Stanca¹, S.N. Petrache¹, A. Dinischiotu¹

¹University of Bucharest, Romania, ²University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine Bucharest, Romania

Quantum dots (QDs) are semiconductor nanocrystals with stable fluorescence properties useful for biomedical imaging. In this study, we used 2.75-11.25 nm QDs formed by a crystalline silicon core surrounded by a SiO₂ shell. Our research highlights the in vivo effects of QDs on the redox status in the kidney and liver of *Carassius auratus gibelio*.

Fish were divided in two groups and intra-peritoneally injected with vehicle and with 2 mg QDs suspension per kilogram of body weight. After 1, 3, and 7 days, six fish from each group were sacrificed and the kidney and liver tissues were removed. The distribution of QDs was highlighted by fluorescent image analysis.

The oxidative stress markers such as: malondialdehyde (MDA), advanced oxidation protein products (AOPP) reduced glutathione (GSH) and the activities of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were investigated.

The QDs accumulated in kidneys and liver in a time dependent manner. The SOD and CAT activities increased continuously during all seven days. MDA levels increased in both tissues, and peaked after 3 days, with increases of 288% respectively 143% compared to controls. The higher MDA levels in the renal tissue could be attributed to the inhibition of GPX activity after 3 and 7 days by 38% respectively 27%, whereas the increased activity of GST prevented the accumulation of AOPP. In contrast, GST activity significantly decreased in the liver and AOPP levels doubled compared to control. The depletion of GSH was observed in both tissues, which correlates with the decrease of GR activity by about 35%, although G6PDH activity decreases only in the liver. This study

demonstrates that QDs accumulation in renal and hepatic tissues presents a potential risk correlated with the impairment of the antioxidant defense system.

Keywords: oxidative stress markers, Quantum dots, *Carrasius auratus gibelio*, antioxidant enzymes

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.459

[0240]

The effect of silicone quantum dots on Hsp60 and Hsp90 expression in liver and kidney of *Carrasius auratus gibelio*

A.I. Serban^{*1,2}, L. Stanca¹, S.N. Petrache¹, A. Dinischiotu¹

¹University of Bucharest, Romania, ²University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine Bucharest, Romania

Through electron or energy transfer to the molecular oxygen, quantum dot nanoparticles (QDs) can produce reactive oxygen species (ROS), and for this reason the potential of these nanoparticles for imaging applications raised concerns about their consequences on human and animal health.

Our goal was to investigate the effects induced in Hsp60 and 90 expression at transcriptional and translational levels by Si/SiO₂ QDs in liver and kidney of *Cyprinus carpio* upon IP injection of 2mg QDs per kg body weight after 1, 2 and 3 weeks of exposure. Fish were divided in two groups: one injected with 0.7% NaCl and the second with QDs suspension. The mRNA expression of Hsp60 and Hsp90 in target tissues was evaluated by qPCR. After 1, 2 and 3 weeks the relative expression ratios (R) of Hsp60 in liver were 0.45±0.03, 0.65±0.06 and 0.72±0.23 and for Hsp90 0.23±0.006, 0.42±0.01 respectively 1.03±0.03. In kidney, R values of Hsp90 were 0.31±0.006, 0.74±0.01 and 1.0±0.04 after 1, 2 respectively 3 weeks. The only upregulated protein at transcriptional level was Hsp60, the highest R value, 3.8±0.66 being after 1 week, whereas after 2 and 3 weeks R was 2.28±0.34 respectively 1.19±0.06. Similar modifications were observed by western blot analysis in both tissues.

The decline of Hsp90 in liver and kidney at mRNA and protein level may compromise cellular integrity, due to ROS formation induced by QDs, making the cells more lysis prone. Hsp60 has an important part of cellular protein homeostasis and the down regulation observed by us could indicate alterations in the protein turnover mechanisms. Our results show that QDs affect hepatic

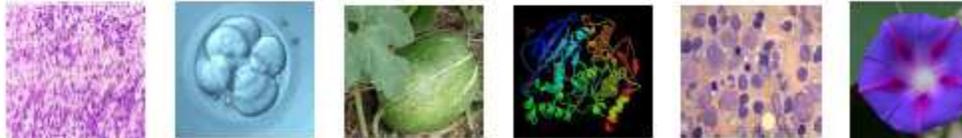
S219



XVII
SIMPOSIO
DEL
DEPARTAMENTO
DE
CIENCIAS
DE LA
SALUD

Memorias

Septiembre de 2012



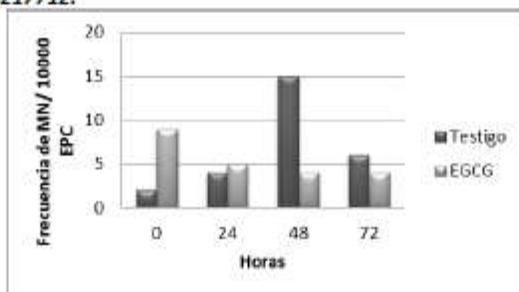
EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA *in vivo* DE LAS FRECUENCIAS DE MICRONÚCLEOS EN RATONES DE LA CEPA CD-1 TRATADOS CON (-)-EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO

Montaño-Rodríguez, Ana Rosa; Altamirano-Lozano, Mario Agustín y García-Rodríguez, María del Carmen*

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

La (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) es uno de los componentes polifenólicos más importantes del té verde. Se le ha descrito como un antioxidante capaz de prevenir la tumorigénesis al proteger a los componentes celulares del daño oxidante mediante la captura de radicales libres. También, se ha observado que la EGCG presenta actividad antimutagénica, anti-angiogénica, antiproliferativa y pro-apoptótica en estudios realizados principalmente *in vitro*. Sin embargo, pocos estudios han evaluado la toxicidad y la genotoxicidad *in vivo* de la EGCG. En este estudio se evaluó la cinética de las frecuencias de micronúcleos (MN) al ser administrada por vía intraperitoneal la EGCG en ratones de la cepa CD-1. Los ratones fueron tratados con 10 mg/kg de EGCG. El daño genotóxico se evaluó mediante el análisis de MN utilizando la técnica de naranja de acridina en eritrocitos policromáticos (EPC) de sangre periférica. Las muestras fueron tomadas de la vena caudal antes del tratamiento (hora 0) y a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. Los resultados muestran que la administración de 10 mg/kg de EGCG no incrementó las frecuencias de MN en ninguna de las horas evaluadas, sino por el contrario, al parecer disminuye los MN basales que presentaban los organismos. Estudios previos han reportado que la EGCG presenta actividad clastogénica^[1], sin embargo en nuestro estudio no se observó daño clastogénico evaluado mediante la formación de MN. Los resultados obtenidos en nuestra investigación, indican que la EGCG no presenta efectos genotóxicos *in vivo*, sino por el contrario los disminuye. A partir de nuestros resultados se sugiere continuar con estos estudios empleando otros protocolos que podrían permitir evaluar un efecto preventivo de la inducción de daño oxidante más consistente. *Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN217712.*

97



Cinética de las frecuencias de MN en ratones tratados con 10 mg/kg de EGCG por vía intraperitoneal

[1] Isbrucker RA, Bausch J, Edwards JA, Wolz E. *Food and Chemical Toxicology*. 44 (2006). 626-635.



Sociedad Mexicana de Genética
Universidad de Occidente



CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2012

A 50 AÑOS DEL DESCIFRAMIENTO DEL CÓDIGO GENÉTICO

MAZATLÁN INTERNATIONAL CENTER
MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO

DEL 3 AL 5 DE OCTUBRE

MEMORIAS

Revista Internacional de Contaminación Ambiental

volumen 28, suplemento 2, 2012



EFFECTO DE LA RUTA DE ADMINISTRACIÓN DEL CROMO (VI) EN ESTUDIOS A CORTO Y LARGO PLAZO SOBRE LA GENOTOXICIDAD EMPLEANDO EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN

García-Rodríguez MC*, Montaña-Rodríguez AR y Altamirano-Lozano MA

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

El Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH), la Agencia de Protección Ambiental (US-EPA) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), han clasificado a los compuestos de Cr (VI) como potentes carcinógenos humanos. Aunque el Cr (VI) presenta una baja actividad biológica, en concentraciones altas es capaz de atravesar la membrana celular y reducirse a Cr (III) produciendo radicales libres que pueden inducir daño al ADN. De ahí que, se ha recomendado realizar estudios en modelos animales para evaluar el daño genotóxico del cromo (VI) tanto por vía oral, como por vía intraperitoneal (i.p.). En este trabajo se estudiaron los efectos de la ruta de administración del Cr (VI) empleando protocolos a corto y largo plazo sobre la genotoxicidad en ratones de la cepa CD-1. Grupos de cinco ratones fueron tratados con CrO₃ por vía oral (1 µM *ad libitum* [largo-plazo] y 20mg/kg intragastricamente [corto-plazo]) y por vía i.p. (20 mg/kg [corto plazo]). La genotoxicidad fue evaluada mediante el ensayo de micronúcleos (MN) en sangre periférica, empleando la técnica de naranja de acridina. Los resultados muestran un incremento en la frecuencia de MN que resulto estadísticamente significativa en el grupo tratado por vía i.p. con CrO₃ en comparación con el grupo testigo, lo que corrobora el daño genotóxico del Cr (VI) *in vivo*. Sin embargo, la administración de las mismas dosis de CrO₃ por vía oral [corto y largo plazo] no incrementaron de forma estadísticamente significativa las frecuencias de MN, lo que sugiere que la vía de administración del CrO₃ juega un papel importante sobre la genotoxicidad de los compuestos de Cr (VI). Esto se debe probablemente a la reducción del Cr (VI) por las enzimas salivales y jugos gástricos, así como por su poca absorción intestinal y la ruta metabólica *in vivo*. El hecho de que el CrO₃ no haya inducido daño genotóxico por vía oral en nuestro estudio resulta de especial importancia ya que la principal vía de exposición al Cr (VI) es mediante la ingestión de agua potable y de bebidas o alimentos contaminados. Proyecto financiado por UNAM, PAPIIT-IN217712.



MEMORIA



IN VIVO EFFECT OF GREEN TEA FLAVONOIDS (EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE AND QUERCETIN) ON THE GENOTOXICITY OF HEXAVALENT CHROMIUM: ANTIOXIDANT AND PROOXIDANT

García-Rodríguez, M.C.*; Montañó-Rodríguez, A.R.; Nicolás-Méndez, T. and Altamirano-Lozano, M.A.

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

Inhibition of oxidative damage constitutes the first line of defense against DNA damage, and can be considered as the most effective way to prevent some forms of cancer. Flavonoids like quercetin and epigallocatechin-3-gallate (EGCG), present in green tea, have shown strong antioxidant properties. Quercetin is considered to be the most potent reactive oxygen species (ROS) scavenger, it has also shown *ex vivo* protection against H₂O₂-induced DNA damage, and has been suggested to empower the plasma endogenous antioxidant capacity^[1,2]. EGCG, the major green tea catechin, besides acting as a ROS scavenger, it has also shown antiproliferative and pro-apoptotic *in vitro* effects^[2]. On the other hand, hexavalent chromium [Cr (VI)] generates ROS during its reduction to Cr (III), leading to DNA damage. As part of our ongoing research program to evaluate chemopreventive or chemoprotective potential components of diet, the ability of quercetin and EGCG to reduce genotoxic damage induction, by Cr (VI) in peripheral blood polychromatic erythrocytes (PCE) of mice, was evaluated in the present study. Mice were treated with flavonoids (quercetin 100 mg/kg and EGCG 10 mg/kg); CrO₃ (20 mg/kg); or the flavonoid prior to CrO₃ administration. DNA damage was evaluated by analysis of micronucleus (MN), using the acridine orange technique. Blood samples were obtained from the tail vein at 0, 24, 48 and 72 h after each treatment. The results showed that the treatments with quercetin and EGCG alone did not modify MN frequency. CrO₃ treatment significantly increased MN frequency after the injection. However the group treated with quercetin and CrO₃ showed a partial decrease MN frequency 24, 48 and 72 after the administration of the treatments, but mainly at 24 h (64% reduction MN); suggesting a limited protection against chromium-induced-genotoxicity; whereas the treatment with EGCG, prior to CrO₃, showed a higher increase in MN frequency at 24 h (30% increase MN) compared with the group treated only with CrO₃ suggesting a pro-oxidant effect. These results indicate that quercetin is capable to prevent DNA damage possibly by ROS scavenging, but also that the increase of MN by CrO₃, is not blocked by the EGCG.

Financial support was obtained from DGAPA-UNAM IN217712.

[1] Philip J. *et al.* Antioxidant and Other Properties of Green and Black Tea at "Handbook of antioxidants" 2nd ed. Marcel Dekker, Inc, USA, 2002.

[2] Boots, A, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical.

Keywords: EGCG, quercetin, chromium (VI), micronucleus, flavonoids.



Universidad
de Guanajuato

Departamento de Ciencias Médicas
División Ciencias de la Salud
Campus León



13ª Reunión de Ciencias Médicas

24-26 de Abril 2013

Memorias

Efecto de la administración *in vivo* de componentes antioxidantes de la dieta humana sobre el daño al material genético inducido por la exposición a metales pesados con potencial cancerígeno (Cromo [VI]).

Ma. del Carmen García-Rodríguez*, Ana Rosa Montañó-Rodríguez, Gabriela Serrano-Reyes y Mario Altamirano-Lozano, M.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Batalla 5 de mayo s/n Esq. Fuerte de Loreto. Col. Ejército de Oriente. C.P. 09230, México D.F. Tel (55)56230772.

* carmen.garcia@unam.mx

Introducción

La dieta es reconocida como un factor importante en la modulación de enfermedades relacionadas con el daño al material genético. En estudios epidemiológicos y experimentales, se ha demostrado que algunas plantas comestibles o sus componentes presentan actividad como antimutágenos además de presentar efectos sobre la carcinogénesis humana^{1,2}, de ahí que, el estudio de sustancias con propiedades protectoras ó moduladoras del daño al material genético, surge como una opción complementaria a los estudios de genotoxicidad, ya que al conocer los mecanismos de protección se pueden generar alternativas para contrarrestar los efectos de los agentes inductores de daño.

La actividad antioxidante como mecanismo de protección, no solo comprende la captura de radicales libres (RL) y de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's), sino también la prevención de su formación y la reparación de las lesiones que ocasionan. Al estrés oxidante (EOx), se le ha relacionado con el daño genotóxico y en ese sentido, el estudio de sustancias con propiedades antioxidantes surge como una opción para la prevención y como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con el EOx y con el daño genotóxico³. El EOx está relacionado con el envejecimiento, además de favorecer la presencia o las complicaciones de enfermedades como: aterosclerosis, diabetes mellitus, alzheimer, diversos tipos de cáncer, así como de procesos inflamatorios y de isquemia/reperfusión, entre otros; por lo que el EOx constituye uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes. El concepto de EOx es considerado como un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de ERO's y RL o por una disminución de los sistemas antioxidantes^{2,4}. La generación de ERO's propicia la formación de RL, los que al tener un electrón impar o solitario en sus órbitas externas son altamente reactivos y pueden interaccionar con macromoléculas biológicas como el ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas; generando daño genotóxico de manera directa o indirecta que puede conducir a carcinogénesis^{2,5}. Los compuestos del cromo [VI] han sido ampliamente estudiados, debido a que forman parte de una gran variedad de compuestos utilizados en la industria y por su asociación con la inducción de cáncer^{6,7}. Si bien, el Cr [III] es un micronutriente esencial que juega un papel importante en el metabolismo de proteínas, azúcares y grasas, el Cr [VI] puede generar ERO's y RL durante su reducción intracelular a Cr [III] e inducir daño genotóxico, incluso se ha planteado que la carcinogénesis del Cr [VI] puede ser iniciada y promovida por esta reducción intracelular⁸. Aunque en estudios *in vitro* e *in vivo* se ha probado la capacidad antioxidante de algunos componentes de la dieta como los flavonoides, los β-carotenos (precursor de vitamina A), así como las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (tocoferoles y tocotrienoles) además de algunos pigmentos como la clorofila y sus sales⁹⁻¹¹, existen pocos

LIBRES ORALES

estudios sobre su posible efecto protector *in vivo* del daño al material genético inducido por sustancias cancerígenas que generan EOX, mediante la formación de ERO's y RL. Por lo que, el presente estudio se diseñó para evaluar los efectos de la administración *in vivo* de componentes antioxidantes de la dieta humana sobre el daño al material genético inducido por metales cancerígenos (Cr [VI]), mediante la evaluación de MN en Eritrocitos Policromáticos (EPC) de sangre periférica de ratones de la cepa CD-1 tratados con trióxido de cromo.

Material y Método**Animales**

Se emplearon ratones de la cepa CD-1 entre 45 y 60 días de edad con un peso de 28 a 35 g. Los ratones se obtuvieron del bioterio Harlan de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se alimentaron con nutricubos (Purina) y se les permitió libre acceso al agua. Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo condiciones de temperatura y circulación de aire controladas, así como periodos de luz-oscuridad de 12-12 horas, durante el tiempo que duro el experimento.

Reactivos

Al menos que se indique, todos los reactivos empleados en el estudio fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Trióxido de cromo [CAS No. 1333-82-0], ácido ascórbico $C_6H_8O_6$ [CAS No. 50-81-7], α -tocoferol $C_{29}H_{50}O_2$ [CAS No. 10191-41-0], β -caroteno $C_{40}H_{56}$ [CAS No. 7235-40-7], (-)-Epigallocatequina-3-galato (EGCG) extraída de té verde [CAS No. 989-51-5].

Tratamientos

El ácido ascórbico, la EGCG y el trióxido de cromo fueron preparados en solución mediante su disolución en agua destilada estéril, mientras que el α -tocoferol y el β -caroteno fueron disueltos en aceite de maíz. Una vez preparados los reactivos, se administraron inmediatamente en un volumen de 0.25 ml. Se conformaron grupos experimentales tomados al azar de cinco ratones cada uno, divididos de la siguiente forma: a) Grupo Testigo, solo se le administró el vehículo (aceite de maíz); b) Grupo Antioxidantes: se les administraron los diferentes antioxidantes (ácido ascórbico, alfa-tocoferol, beta-caroteno o EGCG); c) Grupo Cr [VI], se les aplicó 20 mg/kg de trióxido de cromo por vía intraperitoneal y d) Grupo Antioxidantes-Cr[VI], se les administraron los antioxidantes previo a la aplicación del trióxido de cromo. Los tratamientos de ácido ascórbico (150 mg/kg de peso corporal) y EGCG (10 mg/kg) se administraron por vía i.p, mientras que los tratados con alfa-tocoferol (100 mg/ kg) y beta-caroteno (20 mg/ kg) se administraron por vía oral (sonda intragástrica) utilizando como vehículo aceite de maíz. Todos los tratamientos se administraron en una sola dosis. Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo se establecieron con base en los lineamientos de los programas de la GENOTOX, y la FDA¹²⁻¹⁴.

Preparación de laminillas, toma de muestras y evaluación

Para la evaluación del daño al ADN se siguió la técnica de Micronúcleos propuesta por Hayashi *et al.* (1990)¹⁵. Se prepararon laminillas cubiertas con naranja de acridina (Química Meyer) a las que se les colocaron las muestras de sangre obtenidas de la vena caudal y se guardaron en cajas de plástico

en la oscuridad a 4 °C hasta su evaluación. Las evaluaciones se realizaron mediante la identificación de los eritrocitos normocromáticos (ENC), de los EPC y de los MN bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2). La tinción diferencial que se obtuvo con la naranja de acridina, diferenció a los EPC de los ENC, ya que los EPC se tiñen de rojo-anaranjado fluorescente debido al ARN-ribosomal, y los MN se tiñen de color amarillo fluorescente por su contenido de ADN (Fig. 1). Se analizaron 2000 EPC por cada ratón, en los que se identificó la presencia o ausencia de MN para la evaluación del daño al material genético.

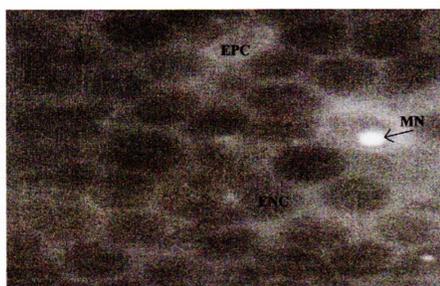


Fig. 1. Frotis de sangre de ratón teñida con naranja de acridina, donde se muestran ENC, EPC y EPC con un MN.

Análisis Estadístico

A las evaluaciones de MN se le calculó el valor absoluto de la frecuencia neta de la inducción de MN (por sus siglas en inglés NIF). Esta frecuencia parte de la premisa de que la inducción de los MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que, al restarle el número de MN evaluados en la hora 0 a las siguientes horas, se asume que se obtiene la inducción “neta” de MN¹⁶. Los valores del NIF se analizaron con una Chi-cuadrada. Se empleó el programa Statistica/PC V 6.0TM, para hacer los análisis estadísticos. Para todos los casos se consideró el nivel de significancia de $p < 0.05$ ¹⁷.

Resultados

En los resultados obtenidos se observó que la administración sola de los tratamientos antioxidantes (ácido ascórbico, alfa-tocoferol, beta-carotenos y EGCG) no incrementa la frecuencia de MN (Fig.2), sino por el contrario, para el caso del ácido ascórbico se reduce la frecuencia basal de MN. Sin embargo, en el grupo tratado con trióxido de cromo, se presentó un incremento en las frecuencias de MN principalmente a las 24 y 48 horas en las que resultaron estadísticamente significativos con respecto al grupo testigo y a su propia hora 0.

Cuando se administraron los antioxidantes previo a la aplicación del trióxido de cromo, se redujeron las frecuencias de MN en todos los grupos excepto con la EGCG en comparación con el grupo tratado solo con el compuesto de Cr [VI]. La mayor protección se presentó a las 48 horas en el siguiente orden: ácido ascórbico (57%) > alfa-tocoferol (46%) > beta-caroteno (24%). Particularmente, con la administración del beta-caroteno, se observó un efecto dual, ya que disminuyeron las frecuencias de MN a las 24 y 48 horas, pero se incrementaron a las 72 horas, lo que nos permite sugerir que el β -caroteno

LIBRES ORALES

presenta tanto un efecto antioxidante, como pro-oxidante. Por el contrario, en el caso de la EGCG solo se observa un efecto pro-oxidante, ya que se incrementaron las frecuencias de MN en todos los tiempos de evaluación en comparación con el grupo tratado solo con trióxido de cromo a la hora 48 (de hasta un 53%) (Fig. 2).

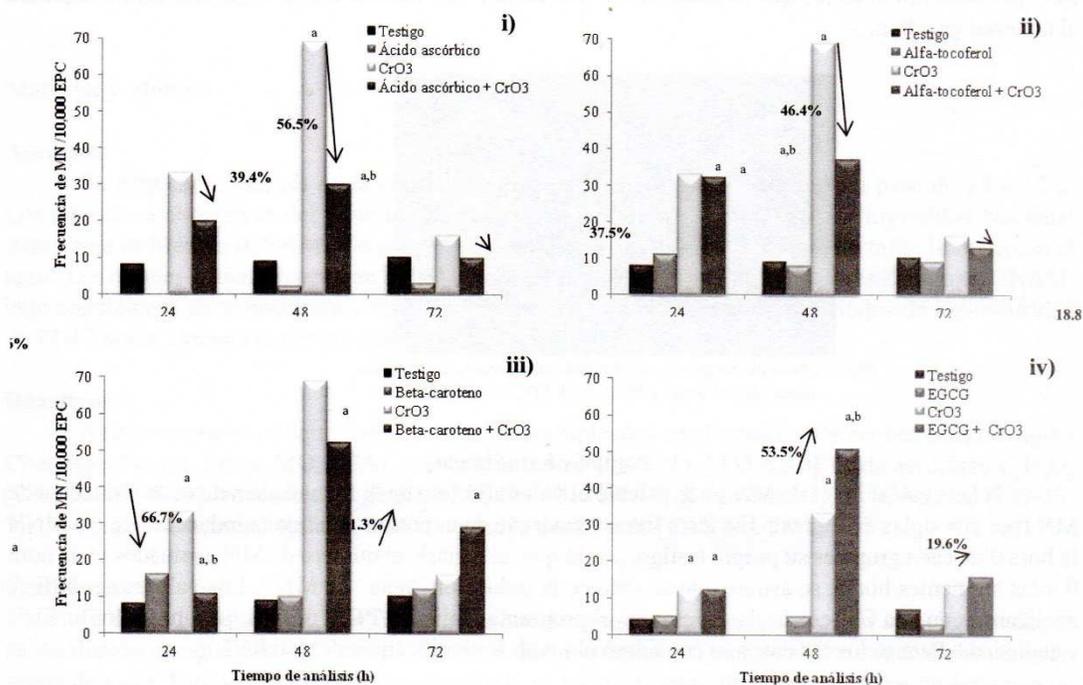


Fig. 2. Efecto de los antioxidantes sobre la inducción de MN en sangre periférica de ratones tratados con trióxido de cromo: i) ácido ascórbico, ii) α -tocoferol, iii) β -caroteno y iv) EGCG. Representación del valor absoluto de los datos obtenidos de MN por 10000 EPC al realizarles el cálculo del NIF.
^a $p < 0.05$ vs testigo; ^b $p < 0.05$ vs trióxido de cromo.

Discusión

En el presente estudio se empleó un modelo *in vivo*, para estudiar los efectos de algunos de los componentes antioxidantes de la dieta sobre el daño al material genético inducido por metales cancerígenos tal es el caso de los compuestos del Cr [VI], con este tipo de estudios se contribuye por una parte, al planteamiento de estrategias para tratar y prevenir enfermedades relacionadas con el EOX, y por otra parte para inferir el modo de acción de los agentes protectores del daño genotóxico (desmutagenesis y bioantimutagénesis), en este caso de los antioxidantes: ácido ascórbico, beta-caroteno, alfa-tocoferol y EGCG.

El ensayo de MN ha sido propuesto como una herramienta útil para la medición de genotoxicidad *in vivo*. Los MN son cromosomas completos que se rezagan durante la anafase y no son incorporados al núcleo principal durante la división celular o pueden ser fragmentos de cromosomas, por lo que los MN son indicativos de daño al material genético^{12,13}. El aumento en las frecuencias de MN en el grupo tratado con el trióxido de cromo es indicativo de daño genotóxico, ya que los lineamientos de la FDA y la OECD señalan que una sustancia o compuesto es considerado como un agente genotóxico cuando es capaz de inducir más de 4 MN/1000 EPC^{18,19} (Fig. 2). El daño genotóxico observado en el presente trabajo por la administración del trióxido de cromo corrobora los resultados reportados previamente tanto por nuestro grupo de trabajo como por otros grupos, quienes también observaron daño genotóxico mediante el incremento en la frecuencia de AC, así como de rompimientos de cadena sencilla y doble del ADN y de mutaciones puntuales^{10,20-22}. La inducción del daño genotóxico por el Cr [VI] se relaciona con los procesos bioquímicos involucrados en el ciclo redox y la generación de ERO's y RL, ya que se ha propuesto que el Cr [VI] al atravesar la membrana celular puede ser reducido intracelularmente y producir reactivos intermedios como el Cr [V], Cr [IV] y finalmente Cr [III]²³. El mecanismo más importante de la activación del oxígeno por metales de transición, involucra a la reacción de Fenton/Haber-Weiss, que genera el radical hidroxilo (OH[•]), el cual es altamente reactivo y capaz de dañar al ADN. En el ciclo de Haber-Weiss, el Cr [VI] puede catalizar la formación de radicales OH[•] a partir del radical superóxido (O₂^{•-}), esto es, el radical (O₂^{•-}) puede reducir al Cr [VI] para generar Cr [V], el cual puede reaccionar con el H₂O₂ para producir el radical OH[•] y generar nuevamente Cr [VI]^{24,25}. Al administrar *in vivo* el ácido ascórbico, los beta-carotenos y el alfa-tocoferol, se moduló el daño al material genético inducido por el trióxido de cromo, el cual es un agente también identificado como cancerígeno. El posible mecanismo de protección de los antioxidantes podría estar relacionado con la captura e inactivación de ERO's y RL generadas por la reducción del Cr [VI] al Cr [III]. El efecto protector de los componentes antioxidantes de la dieta sobre el daño al material genético que observamos en el presente estudio genera grandes expectativas, ya que se ha encontrado en pacientes con algunos tipos de cáncer la formación de aductos, por lo que existe la posibilidad de que los componentes antioxidantes de la dieta puedan disminuir e incluso proteger de la inducción de estos tipos de cáncer²⁵. Sin embargo, las perspectivas para la aplicación de estos agentes protectores de daño al material genético aún son limitadas, ya que, si bien ya se están estudiando los mecanismos de protección que ejercen estos agentes, es necesario conocer los mecanismos de inducción del daño, para identificar el proceso de iniciación, promoción y progresión del cáncer, y saber en qué momento y bajo qué condiciones debe ser aplicado el tratamiento, y por lo tanto obtener una mayor eficacia^{26,27}.

Por otra parte, si bien se ha demostrado *in vitro* que los polifenoles son capaces de capturar RL como el 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), los radicales hidroxilo (OH[•]) y lípidos derivados de los

LIBRES ORALES

RL, los cuales pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades como el cáncer^{28,29}, en nuestro estudio observamos que la administración *in vivo* de la EGCG no disminuyó el daño al material genético inducido por el trióxido de cromo, por el contrario lo incrementó, sugiriendo un efecto pro-oxidante. Estudios previos realizados con EGCG *in vitro* reportaron que el flavonoide es capaz de proteger a las células del daño inducido por compuestos de Cr [VI], sugiriendo como principal mecanismo a la captura de RL^{30,31}. Sin embargo, también se ha encontrado en otros modelos también *in vitro*, que la EGCG puede presentar efectos tanto antioxidantes como prooxidantes, teniendo una relación dependiente de la dosis empleada, donde dosis bajas protegen y dosis altas incrementan el daño al ADN³¹, situación que pudiera estar relacionada con nuestras observaciones.

Conclusiones

La administración *in vivo* de ácido ascórbico, alfa-tocoferol, beta-carotenos y EGCG no inducen daño al material genético mediante el incremento en la frecuencia de MN. Particularmente, el ácido ascórbico es el antioxidante que presentó un mayor efecto protector del daño causado al material genético por la administración del trióxido de cromo. El posible mecanismo de protección de los antioxidantes estudiados podría estar relacionado con la captura e inactivación de las ERO's y los RL generados por la reducción del Cr [VI] al Cr [III]. Por otra parte, el beta-caroteno aunque presenta protección, también presenta un incremento de la frecuencia de MN a las 72 horas, lo que podría estar indicando un efecto dual como antioxidante y pro-oxidante. Mientras que, el incremento en la frecuencia de MN observada en el grupo tratado con EGCG indica que la EGCG no es capaz de bloquear el daño generado por el Cr [VI], por el contrario, lo aumenta, sugiriendo una actividad pro-oxidante.

A partir de nuestras observaciones podemos sugerir que el consumo de antioxidantes en la dieta humana, genera expectativas para su posible aplicación en la quimiopreención del daño al material genético, lo cual podría conducir a una futura aplicación para prevenir procesos de carcinogénesis y mutagénesis. Por lo que, es necesario ampliar este tipo de estudios para obtener datos concluyentes sobre los posibles beneficios en la salud humana.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), mediante la DGAPA con el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), No. de Proyecto IN217712. También queremos expresar nuestro particular agradecimiento a Lourdes Hernández Sánchez por su apoyo técnico.

Referencias

1. Surh, Y-J y Ferguson, LR. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potencial-highlights of a symposium. *Mutat Res* 2003; 523-524, 1-8.
2. Ames BN, Shigenaga, MK, Hagen, TM. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proc Nat Acad Sci* 1993; 90 (17): 7915-7922.
3. García-Rodríguez MC, Vilches-Larrea RE, Nicolás-Mendez T y Altamirano-Lozano MA. El té verde en la quimiopreención *in vivo* del daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (cromo [VI]). *Nutr Hosp* 2012; 27(4): 1204-1212.

4. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* 1992; 275: 257-266.
5. Klauning J, Kamendulis L. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 239-267.
6. EPA, Environmental Protection Agency. Toxicological review of hexavalet chromium: In Support of Summary Information on the Integrated Risk information System (IRIS). Office of Research and Development, Washington, DC.
7. Hartwig A. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* 1995; 8: 3-11.
8. CDPC Chromium Draft for Public Comment U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry Comment Period Ends: February 18. 1992.
9. Konopacka M, WideL M, Rzeszowka-Wolny J. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutat. Res.* 1998; 417(2-3):85-94.
10. García-Rodríguez, M C y Altamirano-Lozano, M. Sales de sodio y cobre de la clorofila: Usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígeno. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 2001; 4, 77-86.
11. García-Rodríguez MC, Serrano-Reyes G, Altamirano-Lozano M. Comparative study in vivo of the genotoxic damage induced by CrO₃ and the effects of the antioxidants: Ascorbic acid, alpha-tocopherol and beta-carotene. *Free Radical Biology and Medicine, Volume 53, Supplement 1*, 2012: 218-19.
12. 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* 1990; 239: 29-80.
13. Hayashi M, Tice R, MacGregor J, Anderson D, Blakey D, Kirsh-Volders M, Oleson F, Pacchierotti F, Romagna F, Shimada H, Sutou S, Vannier B. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 1994; 312: 293-304.
14. FDA. Food and Drug Administration: Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. USA. 2000.
15. 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: 245-249.
16. García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res* 2001; 496: 145-151.
17. Adler I-D, Bootman J, Favor J, Hook G, Schriever-Schwemmer G, Welzl G, Whorton E, Yoshimura I, Hayashi M. Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat Res* 1998; 417: 19-30.
18. Heddle AJ, Hite M, Kirkhart MK, Salamone FM. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, *Ed. Elsevier Science Publisher* 1983; 165-1110.
19. Topham J, Albanese R, Bootman J, Scott D, Tweats D. In vivo cytogenetic assays, En: UKEMS Sub-committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. *Report Part I, Basic test Battery*, Ed. B.J. Dean, *United Kingdom Environmental Mutagen Society*, Swansea, 1983, pp. 119-141.
20. García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. Estudio de la cinética de MN-PCE por CrO₃ en sangre periférica de ratón, usando la técnica de naranja de acridina. *Genet Mol Biol* 1998; 21: 146.
21. De Flora S, Bagnaso M, Serra D, Zancacchi P. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res* 1990; 238: 99-172.
22. Sarkar D, Sharma A, Talukder G. Comparison of the effects of crude extract of spinach-beet leaves and equivalent amounts of chlorophyll and chlorophyllin in modifying the clastogenic activity of chromium (VI) oxide in mice. *Phytother Res* 1994; 9: 199-202.
23. 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; 292: 323-327.
24. O'Brien CS, Patierni S. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res* 2003; 533: 3-36.
25. Peluso M, Airoidi L, Magagnotti C, Fiorini L, Munnia A, Hautefeuille A, et al. White blood cell DNA adducts and fruit and vegetable consumption in bladder cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 183-7.
26. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308.
27. Díaz GD, Qingjie L, Daswood RH. Caspase-8 apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. *Cancer Res* 2003; 63: 1254-61.

LIBRES ORALES

28. Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S, Xin W. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synapotosomes. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1304: 210-222.
29. Shi X, Ye J, Leonard SS, Ding M, VallyathanV, Castranova V, Rojasanakul Y, Dong Z. Antioxidant properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its inhibition of Cr(VI)-induced DNA damage and Cr(VI)- or TPA-stimulated NF-KappaB activation. *Mol Cell Biochem* 2000; 206: 125-132.
30. Fen Wu, Hong Sun, Thomas Kluz, Hailey A. Clancy, Kathrin Kiok, Max Costa. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2013; 258 166–175.
31. Melissa K. Johnson, George Loo. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res* 2000; 459, 211–218.

REVista INTERNacional
de
CONTAMinación
AMBIEntal

volumen 29, suplemento 4, 2013

<http://www.revistas.unam.mx/index.php/rica/>

MEMORIAS

CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2013

A 100 años de la creación del Primer Mapa Genético de un Cromosoma
A 10 años de la culminación del Proyecto Genoma Humano

SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA

Editores

JUANA SÁNCHEZ-ALARCÓN
RAFAEL VALENCIA-QUINTANA
SANDRA GÓMEZ-ARROYO
RAFAEL VILLALOBOS-PIETRINI
CLAUDIO AMESCUA-GARCÍA

Rev. Int. Contam. Ambic. 29, Supl. 4, 2013

CNG2013 057

ESTUDIO DE LAS FRECUENCIAS DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN CD-1 TRATADOS CON TRIÓXIDO DE CROMO, SULFATO DE TALIO Y PENTÓXIDO DE VANADIO *IN VIVO*

Altamirano-Lozano MA, Montaña-Rodríguez AR, García-Cárdenas GP, Peralta-García P y García-Rodríguez MC*

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM México D.F. Tel. 56230772

carmen.garcia@unam.mx;

La contaminación ambiental por metales pesados potencialmente tóxicos, constituye en la actualidad una preocupación a nivel mundial por los riesgos que conlleva para la salud humana. Se ha observado que una de las vías de inducción de daño genotóxico es mediante el estrés oxidante. Compuestos metálicos como los del cromo hexavalente (Cr [VI]) al atravesar la membrana celular son capaces de reducirse a Cr [III] y producir radicales libres que pueden interaccionar y dañar biomoléculas como las proteínas, los lípidos y al ADN. Mientras que, los compuestos metálicos del talio monovalente (Tl [I]) y del vanadio pentavalente (V [V]) aunque han mostrado efectos tóxicos y citotóxicos, existen pocas evidencias *in vivo* de sus efectos sobre el ADN y de la posible vía de inducción de daño. En el presente estudio se evaluaron los efectos genotóxicos de compuestos del Cr [VI], Tl [I] y V [V], para lo cual se analizaron las frecuencias de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos (EPC) de sangre periférica de ratón (CD-1). Grupos de cinco ratones fueron tratados con CrO₃ (20 mg/kg), Tl₂SO₄ (20, 30, 40, 70 y 100 mg/kg) y V₂O₅ (10, 20, 25, 40 y 50 mg/kg). Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos. Los resultados mostraron un incremento significativo en la frecuencia de MN del grupo tratado con CrO₃, lo que corroboró su daño genotóxico *in vivo*. Sin embargo, los incrementos de MN observados en los grupos tratados con Tl₂SO₄ y V₂O₅ no fueron significativos al compararse con el grupo testigo, salvo en las dosis muy altas que indujeron letalidad en los organismos, lo que sugiere un bajo potencial genotóxico *in vivo* bajo nuestras condiciones de trabajo. Particularmente el Tl₂SO₄ presentó una disminución significativa en las frecuencias de EPC, lo que corrobora su efecto citotóxico. **Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN217712.**