



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**EFFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES DEL TÉ VERDE
(EXTRACTO DE POLIFENOLES [P60], CATEQUINAS Y
KAEMFEROL) SOBRE LA INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS
Y DE APOPTOSIS EN RATONES TRATADOS CON Cr (VI)**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

Megumi Monserrat Carvente Juárez

Director de tesis: Dra. María del Carmen García Rodríguez



México D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

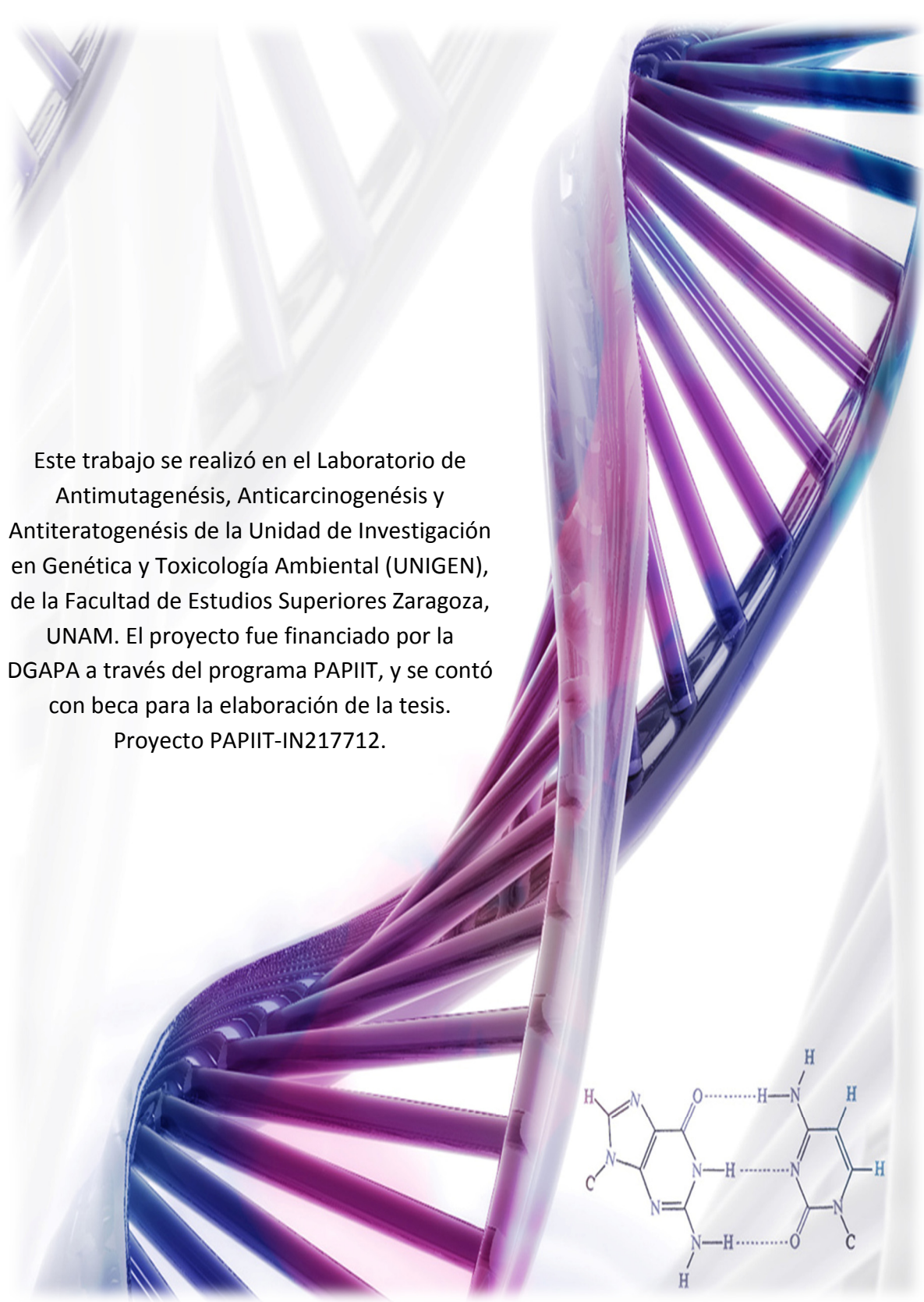


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

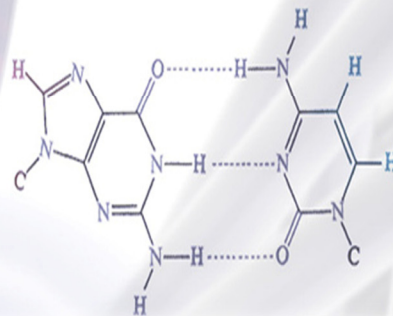
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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



Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a **mis padres Miguelina Juárez y Pedro Carvente**: Porque han sabido formarme con buenos, hábitos. Gracias por su apoyo, esfuerzos, consejos y comprensión. Con amor les dedico todo mi esfuerzo y trabajo puestos en la realización de esta tesis.

A mi hermano Julio César Carvente Juárez: Por la oportunidad de tener un cómplice en todas las situaciones, de mi vida y aunque nuestras vidas año con año van tomando rumbos diferentes, cuentas conmigo siempre.

A Oscar Samuel Ávila Rosales: Por ser esa persona que da lo mejor de sí sin esperar nada a cambio. Sobre todo por el apoyo y confianza, que me has transmitido día con día con tan solo creer en mí. Por ser mi mejor amigo y porque sé que siempre estarás apoyándome en cada nuevo reto que se presente. ¡Somos el mejor de los equipos!

A la Dra. María del Carmen García Rodríguez: Porque aun sin conocerme me brindó la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo para realizar esta tesis bajo su dirección. Por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la confianza en mi trabajo.

Al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano: Por ser un referente intelectual, pues siempre he admirado su visión científica. Con toda mi admiración a su labor y experiencia como docente e investigador gracias por ser un excelente maestro y gran ejemplo.

A mis revisores, M. en C. Carlos Bautista Reyes, Q. Martha Trinidad Julieta Oliveros García y Biól. María Cristina Alvarado Domínguez: Por su importante aporte en la mejora de esta tesis. Debo destacar su disponibilidad y paciencia, no cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado.

A todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto: por su amistad, apoyo, ánimo y compañía. Sin importar donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mi vida, y por la orientación que siempre me han otorgado.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Índice de abreviaturas	3
1. Introducción	6
1.1. Antioxidantes	7
1.2. Polifenoles y flavonoides	7
1.3. Antioxidantes del té verde	12
1.3.1. Efectos de los polifenoles del té verde	15
1.3.2. Efectos de las catequinas	16
1.3.3. Efectos del kaemferol	17
1.4. Estrés oxidante	18
1.4.1. Especies reactivas y Radicales libres	19
1.5. Genotoxicidad	19
1.5.1. Daño oxidante al ADN	20
1.5.2. Agentes inductores de daño genotóxico	21
1.5.3. Metales pesados	21
1.5.4. Compuestos de Cr VI	22
1.5.4.1. Mecanismos de inducción de daño genotóxico del Cr VI	26
1.6. Ensayos para la evaluación del daño genotóxico	28
1.6.1. Micronúcleos	29
1.7. Apoptosis y necrosis	31
2. Planteamiento del problema	34
3. Hipótesis	34

4. Objetivos	34
4.1. Objetivo general	35
4.2. Objetivos particulares	39
5. Material y método	36
5.1. Animales	36
5.2. Reactivos	36
5.3. Tratamientos	36
5.4. Establecimientos de las dosis	42
5.5. Evaluación de la inducción de MN en EPC y la relación de EPC con respecto a ENC	43
5.5.1. Preparación de laminillas	43
5.5.2. Toma de muestras	43
5.5.3. Evaluación de muestras	43
5.6. Evaluación de la viabilidad, apoptosis y necrosis	45
5.6.1. Preparación de colorantes	45
5.6.2. Toma de muestras	45
5.6.3. Evaluación de muestras	46
5.7. Análisis estadístico	48
6. Resultados	48
6.1. Efecto del extracto de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol sobre MN inducidos por el CrO ₃	49
6.2. Efecto del extracto de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol sobre el daño citotóxico inducido por CrO ₃	61

6.3. Efecto del extracto de polifenoles de té verde, catequinas, kaemferol y CrO ₃ sobre la viabilidad celular	65
6.4. Efecto del extracto de polifenoles de té verde, catequinas, kaemferol y CrO ₃ sobre la inducción de apoptosis	68
7. Discusión	74
8. Conclusiones y comentarios finales	88
9. Referencias	91
10. Anexos	103

Resumen

Se realizó el presente estudio para investigar los efectos moduladores de los extractos de polifenoles de té verde (P60), catequinas y kaemferol sobre el daño genotóxico y actividad apoptótica inducida por el cromo hexavalente [Cr (VI)] en sangre periférica de ratones CD-1. Los animales se dividieron en los siguientes grupos: (1) animales tratados únicamente con el vehículo, (2) animales tratados con los extractos de polifenoles de té verde (30 mg/kg) a través de sonda o vía intraperitoneal, animales tratados con 500 mg/kg de catequinas por vía intraperitoneal, animales tratados con 150 mg/kg de kaemferol vía intraperitoneal, (3) animales tratados con Cr (VI) (20 mg/kg de CrO₃) por vía intraperitoneal y (4) animales tratados con ya sea con los extractos de polifenoles de té verde, catequinas o kaemferol, cuatro horas previas al tratamiento con Cr (VI). El daño genotóxico se evaluó mediante la evaluación de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de sangre periférica (MN) obtenidos de sangre periférica de la vena caudal del ratón a las horas 0, 24, 48 y 72 después del tratamiento. La inducción de la apoptosis y la viabilidad celular se evaluó mediante la tinción diferencial con naranja de acridina y bromuro de etidio (NA /BrEt). Los tratamientos de ratones CD-1 con extractos de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol no modificaron las frecuencias de MN. Mientras que, el tratamiento con CrO₃ aumentó significativamente la inducción de MN a las 24, 48 y 72 h después del tratamiento. Los tratamientos con extractos de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol cuatro horas previas al tratamiento con CrO₃ disminuyeron significativamente la inducción de MN en comparación con el grupo tratado sólo con CrO₃. La viabilidad celular no se afectó en los tratamientos con extractos de polifenoles de té verde previo al tratamiento con CrO₃ ni en el tratamiento con kaemferol previo al tratamiento con CrO₃; por el contrario el tratamiento con catequinas previo al tratamiento con el CrO₃, si disminuye la viabilidad celular. Al realizarse el análisis de apoptosis se observó que el tratamiento con extracto de polifenoles de té verde al igual que los tratamientos con catequinas y el tratamiento con kaemferol no incrementan significativamente el número de células viables apoptóticas y células no-viables apoptóticas en comparación con sus respectivos grupos testigo. Por su parte el tratamiento con extracto de polifenoles de té verde previo al tratamiento con CrO₃ incrementa significativamente el número de células viables apoptóticas. También se observó que el tratamiento con catequinas previo al tratamiento con CrO₃. Disminuye significativamente el número de células viables apoptóticas e incrementa significativamente las células no-viables apoptóticas lo que sugiere que este es el posible mecanismo de reducción de las frecuencias de MN por parte del extracto de polifenoles y catequinas del té verde. El tratamiento con kaemferol previo al tratamiento con CrO₃ no modifica significativamente número de células viables apoptóticas y células no-viables apoptóticas. Nuestros resultados apoyan los efectos protectores propuestos previamente para los polifenoles del té verde contra el daño genotóxico inducido por Cr (VI).

Abstract

The present study was conducted to investigate the modulating effects of green tea polyphenol extracts (P60), catechins and kaemferol on genotoxic damage and apoptotic activity induced by hexavalent chromium [Cr (VI)] in peripheral blood of CD-1 mice. Animals were divided into the following groups: (1) animals injected with vehicle only; (2) animals treated with green tea polyphenol extracts (30 mg/kg) via gavage or intraperitoneally, animals treated with 500 mg/kg of catechins, animals treated with 150 mg/kg kaemferol; (3) animals injected with Cr (VI) (20 mg/kg of CrO₃) intraperitoneally; and (4) animals treated with green tea polyphenol extracts in addition to Cr (VI), animals treated with catechins in addition to Cr (VI), animals treated with kaemferol in addition to Cr (VI). Genotoxic damage was evaluated by examining micronucleated polychromatic erythrocytes of peripheral blood (MN) obtained from the caudal vein at 0, 24, 48 and 72 h after treatment. Induction of apoptosis and cell viability were assessed by differential acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining. Treatment of CD-1 mice with green tea polyphenol extracts, catechins and kaemferol led to no significant changes in the average number of induced MN. However, CrO₃ treatment significantly increased MN induction at 24 and 48 h post-injection. Treatment with green tea polyphenol extracts, catechins or kaemferol prior to CrO₃ injection led to a decrease in MN induction compared to the group treated with CrO₃ only. The average number of apoptotic cells was increased at 48 h post-treatment compared to control mice, suggesting that apoptosis could contribute to eliminate the DNA damaged cells (MN) induced by Cr (VI) when green tea polyphenol extracts were administered prior to CrO₃ injection. Our findings support the proposed protective effects of green tea polyphenol extracts against the genotoxic damage induced by Cr (VI). Cell viability was not affected by treatment with extract of green tea polyphenols prior to treatment with CrO₃ neither by treatment with kaemferol prior to treatment with CrO₃ in contrast the treatment with catechins prior to treatment with CrO₃ decreases the cell viability. When apoptosis analysis was performed was observed that treatment with extract of green tea polyphenols as well as treatments with catechins and kaemferol do not significantly increase the number of apoptotic cells and non-viable versus apoptotic cells with their respective control groups. While the treatment with extract green tea polyphenols prior to treatment with CrO₃ significantly increased the number of apoptotic cells viable. We also observed that treatment with catechins prior to treatment with CrO₃ significantly reduces the number of apoptotic cells viable and significantly increases apoptotic cells non-viable, suggesting that apoptosis is the possible mechanism for reducing the frequencies of MN by the extract green tea polyphenols and catechins. Treatment with kaemferol prior to CrO₃ injection no modify the number of viable apoptotic and viable non-apoptotic cells. Our results support the previously proposed protective effects of green tea polyphenols against genotoxic damage induced by Cr (VI).

Índice de abreviaturas

AC	Aberraciones cromosómicas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFB1	Aflatoxina B1
Apaf-1	Factor 1 de la activación de la apoptosis
ATP	Adenositrifosfato
ATSDR	<i>“Agency for Toxic Substances and Disease Registry”</i>
BrEt	Bromuro de etidio
CaCrO ₄	Cromato de calcio
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
COX	Ciclooxigenasa
Cr (III)	Cromo trivalente
Cr (IV)	Cromo tetravalente
Cr (V)	Cromo pentavalente
Cr (VI)	Cromo hexavalente
CrO ₃	Trióxido de cromo
Cu (I)	Cobre monovalente
Cu (II)	Cobre divalente
DIF	<i>“Differential Induction Frequency”</i>
e-	Electrón
ECETOC	<i>“European Center for Ecotoxicology of Chemicals”</i>
ECG	(-)-Epicatequina-3-galato
EGC	(-)-Epigallocatequina
EGCG	(-)-Epigallocatequina-3-galato

Efecto de los antioxidantes del té verde sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI)

ENC	Eritrocitos normocromáticos
EPA	<i>“Environmental Protection Agency”</i>
EPC	Eritrocitos policromáticos
ERO's	Especies Reactivas de Oxígeno
EOx	Estrés oxidante
FADD	Dominio Fas asociado a muerte
FasL	Ligando Fas
FDA	<i>“Food and Drug Administration”</i>
Fe (II)	Hierro divalente
Fe (III)	Hierro trivalente
GC	(+) Galocatequina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
i.g.	Intragástrica
i.p.	Intraperitoneal
IARC	<i>“International Agency for Research on Cancer”</i>
ICH	Intercambio de Cromátidas Hermanas
ICH4	<i>“International Conference on Harmonization”</i>
IL-6	Interleucina 6
IQ	2-amino-3-metilimidazol [4,5-f] quinilona
K ₂ Cr ₂ O ₇	Dicromato de potasio
K ₂ CrO ₇	Cromato de potasio
LD50	Dosis letal media
MN	Micronúcleos
MNU	N-nitroso-N-metilurea

Efecto de los antioxidantes del té verde sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI)

NA	Naranja de Acridina
Na ₂ CrO ₄	Cromato de sodio
NIF	<i>"Net Induction Frequency"</i>
NNK	4-(metilnitrosamino)-1-(3 piridil)-1-butanona
NRC	<i>"National Research Council"</i>
O ₂ ^{-•}	anión superóxido
PARP	Poli-ADP-ribosa polimerasa
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
P60	Polyphenon 60
RL	Radicales Libres
rmp	Revoluciones por minuto
ROO	Radical peroxilo
SOD-1	superóxido dismutasa
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPA	12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRADD	Domino de muerte asociado a tumor
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis asociado a TNF
TRX-1	Tiorredoxina
•OH	Radical hidroxilo
OMS	<i>"World Health Organization"</i>
¹ O ₂	oxígeno singulete
6TG	6-tioguanina
8-OHdG	8-hidroxidesoxigunosina

1. Introducción

En la actualidad las poblaciones humanas nos encontramos expuestas a numerosos xenobióticos debido a factores como el crecimiento demográfico, los avances en la industria y en la tecnología. La exposición a estos agentes puede representar severos riesgos para la salud humana. Se ha estimado que la dieta humana está relacionada con la inducción y prevención de algunos tipos de cáncer. En 1981 Doll y Peto publicaron los resultados de un estudio de correlación entre los factores de exposición y la muerte inducida por cáncer, ellos observaron que alrededor de una tercera parte de los cánceres humanos están relacionados con la dieta. A partir de estos datos, diversos investigadores empezaron a estudiar las propiedades de los componentes de la dieta humana, y encontraron que está constituida tanto por sustancias con actividad mutágena y cancerígena, como por sustancias capaces de contrarrestar o inhibir estos efectos (Ames, 1983; Renner, 1990; Block, 1992; Surh y Ferguson, 2003).

Por otra parte, estudios epidemiológicos muestran que existe una relación inversamente proporcional entre el consumo de vegetales con respecto a la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas como lo son algunos tipos de cáncer (Ferguson, 1994). De ahí, surge el interés de realizar investigaciones encaminadas a estudiar el posible efecto protector o modulador del daño al ADN, para lo cual se han empleado sustancias derivadas de plantas. Con estos estudios además de conocer los mecanismos de protección, también se pueden generar estrategias para la prevención y el tratamiento de determinadas enfermedades relacionadas con el daño al material genético, lo que genera grandes expectativas en materia de salud pública (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007).

Dentro de los componentes de la dieta con potencial antimutágeno y anticancerígeno, las frutas y los vegetales fueron los primeros componentes que han llamado la atención para su estudio como posibles agentes protectores del daño al ADN esto debido a que están constituidos por sustancias con propiedades antioxidantes tales como los cítricos que contienen altas cantidades de vitamina C y vegetales rojos y amarillos como zanahorias y jitomates que contienen principalmente beta carotenos. Los antioxidantes son sustancias que a bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable (proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN) presentan la propiedad de inhibir o disminuir significativamente las alteraciones oxidativas a nivel molecular sobre el sustrato (Thomas, 1994; Gonzales *et al.*, 2000; Venereo, 2002).

1.1. Antioxidantes

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

Se ha propuesto que el inicio de la prevención del daño al material genético derivado del estrés oxidante, radica en el consumo de agentes químicos naturales que disminuyen o inhiben la actividad mutagénica o carcinogénica de los compuestos. Las evidencias obtenidas a partir de estudios epidemiológicos y pruebas realizadas en diferentes laboratorios, sugieren que los alimentos consumidos contienen compuestos que pueden desempeñar un papel importante en la disminución del daño al ADN. Aunque los mecanismos de acción de muchos de ellos aún no se conocen, algunos tienen propiedades antioxidantes y pueden atrapar radicales generados durante el metabolismo celular o los producidos por los mutágenos (Sandler, 1996).

1.2. Polifenoles y flavonoides

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas con capacidad antioxidantes que constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos de las plantas. Son indispensables para su fisiología y protección participando en diferentes etapas de su ciclo de vida. Los polifenoles constituyen una fracción muy importante en la dieta humana, por lo que en años recientes han cobrado un valor significativo, pues mediante numerosas investigaciones se les han atribuido efectos benéficos frente al desarrollo de enfermedades relacionadas al estrés oxidante (como algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y aterosclerosis), además de que se ha encontrado que los polifenoles poseen propiedades antiinflamatorias, antivirales, antibacterianas, antimicrobianas, antitrombóticas y antialérgicas (Martínez *et al.*, 2002; Escamilla *et al.*, 2009; Granado, 2010).

Los polifenoles incluyen desde compuestos altamente polimerizados hasta moléculas simples con un anillo fenólico en su estructura. Hasta hace unos cuantos años se habían descrito poco más de 8000 polifenoles distintos que suelen clasificarse en diferentes grupos según el número de anillos fenólicos que contienen y el sustituyente unido a estos anillos. Son moléculas que incluyen a los alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, polímeros fenólicos (comúnmente conocido como taninos), y flavonoides. La figura 1 muestra la clasificación de los polifenoles según Cadenas y Paker, 2002 (Leibovitz y Mueller, 1993; Bravo, 1998; King y Young, 1999; Martínez *et al.*, 2002; Escamilla *et al.*, 2009; Granado, 2010).

Los ácidos fenólicos se caracterizan por tener un anillo aromático central como en el caso del ácido cinámico, hidroxibenzoico e hidroxicinámico. Existe una gran variedad de fenoles ácidos distribuidos en productos de origen vegetal como la curcumina (presente en el curry y la mostaza) y el ácido cafeico, ferúlico y clorogénico (presentes en las frutas, granos de café y soya). Los polímeros fenólicos son compuestos de alto peso molecular, tales como los taninos condensados. Actualmente se sabe que los polifenoles son capaces de proteger al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (Cadenas y Packer, 2002; Drago *et al.*, 2006; Granado, 2010).

Los flavonoides, ácidos y alcoholes fenólicos, son los grupos más abundantes de polifenoles en los alimentos. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg al día, siendo la quercetina el predominante con un valor entre 16 y 19 mg/día. La cantidad de estos en los alimentos puede ser afectada por la temperatura, luz, patógenos, procesamiento, maduración entre otros factores. Son pigmentos naturales presentes en las plantas como glucósidos, existen diferencias en la composición de estos pigmentos entre los diferentes tipos de plantas, e incluso entre las diferentes partes de la misma planta (Martínez *et al.*, 2002; Cadenas y Packer, 2002; Granado, 2010).

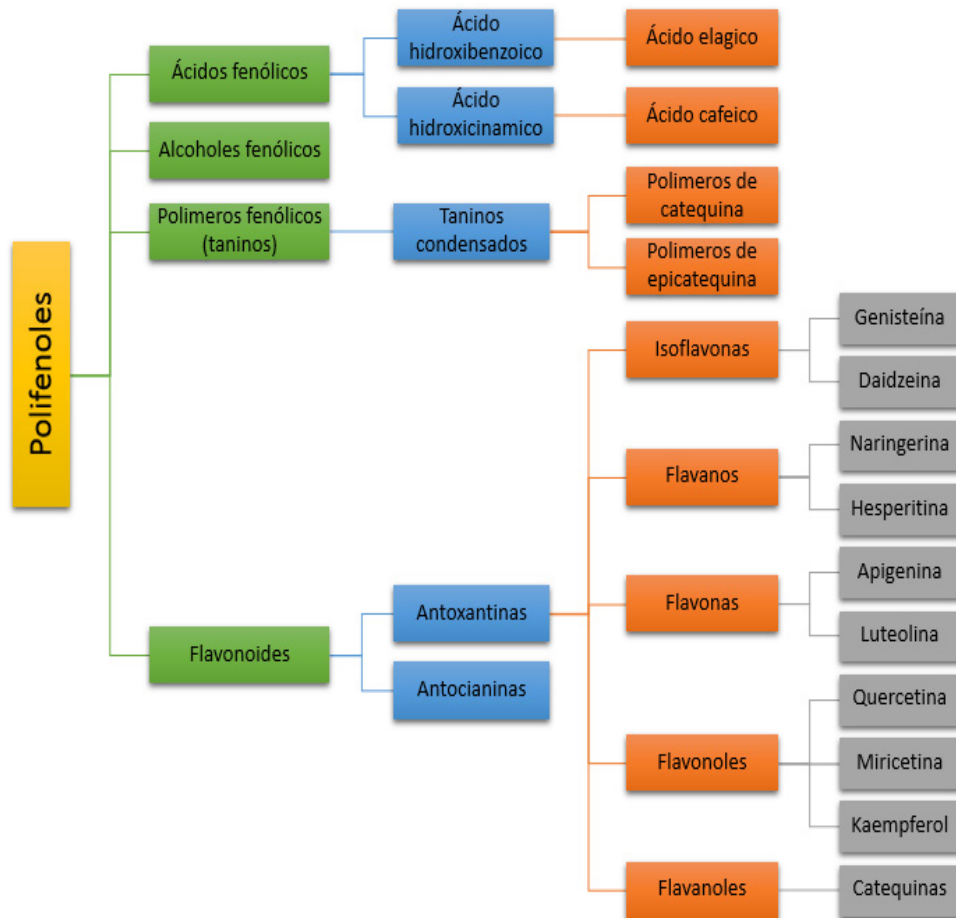


Figura 1. Clasificación de los polifenoles según Cadenas y Packer, 2002.

Los flavonoides fueron aislados por Szent-György en 1930, quien fue ganador del premio Nobel. Son constituyentes importantes de la parte no energética de la dieta humana, y se encuentran en frutas, vegetales, semillas y algunas bebidas como el vino y la cerveza. Hasta el momento se han identificado más de 5000 flavonoides distintos que están conformados por dos anillos fenilos (A y B) ligados mediante un anillo pirano (C), lo que deja un esqueleto de difenilpiranos que son característicos de los flavonoides (figura 2) que son los que confieren su potente actividad antioxidante (Martínez *et al.*, 2002; Escamilla *et al.*, 2009).

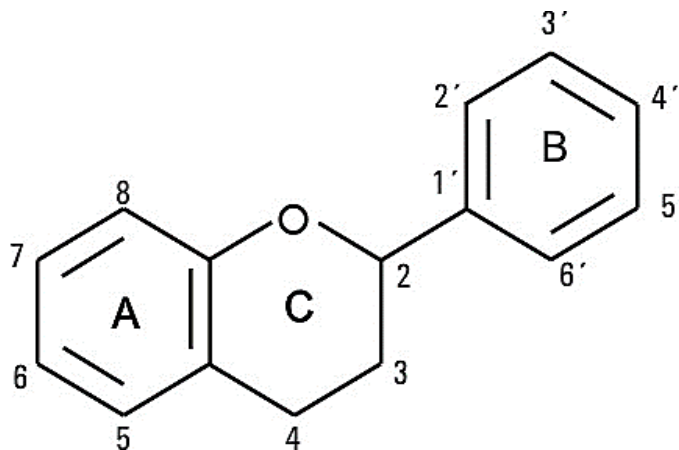


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides.

Los flavonoides se agrupan en antocianinas y antoxantinas. Las antocianinas son glicósidos de antocianidina, y son el grupo más importante de pigmentos vegetales solubles en agua, los responsables de los colores rojo, azul y púrpura de las flores y las frutas. Los antoxantinas son incoloros o amarillo, e incluyen a los flavonoles, flavanoles, flavonas, flavanos, e isoflavonas (ver figura 1) (Cadenas y Packer, 2002).

Los flavonoles son los flavonoides más ampliamente distribuidos, y los más comunes son la quercetina, kaemferol y miricetina. Los flavanoles catequina y epicatequina se presentan comúnmente en combinación con ácido gálico como epigallocatequina galato o epicatequina galato. Se encuentran principalmente en el té y en el vino tinto. Las isoflavonas se encuentran casi exclusivamente en la familia de las leguminosas, particularmente en la soya, en los que la genisteína y la daidzeína son los principales isoflavonas (ver figura 1) (Cadenas y Packer, 2002).

Los flavonoides presentan un amplio espectro de actividades bioquímicas, así como propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes. Se estima que la mayoría de sus actividades podrían estar relacionadas con propiedades antioxidantes. Estas actividades incluyen: La inhibición de los procesos de oxidación (eliminación de radicales y la quelación de iones metálicos). Aunado a esto, también se ha observado que inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa (Rice–Evans *et al.*, 1996; Van Acker *et al.*, 1996; Catapano, 1997; Aviram *et al.*, 1998; De Groot *et al.*, 1998; Sudheesh, *et al.*, 1999; Escamilla *et al.*, 2009).

Para que un polifenol actúe como un antioxidante debe satisfacer dos condiciones básicas:

- Estar presente en baja concentración en relación al sustrato a ser oxidado, ya que así puede retrasar o prevenir la auto-oxidación o la oxidación mediada por RL.
- El radical resultante formado después de la captura debe ser estable para interrumpir la reacción en cadena de la oxidación (Cadenas y Packer, 2002).

La capacidad antioxidante de los polifenoles se debe principalmente a que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que les confieren propiedades de quelación de hierro y otros metales de transición, por lo tanto la inhibición de las reacciones de Fenton y el ciclo de Haber-Weiss, son fuentes importantes para los radicales de oxígeno activos. Los flavonoides son eficaces secuestradores de radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) ROO, y del anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Afanas'ev *et al.*, 1989; Bors *et al.*, 1990; Cheng y Breen, 2000; Cadenas y Packer, 2002; Jomova y Valko, 2011).

La capacidad secuestrante de RL de los polifenoles deriva de que su potencial de reducción es menor que la de los radicales peroxilo (ROO), alquilo y superóxido (O_2^-), por lo que resulta en la inactivación de los RL. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, tales como altas concentraciones de antioxidantes fenólicos, un pH elevado, o la presencia de iones de hierro, los antioxidantes fenólicos puede iniciar un proceso de auto-oxidación y se comportan como pro-oxidantes, en lugar de los antioxidantes (Shahidi *et al.*, 1992; Cadenas y Packer, 2002).

1.3. Antioxidantes del té verde

El té (*Camellia sinensis*) después del agua es la bebida más popular en el mundo además, de una importante fuente de flavonoides de la dieta (Dufresne y Farnworth, 2001). Es por ello que diversos grupos de investigación se han dedicado a estudiar las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y biológicas de los flavonoides presentes en el té, así como sus efectos antioxidantes (Cabrera *et al.*, 2006; Chacko *et al.*, 2010).

Si las hojas del té recién cosechadas se inactivan por exposición al calor del vapor de agua para evitar la oxidación enzimática, se obtiene el té verde. Las hojas frescas del árbol del té contienen una alta cantidad de compuestos con gran actividad antioxidante, a este grupo se le conoce como flavanoles (derivados de los flavonoides), que incluye a las catequinas y a sus formas polimerizadas (Vinson *et al.*, 1995; Vinson, 2000; Valenzuela, 2004; Cabrera *et al.*, 2006).

Las principales catequinas presentes en el té son la epicatequina (EC), la epigalocatequina (EGC), la epicatequina galato (ECG), y la epigalocatequina galato (EGCG), (figura 3) siendo esta última la catequina más abundante en el té verde (Graham, 1992; Vinson, 2000; Valenzuela, 2004; Cabrera *et al.*, 2006).

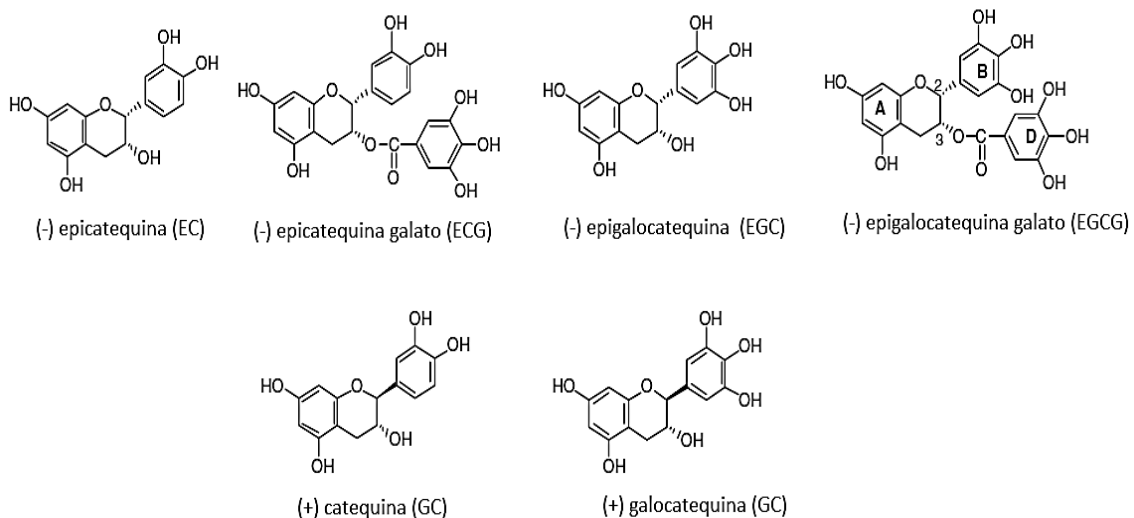


Figura 3. Estructura química de las principales catequinas encontradas en el té verde (Modificada de Zaveri, 2006).

Cuando las catequinas tienen contacto con las polifenol oxidasas, como ocurre cuando se enrollan las hojas del té para la producción del té *oolong* y del té negro, la oxidación produce estructuras diméricas y poliméricas de los flavanoles dando origen a las teaflavinas y a las tearrubiginas, que son los derivados que le aportan el color y sabor característico al té negro. Además de los flavanoles, el té, particularmente el verde, contiene también una pequeña cantidad de flavonoles como la quercetina, la miricetina, el kaemferol y sus glucosidos. De esta forma, el té verde, el *oolong* y el té negro tienen el mismo origen pero diferente procesamiento. El grado de oxidación (también llamado de fermentación) será determinante en el tipo de componentes activos del té y en la proporción en que estos se encuentren en el producto final. En la figura 4 se muestran las estructuras químicas de los principales flavonoles encontrados en el té verde y el cuadro 1 muestra como porcentajes los flavonoides presentes en el té. Aproximadamente un 76% del té que se consume en el mundo es negro, un 22% es té verde y menos de un 2% es *oolong* (Balentine *et al.*, 1997; Cadenas y Packer, 2002; McKay y Blumberg, 2002; Higdon y Frei, 2003; Valenzuela, 2004).

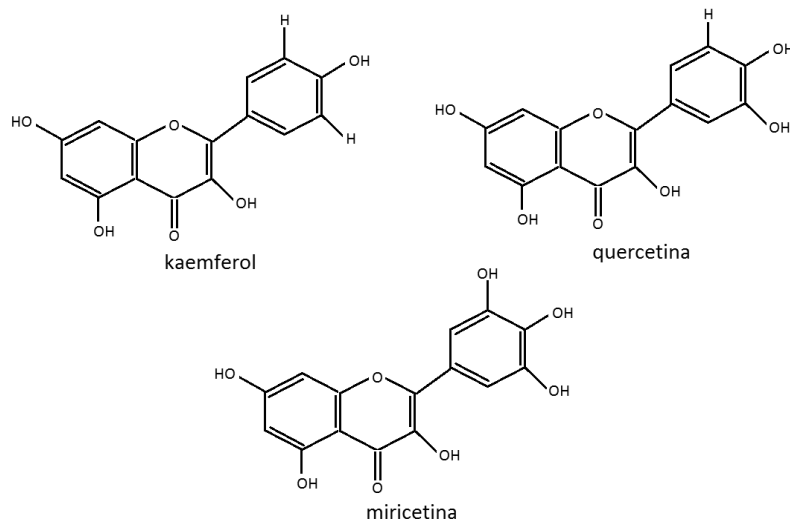


Figura 4. Estructura de los principales flavonoles encontrados en el té verde.

Cuadro1. Porcentaje por peso seco de flavonoides presentes en el té (Tomada y modificada de Hodgson y Crof, 2010).

componente	té verde	té negro
total de flavonoides	15-25	15-25
total de catequinas	12-18	2-3
EC	1-3	<1
ECG	3-6	<1
EGC	3-6	<1
EGCG	9-13	1-2
flavonoles	3-2	1-2
theaflavinas	<1	4
otros polifenoles	2-4	7-15

La importancia como antioxidante de estos flavonoides puede medirse con la ayuda de los valores obtenidos con el ensayo equivalente Trolox de capacidad antioxidante (ensayo TEAC). Dentro del ensayo TEAC la quercetina tiene uno de los valores más altos por ello se le considera como uno de los mejores antioxidantes (Cadenas y Packer, 2002).

Se ha observado que los polifenoles del té verde tienen efecto inhibitor sobre el tamaño de tumores en piel, cuando se expone a ratones (con y sin pelo) a radiación UVB y UVA (Wang *et al.*, 1992; 1994; Cadenas y Packer, 2002). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se observó que la administración por vía oral (intragástrica y *ad libitum*) de té verde a ratones reduce el daño genotóxico inducido por metales pesados (García-Rodríguez *et al.*, 2012). Resultados de estudios en ratas, ratones y hámster muestran que el consumo de té protege del desarrollo de cáncer de piel, pulmón, estómago, boca, esófago, duodeno, riñon, páncreas, hígado, mama y colon (Katiyar y Mukhtar, 1996; Dreosti *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 1997; Koo y Cho, 2004; Chacko *et al.*, 2010). Del mismo modo Shim *et al.*, en 1995 observaron que el consumo de té verde entre fumadores crónicos puede reducir el incremento de biomarcadores del daño oxidativo tales como el incremento de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y la micronucleación de linfocitos. Por otra parte un estudio ha mostrado que el consumo de extractos de té verde también incrementan la actividad de la superóxido dismutasa en el suero y la expresión de catalasa en la aorta; estas enzimas están implicadas en la protección celular contra las especies reactivas de oxígeno (ERO's) (Negishi *et al.*, 2004).

1.3.1. Efectos de los polifenoles del té verde

Las propiedades antioxidantes de los polifenoles presentes en el té verde, consisten fundamentalmente en la captura del radical ROO y O₂⁻, que están implicados en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica, la progresión del ciclo celular, además de poseer propiedades antimutagénicas, antialérgicas, y de inducción de apoptosis. Los polifenoles presentan propiedades sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación. (Cadenas y Packer, 2002; Martínez *et al.*, 2002; Escamilla *et al.*, 2009).

Por otra parte se ha observado que los polifenoles del té verde inhiben *in vitro* de manera selectiva a la enzima ciclooxigenasa (COX), que es una enzima constitutiva, particularmente la COX-II (enzima inducible, especialmente por sustancias identificadas como pro-carcinógenos), por lo cual los polifenoles ejercen un efecto inhibitor en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de colon (Katiyar *et al.*, 1992; Needleman e Isakson, 1998; Valenzuela, 2004).

Se ha encontrado que los polifenoles del té son capaces de inhibir *in vitro* la formación de nitrosaminas, un grupo formado por la activación metabólica de productos de la combustión del tabaco, presentes en el humo que aspira el fumador y aquellos que lo rodean (Hecht y Hoffmann, 1998). También son capaces de inhibir la transformación de las aminas heterocíclicas que son poderosos agentes carcinogénicos, formadas durante el proceso de sobre-cocción de la carne (asado) (Katiyar y Mukhtar, 1996).

Las enzimas hepáticas que participan en la fase II de detoxificación de xenobióticos, como la Glutation S Transferasa promueven la excreción de sustancias carcinogénicas, evitando así su efecto inductor de procesos tumorales. El té verde y sus polifenoles producen una sobre-expresión de la Glutation S Transferasa, aumentando su cantidad en hígado y facilitando así el proceso de detoxificación de xenobióticos, particularmente de aquellos con actividad carcinogénica (Parkinson, 1996; Chen *et al.*, 2000; Valenzuela, 2004).

1.3.2. Efectos de las catequinas

Los compuestos polifenólicos presentes en mayor cantidad en el té verde son las catequinas (EGCG, ECG, EC y GC). Son compuestos incoloros, que contribuyen a la amargura y astringencia de té verde. Una típica ración de té verde (preparada con 2 g de hojas de té) proporcionará 150-200 mg de flavonoides de los cuales el 30% (60 mg) son catequinas (Harbowy y Ballentine, 1997).

Diversos estudios han mostrado que presentan propiedades que inhiben la toxicidad, la proliferación celular, la progresión del ciclo celular, así mismo poseen propiedades antimutagénicas, antialérgicas, e inductoras de apoptosis. De las catequinas la EGCG parece ser la más eficaz, pues se ha observado que inhibe la liberación de histamina, mientras que la CG y ECG, presentan una inhibición moderada y la EC al parecer no tiene efectos. La efectividad de EGCG puede estar relacionada con su mayor disponibilidad en la célula (Cadenas y Packer, 2002).

En estudios, empleando cultivos celulares, se ha observado que las catequinas y quercetina pueden presentar efectos moduladores de la expresión génica, la proliferación celular, el proceso de apoptosis, entre otros. De igual forma, el tratamiento con flavanoles y flavonoles en ratones expuestos a rayos gamma, reduce significativamente la formación de MN en reticulocitos (Shimoi *et al.*, 1994; Cadenas y Packer, 2002).

En estudios *in vivo* mostraron que las catequinas del té verde aumenta la actividad antioxidante total en plasma (Skrzydłowska *et al.*, 2002; Yokozawa *et al.*, 2002; Chacko *et al.*, 2010). Además son capaces de inhibir el crecimiento de células humanas de cáncer de estómago, (línea celular KATO III) e inducen apoptosis (Hibasami *et al.*, 1998; Cadenas y Packer, 2002). Se ha observado que al alimentar a ratas con una dieta alta en proteínas (suplementando esta con una mezcla de catequina o EGCG) estas excretan menos metilguanidina, en la orina, un marcador indirecto de daño renal por el radical •OH (Yozokawa *et al.*, 1992).

En otro estudio, se ha observado que la suplementación con 1% de catequinas en la dieta de ratas, reduce el daño oxidante inducido por dietas altas en grasas poliinsaturadas. Estos estudios indican que la reducción del daño oxidante puede ser una consecuencia del consumo de los flavonoides particularmente catequinas (Nanjo-Honda *et al.*, 1993).

Además, se ha mostrado que la ingestión de las catequinas del té verde puede aumentar la oxidación de grasas durante el ejercicio entre 3% y 7%, (alrededor de 250-600 kJ/día). Este aumento en la oxidación de grasas podría contribuir a los efectos benéficos a largo plazo de las catequinas del té verde sobre el peso corporal (Takashima *et al.*, 2004; Venables *et al.*, 2008). Un estudio en Japón refiere que el consumo de catequinas puede mejorar la disfunción endotelial periférica, al eliminar los RL en hombres fumadores (Oyama *et al.*, 2010). Por otra parte Elmes *et al.*, 2001, observaron que estos compuestos del té verde reducen el potencial invasivo de células de melanoma humanas por la orientación de los receptores COX-2, PGE2 y el epitelio mesenquimal de transición.

1.3.3. Efectos del kaemferol

El kaemferol es un flavonol, que ha sido aislado del té verde, así como de brócoli, uvas, col de Bruselas, endivias y manzanas (Park *et al.*, 2006), y es el compuesto que confiere el color característico a las flores de *Acacia decurrens* y *Acacia longifolia*. Es altamente soluble en agua, en éter etílico y en etanol. Existen estudios que revelan que los flavonoles del té verde como el kaemferol, pueden reducir el riesgo de cáncer pancreático. En un estudio realizado con pacientes voluntarios en la Universidad de California, se observó que los participantes que ingerían frutas y bebidas con alto contenido de polifenoles, mostraban un menor desarrollo del cáncer de pulmón. Por lo que se sugirió que los flavonoides fueron los que inhibieron este efecto particularmente las catequinas, kaemferol y quercetina (Cui *et al.*, 2008).

También se ha encontrado que tienen efecto antiproliferativo en diferentes líneas celulares entre las que se encuentran células de cáncer colon, de melanoma humano y células de cáncer de próstata (Lee *et al.*, 1998; Casagrande y Darbon, 2001; Knowles *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009). Este flavonol ejerce un efecto antiproliferativo sobre la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-453, sobre la cual actúa mediante la interrupción del ciclo celular y puede inducir apoptosis a través de la fosforilación de p53 (Choi y Ahn, 2008). En modelos murinos, se ha encontrado que puede ser un agente quimiopreventivo en el cáncer colorrectal, y su acción es comparable a la de irinotecán, el fármaco de primera línea utilizado en el tratamiento de este tipo de cáncer (Nirmala y Ramanathan, 2011).

Asimismo se realizó un estudio que da a conocer una respuesta sinérgica y aditiva entre los dos flavonoles más comúnmente ingeridos, quercetina y kaemferol, sobre la proliferación celular en las líneas intestinales humanas Caco-2 y hutus-80 y en la línea celular de carcinoma de mama PMC42, mostrando así que una combinación de kaemferol y quercetina, es más eficaz en la reducción de la proliferación de células cancerígenas que al aplicarse solamente quercetina o kaemferol (Leigh-Ackland *et al.*, 2005).

1.4. Estrés oxidante

La oxidación es un proceso de pérdida de electrones (e^-) siempre asociado a otro de captación que llamamos reducción, estas reacciones son muy importantes, debido a que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía a partir de ellas, sin embargo cuando existe un exceso de oxidación aparece el estrés oxidante (EOx), el cual se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de ERO's y RL, que provocan daño oxidante a las macromoléculas (lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos) y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa encargados de eliminar dichas especies químicas, y que alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, etc.) (Roche, 1997; Elejalde, 2001; Ramos, 2006).

El EOx, se produce durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del tabaco, drogas antitumorales, algunos productos químicos carcinogénicos, pesticidas, diversos medicamentos etc. Esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado a múltiples enfermedades (Gonzales, *et al.*, 2000; Elejalde, 2001; Venereo, 2002).

1.4.1. Especies reactivas y radicales libres

El oxígeno es un compuesto esencial en el metabolismo de todos los organismos aerobios, pues participa en diversas reacciones de oxidación, incluyendo la respiración. Durante los procesos biológicos en los que se encuentra involucrado el oxígeno molecular este se reduce, dando origen a las llamadas ERO's, las que en su mayoría son RL. Un RL es una especie química (molécula o átomo) que presenta al menos un e⁻ no apareado en su orbital externo. La mayoría de los RL son en extremo reactivos y tienden a asociarse "apareando" el electrón libre. Los radicales derivados del oxígeno son altamente tóxicos y son capaces de reaccionar con diversas moléculas orgánicas, provocando en ellas diversas alteraciones estructurales, que conducen a alteraciones de tipo funcional, y de esta manera la fisiología de las células y por consecuencia la de los organismos, se ve afectada. El estudio de los RL ha permitido relacionarlos directamente con el desarrollo de diversas enfermedades de tipo neurodegenerativo (Alzheimer, Huntington, Parkinson etc.), con la carcinogénesis, y con el envejecimiento (Bunker, 1992; Gonzales *et al.*, 2000).

1.5. Genotoxicidad

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos. Por "material genético" no sólo se entiende al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula. Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos o xenobióticos y se clasifican en tres categorías de acuerdo a su origen: químicos, físicos y biológicos y de acuerdo a su modo de acción o efectos en mutágenos, carcinógenos o teratógenos, dando lugar a tres tipos de procesos: mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis. La acción o capacidad de inducir daño de estos xenobióticos está influida por la dosis recibida, el tiempo y vía de exposición, junto a la constitución genética del individuo (Hodgson, 2004; Abrevaya, 2008). Los agentes genotóxicos alteran el ADN ya sea uniéndose directamente a éste o actuando en forma indirecta mediante la afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN. Como consecuencia de ello, pueden producirse mutaciones celulares que circunstancialmente pueden derivar en una transformación cancerosa. Sin embargo, es necesario aclarar que un agente genotóxico no es necesariamente cancerígeno aunque, la mayoría de los cancerígenos son también genotóxicos (Hernández, 2010).

1.5.1. Daño oxidante al ADN

Los RL al colisionar con una macromolécula, la oxidan al sustraerle un e⁻ y provocan que pierda su función específica en la célula, dicho daño puede causar oxidación a las macromoléculas. A nivel de orgánulos, se ha observado que las mitocondrias son sumamente sensibles a la presión oxidativa, lo que se refleja en cantidades elevadas de oxidación en lípidos y proteínas, y en mutaciones del ADN mitocondrial (Gonzales *et al.*, 2000; Ramos, 2006).

El daño celular producido por las ERO's en diferentes macromoléculas:

- **Lípidos.** Aquí se produce el mayor daño en un proceso que se conoce como peroxidación lípidica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. Puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singulete (¹O₂), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical •OH.
- **Proteínas.** Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos.
- **Ácido desoxirribonucleico (ADN).** Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación, progresión, o ambas de la carcinogénesis). Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN (Gonzales *et al.*, 2000; Venereo, 2002).

1.5.2. Agentes inductores de daño genotóxico

La contaminación ambiental siempre ha existido, pues es inherente a las actividades humanas; sin embargo, en los años recientes se ha debido prestar mayor atención, ya que han aumentado la frecuencia y gravedad de los incidentes ocasionados por la contaminación en todo el mundo y cada día hay más pruebas de sus efectos adversos sobre el ambiente y la salud, pues la exposición de un organismo a altas cantidades de contaminantes o bien por periodos prolongados, resulta en un daño directo sobre el material genético. Estos agentes pueden ser físicos, químicos o biológicos. Los agentes químicos son de los más estudiados ya que las poblaciones humanas nos encontramos expuestas en mayor cantidad de este tipo de agentes, desde el empleo de estas sustancias en el lugar de trabajo, hasta la exposición de aditivos de la alimentación; sin embargo, la salud también puede ser afectada indirectamente por la deposición de contaminantes atmosféricos en el ambiente y la absorción por las plantas y animales, resultando en productos químicos que entran en la cadena alimentaria o están presentes en el agua potable, por lo que constituyen otras fuentes de exposición humana (Flores *et al.*, 1995).

1.5.3. Metales pesados

La tabla periódica incluye alrededor de 70 elementos metálicos, y de ellos 59 pueden ser considerados “metales pesados” un término generalmente colectivo, que se aplica al grupo de metales y metaloides con una densidad atómica mayor que la de el hierro (Fe) (55.85 g/mol) o cinco veces mayor que la del agua. Sin embargo, con esta definición se excluirían metales con pesos atómicos menores que el del Fe y que con frecuencia pueden ser metales contaminantes, como el vanadio (V) (50.94 g/mol), manganeso (Mn) (54.93 g/mol), cromo (Cr) (52.01 g/mol) y a otros que realmente no son metales como arsénico (As), flúor (F) y fósforo (P) (Duruibe *et al.*, 2007).

Por lo que un metal pesado tiene muy poco que ver con su densidad pero mucho con sus propiedades químicas, por ello, resulta mejor hablar de “elementos traza”, dejando claro que la mayoría de los contaminantes inorgánicos son “metales pesados” (Duruibe *et al.*, 2007; Galán y Romero, 2008).

El término “elementos traza” se refiere a aquellos componentes naturales de la corteza terrestre y pueden ser considerados como micronutrientes, ya que muchos de ellos son esenciales para el crecimiento y desarrollo de plantas y animales, desempeñando un papel importante al ser fundamentales para el correcto funcionamiento de procesos bioquímicos y fisiológicos, tal es el caso del hierro (Fe), cadmio (Cd), zinc (Zn), arsénico (As), vanadio (V) cobre (Cu) y cromo (Cr); sin embargo estos componentes en concentraciones elevadas pueden ser considerados contaminantes y peligrosos para la salud de los seres vivos (Newman y McIntosh, 1991; Duruibe *et al.*, 2007; Ferré-Huguet *et al.*, 2007; Galán y Romero, 2008).

En general todos los elementos traza son tóxicos si se ingieren o inhalan en cantidades altas y durante largos períodos de tiempo (Plant *et al.*, 2001). Dichos datos han convertido a estos elementos en un tema actual tanto en el campo ambiental como en el de salud pública. Estos actúan como potentes tóxicos, llegando a provocar daño genotóxico y teratógeno dependiendo de las dosis absorbidas así como la vía por la cual ingresaron al organismo y la naturaleza química del metal. En función de los niveles a los cuales se detecten, pueden llegar a ser tóxicos, e incluso cancerígenos. La EPA (US Environmental Protection Agency) incluye en la lista de contaminantes prioritarios los siguientes trece elementos traza: antimonio (Sb), arsénico (As), berilio (Be), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg), níquel (Ni), plata (Ag), plomo (Pb), selenio (Se), talio (Tl) y zinc (Zn)(EPA 1998).

El Cr y sus compuestos son de los metales más estudiados en la actualidad, pues tienen un amplio uso a nivel industrial. Particularmente algunos compuestos de este metal presenta efectos teratógenos y genotóxicos evaluado mediante diferentes ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* (Newman y McIntosh, 1991; Ferré-Huguet *et al.*, 2007).

1.5.4. Compuestos de Cr (VI)

El Cr es un metal traza de color gris, tiene como número atómico 24 y su peso molecular es de 52.01 g/mol, pertenece a las primeras series de los elementos de transición. Posee diferentes estados de oxidación (II, III, IV, V y VI) siendo los más comunes son III y VI. Es un metal encontrado en la naturaleza como Cr (0) y Cr (III), formando aleaciones con otros metales con mayor frecuencia en su estado III, aunque los compuestos de Cr (VI) también son encontrados pero en pequeñas cantidades (Quality Guidelines, 2000).

Los niveles de Cr en el suelo varían según el área y el grado de contaminación a partir de fuentes antropogénicas. Pruebas sobre suelos han mostrado concentraciones de Cr que van desde 1 a 1000 mg/kg, con una concentración media que oscila entre 14 a 70 mg/kg. En el aire el nivel de Cr (III y VI) es generalmente bajo con concentraciones entre 0.01 y 0.03 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ sin embargo las emisiones producidas al quemar carbón y petróleo, así como la producción de acero pueden aumentar los niveles de este metal, es por ello que en las industrias estas concentraciones se pueden elevar a varios cientos de $\mu\text{g}/\text{m}^3$ representando importantes riesgos para la salud humana y principalmente para el personal que labora en estas industrias. Los compuestos de Cr se utilizan como catalizadores en la síntesis del amoníaco, en la fabricación de aceros al cromo y aceros inoxidables, curtido de cuero, pigmentos de cromo, industrias cementeras, aleaciones con cromo, en cromado galvanizado, entre otros usos industriales, es por ello que las poblaciones humanas nos encontramos expuestas tanto a Cr (III) como a Cr (VI), (EPA 1998; Air Quality Guidelines, 2000; Dayan y Paine, 2001).

El Cr (III), si bien se encuentra de forma natural en el ambiente o como residuo industrial; se acepta que es un elemento esencial para los humanos (Mertz, 1967), pues es necesario para llevar a cabo mecanismos fisiológicos como catalizar la acción insulínica sobre lípidos, azúcares y proteínas. Estudios en animales de experimentación y en humanos han establecido el papel esencial del Cr III con una ingesta que va desde 50-200 $\mu\text{g}/\text{día}$, tal ingesta por vía oral no representa un problema de toxicidad. La "World Health Organization" (WHO) estima que la ingesta mínima diaria requerida, para mantener un metabolismo adecuado es, de aproximadamente 33 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Hambidge, 1974; World Health Organization, 1996; Air Quality Guidelines, 2000; ATSDR, 2000; O'Brien *et al.*, 2003; Depault *et al.*, 2004; Ferré-Huguet *et al.*, 2007; Mertz, 2009; Kristen *et al.*, 2010).

Por otra parte, las formas de Cr (VI) se encuentran ligadas a oxígeno, por lo que son consideradas fuertes oxidantes, y tienen efectos altamente tóxicos. Es sabido que tanto animales como humanos incorporan a su organismo pequeñas cantidades de Cr por vía aérea, además de que la mayoría de estos compuestos ingresan al organismo a través de los alimentos y el agua. En el cuadro 2 se muestran los niveles de consumo diario de Cr por diferentes rutas de exposición en humanos y la figura 5 se muestra las principales rutas de exposición humana al Cr (III) y Cr (VI) (Norseth, 1981; Newman y McIntosh, 1991; CDC, 1992; Air Quality Guidelines, 2000; ATSDR, 2000; Dayan y Paine, 2001; Depault *et al.*, 2004; Ferré-Huguet *et al.*, 2007).

Cuadro 2. Niveles de consumo diario de cromo por diferentes rutas de exposición en humanos (Tomada y modificada de Air Quality Guidelines, 2000).

ruta de exposición	consumo diario	Absorción
productos alimenticios	<200 µg	<10 µg
agua potable	0.8-16 µg	<1 µg
aire	<1000 ng	<5 ng

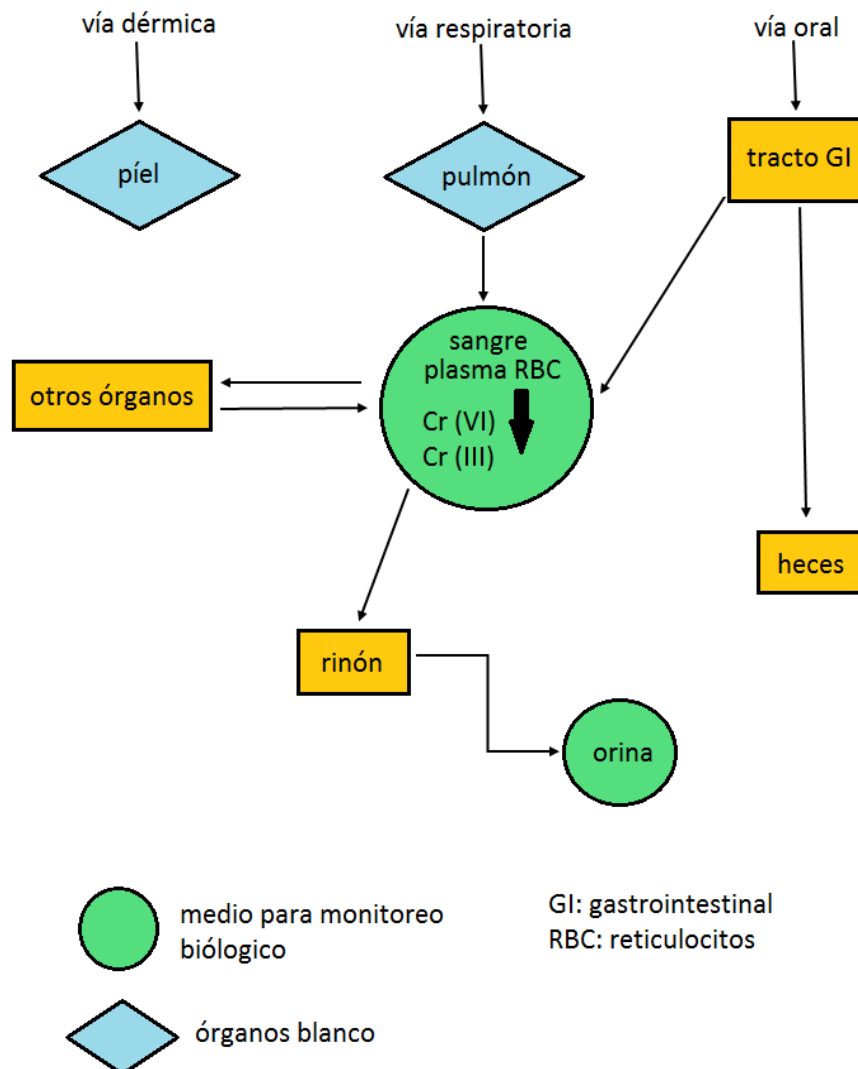


Figura 5. Vías de exposición a Cr (Modificada de Clarkson et al., 1988).

Se ha encontrado que un gran número de compuestos de Cr (VI) representan una mayor amenaza para la salud humana debido a que han mostrado ser mutagénicos o clastogénicos. Por ejemplo un estudio realizado en linfocitos de personas laboralmente expuestas a estos compuestos encontró una prevalencia elevada de aberraciones cromosómicas (AC) e ICH los cuales son ensayos para la evaluación de la genotoxicidad. Además de cambios oxidativos en proteínas y la formación de aductos, ocasionando desde sensibilización alérgica hasta la formación de tumores (Air Quality Guidelines, 2000).

Los compuestos de Cr (VI) producen rupturas de hebras de ADN, enlaces cruzados y modifica nucleótidos como es 8-hidroxiguanina, indicador de formación de radicales del oxígeno. Sin embargo estas reacciones no ocurren en ausencia de agentes reductores, estas son intermediadas por agentes altamente reactivos (RL) como es el Cr (V) y Cr (IV) formados durante la reducción de Cr (VI) a Cr (III) en la célula y son principales responsables de la genotoxicidad descrita para estos compuestos de Cr (VI) (figura 6) (Dayan y Paine, 2001; Kristen *et al.*, 2010).

Se ha descrito que el árbol bronquial es el principal órgano afectado por los efectos cancerígenos de Cr (VI). La inhalación representa gran preocupación con respecto a la exposición a estos compuestos, pues recientemente se ha determinado que estos son un componente de los cigarrillos producidos en Estados Unidos, con una concentración que varía desde 0.24 hasta 6.3mg/kg (Air Quality Guidelines, 2000; Dayan y Paine, 2001; O'Brien *et al.*, 2003; Kristen *et al.*, 2010). También se ha comprobado que atraviesa la placenta representando un alto riesgo para la salud reproductiva. Es sabido que los compuestos de Cr (VI) tienen efectos carcinógenos esto tanto en animales de experimentación como es estudios epidemiológicos realizados en humanos que han sido expuestos a estos compuestos en su lugar de trabajo. La evidencia actual sobre los efectos genéticos derivados de la exposición a compuestos de Cr (VI) parece suficiente para concluir que estos son capaces de inducir mutaciones en humanos (EPA, 1998; Air Quality Guidelines, 2000; Dayan y Paine, 2001).

1.5.4.1. Mecanismos de inducción de daño genotóxico del Cr VI

Se ha descrito que el mecanismo de inducción de daño de los metales ocurre a nivel de la membrana celular, donde afectan tanto a los fenómenos de permeabilidad, así como a las reacciones enzimáticas implicadas en el transporte. Este mecanismo está directamente relacionado con la producción de ERO's y RL, generados durante la reducción intracelular del Cr (VI), ya que al ingresar este fácilmente a la célula debido a que se encuentra comúnmente presente en coordinación tetraédrica y por lo tanto emula fosfatos y sulfatos biológicos, puede ser fácilmente tomada a través de los canales para la transferencia de los aniones isoeléctricos e isoestructurales en la célula o bien mediante el proceso de fagocitosis en caso de los cromatos insolubles y posteriormente es reducido a Cr (V), Cr (IV) y finalmente a Cr (III). La figura 6 muestra de forma general la vía de acceso del Cr (VI) a la región intracelular y las principales rutas implicadas en las lesiones genéticas (Valko *et al.*, 2006; Jomova y Valko, 2011).

Se sabe que las formas reducidas del Cr (VI), se acumulan y reaccionan con moléculas orgánicas, desencadenando alteraciones en el metabolismo celular, EOX y daño genotóxico, pues se conduce a la formación de mono-aductos Cr-ADN, entrecruzamientos de ADN y aductos ternarios. Los agentes reductores importantes para la reducción del Cr VI, incluyen al ascorbato y compuestos sulfidrilos, además de compuestos como la cisteína y el glutatión ver figura 6. Además durante el proceso de reducción del Cr VI, en el que se generan ERO's estas pueden reaccionar en colaboración con el radical •OH ocasionando reacciones tóxicas que pueden dañar a las proteínas, ocasionar la peroxidación lipídica que daña al ADN mediante el rompimiento de sus cadenas así como la inducción de daños cruzados (Gómez y Callao, 2006; Valko *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2007; Nickens *et al.*, 2010; Jomova y Valko, 2011).

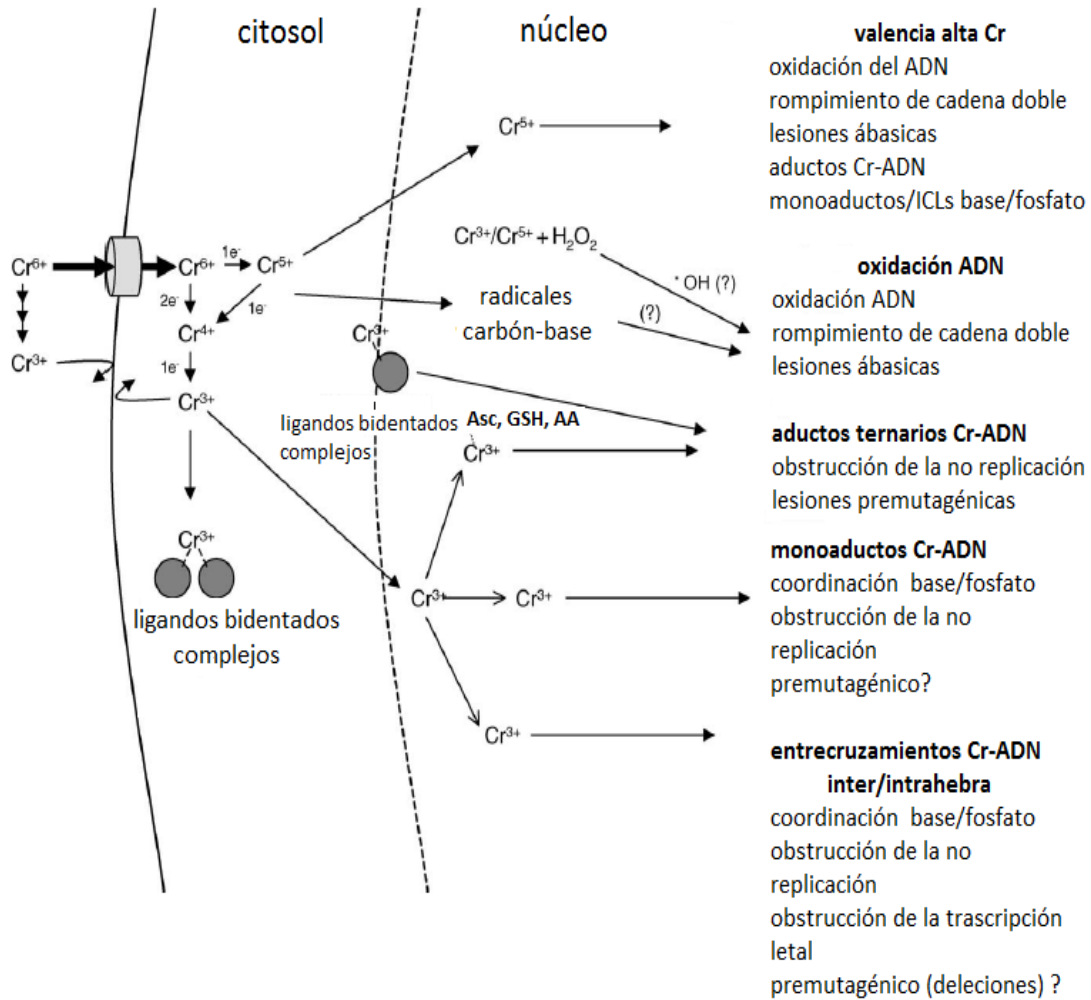


Figura 6. Principales rutas involucradas en las lesiones en el ADN, ocasionadas por el Cr (VI) (Modificada de O'Brien et al., 2003).

El mecanismo más importante de activación de oxígeno por metales de transición, involucra el ciclo de Haber-Weiss donde se genera el radical $\bullet\text{OH}$. Cuando el Cr (VI) entra en la célula, el glutatión forma rápidamente un complejo con este, seguido de una lenta reducción del Cr (VI) a Cr (V) (figura 7b). Una vez formado el Cr (V) este es capaz de 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 $\bullet\text{O}_2$ también es capaz de 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 Dalai, 1992; Navarro et al., 2007).

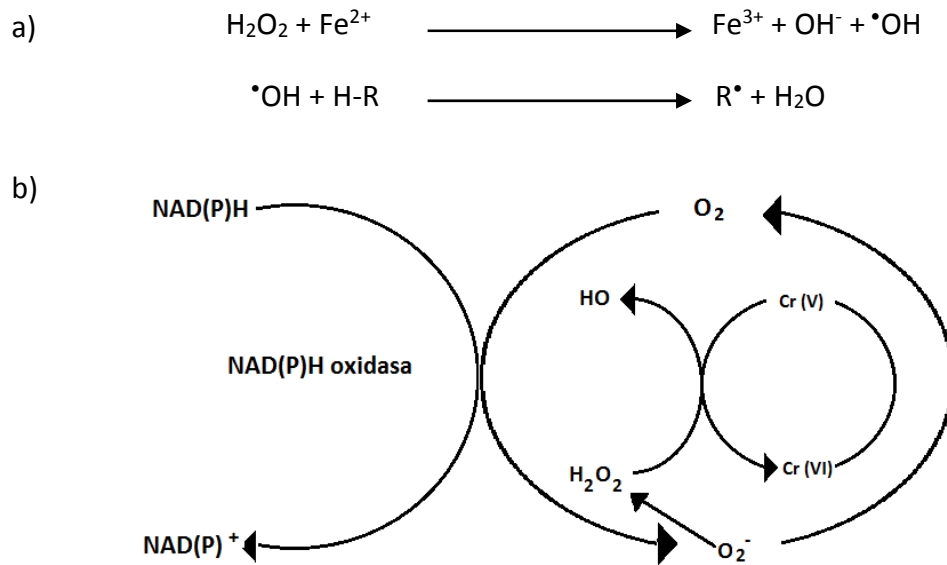


Figura 7: a) reacción de Fenton; b) ciclo de Haber-Weiss y reacción de Fenton para el Cr (VI)
(Tomado de Shi y Dalai, 1992).

1.6. Ensayos para la evaluación del daño genotóxico

De forma general los ensayos de detección del daño genotóxico se agrupa dependiendo del daño a evaluar:

- **Mutaciones Génicas:** estas se refieren ya sea a la sustitución de pares de bases, adiciones o deleciones y en algunas ocasiones pueden llegar a tener consecuencias graves como la inactivación de genes. Estas mutaciones son detectables mediante técnicas de secuenciación de ADN.
- **Alteraciones en la Integridad del ADN:** son lesiones premutagénicas, como lo es la formación de aductos, ligamentos cruzados intra e interbanda y rompimientos de una o ambas cadenas. Para estas alteraciones existe compensación pues pueden ser reparadas enzimáticamente. Las alteraciones en la integridad del ADN pueden ser detectadas mediante electroforesis unicelular en condiciones alcalinas y por determinación de aductos de ADN.

- Aberraciones Cromosómicas (AC): estas se suelen clasificar a su vez en aberraciones estructurales que involucran a las translocaciones, inversiones, deleciones y duplicaciones, que provocan diversas enfermedades genéticas e incluso pueden llegar a ser mortales; se habla de aberraciones numéricas cuando se trata de aneuploidias y poliploidias estos cambios en el material genético la mayoría de las veces ocasionan la muerte en las etapas tempranas del desarrollo. Ambos casos son detectables a partir de un examen de cariotipo (Strickberger, 1988; Pierce, 2005).

1.6.1. Micronúcleos

El ensayo de MN ha sido recomendado para la evaluación genotóxica en la “*International Conference on Harmonization of Genotoxicity Guidelines*” (ICH4), “*Environmental Protection Agency*” (EPA), “*Food and Drug Administration*” (FDA) y la “*International Agency for Research on Cancer*” (IARC). Este ensayo tiene como objetivo identificar sustancias que causan daño citogenético, provocado por clastogénesis o aneuploidogénesis, además es capaz de detectar la rotura o pérdida cromosómica, permitiendo identificar el daño citogenético asociado a la frecuencia de AC. La técnica fue desarrollada por Schmid y Boller en 1970, y originalmente fue propuesta para practicarse en medula ósea; posteriormente, la técnica se ha instrumentado en una gran variedad de tejidos y especies. (Mavournin, 1990; Krishna y Hayashi, 2000).

Los MN son pequeños fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que se forman espontáneamente o por causa de agentes que rompen cromosomas (agentes clastógenos), su forma es generalmente redonda, con un diámetro que varía desde 0.4 a 1.6 micras. Su formación se basa que cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo esto ocurre durante la anafase. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas; sin embargo, los elementos rezagados (fragmentos o cromosomas completos), quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas, y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios. Tales núcleos son mucho más pequeños que el núcleo principal, y de ahí su nombre de “micronúcleos” en la figura 8 se observan un esquema general de los mecanismos de formación de MN (Mavournin, 1990; Krishna y Hayashi, 2000).

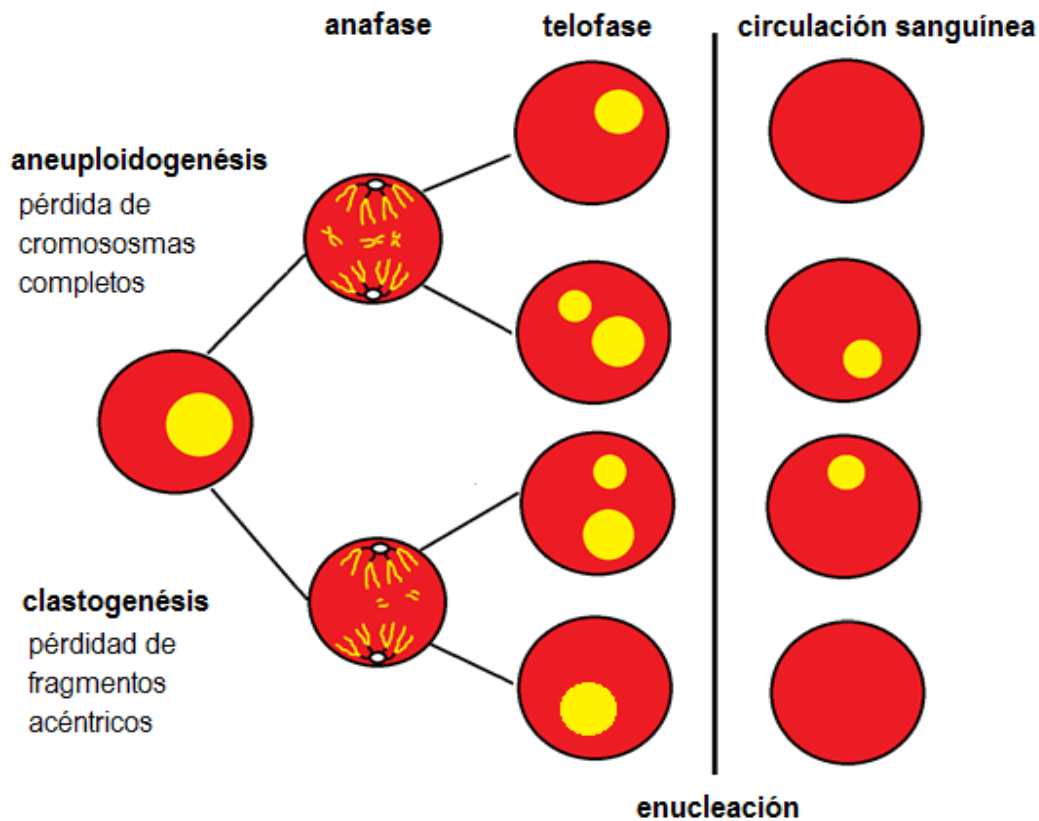


Figura 8. Mecanismos de formación de MN.

Los MN pueden ser evaluados en diferentes tipos celulares, por ejemplo: mieloblastos, mielocitos, médula ósea de ratón (eritrocitos) o en eritrocitos de sangre periférica, células binucleadas (linfocitos) inducidos mediante citocalacina B, así como células uroteliales y exfoliadas de la mucosa oral 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; Krishna y Hayashi, 2000).

En las células eritroides se distinguen claramente a los eritrocitos jóvenes o eritrocitos policromáticos (EPC) y los maduros o eritrocitos normocromáticos (ENC), pues los EPC, todavía contiene 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 más pequeños que los EPC y son acidófilos. Partiendo de esto los eritrocitos se pueden diferenciar en EPC y ENC utilizando diferentes colorantes como May Grunwald, Giemsa y NA (Schmid y Von Ledebur, 1973; Hayashi *et al.*, 1990).

1.7. Apoptosis y necrosis

La muerte celular en los tejidos de los organismos es un hecho natural y no produce alteraciones de las funciones, por el contrario, la cantidad de células en los tejidos está determinada por un balance homeostático entre la proliferación de las células nuevas y la muerte de las células no funcionales, existiendo una tasa o ritmo de relación proliferación/muerte que varía de un tejido a otro. Existen dos tipos de muerte celular una es la que se produce como consecuencia de una lesión celular masiva conocida como necrosis, y la otra es la apoptosis que es un mecanismo controlado de muerte celular (Elena, 2002).

La necrosis ocurre de manera aguda, por una forma no fisiológica, mediante una agresión que causa lesión en una porción importante del tejido. Este proceso es desencadenado por toxinas, hipoxia severa, agresión masiva y cualquier otra condición que genere disminución de ATP, esto crea cambios histológicos como la desorganización y lisis del citoplasma, con dilatación del retículo endoplasmático y las mitocondrias, disolución de la cromatina y pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática. El ADN es fragmentado al azar. Debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular, el contenido del citoplasma es vertido al espacio extracelular, produciendo la atracción de células inmunes en el área, lo que genera el proceso de inflamación, en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitosis de inmigrantes (Elena, 2002).

La apoptosis fue descrita por Kerr en 1970, es un proceso altamente selectivo, que regula el desarrollo normal y la homeostasis de los organismos multicelulares, importante tanto en condiciones fisiológicas, como la destrucción programada en el desarrollo embrionario para terminar de formar los tejidos y en condiciones patológicas como la muerte celular inducida por un quimioterapéutico en un proceso canceroso (Elena, 2002; Sosa *et al.*, 2012).

Uno de los propósitos de la apoptosis a nivel celular es la auto-desintegración de células innecesarias o senescentes. Sin embargo también es considerado un mecanismo de eliminación de daño celular irreparable que de otra forma podría alterar el estado de salud de todo el organismo (Elena, 2002; Sosa *et al.*, 2012).

Histológicamente la apoptosis se caracteriza por la condensación de los componentes del citoplasma, con grandes brotes en la membrana celular y la condensación de la cromatina que lleva a la formación de cuerpos apoptóticos. Este proceso se lleva a cabo en células aisladas dentro del tejido. El ADN es fragmentado en fracciones de 185 pares de bases o múltiplos, mientras la membrana celular permanece intacta. Luego el cuerpo apoptótico es fagocitado por células vecinas sin generar proceso inflamatorio. En la figura 9 se observa la morfología de la necrosis y de la apoptosis (Norbury y Hickson, 2001; Elena, 2002; Squier y Cohen, 2002; Sosa *et al.*, 2012).

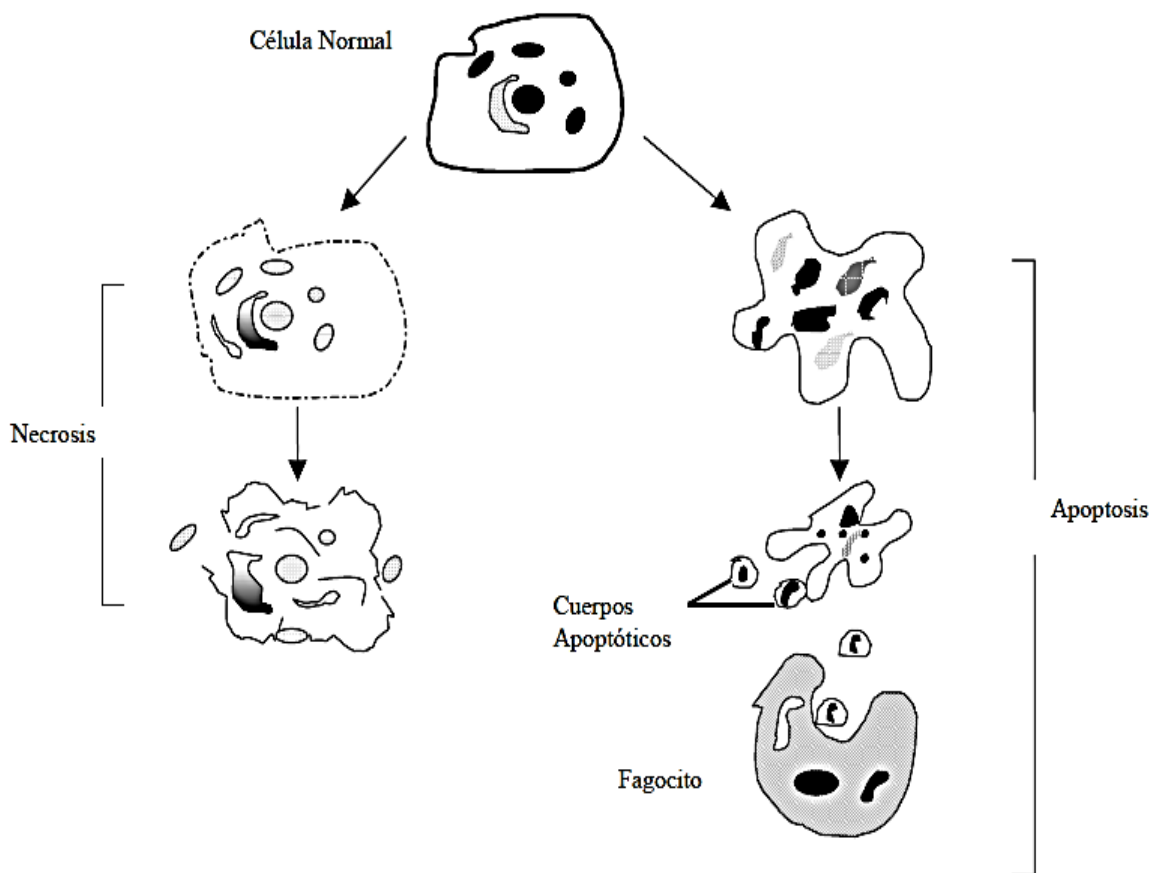


Figura 9. Morfología de la necrosis y la apoptosis. A la izquierda, el proceso de necrosis muestra el edema, la pérdida de integridad de la membrana celular y la salida de los organelos intracelulares al espacio exterior. A la derecha, el proceso de apoptosis muestra integridad de la membrana después de la membrana celular condensación de la cromatina y los cuerpos apoptóticos que contienen organelos (Tomada de Elena, 2002).

Bioquímicamente el proceso de apoptosis implica una cascada de señalización que conduce a dichos cambios histológicos, donde la mayoría de las vía apoptóticas convergen en una cascada común de cistein-proteasas (caspasas). Las caspasas son centrales al mecanismo de la apoptosis ya que son tanto iniciadoras como ejecutoras del proceso (Elena, 2002; Sosa *et al.*, 2012).

Existen dos vía que pueden llevar a apoptosis: inducción positiva o externa por un ligando unido a receptores específicos de la membrana plasmática y la inducción negativa o interna que ocurre por pérdida de la actividad supresora de mecanismos intracelulares. La inducción positiva involucra ligandos que por una porción intracelular del receptor transducen al interior una señal; esa porción es llamada dominio de muerte. La inducción negativa se produce por perdida de la actividad supresora a cargo de una familia de proteínas específicas que están relacionadas con la mitocondria. El cuadro 3 muestra las diferencias entre el proceso de apoptosis y el de necrosis (Elena, 2002; Sosa *et al.*, 2012).

Cuadro 3. Diferencias entre los procesos de necrosis y de apoptosis

característica	necrosis	apoptosis
Estimulo	Agresión masiva, toxinas, anoxia, caída de ATP	Condiciones fisiológicas y patológicas sin caída de ATP
Requerimientos de energía	Ninguno	Dependiente de ATP
Histología	Lisis del citoplasma y organelos. Se da en sectores de tejido	Condensación de la cromatina, cuerpos apoptóticos. Se da en células aisladas.
Ruptura del ADN	En tamaños irregulares	Fragmentos de 185 pares de bases o múltiplos.
Membrana plasmática	Lisis	Intacta, con alteraciones moleculares
Fagocitosis de las células muertas	Fagocitosis inmigrantes	Células vecinas
Reacción tisular	Inflamación	Sin inflamación

2. Planteamiento del problema

Las poblaciones humanas nos encontramos expuestas a diversos xenobióticos como son los metales pesados. Entre ellos, los compuestos de Cr (VI) llaman la atención para su estudio debido a que son ampliamente utilizados en diferentes industrias. A los estos compuestos, se les ha asociado con el desarrollo de algunos tipos de cáncer y se ha observado que son capaces de inducir daño genotóxico, mediante la generación de ERO's y RL durante su reducción intracelular a Cr (III). En contraparte, recientemente ha surgido el interés de estudiar sustancias que puedan proteger o contrarrestar el daño al ADN inducido por el EOx. Dentro de la dieta humana se encuentran varios componentes que presentan propiedades antioxidantes, principalmente en frutas y vegetales, así como en bebidas como el té verde, cerveza, vino tinto entre otras. Entre los compuestos con mayor poder antioxidante se encuentran los polifenoles del té verde. Es por ello que resulta interesante estudiar *in vivo*, los efectos de extractos polifenólicos del té verde (P60), y en particular sus catequinas y flavonoles (kaemferol) sobre el daño en el material genético inducido por agentes que generan EOx, como lo son los compuestos de Cr (VI).

3. Hipótesis

Se ha observado que los compuestos de Cr (VI) son capaces de atravesar la membrana celular y reducirse a Cr (III) generando ERO's y RL que interaccionan con macromoléculas como el ADN, lípidos y proteínas. Por su parte los polifenoles del té verde presentan una gran capacidad antioxidante. Por lo que, en el presente estudio se espera que la administración previa de antioxidantes del té verde (extractos de polifenoles, catequinas y kaemferol) a ratones tratados con compuestos de Cr (VI) reduzca el daño genotóxico y citotóxico producido por el compuesto metálico cancerígeno (CrO₃).

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de los antioxidantes del té verde (extracto de polifenoles de té verde [P60], catequinas y kaemferol) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por Cr (VI), mediante la evaluación de MN y de apoptosis en ratones de la cepa CD-1 tratados con CrO₃.

4.2. Objetivos particulares

- Establecer la dosis de los antioxidantes del té verde (extracto de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol) que no inducen daño genotóxico ni citotóxico, mediante la evaluación de MN en EPC de sangre periférica de ratón y de la relación de EPC con respecto a los ENC, así como de la viabilidad celular en leucocitos de sangre periférica de ratón.
- Establecer la dosis genotóxica y citotóxica del CrO_3 , mediante la evaluación de MN en EPC de sangre periférica de ratón y la evaluación de la relación de EPC con respecto a los ENC, así como la viabilidad celular en leucocitos de sangre periférica de ratón.
- Evaluar el efecto de los antioxidantes del té verde (extracto de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol) sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI), mediante la evaluación de MN, en EPC en de sangre periférica de ratón.
- Evaluar el efecto de los antioxidantes del té verde (extracto de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol) sobre el daño citotóxico inducido por Cr (VI), mediante la evaluación de la relación de EPC con respecto a ENC, y de la viabilidad celular en leucocitos de sangre periférica de ratones tratados con CrO_3 .
- Evaluar la apoptosis en leucocitos de sangre periférica de ratones tratados con los antioxidantes del té verde (extracto de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol) y con CrO_3 empleando la técnica de tinción diferencial con NA/BrEt.
- Evaluar el efecto del tratamiento con los antioxidantes del té verde (extracto de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol) previa a la administración de CrO_3 sobre la inducción de apoptosis en en leucocitos de sangre periférica de ratón empleando la técnica de tinción diferencial con NA/BrEt.

5. Material y método

5.1. Animales

Este estudio se emplearon ratones macho de la cepa CD-1 de 2 a 3 meses de edad, con peso entre 30 y 40 g, provenientes del laboratorio Harlan de La Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), los cuales se mantuvieron durante dos semanas en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”, UNAM para su adaptación. Los ratones tuvieron libre acceso al agua y al alimento (nutricubos Purina). Las condiciones de temperatura, humedad y circulación de aire se mantuvieron controladas al igual que el fotoperiodo, con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo fueron establecidos con base a los lineamientos de los programas de la GENOTOX, la EPA, la “*European Center for Ecotoxicology of Chemicals*” (ECETOC) y la FDA (Heddle *et al.*, 1983; EPA, 1984; Mavournin *et al.*, 1990; Hayashi *et al.*, 1994; FDA, 2000).

5.2. Reactivos

Los reactivos manejados en este estudio se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Colorante naranja de acridina (NA) [CAS N° 10127-02-03]; Bromuro de Etidio (BrEt) [CAS N° 1239-45-8]; Extractos de polifenoles de té verde, estos extractos se obtuvieron de una marca comercial conocida como Polyphenon 60 (P60) [CAS N° 138988-88-2]; catequinas [CAS N° 225937-10-0]; kaemferol [CAS N° 520-180-3]; y CrO₃ [CAS N° 133-82-0].

5.3. Tratamientos

Los extractos de polifenoles de té verde, catequinas, kaemferol y CrO₃ fueron preparados 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. Los grupos a tratar fueron de cinco ratones cada uno. Los protocolos se plantearon de acuerdo a los lineamientos propuestos por las agencias reguladoras FDA, EPA e IARC para pruebas de genotoxicidad.

Para cubrir los objetivos se realizarán los siguientes protocolos:

Protocolo 1. Efecto de la administración del extracto de polifenoles de té verde (P60), vía i.g. sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃

Cada grupo contó con un total de cinco ratones machos de la cepa CD-1. Un grupo fue empleado como grupo testigo por lo que se le trató únicamente con el vehículo. Otro grupo de ratones fue tratado con una sola dosis de 30 mg/kg de extracto de polifenoles de té verde, por vía i.g. mientras que un grupo más fue tratado con una sola dosis de 20 mg/kg, por vía i.p. de CrO₃, otro grupo fue tratado con una sola dosis de 30 mg/kg de extracto de polifenoles de té verde, por vía i.g. cuatro horas previas a la administración de 20 mg/kg, por vía i.p. de CrO₃. El tiempo de administración del CrO₃ fue considerado como la hora 0. 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 mediante la evaluación de MN en EPC de sangre periférica de ratón (ver figura 10).

Protocolo 2. Efecto de la administración del extracto de té verde, vía i.p. sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃

Cada grupo contó con un total de cinco ratones machos de la cepa CD-1. Un grupo fue empleado testigo por lo que se le trató únicamente con el vehículo. Otro grupo de ratones fue tratado con una sola dosis de 30 mg/kg de de extracto de polifenoles de té verde, por vía i.p. mientras que un grupo más fue tratado con una sola dosis de 20 mg/kg, por vía i.p. de CrO₃, un último grupo más fue tratado con una sola dosis de 30 mg/kg de de extracto de polifenoles de té verde, por vía i.p. cuatro horas previas a la administración de 20 mg/kg, por vía i.p. de CrO₃. El tiempo de administración del CrO₃ fue considerado como la hora 0. Posteriormente se tomaron muestras de sangre periférica cada 24 hora desde la hora 0 hasta la hora 72 para la evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad mediante la evaluación de MN en EPC de sangre periférica de ratón. Posteriormente se tomaron muestras de sangre periférica a la hora 48, para la evaluación de la viabilidad celular e inducción de apoptosis (ver figura 11).

Efecto de los antioxidantes del té verde sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI)

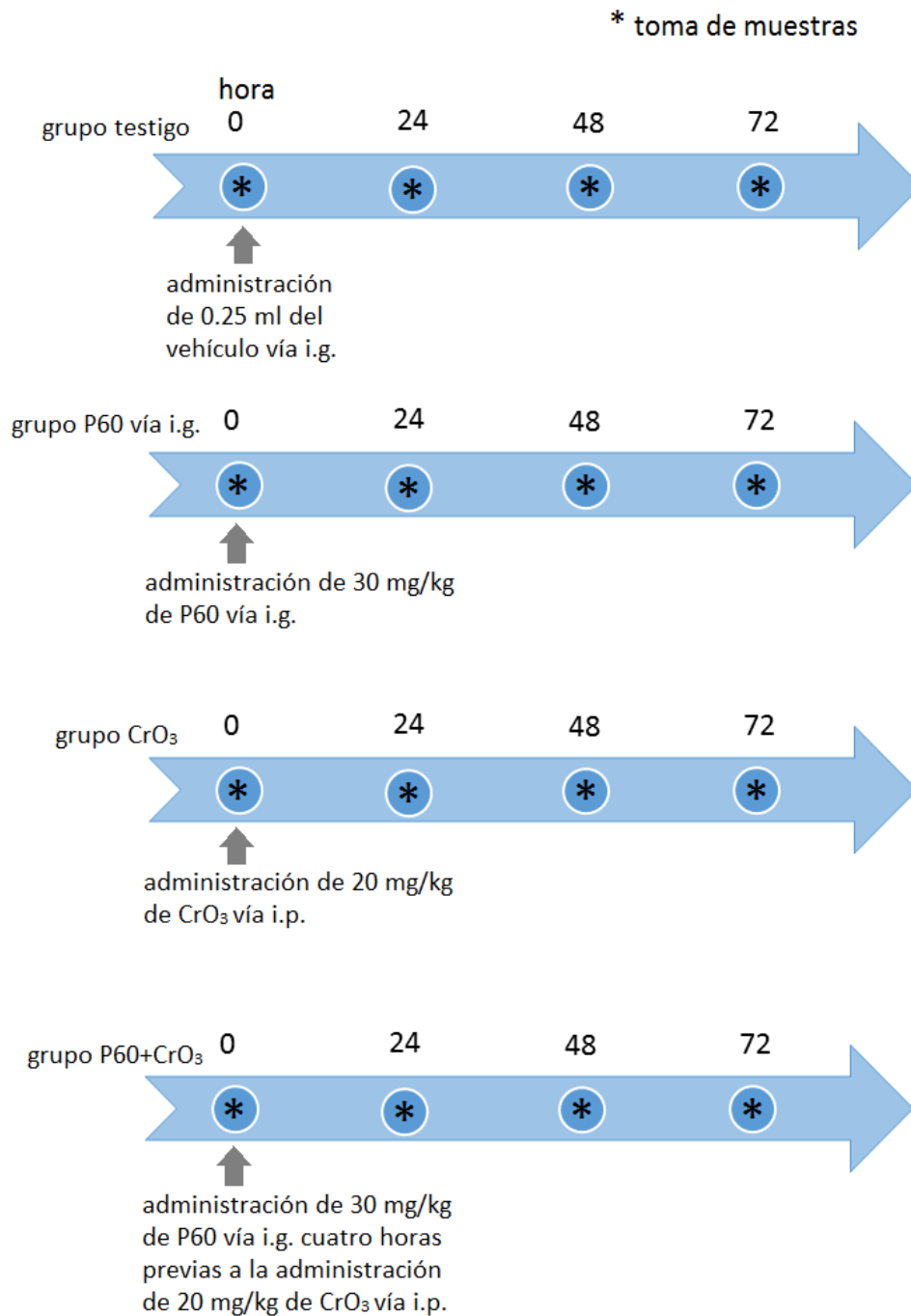


Figura 10. Protocolo 1. Administración del tratamiento con extracto de polifenoles de té verde vía i.g. y CrO₃ vía i.p.

Efecto de los antioxidantes del té verde sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI)

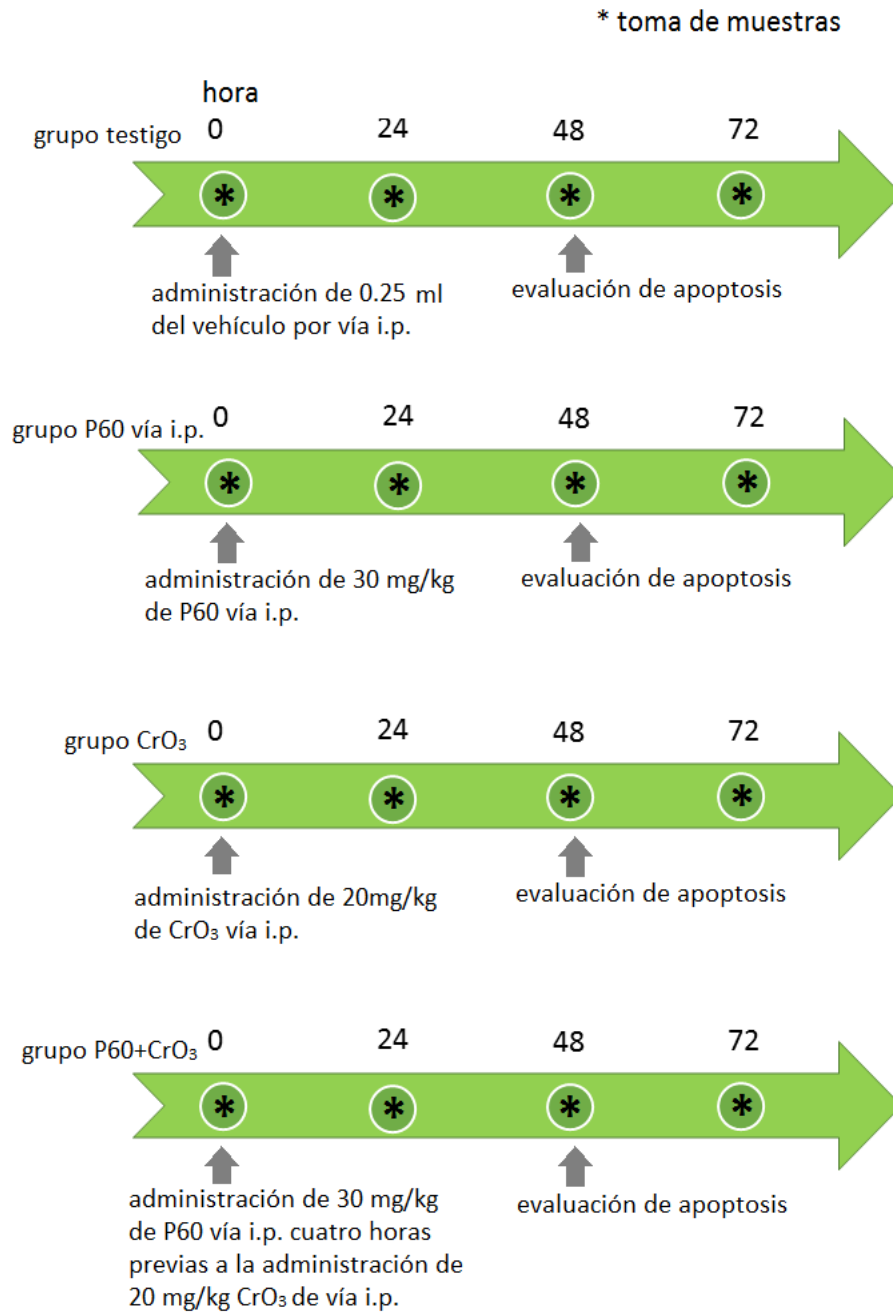


Figura 11. Protocolo 2. Administración del tratamiento con extracto de polifenoles de té verde vía i.p. y CrO₃ vía i.p.

Protocolo 3. Efecto de la administración de catequinas vía i.p. y kaemferol vía i.p. sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃

Cada grupo contó con un total de cinco ratones machos de la cepa CD-1. Un grupo fue empleado como testigo por lo que se le trató únicamente con el vehículo. Dos grupos más fueron tratados con una sola dosis de 500 mg/kg de catequinas, por vía i.p. y otro con una sola dosis de 150 mg/kg de kaemferol por vía i.p. Un grupo más fue tratado con 20 mg/kg, por vía i.p. de CrO₃. Dos grupos más fueron tratados. Uno con una sola dosis de 500 mg/kg de catequinas, por vía i.p. cuatro horas previas a la administración de 20 mg/kg, por vía i.p. de CrO₃ y el otro con una sola dosis de 150 mg/kg de kaemferol, por vía i.p. cuatro horas previas a la administración de 20 mg/kg, por vía i.p. de CrO₃. El tiempo de administración del CrO₃ fue considerado como la hora 0. Posteriormente se tomaron muestras de sangre periférica cada 24 hora desde la hora 0 hasta la hora 72 para la evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad mediante la evaluación de MN en EPC de sangre periférica de ratón. Posteriormente se tomaron muestras de sangre periférica a la hora 48, para la evaluación de la viabilidad celular e inducción de apoptosis (ver figura 12).

Efecto de los antioxidantes del té verde sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI)

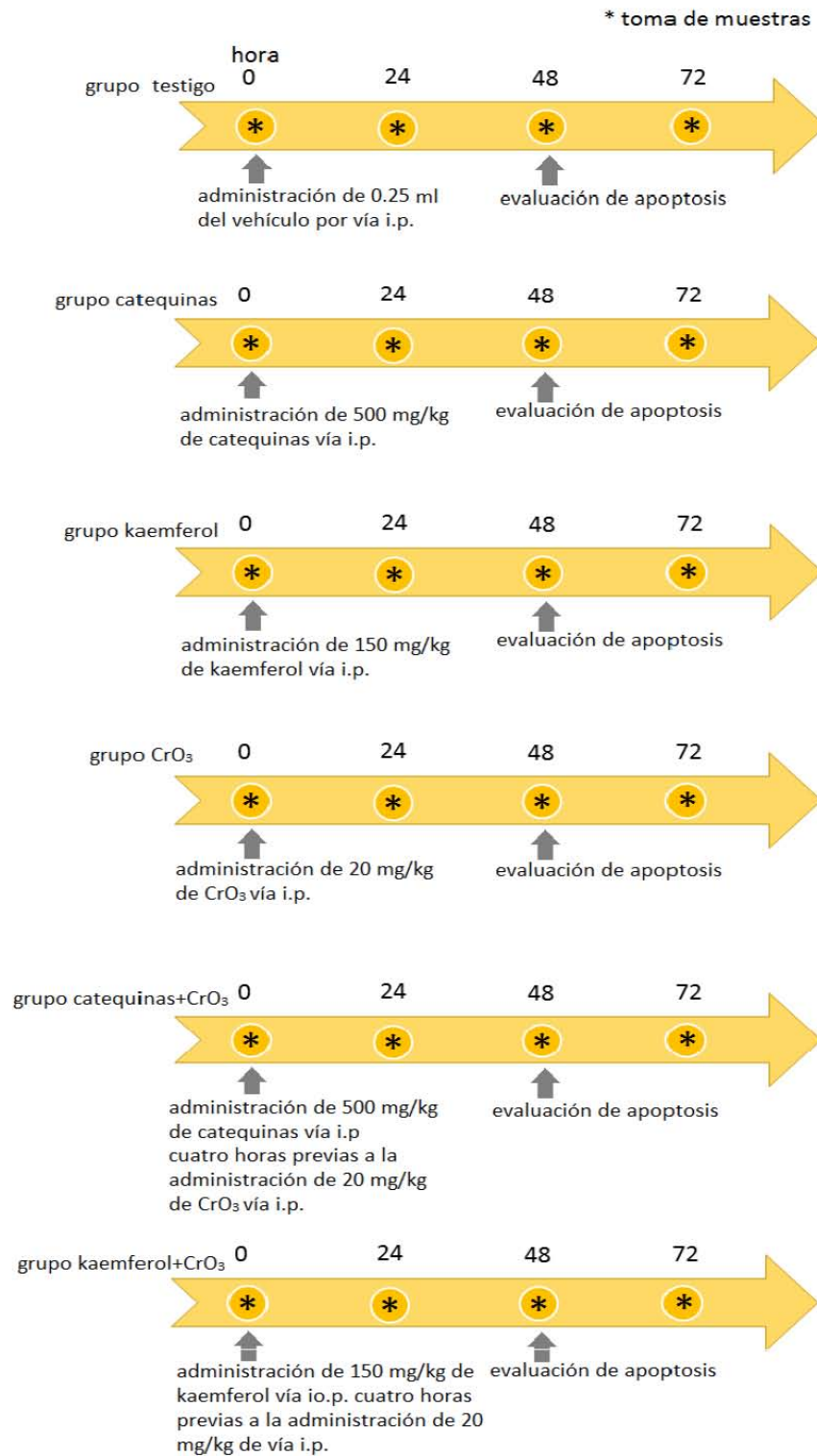


Figura 12. Protocolo 3. Administración de los tratamientos con catequinas vía i.p., kaemferol vía i.p. y CrO₃ vía i.p.

5.4. Establecimiento de las dosis

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 extracto de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol fueron seleccionadas con base en estudios previos, realizados en nuestro laboratorio en los que no se observaron efectos genotóxico tras la administración de 30 mg/kg de peso corporal de extracto de polifenoles de té verde, 500 mg/kg de peso corporal de catequinas y 150 mg/kg de peso corporal de kaemferol.

Una vez seleccionadas las dosis de extracto de polifenoles de té verde, catequinas, kaemferol y CrO₃ y establecidas las condiciones de trabajo, se administraron las dosis de acuerdo a los protocolos previamente descritos. El extracto de polifenoles de té verde, las catequinas y kaemferol fueron administrados cuatro horas previas a la administración de CrO₃ ya que de acuerdo a la farmacocinética de los polifenoles del té verde, estos se encuentran distribuidos por completo en el organismo aproximadamente cuatro horas después de su administración (Chen *et al.*, 1997).

5.5. Evaluación de la inducción de MN en EPC y la relación de EPC con respecto a ENC

5.5.1. Preparación de laminillas

Las laminillas se prepararon con naranja de acridina (NA) este proceso es previo a la toma de muestras. Para ello se preparó una solución de NA con agua desionizada y se colocó la solución sobre un portaobjetos precalentado de acuerdo a la técnica previamente descrita por Hayashi *et al.*, (1990).

5.5.2. Toma de muestras

Posteriormente a la administración de los tratamientos se obtuvieron muestras de sangre periférica de los ratones, en los tiempos de evaluación establecidos. Las muestras se obtuvieron de la vena caudal, se colocaron aproximadamente 10 μ L directamente al centro de las laminillas previamente preparadas con NA, inmediatamente después se colocó un cubreobjetos cual fue sellado con silicón líquido. En cada toma de muestras se prepararon 2 laminillas por ratón. Las preparaciones de muestras se guardaron en cajas de plástico y bajo la oscuridad, a una temperatura de 4°C hasta su evaluación. El análisis de las muestras se realizó al menos 24 horas después de haber sido preparadas, procurando no exceder de los ocho días.

5.5.3. Evaluación de muestras

La evaluación de las muestras se realizó en los eritrocitos de la sangre periférica, con ayuda de un microscopio de fluorescencia (luz azul) con filtro de luz amarilla (Nikon OPTIPHOT-2). El daño citotóxico se evaluó con la frecuencia de EPC con respecto a los ENC de 1000 eritrocitos totales; mientras que la evaluación del daño genotóxico se evaluó mediante la frecuencia de MN presentes en los EPC analizando 2000 eritrocitos totales. La figura 13 muestra el diagrama de flujo del procedimiento realizado para el análisis del daño genotóxico y citotóxico. (Schmid y Von Ledebur, 1973; Hayashi *et al.*, 2000; Krishna y Hayashi, 2000).

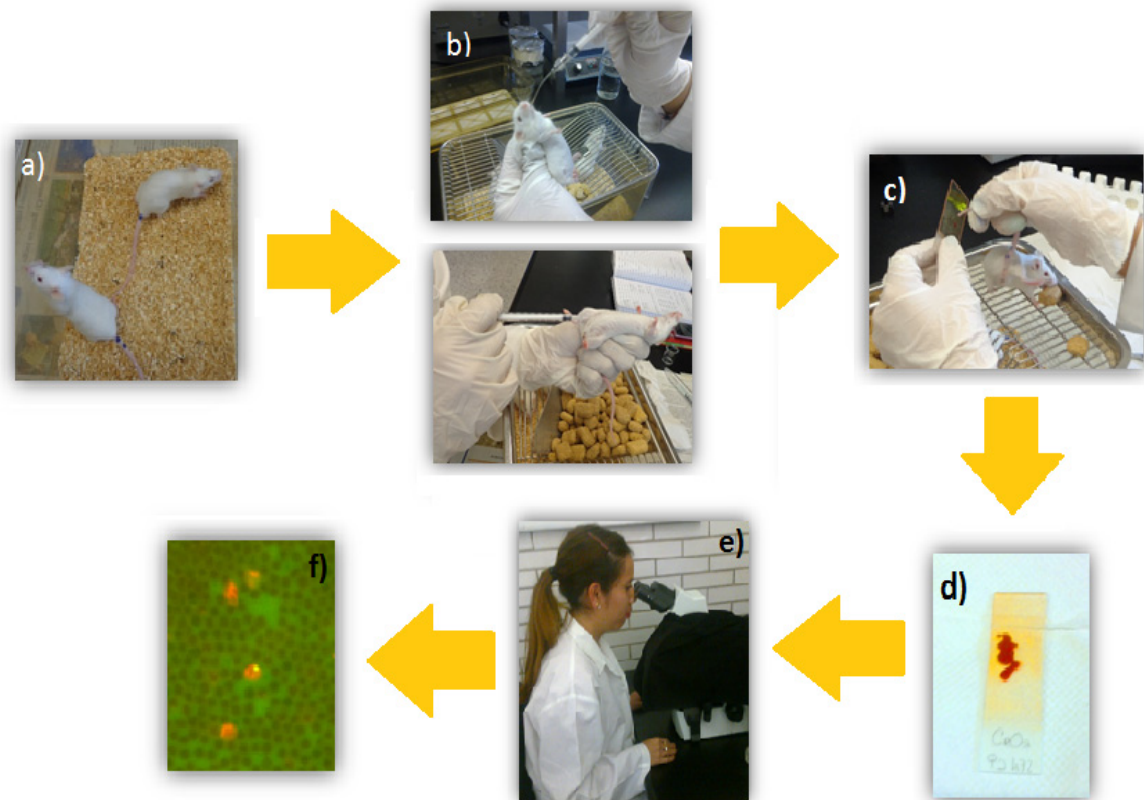


Figura 13. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico: a) grupos de 5 ratones de la cepa CD-1; b) administración de los diferentes tratamientos; c) toma de muestra de sangre periférica; d) preparación de las laminillas; e) observación de las muestras bajo el microscopio de fluorescencia; f) evaluación del daño genotóxico y citotóxico mediante el método de MN teñidos con NA.

5.6. Evaluación de la viabilidad, apoptosis y necrosis

La inducción de apoptosis fue evaluada mediante de la tinción con NA y BrEt, con esta técnica es posible determinar las células que han muerto por apoptosis debido a, los cambios morfológicos característicos que tienen lugar en una célula apoptótica como lo es la condensación y fragmentación de la cromatina y el colapso nuclear mientras que la membrana plasmática está todavía intacta. Esta técnica emplea la tinción diferencial de unión al ADN de colorantes fluorescentes (NA y BrEt), para determinar las células viables de las no viables en una población dada, además nos permiten conocer si las células se encuentran en apoptosis se basándose en la integridad de la membrana. El NA se intercala con ADN dando una apariencia verde. Mientras que el BrEt se une solamente a las células no viables este colorante también se intercala con el ADN haciendo que la célula tenga apariencia de color anaranjado y se une débilmente al ARN dando una ligera apariencia roja (McGahon *et al.*, 1995; García-Rodríguez *et al.*, 2013).

5.6.1. 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 BrEt utilizando solución amortiguadora de fosfatos (PBS) como diluyente, de acuerdo a la técnica descrita por McGahon *et al.*, (1995), con algunas modificaciones (García-Rodríguez *et al.*, 2013). La mezcla se almacenó en un frasco ámbar en la oscuridad hasta el momento de su uso.

5.6.2. Toma de muestras

Después de los tratamientos establecidos en los protocolo 2 y 3 se obtuvieron antes (hora 0) y después del tratamiento (hora 48), muestras de aproximadamente 100µl de sangre periférica a partir de un pequeño corte en la vena caudal del ratón, con ayuda de unas tijeras de punta fina. La sangre fue directamente extraída con ayuda de una jeringa heparinizada, la muestra se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos, después de eliminar el sobrenadante se agregaron 20 µl de la mezcla de colorantes (100µg de NA+100µg de BrEt preparados ambos en PBS) y se agitó suavemente, posteriormente se colocaron 10µl de la suspensión celular teñida sobre laminillas limpias estas fueron cubiertas con cubreobjetos, se realizaron dos preparaciones por ratón (García-Rodríguez *et al.*, 2013).

5.6.3. Evaluación de muestras

Las preparaciones fueron evaluadas inmediatamente en un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2) con filtro de excitación azul y un filtro de emisión de luz amarilla. Se evaluaron 200 células totales; para la evaluación de la viabilidad se contabilizaron las células viables y no viables, mientras que para el análisis de apoptosis y necrosis se identificaron en los siguientes grupos: células viables no apoptóticas; células no viables no apoptóticas; células viables apoptóticas y células no viables apoptóticas. La figura 14 (García-Rodríguez *et al.*, 2013).

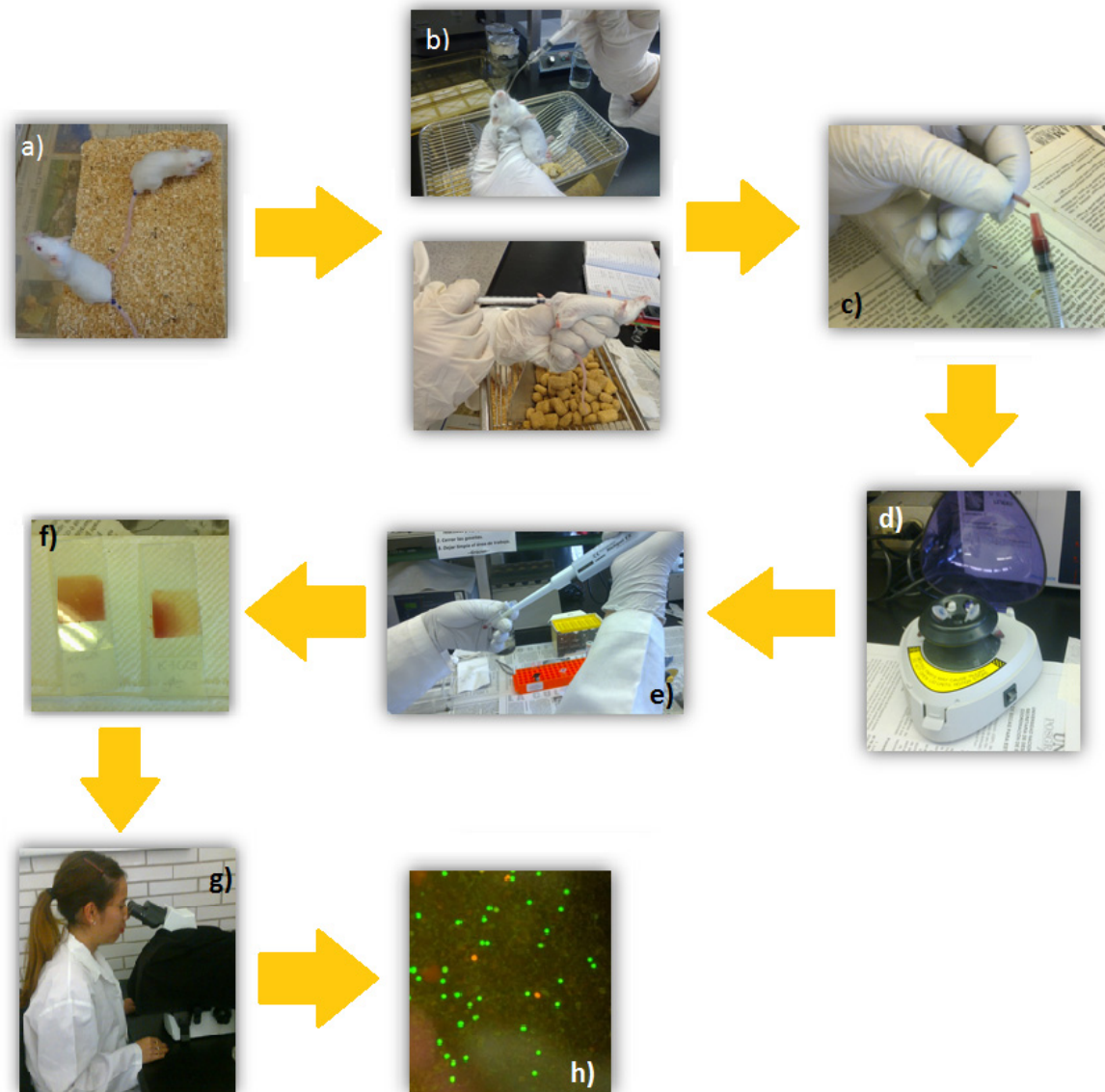


Figura 14. Evaluación de la viabilidad y apoptosis: a) grupos de 5 ratones de la cepa CD-1; b) administración de los diferentes tratamientos; c) toma de muestra de sangre periférica; d) centrifugación de las muestras a 5000 rpm; e) eliminación del sobrenadante y adición de la mezcla de colorantes BrEt y NA; f) preparación de las muestras sobre laminillas limpias; g) observación de las muestras bajo el microscopio de fluorescencia; h) evaluación de viabilidad y apoptosis mediante la tinción diferencial con colorantes BrEt y NA.

5.7. Análisis estadístico

Los resultados de la frecuencia de inducción de MN, frecuencia de EPC, y el análisis de viabilidad se presentan como media \pm desviación estándar, con el programa estadístico *SPSS/PC V19™*, se compararon mediante un análisis de varianzas (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey para determinar la significancia entre los promedios de cada grupo. Además 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) y la frecuencia diferencial de la inducción de MN (DIF por sus siglas en inglés), que permitió descartar la posibilidad de que el efecto observado fuera producto de la manipulación de los animales (García-Rodríguez *et al.*, 2001). Los datos obtenidos de los cálculos de NIF y DIF y los resultados del ensayo de viabilidad y apoptosis se analizaron con una chi-cuadrada, con el programa *Statistica V7.0*. Para todos los casos se consideró el nivel de significancia de $p < 0.05$ (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001).

6. Resultados

La tinción obtenida con la técnica de NA desarrollada por Hayashi *et al.*, (1990) permite distinguir fácilmente a los EPC, ya que al contener ARN se tiñen de color naranja fluorescente, mientras que los ENC, no son teñidos por lo que se observan oscuros. Los MN se observan como cuerpos redondos de color verde-amarillo, debido a la presencia de ADN (figura 15). Dentro de las ventajas de la técnica de MN se incluyen la facilidad y rapidez, la posibilidad de probar un sólo químico sin otros compuestos, la abundancia de células analizables en diferentes periodos del ciclo celular y el que los MN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase; además, la prueba no deja lugar a dudas sobre el daño producido, pues lo que se observa como MN es claramente una pérdida de ADN (Schmid y Von Ledebur, 1973; Hayashi *et al.*, 2000; Krishna y Hayashi, 2000).

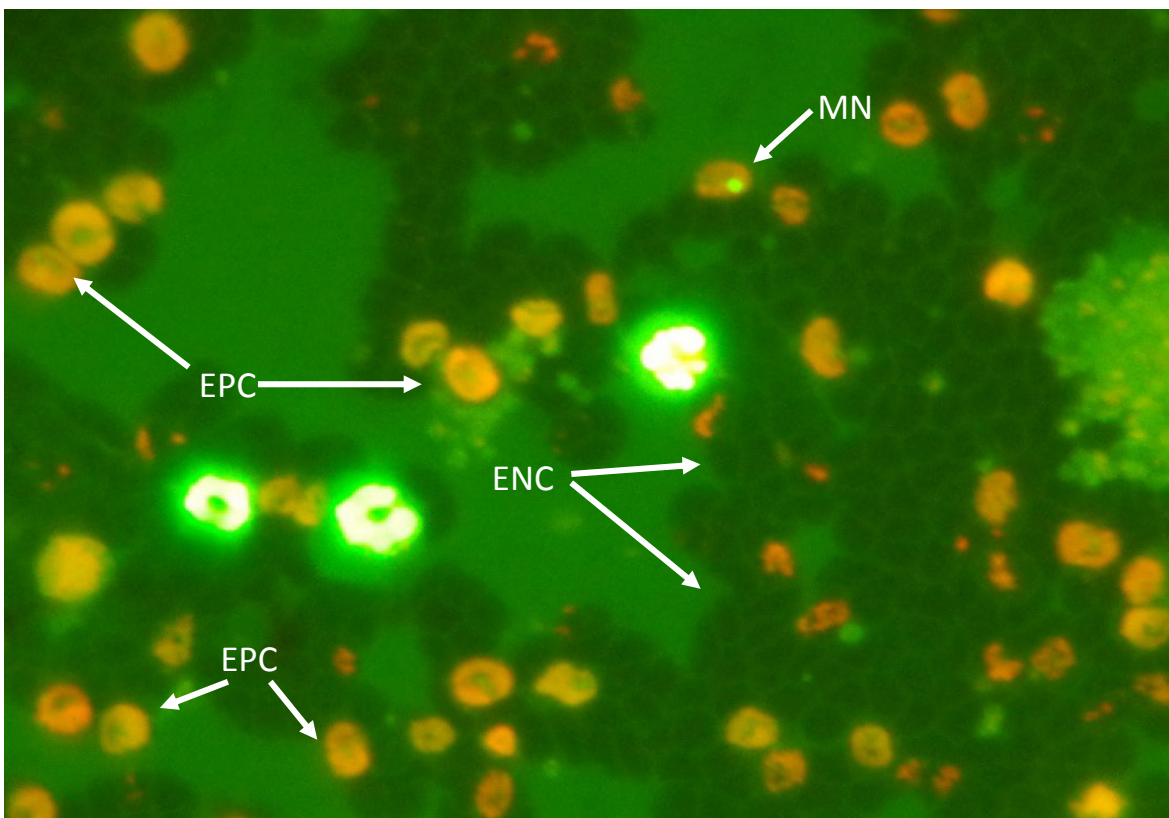


Figura 15. Eritrocitos de sangre periférica de ratón teñidos con la técnica de NA. Se observan los ENC, EPC, y EPC con MN.

6.1. Efecto del extracto de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol sobre MN inducidos por el CrO₃

En el cuadro 4 se muestran los promedios de las frecuencias de MN \pm desviación estándar, evaluadas de las 0 a las 72 horas cuando se administraron los tratamientos de extracto de polifenoles de té verde, (30 mg/kg vía i.g.), CrO₃ (20 mg/kg vía i.p.) y la combinación de extracto de polifenoles de té verde, cuatro horas previas a la administración de CrO₃ (30 mg/kg vía i.g. y 20 mg/kg vía i.p. respectivamente). Los resultados muestran que el tratamiento con extracto de polifenoles de té verde, vía i.g. no incrementa de forma significativa los promedios de MN en ninguna de las horas evaluadas. Mientras que el grupo tratado con CrO₃ mostró un incremento en las frecuencias de MN (3, 8 y 5 a las 24, 48 y 72 horas respectivamente) que resultaron estadísticamente significativos al compararse con el grupo testigo.

El incremento de las frecuencias de MN de la hora 48 de este mismo grupo es estadísticamente significativo al ser comparado con su respectiva hora 0 (es decir la evaluación antes de administrar el CrO₃), con un incremento de alrededor de 5 MN. Cuando se combinaron los tratamientos (grupo extractos de polifenoles de té verde, P60 y CrO₃) se encontró una disminución significativa en las frecuencias de MN en las horas 24, 48 y 72 (entre 4 y 5 MN), con respecto al grupo tratado sólo con CrO₃. Sin embargo el valor observado a la hora 72 aún es significativo con respecto a la hora 0 del grupo.

Cuadro 4. Frecuencia de MN en ratones macho CD-1 tratados con extracto de polifenoles de té verde, vía i.g., CrO₃ vía i.p. y la combinación extracto de polifenolesde té verde+CrO₃

tratamiento	dosis (mg/kg)	n	hora	MN/2000 células media ± d. e.	ANOVA p<0.05
testigo	0	5	0	0.6 ± 0.9	
			24	1.0 ± 1.0	
			48	1.2 ± 0.8	
			72	1.6 ± 1.5	
P60	30	5	0	1.0 ± 1.2	
			24	1.8 ± 1.9	
			48	1.2 ± 1.3	
			72	1.4 ± 0.5	
CrO ₃	20	5	0	3.6 ± 0.9	
			24	4.4 ± 0.5	a, d
			48	9.0 ± 2.7	a, b, e
			72	6.4 ± 2.3	a, f
P60+CrO ₃	30+20	5	0	1.2 ± 1.3	
			24	0.6 ± 0.5	
			48	5.2 ± 1.8	a, c
			72	1.2 ± 1.0	

^a:vs testigo; ^b:vs CrO₃ h 0; ^c:vs P60 y CrO₃ h 0; ^d:vs P60 y CrO₃ h 24; ^e:vs P60 y CrO₃ h 48; ^f:vs P60+CrO₃ h 72

A pesar de que se observó disminución de las frecuencias de MN cuando se administró el extracto de polifenoles de té verde vía i.g., previo a la administración de CrO₃, la frecuencia de MN observada a la hora 48 aún resultó significativa al ser comparada con el testigo, al igual que con su respectiva hora 0 (alrededor de 4 MN), lo que sugiere una protección parcial del daño genotóxico. Por ello se optó por administrar el extracto de polifenoles de té verde, por vía i.p. a fin de observar un efecto más directo en la posible protección del daño genotóxico.

En el cuadro 5 se muestran los promedios de las frecuencias de MN \pm desviación estándar, evaluados de las 0 a las 72 horas cuando se administraron los tratamientos extracto de polifenoles de té verde (30 mg/kg vía i.p.), CrO₃ (20 mg/kg vía i.p.) y la combinación de extracto de polifenoles de té verde, cuatro horas previas a la administración de CrO₃ (30 mg/kg vía i.p. y 20 mg/kg vía i.p. respectivamente). De igual manera la administración del extracto de polifenoles de té verde, no incrementó los promedios de MN en ninguna de las horas evaluadas en comparación con el grupo testigo. El incremento en las frecuencias de MN en el grupo tratado con CrO₃ se ratifica al incrementarse aproximadamente 12 MN, a la hora 48. Por otra parte se observa la disminución de las frecuencias de MN en el grupo tratado con extracto de polifenoles de té verde, cuatro horas previas a la administración de CrO₃ fue mayor en todas las horas evaluadas (alrededor de 10 MN) en comparación con el tratamiento vía i.g. Estos resultados muestran una mayor eficacia del extracto de polifenoles de té verde, vía i.p. en la protección frente al daño genotóxico ocasionado por la administración de CrO₃.

Cuadro 5. Frecuencia de MN en ratones macho CD-1 tratados con extracto de polifenoles de té verde, vía i.p., CrO₃, y la combinación de ambos tratamientos extractos de polifenoles de té verde+CrO₃

tratamiento	dosis (mg/kg)	n	hora	MN/2000 células media ± d. e.	ANOVA p<0.05
testigo	0	5	0	0.4 ± 0.5	
			24	1.0 ± 0.7	
			48	1.0 ± 1.2	
			72	1.2 ± 1.3	
P60	30	5	0	0.6 ± 0.9	
			24	1.0 ± 1.2	
			48	0.0 ± 0.0	
			72	1.6 ± 1.5	
CrO ₃	20	5	0	0.2 ± 0.4	
			24	3.0 ± 1.6	
			48	13.2 ± 3.8	a, b, c
			72	3.4 ± 1.1	
P60+CrO ₃	30+20	5	0	1.2 ± 0.8	
			24	2.6 ± 2.3	
			48	3.4 ± 1.1	
			72	1.8 ± 1.5	

^a: vs testigo; ^b: vs CrO₃ h 0; ^c: vs P60+CrO₃ h 48

Debido a la variabilidad existente en las frecuencias de MN basales (es decir cuando aún no se han administrado los tratamientos hora 0), se realizó el cálculo de la Frecuencia Neta de inducción de MN (NIF por sus siglas en inglés) este cálculo parte de la premisa de que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que al restar el número de MN evaluados en la hora 0 a las siguientes horas, se asume que se obtiene la inducción neta de MN (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

$$\text{NIF} = \text{MN observados en "A" a la hora } x_i - \text{MN observados en "A" a la hora } x_0$$

Dónde: "A"=grupo; x_i =tiempo de evaluación; x_0 =tiempo 0

En la figura 16 se muestra el análisis de NIF por tiempo y por grupo, calculado para 10 000 EPC, de los grupos tratados con CrO_3 , extracto de polifenoles de té verde, vía i.g, y extracto de polifenoles de té verde, vía i.g. previo a la administración de CrO_3 (figura 16A); extracto de polifenoles de té verde, vía i.p. y extracto de polifenoles de té verde, vía i.p. previo a la administración de CrO_3 (figura 16B). Al realizar este análisis se observa que en el grupo tratado con extracto de polifenoles de té verde, vía i.g. cuatro horas previas a la administración de CrO_3 hay una protección del daño genotóxico del 175% a las 24 horas y que esta disminuye a 26% a las 48 horas, mientras que a las 72 horas la protección es del 100%. Mientras que al analizar el grupo tratado con extracto de polifenoles de té verde, vía i.p. en combinación con CrO_3 se observa una protección del 50% a las 24 horas y del 83% y 81% a las 48 y 72 horas respectivamente, por lo que se sugiere una protección más consistente cuando el extracto de polifenoles de té verde, es administrado por vía i.p.

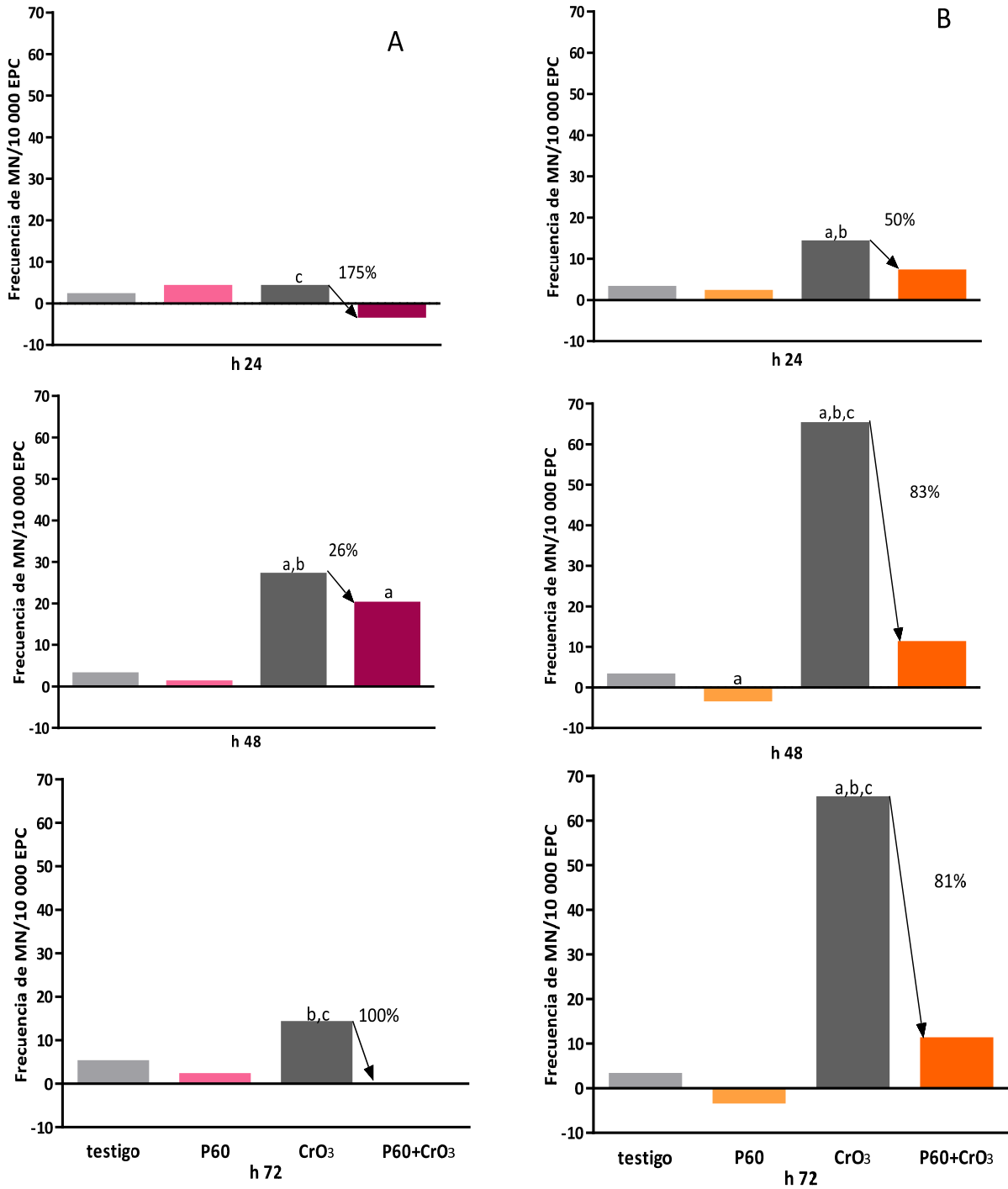


Figura 16. Análisis de NIF de MN por tiempo y grupo calculado para 10 000 EPC, de los grupos tratados con extracto de polifenoles de té verde, CrO₃ y la combinación extracto de polifenoles de té verde+CrO₃ por vía i.g. (A) y vía i.p. (B) p<0.05: a: vs testigo; b: vs extracto de polifenoles de té verde; c: vs extracto de polifenoles de té verde+CrO₃.

También se calculó la frecuencia diferencial de inducción de MN (DIF por sus siglas en inglés), con la intención de descartar los MN inducidos por el manejo de los ratones durante el experimento. Este análisis consiste en restar los MN observados en todas las horas del grupo testigo a sus correspondientes horas evaluadas de los diferentes grupos tratados tanto con CrO₃, como con extracto de polifenoles de té verde, así como la administración de extracto de polifenoles de té verde, cuatro horas previas a las administración de CrO₃, de tal forma que se apreciaran únicamente los MN inducidos por los diferentes tratamientos (García Rodríguez *et al.*, 2001).

$$\text{DIF} = \text{MN observados en "A" a la hora } x_i - \text{MN observados en "T" a la hora } x_i$$

Dónde: "A"=grupo; x_i =tiempo de evaluación; x_0 =tiempo 0; T=grupo testigo

En la figura 17 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN al realizar el análisis de DIF, en la figura 17A se observa que el grupo tratado con extracto de polifenoles de té verde, vía i.g., no presenta variaciones significativas con respecto a sus frecuencias basales, mientras que los grupos tratados cuatro horas antes con extracto de polifenoles de té verde, vía i.g. a la administración de CrO₃ presentan un comportamiento similar; sin embargo en este grupo disminuye la inducción de MN en todas las horas evaluadas en comparación con el grupo tratado sólo con CrO₃. En la figura 17B se observa que el grupo tratado con CrO₃, incrementa las frecuencias basales de MN en todas las horas evaluadas, presentándose el mayor pico de inducción a la hora 48. El grupo tratado sólo con extracto de polifenoles de té verde, vía i.p. disminuye significativamente la frecuencia basal de MN a la hora 48. El grupo donde se administró extracto de polifenoles de té verde, vía i.p. previo a la administración de CrO₃ no presenta variaciones significativas con respecto a sus frecuencias basales.

Efecto de los antioxidantes del té verde sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI)

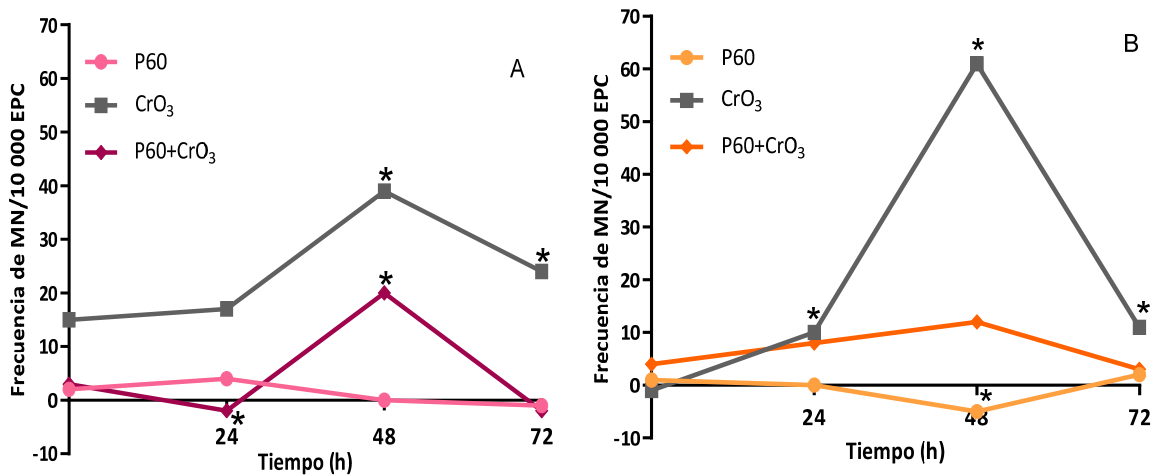


Figura 17. Análisis de DIF de MN por tiempo y grupo, calculado para 10 000 EPC, de los grupos tratados con extracto de polifenoles de té verde, CrO₃ y la combinación extracto de polifenoles de té verde+CrO₃ por vía i.g. (A) y vía i.p. (B), p<0.05: * : vs h 0 de cada tratamiento.

Dado que el extracto de polifenoles de té verde, es una mezcla comercial de polifenoles, presentes en el té verde se realizó el estudio empleando las catequinas al 100%, debido a que estos flavanoles se encuentran en un porcentaje del 60% en la mezcla de extracto de polifenoles de té verde (P60). También se seleccionó el kaemferol, flavonol presente en el té verde y que junto con la quercetina son los más consumidos en la dieta humana. En el cuadro 6 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluadas de las 0 a las 72 horas cuando se administraron los tratamientos catequinas (500 mg/kg vía i.p.), kaemferol (150 mg/kg vía i.p.), CrO₃ (20 mg/kg vía i.p.), la combinación de catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO₃ (500 mg/kg vía i.p. y 20 mg/kg vía i.p. respectivamente) y kaemferol cuatro horas previas a la administración de CrO₃ (150 mg/kg vía i.p. y 20 mg/kg vía i.p. respectivamente). Se observa que el tratamiento con catequinas al igual que con kaemferol no incrementan significativamente las frecuencias de MN en ninguna de las horas evaluadas. Se ratifica la generación de daño genotóxico en el grupo tratado sólo con CrO₃. Cuando se trató al grupo con catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO₃ se observó una disminución significativa de los promedios de MN a las horas 48 y 72 (alrededor de 4 MN), en este grupo se presentó la muerte de un organismo a la hora 48 después del tratamiento por lo que para la hora 72 la n del grupo fue de 4 organismos.

El grupo tratado con kaemferol previo a la administración de CrO₃ también se observó una disminución significativa, en las frecuencias del MN, la hora 48 y 72 (alrededor de 5 y 4 respectivamente).

Cuadro 6. Frecuencia de MN en ratones macho CD-1 tratados con catequinas, kaemferol, CrO₃, la combinación catequinas+CrO₃ y kaemferol+CrO₃

tratamiento	dosis (mg/kg)	n	hora	MN/2 000 células media ± d. e	ANOVA p<0.05
testigo	0	5	0	0.6 ± 0.5	
			24	0.0 ± 0.0	
			48	1.4 ± 1.5	
			72	0.6 ± 0.5	
catequinas	500	5	0	1.6 ± 0.9	
			24	0.8 ± 1.1	
			48	0.8 ± 0.8	
			72	1.0 ± 1.4	
kaemferol	150	5	0	0.8 ± 0.8	
			24	1.0 ± 1.7	
			48	1.2 ± 2.2	
			72	1.4 ± 0.9	
CrO ₃	20	5	0	0.8 ± 1.1	
			24	2.4 ± 2.4	
			48	5.8 ± 2.4	a, b, c, e
			72	5.4 ± 0.9	a, b, d, f
catequinas+CrO ₃	500+20	5	0	0.2 ± 0.4	
			24	0.6 ± 0.9	
			48 [†]	1.8 ± 2.2	
			72 [*]	1.0 ± 1.7	
kaemferol+CrO ₃	150+20	5	0	0.2 ± 0.4	
			24	1.2 ± 1.3	
			48	0.8 ± 1.3	
			72	1.4 ± 1.1	

^a:vs testigo; ^b:vs CrO₃ h 0; ^c:vs catequinas+CrO₃ h 48; ^d:vs catequinas+CrO₃ h 72; ^e:vs kaemferol+CrO₃ h 48; ^f:vs kamferol+CrO₃ h 72; [†] muerte de un organismo; ^{*}: n= 4 organismos.

En la figura 18 se muestra el análisis de NIF por tiempo y por grupo, calculado para 10 000 EPC, de los grupos tratados con CrO₃, catequinas, kaemferol, y la combinación de cada uno de estos flavonoides con CrO₃. Al realizar este análisis se observa que en el grupo tratado con catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO₃ hay una protección del daño genotóxico del 75% a la hora 24, mientras que en la misma hora del grupo tratado con kaemferol cuatro horas previas a la administración de CrO₃ se observa una protección del 38%, ambos datos aun son significativos al ser comparados contra el grupo testigo. A la hora 48 en el grupo tratado con catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO₃ se observa una protección del 68%, además hay que recordar que en esta hora se presentó la muerte de un organismo. En la misma hora del grupo tratado con kaemferol previo a la administración de CrO₃ hay una protección del 88%. Al realizarse el análisis de la hora 72 se se observa el mayor porcentaje de protección en el grupo tratado con catequinas previo a la administración de CrO₃ (83%), por su parte en la misma hora de evaluación del grupo tratado con kaemferol previo a la administración de CrO₃, hay una disminución del daño genotóxico del 74%.

Efecto de los antioxidantes del té verde sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI)

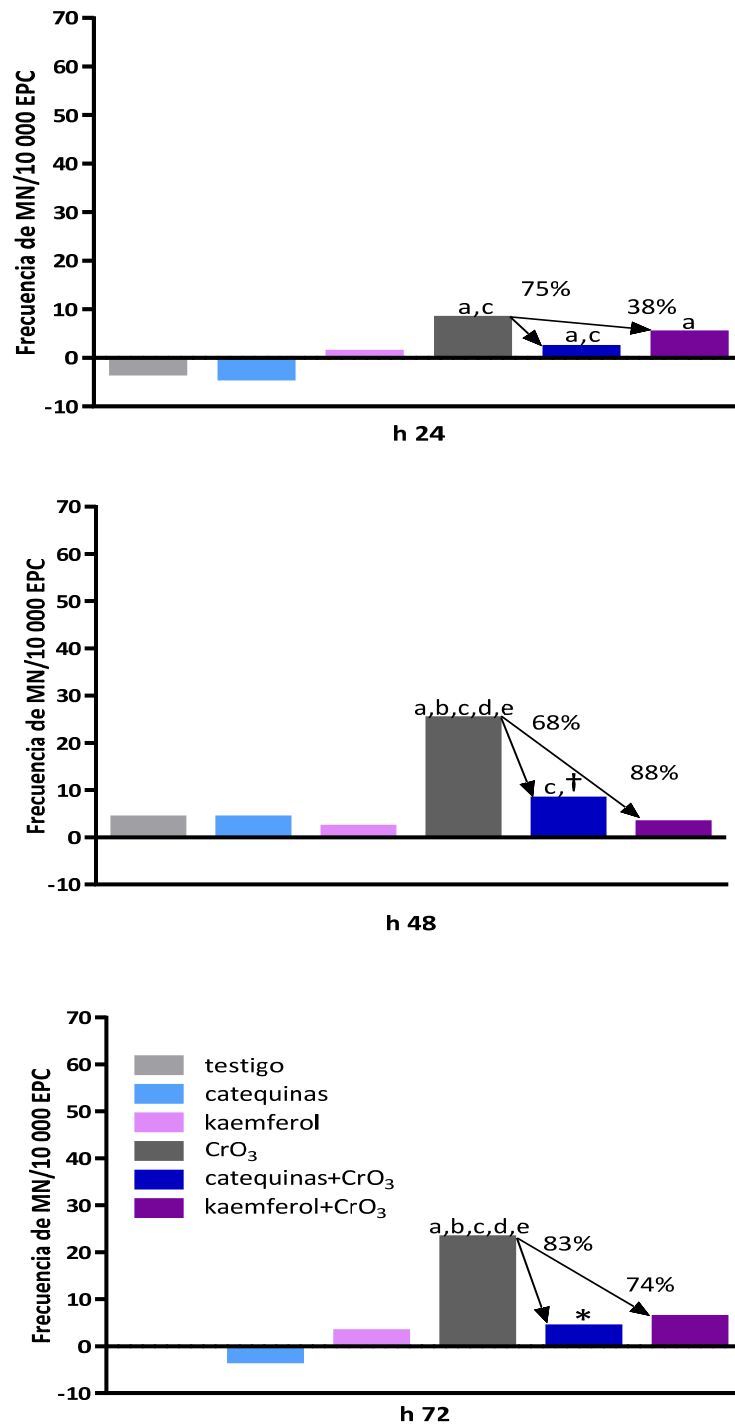


Figura 18. Análisis de NIF de MN por tiempo y por grupo, calculado para 10 000 EPC, de los grupos tratados con catequinas, kaemferol, CrO₃, catequinas+CrO₃ y kaemferol+CrO₃. $p < 0.05$: ^a: vs testigo; ^b: vs kaemferol; ^c: vs catequinas; ^d: vs catequinas+CrO₃; ^e: vs kaemferol+CrO₃; [†]: muerte de un organismo; *: n = 4 organismos

En la figura 19 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN tras realizar el análisis de DIF, para los grupos tratados con CrO₃, catequinas, kaemferol, catequinas previo a la administración de CrO₃ y kaemferol previo a la administración de CrO₃. Se observa que el grupo tratado sólo con CrO₃, incrementa las frecuencias de MN a las horas 48 y 72 con respecto a su frecuencia basal (hora 0). Los grupos que incluyeron el tratamiento con flavonoides (catequinas o kaemferol), ya sea en combinación o no con CrO₃, presentan un comportamiento muy similar ya que a la hora 24 después de los tratamientos se observa un ligero incremento en las frecuencias de MN basales que solo resulta significativa en los grupos tratados con kamferol cuatro horas previas al tratamiento con CrO₃ y en el grupo tratado con catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO₃. Para la hora 48 de evaluación se observa una disminución de los MN basales observados que sólo es significativa en el grupo tratado con catequinas. Hay que recordar que, cuando las catequinas se combinaron con el CrO₃, se presentó la muerte de un ratón en esta hora,. En la hora 72 de evaluación la inducción de MN se incrementa ligeramente; sin embargo solo es significativa en el grupo que fue tratado con kaemferol previo a la administración de CrO₃.

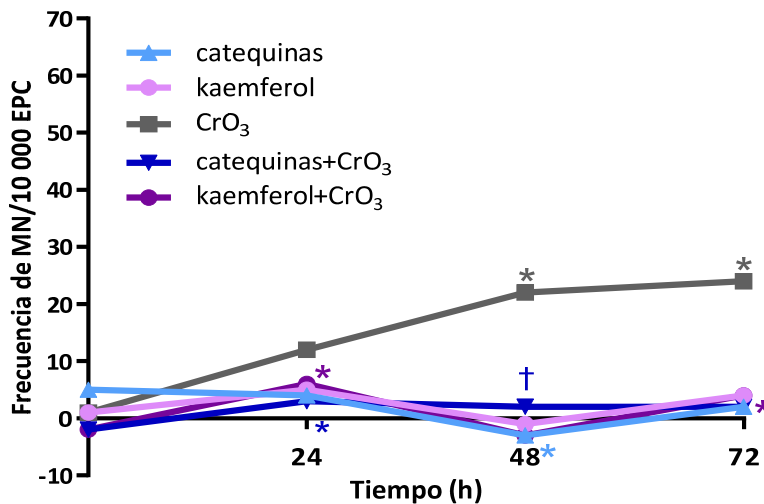


Figura 19. Análisis de DIF de MN por tiempo y por grupo, calculado para 10 000 EPC, de los grupos tratados con catequinas, kaemferol, CrO₃, catequinas+ CrO₃ y kaemferol+ CrO₃, p<0.05*: vs h 0 de cada tratamiento; †: muerte de un organismo.

6.2. Efecto del extracto de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol sobre el daño citotóxico inducido por CrO₃

En el cuadro 7 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC \pm desviación estándar, evaluadas de las 0 a las 72 horas cuando se administraron los tratamientos de extracto de polifenoles de té verde, (30 mg/kg vía i.g.), CrO₃ (20 mg/kg vía i.p.) y extracto de polifenoles de té verde, cuatro horas previas a la administración de CrO₃ (30 mg/kg vía i.g. y 20 mg/kg vía i.p. respectivamente). Los resultados muestran que ninguno de los tratamientos incrementa significativamente los promedios de EPC con respecto a ENC, en ninguna de las horas evaluadas. Por lo cual se puede sugerir que ninguno de los tratamientos tiene efectos citotóxicos al ser evaluados mediante este parámetro.

Cuadro 7. Frecuencia de EPC en ratones macho CD-1 tratados con extracto de polifenoles de té verde, vía i.g., CrO₃ vía i.p. y la combinación extracto de polifenoles de té verde+CrO₃

tratamiento	dosis (mg/kg)	n	hora	EPC/ 1000 células media \pm d. e.
testigo	0	5	0	65.6 \pm 8.4
			24	57.8 \pm 21.9
			48	44.6 \pm 13.5
			72	46.8 \pm 11.8
P60	30	5	0	68.0 \pm 23.1
			24	51.0 \pm 7.5
			48	47.0 \pm 10.4
			72	45.8 \pm 9.2
CrO ₃	20	5	0	34.6 \pm 1.7
			24	41.2 \pm 6.1
			48	38.0 \pm 7.9
			72	37.6 \pm 7.9
P60+CrO ₃	30+20	5	0	54.4 \pm 21.4
			24	64.8 \pm 10.1
			48	42.2 \pm 16.5
			72	44.6 \pm 13.5

En el cuadro 8 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC \pm desviación estándar, evaluadas de las 0 a las 72 horas cuando se administraron los extracto de polifenoles de té verde, (30 mg/kg vía i.p.), CrO₃ (20 mg/kg vía i.p.) y la administración de extracto de polifenoles de té verde, previo a la administración de CrO₃ (30 mg/kg vía i.p. y 20 mg/kg vía i.p. respectivamente). Estos resultados muestran que el tratamiento con CrO₃ disminuye significativamente las frecuencias de EPC en las horas 48 y 72 con respecto al testigo (alrededor de 24 y 20 EPC respectivamente) y con su respectiva hora 0 (alrededor de 10 EPC). Mientras que en el grupo tratado con extracto de polifenoles de té verde, previo a la administración de CrO₃ se observa una disminución significativa en las horas 48 y 72 al compararse con su respectiva hora 0 (alrededor de 16 EPC). Esto nos sugiere un posible daño citotóxico ocasionado por el tratamiento con CrO₃ y por extracto de polifenoles de té verde, administrado por vía i.p. al evaluar la citotoxicidad mediante este parámetro.

En el cuadro 9 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC \pm desviación estándar, evaluadas de las 0 a las 72 horas cuando se administraron los tratamientos catequinas (500 mg/kg vía i.p.), kaemferol (150 mg/kg vía i.p.), CrO₃ (20 mg/kg vía i.p.), catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO₃ (500 mg/kg vía i.p. y 20 mg/kg vía i.p. respectivamente) y kaemferol cuatro horas previas a la administración de CrO₃ (150 mg/kg vía i.p. y 20 mg/kg vía i.p. respectivamente). Estos resultados muestran que el tratamiento con catequinas, kaemferol no modifica los promedios de EPC con respecto a los ENC en ninguna de las horas evaluadas. Por el contrario se observa una disminución de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC en el grupo tratado sólo con CrO₃, en las horas 24, 48 y 72; sin embargo estas frecuencias no son estadísticamente significativas.

El grupo que se trató con catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO₃ no modifica significativamente las frecuencias en ninguna de las horas evaluadas. Por otra parte en el grupo que se trató con kaemferol cuatro horas previas a la administración de CrO₃ se observa un incremento significativo de EPC a las horas 24 y 48, al compararse estas frecuencias con las respectivas horas del grupo testigo (alrededor de 32 y 34 EPC respectivamente) y con respecto al grupo CrO₃ (incremento de alrededor de 44 y 39 EPC respectivamente) sugiriendo un efecto citotóxico sinérgico de estos tratamientos.

Cuadro 8. Frecuencia de EPC en ratones macho CD-1 tratados con extracto de polifenoles de té verde, vía i.p., CrO₃ vía i.p. y la combinación de ambos tratamientos extracto de polifenoles de té verde+CrO₃

tratamiento	dosis (mg/kg)	n	hora	EPC/1000 células media ± d. e	ANOVA p<0.05
testigo	0	5	0	58.2±6.5	
			24	54.6 ± 7.0	
			48	60.2 ± 6.9	
			72	62.6 ± 5.3	
P60	30	5	0	54.6 ± 3.2	
			24	48.6 ± 7.1	
			48	53.0 ± 10.4	
			72	52.4 ± 3.8	
CrO ₃	20	5	0	53.2 ± 8.1	
			24	54.0 ± 7.5	
			48	36.0 ± 4.1	a, b
			72	42.8 ± 7.4	a
P60+CrO ₃	30+20	5	0	62.0 ± 4.6	
			24	46.0 ± 5.0	c
			48	46.0 ± 8.5	c
			72	51.6 ± 6.9	

^a:vs testigo; ^b:vs CrO₃ h 0; ^c:vs P60+CrO₃ h 0

Cuadro 9. Frecuencia de EPC en ratones macho CD-1 tratados con catequinas vía i.p., kaemferol vía i.p., CrO₃ vía i.p., catequinas+ CrO₃ y kaemfero+ CrO₃

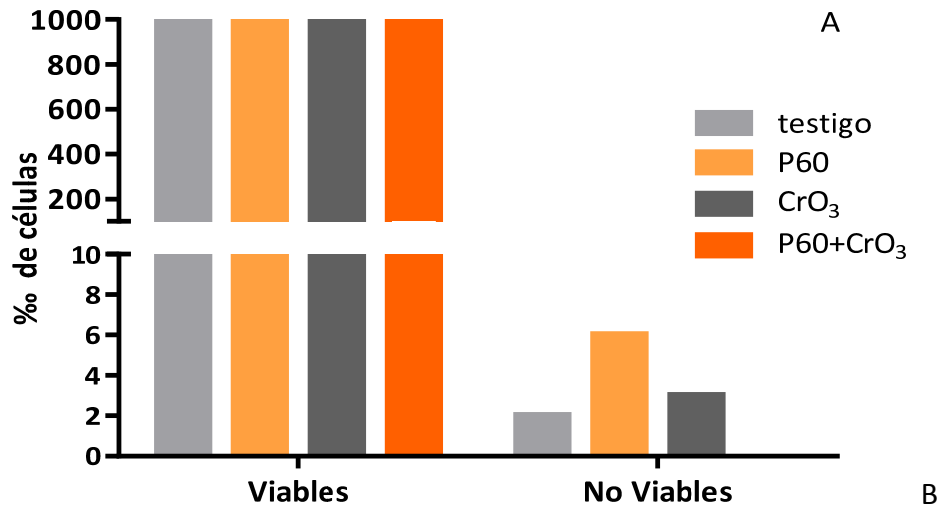
tratamiento	dosis (mg/kg)	n	hora	EPC/1000 células media ± d. e.	ANOVA p<0.05
testigo	0	5	0	50.8 ± 12.6	
			24	54.6 ± 5.8	
			48	53.0 ± 7.2	
			72	67.2 ± 10.3	
catequinas	500	5	0	56.2 ± 5.8	
			24	62.6 ± 3.6	
			48	65.2 ± 15.3	
			72	72.4 ± 8.0	
kaemferol	150	5	0	67.0 ± 10.5	
			24	67.6 ± 11.8	
			48	69.0 ± 15.0	
			72	71.0 ± 8.6	
CrO ₃	20	5	0	60.4 ± 11.2	
			24	42.4 ± 8.6	
			48	47.4 ± 6.1	
			72	49.4 ± 3.6	
catequinas+CrO ₃	500+20	5	0	61.2 ± 5.0	
			24	54.8 ± 9.2	
			48 [†]	54.4 ± 11.2	
			72 [*]	51.6 ± 29.1	
kaemferol+CrO ₃	150+20	5	0	92.8 ± 6.0	
			24	86.2 ± 8.6	a, b
			48	86.6 ± 5.3	a, c
			72	80.8 ± 8.0	

^a:vs testigo; ^b:vs CrO₃ h 24; ^c:vs CrO₃ h 48; [†]: muerte de 1 organismo; ^{*}: n= 4 organismos

Debido a que los datos observados en la relación de EPC, con respecto a los ENC, en todos los grupos muestran alta variabilidad se procedió a realizar el análisis de viabilidad celular en leucocitos, mediante el método descrito por McGahon *et al.*, (1995) y García Rodríguez *et al.*, (2013). Este método proporciona una evaluación más precisa de la citotoxicidad de los tratamientos.

6.3. Efecto del extracto de polifenoles de té verde, catequinas, kaemferol y CrO₃ sobre la viabilidad celular

En la figura 20 se muestran el análisis de los resultados obtenidos del análisis de la viabilidad celular de los diferentes grupos tratados, con extracto de polifenoles de té verde, CrO₃ y extracto de polifenoles de té verde previo a la administración de CrO₃. En la figura 20A se observan las frecuencias de células viables y no viables obtenidas de 1000 células totales evaluadas. Estos datos se analizaron con el cálculo de chi cuadrada y se observa que no hay variación significativa en las células viables observadas en los diferentes grupos tratados, mientras que en las células no viables se observa un incremento de 4 células en el grupo tratado únicamente con extracto de polifenoles de té verde, sin embargo este no es estadísticamente significativo. Los promedios \pm desviación estándar, de las células viables y las no viables en los diferentes grupos tratados se muestran en la figura 20B, tras realizar el análisis de estos datos con la prueba ANOVA se puede observar que las células viables y las no viables, no varían de forma significativamente en ninguno de los diferentes tratamientos.

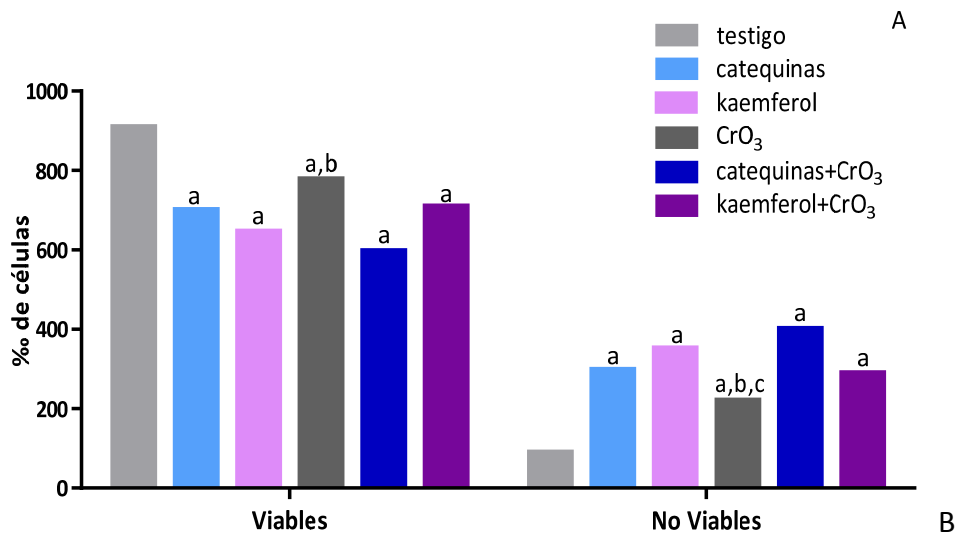


tratamiento	dosis (mg/kg)	n	(media ± d. e.)	
			células viables	células no viables
testigo	0	5	199.6 ± 0.9	0.4 ± 0.9
P60	30	5	198.8 ± 1.1	1.2 ± 1.1
CrO ₃	20	5	199.4 ± 0.9	0.6 ± 0.9
P60+CrO ₃	30+20	5	200.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Figura 20. Análisis de células viables y no viables de los grupos tratados con P60, CrO₃ y P60+CrO₃. $p < 0.05$; ^a: vs testigo.

En la figura 21 se muestran el análisis de los resultados obtenidos del análisis de la viabilidad celular de los diferentes grupos tratados con catequinas, kaemferol, CrO₃, catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO₃ y kaemferol cuatro horas previas a la administración de CrO₃. En la figura 21A se observan las frecuencias de células viables y no viables obtenidas de 1000 células totales evaluadas. Tras realizarse el cálculo chi cuadrada se puede observar que las frecuencias de células viables disminuyen significativamente en todos los tratamientos al compararse con el testigo. El grupo tratado con catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO₃, incluso disminuye significativamente su frecuencia de células viables al compararse contra el grupo tratado sólo con CrO₃. Las células no viables incrementaron significativamente en todos los tratamientos; los grupos tratados con catequinas previo a la administración de CrO₃ y kaemferol previo a la administración de CrO₃ incluso resultaron significativos con respecto al grupo tratado sólo con CrO₃.

En la figura 21B se muestran, los promedios \pm desviación estándar, de las células viables y las no viables en los diferentes grupos tratados, tras realizar el análisis de estos datos con la prueba ANOVA se observa que las células viables disminuyen en todos los tratamientos, sin embargo solamente resultan significativos el grupo tratado con kaemferol y el grupo tratado con catequinas previo a la administración de CrO₃; por el contrario se observa un incremento significativo de las células no viables sólo en el grupo tratado con kaemferol y en el grupo tratado con catequinas previo a la administración de CrO₃ lo cual es consistente con lo observado previamente tras el análisis de los datos totales con la prueba de chi cuadrada (figura 21A).



tratamiento	dosis (mg/kg)	n	(media \pm d. e.)	
			células viables	células no viables
testigo	0	5	182.0 \pm 6.6	18.0 \pm 6.6
catequinas	500	5	140.2 \pm 32.1	59.8 \pm 32.1
kaemferol	150	5	129.4 \pm 15.6 ^a	70.6 \pm 15.6 ^a
CrO ₃	20	5	155.8 \pm 26.2	44.2 \pm 26.2
catequinas+CrO ₃	500+20	5	119.6 \pm 27.5 ^a	80.4 \pm 27.5 ^a
kaemferol+CrO ₃	150+20	5	142.0 \pm 22.3	58.0 \pm 22.3

Figura 21. Análisis de células viables y no viables de los grupos tratados con catequinas, kaemferol, CrO₃, catequinas+CrO₃ y kaemferol+CrO₃; p<0.05; ^a: vs testigo; ^b: vs catequinas+CrO₃; ^c: kamferol+CrO₃.

6.4. Efecto de extracto de polifenoles de té verde, catequinas, kaemferol y CrO₃ sobre la inducción de apoptosis

La apoptosis fue evaluada directamente en leucocitos de sangre periférica de ratón antes (hora 0) y después del tratamiento (hora 48) con base en la tinción diferencial de unión al ADN de colorantes fluorescentes (NA y BrEt). Con esta técnica es posible determinar las células que han muerto por apoptosis debido a, los cambios morfológicos característicos que tienen lugar en una célula apoptótica como es la condensación y fragmentación de la cromatina por acción de endonucleasas endógenas y el colapso nuclear (McGahon *et al.*, 1995; García-Rodríguez *et al.*, 2013).

El colorante NA se intercala con ADN dando una apariencia verde. Mientras que el colorante BrEt se une solamente a las células no viables este colorante también se intercala con el ADN haciendo que la célula tenga apariencia de color anaranjado y se une débilmente al ARN dando una ligera apariencia roja. Se evaluaron 200 células totales las cuales se identificaron en los siguientes grupos: Células viables no-apoptóticas debido a que el NA se intercala con al ADN dando al núcleo un color verde brillante con estructura organizada. En las células no-viables no-apoptóticas, se aprecian el núcleo de color rojo-anaranjado con estructura organizada, debido a que además del NA el BrEt se intercala con al ADN. Las células viables apoptóticas. Se observan con núcleo verde brillante con estructura fragmentada y las células no-viables apoptóticas con núcleo rojo-anaranjado con estructura fragmentada ver figura 22.

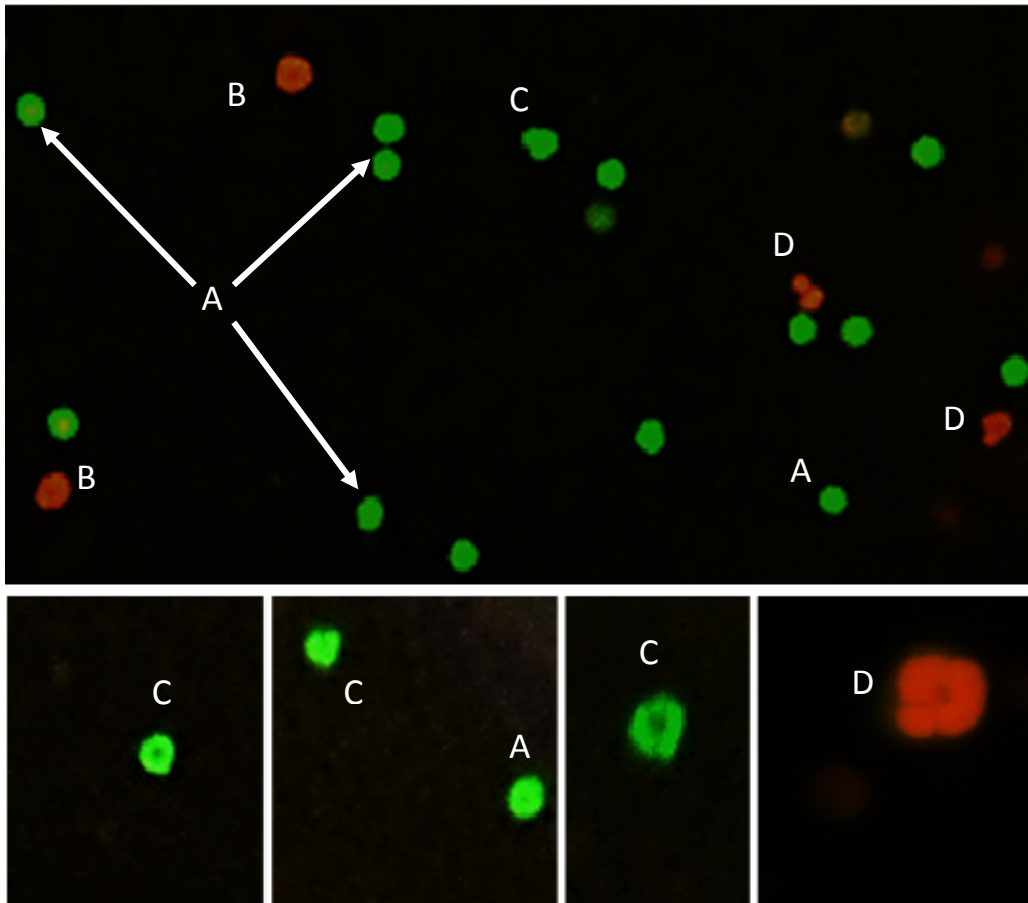


Figura 22. Análisis de viabilidad y apoptosis, en linfocitos de sangre periférica de ratones CD-1, teñidos con el método de NA y BrEt. Las células viables se tiñen de color verde uniforme con estructura organizada (A), las células no-viables no-apoptóticas se aprecian de color rojo-anaranjado con estructura organizada (B), Las células viables apoptóticas se observan de color verde brillante con estructura fragmentada (C) las células no-viables no-apoptóticas se observan de color rojo-anaranjado con estructura fragmentadas (D).

En la figura 23 se muestra el análisis de los datos obtenidos tras realizar el análisis de la apoptosis en los diferentes grupos tratados con extracto de polifenoles de té verde, CrO_3 y extracto de polifenoles de té verde previo a la administración de CrO_3 . En la figura 23A se observan las frecuencias de células viables apoptóticas, células viables no-apoptóticas así como las células no-viables apoptóticas y no-viables no-apoptóticas de un total de 1000 células evaluadas. Tras realizarse el cálculo chi cuadrada se puede observar que las células viables no-apoptóticas no se incrementan en ninguno de los diferentes tratamientos.

Al analizar las células viables apoptóticas, se observa que estas incrementan significativamente en los grupos tratados con extracto de polifenoles de té verde, y CrO_3 ; sin embargo al realizar la combinación de los tratamientos (grupo tratado con extracto de polifenoles de té verde, previo a la administración de CrO_3), se observa el mayor incremento en las frecuencias de las células viables apoptóticas, sugiriendo un efecto sinérgico al combinar estos tratamientos. Al evaluar las células no-viables no-apoptóticas tampoco se observó variación significativa en ninguno de los tratamientos analizados. Por su parte al analizar las células no-viables apoptóticas se observa un incremento significativo en las frecuencias del grupo que fue tratado únicamente con extracto de polifenoles de té verde.

En la figura 23B se muestran como media \pm desviación estándar, las células viables apoptóticas, viables no-apoptóticas, no-viables apoptóticas y no-viables no-apoptóticas, de los diferentes grupos tratados tras realizar el análisis de estos datos con la prueba ANOVA se puede observar que las células viables apoptóticas incrementan en todos los grupos estudiados; sin embargo sólo resultan significativos el grupo que fue tratado con CrO_3 y el grupo tratado con extracto de polifenoles de té verde, previo a la administración de CrO_3 . Este incremento significativo es consistente con lo analizado previamente al realizar la prueba chi cuadrada lo cual nos sugiere que si bien el daño genotóxico ocasionado por el CrO_3 se vio disminuido al administrar extracto de polifenoles de té verde, la posible vía de protección de daño sería mediante la inducción de apoptosis. No se observa variación significativa en diferentes los grupos tratados al realizar la evaluación de las células viables no-apoptóticas, células no-viables no-apoptóticas y las células no-viables apoptóticas.

Efecto de los antioxidantes del té verde sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI)

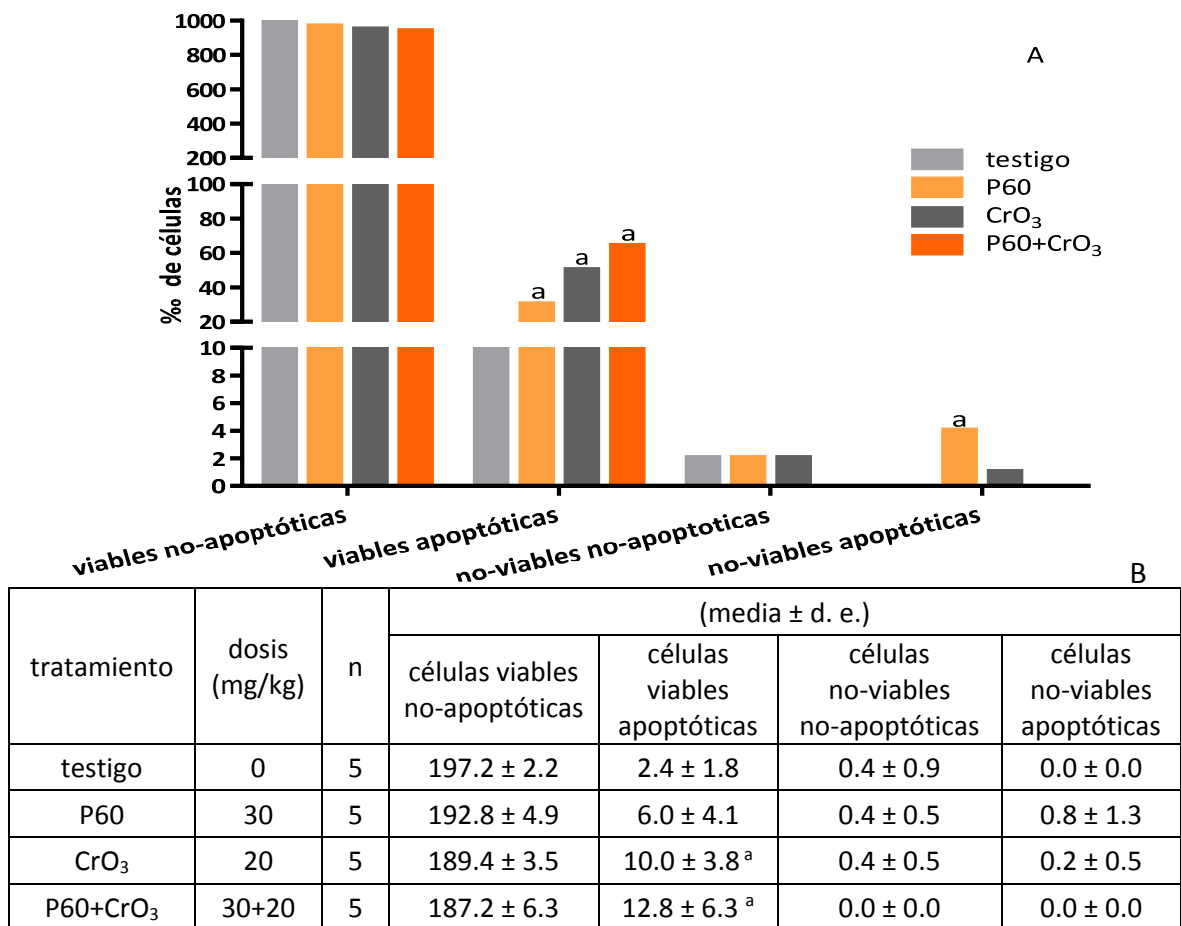


Figura 23. Análisis de células viables no-apoptóticas, viables apoptóticas, no-viables no-apoptóticas y no-viables apoptóticas, de los grupos tratados con CrO₃, P60 y P60 en combinación con CrO₃ p<0.05; ^a: vs testigo.

En la figura 24 se muestran el análisis de los datos obtenidos tras realizar el análisis de la apoptosis, en los diferentes grupos tratados con catequinas, kaemferol, CrO₃, catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO₃ y kaemferol cuatro horas previas a la administración de CrO₃. En la figura 24A se muestran las células viables apoptóticas, viables no-apoptóticas, no-viables apoptóticas y no-viables no-apoptóticas de un total de 1000 células evaluadas. Tras realizarse el cálculo chi cuadrada se observa que las células viables no-apoptóticas disminuyen significativamente en todos los tratamientos, el grupo que fue tratado con catequinas previo a la administración de CrO₃ incluso resulta significativo al compararse con el grupo que tratado sólo con CrO₃.

Se observa que las células viables apoptóticas disminuyen significativamente en los grupos tratados con catequinas, kaemferol, CrO₃ y catequinas previo a la administración de CrO₃. Mientras que las células no-viables no-apoptóticas incrementan significativamente en todos los tratamientos evaluados, los grupos tratados con catequinas previo a la administración de CrO₃ y kaemferol previo a la administración de CrO₃, incluso resultan significativos al compararse con el grupo que sólo fue tratado con CrO₃. Por su parte las células no-viables apoptóticas disminuyen significativamente en los grupos que fueron tratados con CrO₃ y kaemferol previo a la administración de CrO₃.

En la figura 24B se muestran como media \pm desviación estándar, las células viables no-apoptóticas, células viables apoptóticas, células no-viables no-apoptóticas y las células no-viables apoptóticas, de los diferentes grupos tratados. Tras realizar el análisis de estos datos con la prueba ANOVA se puede observar una disminución de las células viables no-apoptóticas en todos los grupos, sin embargo solamente resultan significativos el grupo tratado con kaemferol y el grupo tratado con catequinas previo a la administración de CrO₃ lo cual es consistente con lo previamente analizado con la prueba chi cuadrada. Al evaluar las células viables apoptóticas se observa disminución en todos los grupos tratados, aunque ninguno resulto significativo. Mientras que las células no-viables no-apoptóticas incrementan en todos los tratamientos pero sólo son significativos el grupo tratado con kaemferol y el grupo tratado con catequinas previo a la administración de CrO₃ lo cual es consistente con lo previamente analizado con la prueba chi cuadrada. No se observa variación estadística significativa en ninguno de los tratamientos al evaluar las células no viables apoptóticas.

Efecto de los antioxidantes del té verde sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI)

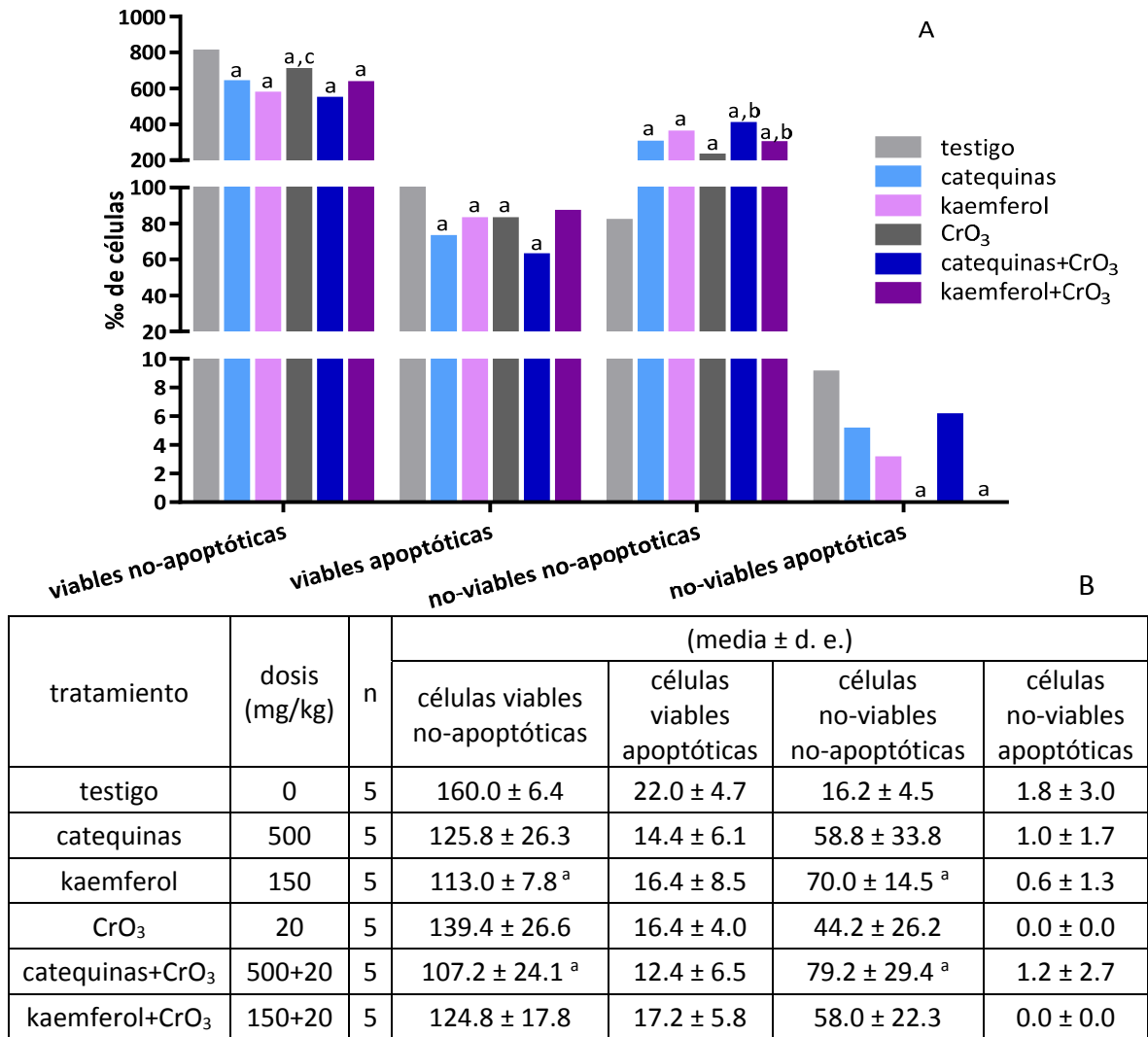


Figura 24. Análisis de células apoptóticas y no apoptóticas de los grupos tratados con catequinas, kaemferol, CrO₃, catequinas+ CrO₃ y kaemferol+CrO₃; p<0.05; ^a: vs testigo; ^b: vs CrO₃; ^c: vs catequinas+CrO₃.

7. Discusión

En las últimas décadas el té verde ha llamado la atención debido a que se le han atribuido numerosas propiedades benéficas dado que su consumo está asociado con la disminución del desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas incluyendo algunos tipos de cáncer. Estos efectos benéficos se atribuyen principalmente a su contenido de polifenoles particularmente flavonoles y flavanoles (derivados de los flavonoides) que representan el 30% del peso de la hoja seca de *Camelia sinensis* (Cabrera *et al.*, 2006; Chacko *et al.*, 2010). Estos polifenoles poseen gran capacidad antioxidante la cual se debe principalmente a su estructura fenólica que les permite neutralizar los RL mediante la donación de un e⁻ o átomo de hidrógeno. En contraparte los organismos nos encontramos expuestos a diversos xenobióticos como son los metales pesados. Entre ellos, los compuestos de Cr (VI) llaman la atención para su estudio debido ya que son ampliamente utilizados en diferentes industrias y se les ha asociado con el desarrollo de algunos tipos de cáncer. Se ha observado que son capaces de inducir daño genotóxico mediante la generación de ERO's y RL generados durante su reducción intracelular a Cr (III). Por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto de los antioxidantes del té verde (extracto de polifenoles de té verde, catequinas y kaemferol) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por Cr (VI), mediante la evaluación de MN y de apoptosis en ratones de la cepa CD-1 tratados con CrO₃.

Los resultados muestran que la administración de 30 mg/kg de extracto de polifenoles de té verde, por vía i.g. e i.p. no induce daños tóxicos aparentes, ni incrementan las frecuencias de MN (cuadro 4 y cuadro 5). Estos resultados concuerdan con estudios previos que muestran que la administración de polifenoles del té verde no inducen genotoxicidad; adicionalmente, la administración por vía oral de polifenoles del té verde durante 28 días, en dosis de 625, 1250 y 2500 mg/kg/día, en ratones ICR no tiene ningún efecto sobre la genotoxicidad; por el contrario se observó una disminución significativa al medir los triglicéridos y los niveles de colesterol (Isbrucker *et al.*, 2006; Zaveri, 2006; Hsu *et al.*, 2011). Resultados similares se encontraron en estudios clínicos en los que se observó que la administración de un extracto acuoso de té verde (6 cápsulas/día para un total de 714 mg de polifenoles de té verde/día) durante 3 semanas a hombres sanos no tiene efectos adversos (Frank *et al.*, 2009). Un estudio, controlado con placebo en voluntarios sanos informó que la administración de 800 mg/día durante cuatro semanas de EGCG o Polyphenon E (un extracto descafeinado de té verde que contiene 60% de EGCG) no presentó efectos adversos (Sherry *et al.*, 2005; Sarma *et al.*, 2008).

Los estudios han sugerido que ingesta “ideal” de té verde es de al menos 3 tazas al día, las cuales proporcionan un mínimo de 250 mg/día de catequinas (Kono *et al.*, 1992; Jian *et al.*, 2004; Boehm *et al.*, 2009). Por lo que la dosis de 30 mg/kg de extracto de polifenoles de té verde, utilizadas en el presente estudio corresponde al 7.2% de la dosis diaria deseable. Estos resultados sugieren que el extracto de polifenoles de té verde, no tiene efectos tóxicos ni genotóxicos en los organismos.

Al administrar 500 mg/kg de catequinas por vía i.p., tampoco se encontraron signos de toxicidad aparente, ni genotoxicidad en los ratones tratados, con base en los resultados obtenidos al realizarse el análisis de las frecuencias de MN (cuadro 6). Estos resultados concuerdan con la información obtenida previamente para los extractos acuosos de los polifenoles del té verde donde la mayor cantidad de sus polifenoles son las catequinas, como el estudio realizado por Ogura *et al.*, (2008) en el cual se observó que la administración de 500, 1000 y 2000 mg/kg por dos días consecutivos, de extractos de té verde con altas cantidades de catequinas, no se encontraron efectos genotóxicos utilizando el ensayo de MN en medula ósea de ratón. En un estudio realizado en 30 voluntarios sanos quienes tomaron en ayuno un extracto de polifenoles del té verde conocido como Polyphenon E (mezcla de catequinas de té verde descafeinado), en grupos de dosis únicas de 400, 800, ó 1200 mg se encontró que fue generalmente bien tolerado aunque se reportó náuseas leves en la dosis de Polyphenon E más alta (1200 mg) y en la condición de ayuno Sherry *et al.*, 2005. Además un estudio realizado por Oyama *et al.*, en 2010 en hombres fumadores, mostraron que el tratamiento con dosis de hasta 580 mg de catequinas diariamente durante dos semanas no produce efectos adversos por el contrario ellos observaron que la concentración plasmática de 8-OHdG, IL-6, TNF-alfa, y FasL soluble disminuyó significativamente durante el tratamiento por dos semanas en el grupo de dosis más alta, (580 mg). Por lo que la dosis de 500 mg/kg de catequinas administrada en este estudio corresponden a la dosis más baja de las encontradas como no genotóxicas por Ogura *et al.*, 2008 y al 200% de la dosis diaria de catequinas “ideal” recomendada en humanos (Kono *et al.*, 1992; Jian *et al.*, 2004; Boehm *et al.*, 2009).

En cuanto a la administración de 150 mg/kg de kaemferol vía i.p. no se encontraron efectos tóxicos aparentes, ni genotóxicos con base a los resultados obtenidos en las frecuencias de MN (cuadro 6). Estos resultados son consistentes con la información obtenida en un estudio donde se observó que la administración oral de 50, 100 y 200 mg/kg de kaemferol no tiene efectos adversos en ratas wistar, en contraste se observó que este flavonol puede actuar como agente quimiopreventivo en el modelos murinos de cáncer colorectal (Nirmala y Ramanathan, 2011).

De igual forma se ha encontrado que administración de flavonoles como kaemferol vía i.p. (25-100 mg/kg) no producen efectos genotóxicos por el contrario estos son capaces de inhibir de forma dependiente de la dosis el daño gástrico producido por etanol acidificado en ratas (Izzo *et al.*, 1994). Por lo que la dosis de 150 mg/kg de kaemferol vía i.p. corresponden a la dosis en las cuales no se encontraron efectos adversos en modelos animales. Los resultados de este estudio sugieren que el tratamiento de ratones CD-1 con 150 mg/kg de kaemferol vía i.p. no presenta efectos genotóxicos al evaluarse este parámetro mediante el análisis de las frecuencias de MN.

La genotoxicidad de los compuestos de Cr (VI) se demuestra en los grupos que fueron tratados con 20 mg/kg de CrO₃ vía i.p. en los cuales se observó un incremento en las frecuencias de MN, siendo constante la significancia estadística a la hora 48 después del tratamiento. Este incremento se hace evidente al compararse contra el grupo testigo, lo cual corrobora el daño genotóxico reportado previamente para los compuestos de Cr (VI) (Norseth, 1981; Newman y McIntosh, 1991; CDPC, 1992; Air Quality Guidelines, 2000; ATSDR, 2000; Dayan y Paine, 2001; Depault *et al.*, 2004; Ferré-Huguet *et al.*, 2007; Kristen *et al.*, 2010) y particularmente para el CrO₃ (García-Rodríguez *et al.*, 2001; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2006).

En el presente estudio se realizó la evaluación del daño genotóxico inducido por CrO₃, mediante el análisis de la cinética de MN, cada 24 horas de las 0 a las 72 horas después de administrar el compuesto. Los resultados de este análisis muestran que la administración de CrO₃ incrementa las frecuencias de MN en todas las horas evaluadas, sin embargo la mayor inducción de MN se observa a las 48 horas. Esto posiblemente se debe a que la mayor distribución y biotransformación de los agentes químicos se presenta entre las 24 y 48 horas después de su administración, aunado al proceso de eritropoyesis en el ratón, pues por lo general la inducción de MN se observa 12 horas después de la administración del compuesto de estudio (Hayashi *et al.*, 1990; Krishna y Hayashi, 2000).

El mecanismo de genotoxicidad de los compuestos de Cr(VI) se ha asociado con la capacidad que tiene de reducirse a Cr(III) al atravesar la membrana celular por canales iónicos no específicos, o bien por el proceso de fagocitosis en el caso de cromatos insolubles (Valko *et al.*, 2006), ya en el interior de la célula el Cr(VI) se reduce a Cr(V), Cr(IV) y finalmente a Cr(III), estas formas reducidas son capaces de interactuar con moléculas citoplasmáticas, como ácidos nucleicos, debido a la afinidad a bases nitrogenadas y grupos fosfato, dando como resultado la formación de aductos Cr-ADN.

Durante este proceso de reducción del Cr (VI), se generan además RL y ERO's que también son responsables de daño genotóxico, como rupturas en la cadena de ADN, oxidación de bases, sitios abásicos, etcétera (Dayan y Paine, 2001; O'Brien *et al.*, 2003; Jomova y Valko, 2011). Por lo tanto se sugiere que estos efectos también son capaces de conducir a la formación de MN en EPC de sangre periférica en los ratones tratados con este compuesto metálico.

Una vez encontradas las dosis no genotóxicas de los antioxidantes así como la dosis genotóxica del CrO₃ se combinaron los tratamientos con el objetivo de evaluar el efecto de los antioxidantes del té verde [extracto de polifenoles de té verde (P60), catequinas y kaemferol] sobre el daño genotóxico inducido por la administración de 20 mg/kg de CrO₃, mediante la evaluación de las frecuencias de MN.

Los resultados muestran que al administrarse 30 mg/kg del extracto de polifenoles de té verde, *in vivo* por vía i.g., cuatro horas previas a la administración de CrO₃ se observó una disminución de las frecuencias de MN en EPC en todas las horas evaluadas al compararse con el grupo tratado sólo con CrO₃ (cuadro 4), la protección se confirma al realizar en cálculo del NIF (figura 16A), donde se observa una protección del daño ocasionado por la administración de CrO₃, del 175%, a la hora 24, del 26% a la hora 48 y del 100% a la hora 72 de evaluación. La protección observada es incluso mayor que al administrar té verde *ad libitum* (García-Rodríguez *et al.*, 2012); esta protección puede deberse al efecto antioxidante, previamente descrito para los polifenoles presentes en el té verde, pues la evidencia de diversos estudios sugieren que el consumo de los polifenoles del té verde es capaz de reducir los efectos adversos ocasionados por la oxidación del ADN; sin embargo la frecuencia de MN a la hora 48 aun es significativa al compararse con el grupo testigo lo que sugiere una protección de daño genotóxico parcial, esto posiblemente se deba a la baja biodisponibilidad de los polifenoles tras haber sufrido el proceso de metabolización en el tracto gastrointestinal.

Estudios realizados recientemente han encontrado que la biodisponibilidad difiere notablemente entre polifenoles, pues al ser metabolizados circulan en el organismo como derivados sulfatados, metilados o bien glucuronizados (Lee *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2002), que si bien estos también poseen capacidad antioxidante, esta es mucho más baja que la descrita para los polifenoles del té verde sin metabolizar. Otro estudio realizado en ratas mostró que los niveles de EGCG en los tejidos y la sangre correspondían a 0.0003-0.45 % de la dosis ingerida inicialmente, lo que demuestra la pobre biodisponibilidad de los polifenoles del té verde (Nakagawa y Miyazawa, 1997; Lee *et al.*, 2002; Lambert y Yang, 2003; Laurie *et al.*, 2005).

Suganuma *et al.*, (1998) encontraron que después de una dosis única de [3H]-EGCG tanto en rata como en ratón vía i.g, la radiactividad se puede detectar en todo el cuerpo después de 24 horas en porcentajes bajos, sólo el 10 % de la dosis inicial presente en sangre y aproximadamente 1% en el cerebro, pulmón, corazón, hígado, riñón y otros tejidos. Por lo que se demuestra que la biodisponibilidad difiere notablemente de un polifenol a otro, esto puede deberse a varios factores tales como la dosis administrada de los polifenoles, la variación interindividual en el metabolismo de los componentes del té y principalmente la vía de administración utilizada; es por ello que con el objetivo de observar un efecto más directo sobre la protección del daño genotóxico ocasionado por el CrO₃ y considerando la importancia que tiene la vía de administración se optó por realizar la administración de los polifenoles estudiados por vía i.p. ya que se ha mostrado que la administración de fármacos por vía i.p. puede incrementar considerablemente la concentración en plasma en comparación con vías de administración enterales. La administración vía i.p. se considera apropiada para este tipo de compuestos debido al control sobre las dosis real recibida por el organismo, además de que la biodisponibilidad del compuesto será del 100%(Dedick y Flessner, 1997).

Por lo que al administrarse 30 mg/kg de extracto de polifenoles de té verde, por vía i.p., cuatro horas previas a la administración de CrO₃ se observó la disminución de las frecuencias de MN en todas las horas evaluadas, al compararse con el grupo tratado sólo con CrO₃ (cuadro 5), protección que se confirma al realizar el cálculo del NIF, donde se observa protección del 50%, 83%, y 81% a las 24, 48 y 72 horas respectivamente después del tratamiento (figura 16B), la protección observada al administrar extracto de polifenoles de té verde, por vía i.p es mucho más efectiva que al administrar el extracto de polifenoles de té verde, por vía i.g. Se sabe que la capacidad antioxidante de los polifenoles del té verde se debe a su estructura fenólica que les permite neutralizar los RL mediante la donación de un e⁻ o átomo de hidrógeno. Los polifenoles suprimen la generación de RL, que en este caso serían los RL generados durante la reducción de Cr (VI) a Cr (III), disminuyendo así la tasa de oxidación mediante la inhibición o la desactivación de la formación de las especies reactivas y precursores de RL.

Con frecuencia, los polifenoles actúan como eliminadores “directos” de radicales en las reacciones en cadena de la peroxidación de lípidos (interruptores de la cadena), interrumpen la cadena al donar un electrón al RL, neutralizando los radicales y convirtiéndose ellos mismos en radicales menos reactivos, deteniendo así las reacciones en cadena, además de eliminación de RL, los polifenoles son conocidos también como formadores de quelatos metálicos (Cadenas y Packer, 2002; Escamilla *et al.*, 2009).

La quelación de metales de transición tales como Fe^{2+} puede reducir la tasa de reacción de Fenton, evitando así la oxidación causada por los radicales $\bullet\text{OH}$ altamente reactivos (Pietta, 2000; Cadenas y Packer, 2002; Martínez *et al.*, 2002; Escamilla *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2009; Perron y Brumaghim, 2009; Tsao, 2010).

Al administrar 500 mg/kg de catequinas cuatro horas previas al tratamiento con CrO_3 se observó la disminución de las frecuencias de MN en EPC en todas las horas evaluadas al compararse con el grupo que fue tratado únicamente con CrO_3 (cuadro 6), protección que se confirma al realizar el cálculo del NIF, donde se observa protección del 75%, 68%, y 83% a las 24, 48 y 72 horas respectivamente después del tratamiento (figura 18). Los porcentajes de protección son mayores que los observados en el grupo tratado con extracto de polifenoles de té verde, vía i.p. a las horas 24 y 72; sin embargo a la hora 48 se presentó la muerte de un organismo lo cual sugiere un efecto tóxico sinérgico de las catequinas en combinación con CrO_3 lo cual pudiera estar relacionado con la capacidad pro-oxidante mostrada para la EGCG.

La dosis administrada en este estudio (500 mg/kg de catequinas vía i.p.) contiene un 60% de EGCG (30mg) y se sabe que esta la catequina más abundante y con mayor actividad antioxidante del té verde para la cual se ha reportado que es capaz de inducir por sí misma o incrementar el daño genotóxico inducido por agentes mutágenos, cuando se emplean dosis elevadas (Imanishi *et al.*, 1991; Weisburger, 1997; Hsu *et al.*, 2011). Estudios *in vitro* indican que el tratamiento de hepatocitos de rata con altas dosis de EGCG resulta en la reducción de la viabilidad celular (Schmidt, 2005; Galati *et al.*, 2006). Un estudio realizado por Hirose *et al.*, (2001), quienes observaron el incremento del riesgo de cáncer de colon en ratas tratadas con catequinas del té verde como lo es la EGCG. Lo que sugiere un posible efecto pro-oxidante al administrar 500mg/kg de catequinas al 100% las cuales contiene el 60% de EGCG que es considerado como uno de los polifenoles con mayor capacidad antioxidante, por lo que es capaz de actuar como pro-oxidante a altas concentraciones.

Al administrar 150 mg/kg de kaemferol cuatro horas previas al tratamiento con CrO_3 se observó la disminución de las frecuencias de MN en EPC en todas las horas evaluadas al compararse con el grupo que fue tratado únicamente con CrO_3 (cuadro 6), esta protección que se confirma al realizar el cálculo del NIF, donde se observa protección del 38%, 88%, y 72% a las 24, 48 y 72 horas respectivamente después del tratamiento (figura 18).

Los porcentajes de protección podrían ser comparables con el grupo que fue tratado con extracto de polifenoles de té verde, vía i.p. cuatro horas previas a la administración de CrO₃, pues en ambos grupos se presenta protección del daño genotóxico mayor al 80% a las horas 48 y 72 que corresponden a las horas de mayor inducción de daño por parte del CrO₃, (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

En estudios previos se observó la capacidad del kaemferol para reducir el riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer, en líneas celulares de cáncer colon, de melanoma humano y células de cáncer de próstata. Se encontró que este flavanol tiene efecto antiproliferativo (Lee *et al.*, 1998; Casagrande y Darbon, 2001; Knowles *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009). Un estudio reciente ha mostrado que este flavonol ejerce un efecto antiproliferativo en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-453 (Choi y Ahn, 2008). Incluso se habla de su posible uso del flavonol como agente quimiopreventivo en el tratamiento de cáncer colorrectal, ya que su acción es comparable a la de irinotecán, el fármaco de primera línea utilizado en el tratamiento de este tipo de cáncer (Nirmala y Ramanathan, 2011). Asimismo se realizó un estudio que da a conocer una respuesta sinérgica y aditiva entre los dos flavonoles más comúnmente ingeridos en la dieta humana, quercetina y kaemferol, sobre la proliferación celular en las líneas intestinales humanas Caco-2 y hutus-80 y en la línea celular de carcinoma de mama PMC42, mostrando que una combinación de, kaemferol y quercetina es más eficaz en la reducción de la proliferación de células cancerígenas que al aplicarse solamente quercetina o kaemferol (Leigh-Ackland *et al.*, 2005). En el mismo sentido Lim *et al.*, en 2011 encontraron que un extracto conocido como EGb761, que contiene flavonoles, como el kaemferol es capaz de reducir el riesgo de desarrollar aterosclerosis de forma dependiente de la dosis en modelos de ratas obesas resistentes a la insulina que fueron tratadas durante 6 semanas con dosis de 100 mg/kg/día y 200 mg/kg/día del extracto.

Estudios en humanos como el realizado con pacientes voluntarios en la Universidad de California, se observó que los participantes que ingerían frutas y bebidas con alto contenido de flavonoides, mostraban un menor desarrollo del cáncer de pulmón. Por lo que se sugirió que los flavonoides fueron los que inhibieron este efecto y particularmente las catequinas, el kaemferol y la quercetina (Cui *et al.*, 2008).

Al evaluar la citotoxicidad, mediante las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, se observó una alta variabilidad en las frecuencias de EPC. Pues si bien se ha descrito que el daño citotóxico puede determinarse por la disminución de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, la evaluación de este parámetro debe tomarse con reserva, esto es debido a que cuando un compuesto causa la muerte celular, también pueden activarse los mecanismos de división celular y por tanto ocultar el efecto (Krishna *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 2000). Es por ello que se evaluó la viabilidad celular y la inducción de apoptosis en leucocitos de sangre periférica de los diferentes grupos tratados con 30 mg/kg de extracto de polifenoles de té verde, vía i.p., 500 mg/kg de catequinas, vía i.p., 150mg/kg de kaemferol vía i.p., 20 mg/kg de CrO₃ vía i.p., extracto de polifenoles de té verde cuatro horas previas al tratamiento con CrO₃, catequinas cuatro horas previas al tratamiento con CrO₃ y kaemferol cuatro horas previas al tratamiento con CrO₃.

Las evaluaciones de cada grupo se llevaron a cabo a las 48 horas después de la administración de cada tratamiento, debido a que es la hora de mayor inducción de MN por parte del CrO₃ de acuerdo a estudios realizados previamente en nuestro grupo de trabajo (García-Rodríguez *et al.*, 2001). 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 del tejido hemático, sin embargo los leucocitos tiene la característica de presentar núcleo lo cual es importante ya que permite la observación de los cambios morfológicos nucleares que se llevan a cabo en el proceso de apoptosis.

El análisis de resultados del análisis de viabilidad celular en leucocitos, muestra que el grupo tratado únicamente con CrO₃ se incrementa significativamente la frecuencia de células viables apoptóticas en comparación con el grupo testigo (figura 23). Esto puede estar relacionado con la liberación de ERO's durante el proceso de reducción de Cr (VI) a Cr (III), ya que como se ha descrito previamente, el incremento de ERO's en el interior de la célula, es uno de los factores que pueden desencadenar la muerte celular particularmente la muerte por apoptosis.

Estos resultados son consistentes con lo reportado inicialmente por Blankenship *et al.*, (1994), ellos observaron que las células de ovario de hámster chino tratada con Cr (VI) exhibieron características apoptóticas, analizadas con la tinción con NA. Más tarde Wang *et al.*, (2006), encontraron que la administración oral de Cr (VI) a ratones, indujo daño al ADN y muerte celular por apoptosis, además observaron incremento de las ERO's en hígado.

Un estudio realizado por Shi *et al.*, (1999), sugiere que las ERO's contribuyen a los efectos tempranos de la apoptosis inducida por Cr (VI) a través de un mecanismo independiente de p53, mientras que los efectos apoptóticos podrían ser bloqueados en presencia de eliminadores de ERO's, tales como la catalasa. Bagchi *et al.*, (2001) también han mostrado que un aumento en la producción de ERO's se correlaciona con la muerte apoptótica de manera dependiente de la concentración de Cr (VI). Por lo que sugerimos que la alteración del estado oxidativo intracelular tiene el potencial de desencadenar o sensibilizar una célula al proceso de apoptosis, por lo tanto las ERO's generadas a partir de la reducción intracelular de Cr (VI) a Cr (III), juega un papel importante en la vía de señalización de la apoptosis. Sin embargo la evaluación de los cambios morfológicos nucleares de la célula es considerada como uno de los primeros pasos a seguir para la identificación de la muerte celular, ya que se recomienda complementar la evaluación de este proceso con el uso de métodos más precisos como la cuantificación de la expresión génica y de marcadores moleculares bcl-2, p53, p21, caspasas entre otros (Kroemer *et al.*, 2008).

Cuando se administró el tratamiento de 30 mg/kg de extracto de polifenoles de té verde, se observó un incremento significativo en el número de células viables apoptóticas en la evaluación de las células viables totales que se analizó bajo la prueba estadística chi cuadrada. Al realizar el análisis de los promedios de células viables apoptóticas aún se observa este incremento; sin embargo este no es estadísticamente significativo al realizar la prueba estadística ANOVA (figura 23). Previamente se han realizado estudios en los cuales se ha encontrado que los polifenoles del té verde poseen una acción cancerígena directa mediante la inducción de la apoptosis, por ejemplo estudios sugieren que los polifenoles del té verde pueden unirse directamente a ciertos dominios de las proteínas de la familia Bcl-2 y Bcl-X, que tienen acción antiapoptótica al analizarse con ayuda de espectroscopía. Al inhibir a estas proteínas, se conseguiría una acción pro-apoptótica en las células tumorales (Leone *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2007). Otros estudios han encontrado que los polifenoles del té verde, tales como EGCG y ECG inhiben el crecimiento del cáncer de pulmón humano (línea celular PC-9) mostrando además que la inhibición del crecimiento celular fue acompañado por la detención del ciclo celular en la fase G2/M (Okabe *et al.*, 1997; Fujiki *et al.*, 1998) lo que podría estar relacionado con la actividad apoptótica de estos polifenoles.

Cuando se administraron los extractos de polifenoles de té verde cuatro horas antes del tratamiento con CrO_3 , se observó un incremento significativo en las células viables apoptóticas al realizar el análisis con la prueba chi cuadrada, este incremento significativo es consistente al analizar los promedios con la prueba estadística ANOVA (figura 23). El incremento de las células viables apoptóticas fue aún mayor que el observado después del tratamiento sólo con CrO_3 . Estudios afirman que los polifenoles del té verde no sólo actúa inhibiendo las proteínas de la familia Bcl-2, sino que también estimula la expresión de los genes Bax y Bak, que son proteínas pro-apoptóticas. Esto se ha visto en diferentes tipos de cáncer, como el condrosarcoma (Kanwar *et al.*, 2012). En el mismo sentido se ha mostrado que los polifenoles del té actúan sobre la proteína cinasa 2, esto en estudios sobre la leucemia promielocítica aguda (Britschgi *et al.*, 2010). Otros estudios sugieren que la vía de las caspasas es otro punto de acción de los polifenoles del té verde, como indican estudios realizados en células de adenocarcinoma de mama que carecían de receptores de estrógenos en las que se observó una activación de la caspasa-3 (Roy *et al.*, 2005). Otro experimento, realizado sobre células de tumor gastrointestinal de células estromales (GIST), en el cual se incluían células resistentes al imatinib, se encontró que el EGCG inhibe el crecimiento celular y estimula la muerte celular dependiente de caspasas (Chi *et al.*, 2009). Los datos observados en este estudio nos muestran una mayor inducción de la apoptosis después de un tratamiento combinado (extracto de polifenoles de té verde y CrO_3), esto sugiere que el proceso apoptótico puede contribuir a eliminar las células con ADN dañado inducida por Cr (VI).

Por otra parte en el análisis de apoptosis tras realizarse el cálculo chi cuadrada (figura 24A) de los grupos tratados con catequinas, kaemferol, CrO_3 , catequinas cuatro horas previas al tratamiento con CrO_3 y kaemferol cuatro horas previas al tratamiento con CrO_3 , se observó que las células viables apoptóticas disminuyen significativamente en los grupos tratados con catequinas, kaemferol, CrO_3 y catequinas previo a la administración de CrO_3 .

Se observó que las células no viables apoptóticas disminuyen significativamente en los grupos que fueron tratados con CrO_3 y kaemferol previo a la administración de CrO_3 e incrementan significativamente en el grupo tratado con catequinas previo a la administración de CrO_3 en comparación con el grupo tratado sólo con CrO_3 . Sin embargo estos resultados no son consistentes con el análisis de los promedio tras realizar el análisis con la prueba ANOVA (figura 24B) se puede observar en células viables apoptóticas una disminución en todos los grupos tratados, aunque ninguno resultado significativo.

Estos resultados son contrastantes con lo previamente reportado en diversos estudios los cuales observaron efecto pro-apoptótico tras el tratamiento con catequinas. Un estudio en el que se muestra una relación entre la dosis de catequinas del té verde y la tasa de apoptosis en células tumorales, de cáncer de vejiga (Philips *et al.*, 2009). Además la inducción de la apoptosis por catequinas también se ha mostrado en células de leucemia, células de carcinoma epidermoide humano, carcinoma de queratinocitos humanos y células de carcinoma de próstata humanos (Hibasami *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 1997). En un estudio realizado por Randall *et al.*, (1989) ellos observaron que las catequinas del té verde tienen actividad antioxidante hacia peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical O_2^- , impidieron la inhibición de la comunicación intercelular en hepatocitos de ratón en cultivo B6C3F1 y queratinocitos humanos (células NHEK) inducida por el radical H_2O_2 , además el tratamiento con las catequinas del té verde evitó la muerte de los hepatocitos (medida por la liberación de lactato deshidrogenasa) de una manera dependiente de la concentración.

El tratamiento con 150 mg/kg de kaemferol no indujo la muerte celular por apoptosis estos resultados contrastan con lo observado por Sharma *et al.*, (2007) en el que se investigó el efecto de kaemferol en células de glioblastoma humano. El kaemferol indujo la apoptosis en células de glioma mediante la elevación de estrés oxidante intracelular [aumento en la generación de ERO's, acompañado de la disminución en los agentes de barrido oxidante tales como la superóxido dismutasa (SOD-1) y tiorredoxina (TRX-1)]. Es importante destacar que, en este estudio el kaemferol potenció el efecto tóxico del agente quimioterapéutico utilizado como control positivo (doxorrubicina) mediante la amplificación de la toxicidad ocasionada por ERO's y la disminución del flujo de salida de la doxorrubicina. Más tarde un estudio realizado por Yoshida *et al.*, (2008) en el que observaron que el tratamiento combinado con kaemferol y el factor de necrosis tumoral relacionado al ligando inductor de apoptosis (TRAIL) induce drásticamente la apoptosis en las células SW480 de cáncer de colon humano, en comparación a los tratamientos individuales.

En 2009 Li *et al.*, estudiaron el efecto anti-proliferativo del kaemferol sobre las células de cáncer de colon humano en la línea HCT116, ellos observaron que inhibió el crecimiento dependiente de p53 y de la apoptosis. Asimismo, kaemferol induce la liberación del citocromo c de la mitocondria y activa la caspasa-3. Sugiriendo que kaemferol podría ser un candidato potente para el tratamiento del cáncer colorrectal.

En 2008 Choi y Ahn mostraron los efectos de kaemferol sobre las células de carcinoma de mama humano MDA- MB-453, ellos observaron que este flavonol inhibe la proliferación celular mediante la interrupción del ciclo celular, que está fuertemente asociada con la inducción de la detención en la fase G2/M y pueden inducir a apoptosis a través de la fosforilación de p53. Del mismo modo Zhang y Fang (2005) observaron que un extracto de kaemferol de *Gingko biloba* es capaz de inhibir la proliferación de células de cáncer de páncreas analizado mediante recuento directo de la incorporación de 3H-timidina a las células y ensayo de MTS además reportaron que kaemferol induce apoptosis.

Las diferencias observadas en nuestros resultados con los datos reportados previamente en la literatura posiblemente se deban a que los estudios fueron realizados con extractos de kaemferol obtenidos de plantas con altas concentraciones de este flavonol, como el *Gingko biloba*. En ninguno de los estudios citados el kaemferol fue extraído del té verde (*Camellia sinensis*), como lo es el extracto utilizado en este estudio. Con base en experimentos *in vitro*, se han propuesto muchos mecanismos para explicar la actividad de kaemferol; sin embargo la importancia de algunos de estos estudio *in vivo* permanece en cuestión debido a una comprensión incompleta de la biodisponibilidad del kaemferol y a que las concentraciones utilizadas muchas veces son mayores a las encontradas en condiciones *in vivo*.

De manera complementaria a la evaluación de la citotoxicidad y a la inducción de muerte por apoptosis, se realizó el análisis de la viabilidad celular, mediante los resultados obtenidos del ensayo de apoptosis en leucocitos de sangre periférica. En este análisis se tomaron en cuenta como células viables totales a las células viables apoptóticas y las células viables no-apoptóticas y como células no-viables totales a las células no-viables apoptóticas y las células no-viables no-apoptóticas.

El análisis mostró que el tratamiento extracto de polifenoles de té verde, y el tratamiento con extracto de polifenoles de té verde previo al tratamiento con CrO₃, no modifica significativamente la viabilidad celular puesto que estos resultados son consistentes al analizar los datos de células viables totales con chi cuadrada así como al analizar los promedios de viabilidad celular con la prueba estadística ANOVA (figura 20), por lo que se sugiere que los polifenoles del té verde no modifican la estabilidad celular.

Por el contrario en los grupos que fueron tratados con catequinas, kaemferol, CrO_3 , catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO_3 y kaemferol cuatro horas previas a la administración de CrO_3 , se observó una disminución significativa en el número de células viables totales en todos los grupos evaluados y un incremento significativo en el número de células no viables totales en todos los grupos evaluados, esto al realizar la prueba de chi cuadrada (figura 21); sin embargo al realizar el análisis de los promedios de viables células evaluadas con la prueba estadística ANOVA, los grupos tratados con kaemferol y catequinas previo a la administración de CrO_3 presentan una disminución significativa. Al analizar los promedios de las células no viables, de igual forma los grupos tratados con kaemferol y catequinas previo a la administración de CrO_3 presentan un incremento estadísticamente significativo. Puesto que estos datos son consistentes con lo observado en las células viables totales y no-viables totales al analizarse con la prueba estadística chi-cuadrada, los resultados nos sugieren un efecto citotóxico notable al administrar 150 mg/kg de kaemferol y 500 mg/kg de catequinas previo a la administración de 20 mg/kg de CrO_3 .

En el caso catequinas esto posiblemente se deba a las altas concentraciones de EGCG, para las cuales se ha descrito después de la quercetina la mayor capacidad antioxidante, además de ser las de mayor presencia en el extracto de catequinas del té verde (60%) (Schmidt *et al.*, 2005; Galati *et al.*, 2006). Por su parte, sobre el kaemferol existen estudios previos realizados en cultivos celulares con altas concentraciones del flavonol que indican que este es capaz de reducir la viabilidad de células A549 de manera dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al flavonol (Nguyen *et al.*, 2003). Esto sugiere que el tratamiento ya sea con catequinas, con kaemferol o con CrO_3 tiene efecto citotóxico notable.

Por su parte los grupos que fueron tratados con catequinas cuatro horas previas a la administración de CrO_3 y kaemferol cuatro horas previas a la administración de CrO_3 inducen la muerte celular lo que sugiere que estos polifenoles actúan bajo su mecanismo antioxidante, evitando así los daños ocasionados por el CrO_3 .

En resumen, el presente estudio demuestra que la administración de CrO_3 vía i.p. podría inducir daño en el ADN y apoptosis, estos efectos son dependientes del tiempo. La formación de ERO's y RL puede desempeñar un papel esencial daño al ADN mediado por en el Cr (VI) y la apoptosis *in vivo*. Por otra parte, los extracto de polifenoles de té verde, administrados vía i.p. son capaces de reducir el daño genotóxico inducido por el Cr (VI) más eficazmente que el tratamiento con catequinas o con kaemferol por la misma vía de administración. Se observó la mayor protección a las 24 horas después del tratamiento con CrO_3 vía i.p. (figura 16). La protección se da en el siguiente orden: 50% a las 24 h, > 83% a las 48 h y >81% a las 72 h después del tratamiento. Con base en estos resultados, los extracto de polifenoles de té verde, pueden proteger eficazmente contra el daño genotóxico en los ratones CD-1 tratados con Cr (VI).

Los efectos benéficos del extracto de polifenoles de té verde podrían ser el resultado de la inhibición de ERO's y RL, generados por el estrés oxidativo causado por el Cr (VI) y por la actividad inductora de apoptosis del extracto. Existe evidencia que demuestra que el consumo regular de té verde puede reducir el daño genotóxico. Por lo tanto, este estudio contribuye con pruebas *in vivo* que demuestran que los polifenoles del té verde pueden proteger contra el daño genotóxico inducido por carcinógenos relacionados con el estrés oxidante, tales como compuestos de Cr (VI).

8. Conclusiones y comentarios finales

- El tratamiento con 30 mg/kg de extracto de polifenoles de té verde por vía i.g. e i.p., así como los tratamientos de 500 mg/kg de catequinas por vía i.p. y 150 mg/kg de kaemferol por vía i.p. no inducen daño genotóxico, ya que no incrementaron de manera significativa la frecuencia de MN.
- El tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. induce daño genotóxico, ya que incrementa significativamente la frecuencia de MN a las 48 y 72 horas después de su aplicación.
- El tratamiento con 30 mg/kg de extracto de polifenoles del té verde por vía i.g. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. disminuye el daño genotóxico ocasionado por CrO₃ a las 24, 48 y 72 horas en el siguiente orden: hora 24 (175%) > hora 72 > (100%) > hora 48 (26%), sin embargo a la hora 48 esta disminución aún es significativa comparada con el grupo testigo, lo que sugiere una protección de daño genotóxico parcial.
- El tratamiento con 30 mg/kg de extracto de polifenoles del té verde por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. disminuye el daño genotóxico ocasionado por CrO₃, ya que disminuyó las frecuencias de MN en el siguiente orden: hora 48 (83%) > hora 72 (81%) > hora 24 (50%).
- El tratamiento con 500 mg/kg catequinas por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. disminuye el daño genotóxico ocasionado por CrO₃, ya que disminuyó las frecuencias de MN en el siguiente orden: hora 72 (83%) > hora 24 (75%) > hora 48 (68%).
- El tratamiento con 150 mg/kg kaemferol por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. disminuye el daño genotóxico ocasionado por CrO₃, ya que disminuyó las frecuencias de MN en el siguiente orden: hora 48 (88%) > hora 72 (77%) > hora 24 (38%).

- El tratamiento con 30 mg/kg de extracto de polifenoles del té verde por vía i.g. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. al igual que el tratamiento con 500 mg/kg catequinas por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. no modificaron la relación de EPC con respecto a los ENC, sin embargo estos datos deben tomarse con reserva.
- El tratamiento con 30 mg/kg de extracto de polifenoles del té verde por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. lo mismo que el tratamiento 150 mg/kg kaemferol por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. modificaron la relación de EPC con respecto a los ENC, a las horas 24 y 48 después del tratamiento sin embargo estos datos deben tomarse con reserva.
- Los tratamiento con 30 mg/kg de extracto de polifenoles del té verde vía i.p. y el tratamiento con 500 mg/kg de catequinas vía i.p. no disminuyen la viabilidad celular, ya que no incrementan significativamente el número de células no viables, en comparación con el grupo testigo.
- El tratamiento 150 mg/kg de kaemferol vía i.p. disminuye la viabilidad celular, ya que incrementa significativamente el número de células no viables en comparación con el grupo testigo.
- Los tratamientos con 30 mg/kg de extracto de polifenoles de té verde por vía i.p. previo a 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. y el tratamiento con 150 mg/kg kaemferol por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. no disminuyen la viabilidad celular ya que no incrementan significativamente el número de células no viables en comparación con el grupo testigo.
- El tratamiento con 500 mg/kg catequinas por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. disminuye la viabilidad celular ya que incrementa significativamente el número de células no viables en comparación con el grupo testigo.

- El tratamiento con 30 mg/kg de extracto de polifenoles de té verde vía i.p. al igual que los tratamientos con 500 mg/kg de catequinas vía i.p. y 150 mg/kg de kaemferol vía i.p. no incrementan significativamente el número de células viables apoptóticas y células no-viables apoptóticas en comparación con sus respectivos grupos testigo.
- El tratamiento con 30 mg/kg de extracto de polifenoles de té verde por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. incrementa significativamente el número de células viables apoptóticas en comparación con el grupo testigo, lo que sugiere que este es el posible mecanismo por el cual el extracto de polifenoles disminuye las frecuencia de MN.
- El tratamiento con 500 mg/kg catequinas por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. disminuye significativamente el número de células viables apoptóticas en comparación con el grupo testigo e incrementa significativamente las células no-viables apoptóticas en comparación con el grupo tratado sólo con CrO₃ lo que sugiere que este es el posible mecanismo de reducción de MN por parte de las catequinas.
- El tratamiento con 150 mg/kg kaemferol por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. no modifica significativamente número de células viables apoptóticas y células no-viables apoptóticas en comparación con el grupo testigo.
- El tratamiento con 500 mg/kg catequinas por vía i.p. previo al tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. indujo la muerte de un ratón a la hora 48 después del tratamient, lo que sugiere que la combinación de catequinas y CrO₃ presenta un efecto tóxico sinérgico induciendo letalidad; sin embargo esto puede corresponder a la variación interindividual.

9. Referencias

- Abrevaya X. ¿qué es la genotoxicidad? *Intra Med.* 2008 Artículos
- Adler ID, Boorman J, Favor J, Hook G, Schriever G, Welzl G, Whorton E, Yoshimura I, Hayashi M. Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat Res.* 1998; 417:19-30.
- Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38:1763- 1769.
- Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal AL, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer I.* 1997; 89(24):1881-1886.
- Air Quality Guidelines-Second Edition WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000, Chapter 6.4 Chromium.
- Ames B. Dietary Carcinogens and Anti-carcinogens (Oxygen Radicals and Degenerative Diseases). *Science.* 1983; 22:1256-1264.
- ATSDR. Agency for Toxic Substance and Disease Registry Toxicological Profile for Chromium. P.H.S. U.S.D Department of Health and Human Service. 2000.
- Aviram M, Fuhrman B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis.* 1998; 137(suppl):S45–S50.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ. Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biochem.* 2001; 222:149-158.
- Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1997; 37:693-704.
- Blankenship LJ, Manning FC, Orenstein JM, Patierno SR. Apoptosis is the mode of cell death caused by carcinogenic chromium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994; 126:75–83,
- Block G. The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutrition Rev.* 1992; 50:207-213.
- Boehm, K., Borrelli, F., Ernst, E., Habacher, G., Hung, S.K., Milazzo, S., Horneber, M. Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer. *Syst Rev.* 2009; 3:1–58.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radicals scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 1990; 186:343–355.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Rev.* 1998; 56:317–333.

- Britschgi A, Simon HU, Tobler A, Fey MF, Tschan MP. Epigallocatechin-3-gallate induces cell death in acute myeloid leukaemia cells and supports all-trans retinoic acid-induced neutrophil differentiation via death-associated protein kinase 2. *Br J Haematol.* 2010; 149(1):55–64.
- Bunker VW. Free radicals, antioxidants and ageing. *Med Lab Sci.* 1992; 49:299-312.
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea: a review. *J Am Coll Nutr.* 2006; 25:79-99.
- Cadenas y Packer. Handbook of Antioxidants, 2da edición, Dekker, Inc. 2002. Los Angeles California.
- Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol.* 2001; 61:1205-15.
- Catapano AL. Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology.* 1997; 48:39–44.
- CDPC. Chromium Draft for Public Comment. US. Department of Health and Human Service Agency for Toxic Substance and Disease Registry Coments. 1992.
- Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Fundam Clin Pharma Col.* 1998; 12:249-255.
- Chen C, Yu R, Owuor ED, Kong AN. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenols components during cell survival and death. *Arch Pharm Res.* 2000; 23: 605-612.
- Chen L, Lee MJ, Li H, Yang CS. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos.* 1997; 25(9): 1045-1050.
- Cheng IF, Breen K. On the ability of four flavonoids, baicilein, gluteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals.* 2000; 1:77-83.
- Chi HT, Vu HA, Iwasaki R, Thao le B, Hara Y, Taguchi T, Watanabe T, Sato Y. Green tea (-) epigallocatechin-3-gallate inhibits KIT activity and causes caspase-dependent cell death in gastrointestinal stromal tumor including imatinib-resistant cells. *Cancer Biol Ther.* 2009; 8(20): 1934–1939.
- Choi EJ, Ahn WS. Kaempferol induced the apoptosis via cell cycle arrest in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Nutr Res Pract.* 2008; 2(4): 322-325.
- Clarkson WT, Friberg I, Norberg FG, Sager RP. Biological monitoring of toxic metals. Ed plenum press, New York. 1988; 369-382.
- Cui Y, Morgenstern H, Greenland S, Tashkin D, Mao Jenny T, Cai L, Cozen W, Mack T, Lu Q-Y, Zhang Z-F. Dietary flavonoid intake and lung cancer-a population-based case-control study. *Cancer.* 2008; 112(10): 2241-2248.

- Dayan A, Paine A. Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000. *Hum Exp Tox.* 2001; 20: 439-451.
- De Groot H, Raven U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharma Col.* 1998; 12:249-55.
- Dedick RI, Flessner MF. Pharmacokinetic problems in peritoneal drug administration: Tissue penetration and surface exposure. *J Natl Cancer I.* 1997; 89(7): 480-487.
- Depault F, Cojocar M, Fortin F, Chakrabart S, Lemieux M. Genotoxic effects of chromium (VI) and cadmium (II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy in situ end-labeling (EM-ISEL) assay. *Toxicol In Vitro.* 2004; Epub. Nov. 5.
- Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer I.* 1981; 66(6):1191-1308.
- Drago M., López M., Saiz T. Componentes Bioactivos de los Alimentos Funcionales de Origen Vegetal. *Rev Mex Cienc Farm.* 2006; 37(4):58-68.
- Dreosti IE, Wargovich MJ, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by tea: the evidence from experimental studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1997; 37:761-70.
- Dufresne CJ, Farnworth ER. A review of latest research finding on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem.* 2001; 12:404-421.
- Duruibe J, Ogwuegbu M, Egwurugwu J. Contaminación de Metales Pesados y Efectos Biotóxicos Humanos. *Int J Phys Sci.* 2007; 2(5):112-118.
- Elejalde JI, Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An. Med. Interna.* 2001; 18(6):326-335.
- Elena GA. Mecanismos de muerte celular apoptosis y necrosis. *Rev. Arg. Antes.* 2002; (60)6:391-401.
- Elmets CA, Singh D, Tubesing K, Matsui M, Katiyar SK, Mukhtar H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 44:425-32.
- EPA, Environmental Protection Agency, Integrated Risk Information System (IRIS) on chromium (VI). National Center for Environmental Assessment. 1998.
- Escamilla C., Cuevas E., Guevara J., Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Medigraphic. Rev Fac Med UNAM.* 2009; 2:73-75.
- Ferguson, L. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat Res.* 1994; 307:395-410.
- Ferré-Huguet N, Schuhmacher M, Llobet M. Metales Pesados y Salud, *MAPFRESEGURIDAD.* 2007;108: 50-58.

Efecto de los antioxidantes del té verde sobre el daño genotóxico inducido por Cr (VI)

- Flores J, Lopez-Moreno S, Albert LA. La contaminación y sus Efectos en la Salud y el Ambiente. *Cen Ecol Des A.C.* 1995; México, D.F.
- Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr.* 2003; 133 3275S-3284S.
- Fujiki H, Suganama M, Okabe S. Cancer inhibition by green tea. *Mutat Res.* 1998; 402:307-310.
- Galán H, Romero B. Conferencia. Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Rev Soc Esp Min.* 2008; (10):48-60
- Galati G, Lin A, Sultan AM, O'Brien PJ. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(4):570-580.
- García-Rodríguez M, Altamirano-Lozano M. La clorofilina como modulador y protector del daño al ADN: experiencia en el ratón in vivo. *Bioquímica.* 2007; 32:15-24
- García-Rodríguez M, Altamirano-Lozano M. Sales de sodio y cobre de la clorofila: usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutagena y anticancerígena. *TIP Rev Esp Cie.* 2001; 4(2):77-86
- García-Rodríguez M, Vilches-Larrea R, Nicolás-Méndez T, Altamirano-Lozano M. El té verde en la quimiopreención in vivo del daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (cromo [VI]). *Nutr Hosp* 2012; 27(4): 1204-1212.
- García-Rodríguez MC, Altamirano-Lozano MA. Study of effects chlorophyllin on genotoxic and teratogenic damage induced by chromium (VI), *Env Mol Mut.* 2006; 4(6):460.
- García-Rodríguez MC, Carvente-Juárez MM, Altamirano-Lozano MA, Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-Induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. *Hindawi.* 2013; 1-9.
- García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano MA. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood, *Mutat Res.* 2001; 496: 45-151.
- García-Rodríguez MC, Vilches-Larrea RE, Nicolás-Méndez T, 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):1188-1196.
- Gómez V, Callao M. Chromium determination and speciation since 2000. *Trends Analyt Chem.* 2006; 25(10):1006-1015.
- Gonzales M, Betancourt M, Ortiz R. Daño oxidativo y antioxidants. *Bioquímica.* 2000; 25(1): 3-9.
- Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med.* 1992; 21: 334-350.

- Granado A. Estudio de los Mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales de experimentación. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas 2010.
- Guo, JJ, Hsieh HY, Hu CH. Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: A theoretical study. *J Phys Chem B*. 2009; 113:15699-15708.
- Hambidge M. Chromium nutrition in man. *Am J Clin Nutr*. 1974; 27:505-514.
- Harbowy ME, Balentine DA. Tea chemistry. *Crit Rev Plant Sci*. 1997; 16:415–80.
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate MJr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res*. 1990; 245:245-249.
- Hayashi M, Tice RR, MacGregor J, Anderson D, Blakey DH, Krish-Volders M, Oleson FB Jr, Pacchierotty F, Romagna F, Shimada H, Soutu S, Vannier B. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res*. 1994; 312:293-304.
- Hayashi M., MacGregor J, Gatehouse D, Adler I, Blaker D, Dertinger S, Krishna G, Morita T, Ruso A, Suto S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: II Some aspects of protocol dsin including repeated treatment, integration whit toxicity testing, and automated scoring. *Env Mol Mutagen*. 2000; 35:234-252.
- Hecht SS, Hoffmann D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*. 1998; 9:875-884.
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavourninn K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. The induction of the micronuclei as a measure if genotoxicity. A report of the U. S. Enviromental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*. 1983; 123: 61-118.
- Hernández-Rincón S. Citotoxicidad y genotoxicidad del compuesto de minerales trióxido (MTA): una revisión bibliográfica, *Endod Div RAOA*. 2010; 98(4): 313-321.
- Hibasami H, Achiwa Y, Fujikawa T, KomiyaT. Induction of programed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukemia cells by catechin compounds. *Anticancer Res*. 1996; 16: 1943-1946.
- Hibasami H, Komiya T, Achiwa Y, Ohnishi K, Kojima T, Nakanishi K, Akashi K, Hara Y. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol Rep*. 1998; 5:527–529.
- Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003; 43:89-143.
- Hirose M, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Nakamura A, Akagi K, Sirai T. Green tea catechins enhance tumor developed in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreated with 1,2- Dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-n-propylNitrosamine in male F344 rats. *Cancer Lett*. 2001; 168: 23-29.

- Hodgson E. A text of modern toxicology, 3^a ed. Wiley Interscience, North Carolina State University. 2004; 533.
- Hodgson MJ, Croft DK, Tea flavonoids and cardiovascular health, *Mol Asp Med*. 2010; 495–502.
- Hsu YW, Tsai CF, Chen WK, Huang HF, Yen CC. A subacute toxicity evaluation of green tea (*Camellia sinensis*) extract in mice. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49:2624-2630.
- Imanishi H, Sasaki YF, Ohta T, Watanabe M, Kato T, Shirasu Y. Tea tannin components modify the induction of sister chromatid exchanges and chromosomes aberrations in mutagen-treated cultured mammalian cell and mice. *Mutat Res*. 1991; 259:79-81.
- Isbrucker RA, J. Bausch J, Edwards JA, Wolz E. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: Genotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44:626-635.
- Izzo AA, Carlo GD, Mascolo N, Capasso F, Autore G. Effect of quercetin on gastrointestinal tract. *Phyto Ther Res*. 1994; 8:179-185.
- Jian L, Xie LP, Lee AH, Binns CW. Protective effect of green tea against prostate cancer: a casecontrol study in southeast China. *Int J Cancer*. 2004; 108(1):130–135.
- Jovova K, Valko M. Advances In Metal -Induced Oxidative Stress And Human Disease. *Toxicology*. 2011. 283: 65-87.
- Kanwar J, Taskeen M, Mohammad I, Huo C, Chan TH, Dou QP. Recent advances on tea polyphenols. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012; 4: 111–131.
- Katiyar H, Mukhtar H. Tea in chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies (review). *Int J Oncol*. 1996; 8:221-238.
- Katiyar SK, Agarwal R, Wood GS, Mukhtar H. Inhibition of 12-C-tetradecanoyl phorbol-13-acetate-caused tumour promotion in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-initiated SENCAR mouse skin by polyphenolic fraction isolated from green tea. *Cancer Res*. 1992; 52:6890-6897.
- King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc*. 1999; 99: 213–218.
- Knowles LM, Zigrossi DA, Tauber RA. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. *Nutr Cancer*. 2000; 38:116-22,
- Kohlmeier L, Weterings KGC, Steck S, Kok FJ. Tea and cancer prevention: an evaluation of the epidemiologic literature. *Nutr Cancer*. 1997; 27:1–13.
- Kono S, Shinchi K, Ikeda N, Yanai F, Imanishi K. Green tea consumption and serum lipid profiles: a cross-sectional study in northern Kyushu, Japan. *Prev Med*. 1992; 21:526–531.
- Koo MWL, Cho CH. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *Eur J Pharmacol*. 2004; 500:177-185.

- Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation, *Mutat Res.* 2000; 455:155-166.
- Krishna G, Nath J, Ong T. Sister chromatid exchanges in mice by vitamin C inhibition. *Cancer Res.* 1986; 46:2670-2674.
- Kristen P, Steven P, Susan C, Chromium genotoxicity: A double-edged sword. *Chem-Biol Interact.* 2010 188, 276–288.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blangosklonny MV, El-Deiry WS, Gostein P, Green DR, Hengather M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Placentini M, Zhivotovky B, Melino G. Classification of cell death: recomentations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Diffffer.* 2008; 1-9.
- Lambert JD, Yang CS. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr.* 2003; 133(10): 3262S–3267S.
- Laurie SA, Miller VA, Grant SC, Kris MG, Ng KK. Phase I study of green tea extract in patients with advanced lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005; 55(1):33–8.
- Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomar.* 2002; 11:1025-32.
- Lee SC, Kuan CY, Yang CC, Yang SD. Bioflavonoids commonly and potently induce tyrosine dephosphorylation/inactivation of oncogenic proline-directed protein kinase FA in human prostate cancer cells. *Anticancer Res.* 1998; 18:1117-1121.
- Leibovitz BE, Mueller JA. Bioflavonoids and polyphenols: medical application. *J Optim Nutr.* 1993; 2:17–35.
- Leigh-Ackland M, Van De Waarsenburg S, Jones R. Synergistic Antiproliferative Action of the Flavonols Quercetin and Kaempferol in Cultured Human Cancer Cell Lines. *In vivo.* 2005; 19:69-76.
- Leone M, Zhai D, Sareth S, Kitada S, Reed JC, Pellecchia M. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cancer Res.* 2003; 63(23):8118–21.
- Li W, Bingna D, Wang T, Wang S, Zang, J. Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells via the Ataxia-Telangiectasia mutated-p53 pathway with the involvement of p53 upregulated modulator of apoptosis. *Chem Biol Interact.* 2009; 177 (2):121–127.
- Lim S, Yoon JW, Kang SM, Choi SH, Cho BJ, Kim M, Park HS, Cho HJ, Shin H, Kim YB, Kim HS, Jang HC, Park KS. EGb761, a Ginkgo Biloba Extract, Is Effective Against atherosclerosis In Vitro, and in a Rat Model of Type 2 Diabetes. *PLoS ONE.* 2011; 6(6): e20301.

- Martínez S, González J, Culebras J, Tuñón J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 2002; 6:271-278.
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and the peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutant Res.* 1990; 239:29-80.
- McGahon AJ, Martín SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro, en: *Methods in cell biology.* 1995; 46:153-185.
- McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr.* 2002; 21:1-13.
- Meng X, Sang S, Zhu N, Lu H, Sheng S, Lee MJ. Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. *Chem Res Toxicol.* 2002; 15:1042-50.
- Mertz W. Chromium in Human Nutrition: A Review. *J Nutr.* 2009; 626-633.
- Mertz, W. Biological role of chromium. *Fed Pro.* 1967; 26:186-193.
- Nakagawa K, Miyazawa T. Absorption and distribution of tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in the rat. *Nutr Sci.* 1997; 43:79-684.
- Nanjo F, Honda M, Okushio K, Matsumoto N, Ishigaki F, Ishigami T, Hara Y. Effects of dietary tea catechins on α -tocopherol levels, lipid peroxidation, and erythrocyte deformability in rats fed on high palm oil and perilla oil diets. *Biol Pharm Bull.* 1993; 16:1156-1159.
- Navarro J, Aguilar I, López-Moya J. Aspectos bioquímicos y genéticos de la acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas.* 2007; 16(2):10-25.
- Needleman P, Isakson P. Selective inhibition of cyclooxygenase II. *Soc Sci Med.* 1998; 5:26-35.
- Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y. Black and Green Tea Polyphenols Attenuate Blood Pressure Increases in stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *J Nutr.* 2004; 38-42.
- Newman M, McIntosh A. Metal Ecotoxicology. Ed Lewis Publishers. 1991; 395.
- Nguyen TTT, Tran E, Ong CK, Lee SK, Do PT, Huynh TT, Nguyen TH, Lee JJ, Tan Y, Ong CS, Huynh H. Kaempferol-Induced Growth Inhibition and Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells Is Mediated by Activation of MEK-MAPK. *J Cell Phys.* 2003; 197:110-121.
- Nickens KP, Patierno SR, Ceryak S. Chromium Genotoxicity: A Double- Edged Sword. *Chem Biol Interact.* 2010; 188:227-28.
- Nirmala P, Ramanathan M, Effect of kaempferol on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinoma in rats. *Eur J Pharm.* 2011; 75-79.

- Norbury CL, Hickson ID. Cellular response to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41: 367-401.
- Norseth T. The carcinogenicity of Chromium: Environmental Health Perspectives. 1981; 40: 121-130.
- O'Brien TJ, Fornisaglio JL, Ceryak S, Patierno SR. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res*. 2003;533:3-36.
- Ogura R, Ikeda N, Yuki K, Morita O, Saigo K, Blackstock C. Genotoxicity studies on Green tea catechin. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46:2190-2200.
- Okabe S, Suganuma M, Hayashi M, Sueoka E, Komori A, Fujiki H. Mechanism of growth inhibition of human lung cancer cell line PC-9 by tea polyphenols. *Jpn J Cancer Res*. 1997; 88:639-643.
- Oyama JI, Maeda T, Sasaki M, Kozuma K, Ochiai R, Tokimitsu I, Taguchi S, Higuchi Y, Makino N. 2010. Green Tea Catechins Improve Human Forearm Vascular Function and Have Potent Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects in Smokers. *Intern Med*. 2010; 49:2553-2559.
- Park JS, Ho SR, Kim DH, Chang, IS. Enzymatic preparation of Kf from green tea seed and its antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem*. 2006; 54(8):2951–2956.
- Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. En: Cassarett and Roul's Toxicology, The Basic Science of Poisons, 5th Ed., (Klassen CE, ed). McGraw-Hill, New York, 1996; 113-186.
- Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys*. 2009; 53:75-100.
- Philips BJ, Coyle CH, Morrisroe SN, Chancellor MB, Yoshimura N. Induction of apoptosis in human bladder cancer cells by green tea catechins. *Biomed Res*. 2009; 30(4):207–15.
- Pierce B. Genética: Un enfoque conceptual. 2ª. ed. Medica Panamericana. 2005; 711.
- Pietta, PG. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod*. 2000; 63:1035-1042.
- Plant, J., Smith, D., Smith, B, Williams, L. Environmental geochemistry at the global scale. *Appl Geochem*. 2001; 16:1291-1308.
- Qin J, Xie LP, Zheng XY, Wang YB, Bai Y, Shen HF, Li LC, Dahiya R. A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 354(4):852–7.
- Ramos ML, Batista CM, Gómez BC, Zamora AL. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes *Medigraphic*. 2006; 8(1): 7-15.

- Randall JR, Cheng SJ, Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. 1989; 10(6): 1003-1008.
- Renner H. In vivo effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations. *Mutat Res*. 1990; 244: 185-188.
- Rice–Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20:933–956.
- Roche E, Romero-Alvira D. Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo. II) Alteraciones oxidativas en las macromoléculas biológicas. En: Romero-Alvira D, Roche E. *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología*. ENE Ediciones 1997; 91-104.
- Roy AM, Baliga MS, Katiyar SK. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. *Mol Cancer Ther*. 2005; 4(1):81–90.
- Sandler RS. aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory agents in the prevention of colorectal cancer. *Imp Adv Oncol*. 1996. 123-137.
- Sarma DN, Barrett ML, Chávez ML, Gardiner P, Ko R, Mahady GB, Marles RJ, Pellicore LS, Giancaspro GI, Low Dog T. Safety of green tea extracts: a systematic review by the US Pharmacopeia. *Drug Saf*. 2008; 31(6):469-484.
- Schmid W, Von Ledebur M. The micronucleus test assay methodological aspects. *Mutat Res*. 1973; 45:528-537.
- Schmidt M, Schmitz HJ, Baumgart A. Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. *Food Chem Toxicol*. 2005; 43:307–314.
- Shahidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1992; 32:67–103.
- Sherry HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Ranger-Moore J, Chew WM, Celaya CA, Rodney SR, Hara Y, Alberts DS. Effects of Dosing Condition on the Oral Bioavailability of Green Tea Catechins after Single-Dose Administration of Polyphenon E in Healthy Individuals. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:4627-4633.
- Shi X, A. Chiu A, Chen CT, Halliwell B, Castranova V, Vallyathan V. Reduction of chromium (VI) and its relationship to carcinogenesis. *J Toxicol Environ*. 1999; 87–104.
- Shi X, Dalai NS. The role of superoxide radical in the chromium (VI)-generated hydroxyl radical: the Cr (VI) Haber Weiss Cycle. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 292:323-327.
- Shimoi K, Masuda S, Furugori M, Esaki S, Kinae N. Radioprotective effect of antioxidant flavonoids in γ -ray-irradiated mice. *Carcinogenesis*. 1994; 15:2669–2672.

- Skrzydłewska E, Ostrowska J, Farbiszewski R, Michalak K. Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine*. 2002; 9: 232–238.
- Sosa RD, Nora B, Javier J. Apoptosis, Catedra De Bioquímica Facultad De Medicina UNNE. 2012; 2-6
- Squier MK, Cohen JJ. Assays of apoptosis en: methods in molecular biology. J.S. Elce Ed. 2000; 144: 327-337.
- Stickberger M. Genetics. 3ra ed. Ediciones Omega. 1985; ISBN 978-0-02-418070-4.
- Sudheesh S, Sandhya C, Sarah KA, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from solanum melongena. *Phytother Res*. 1999; 13:393-396.
- Suganuma M, Okabe S, Oniyama M, Tada Y, Ito H, Fujiki H. Wide distribution of [3H](–)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue, *Carcinogenesis*. 1998; 19:1771–1776.
- Surh Y, Ferguson L. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potencial highlights of a symposium. *Mutat Res*. 2003; 523-524.
- Swiercz R, Skrzypczak–Jankun E, Merrell M, Selman S, Jankun J. Angiostatic activity of synthetic inhibitors of urokinase type plasminogen activator. *Oncol Rep*. 1999; 6:523–526.
- Takashima S, Kataoka K, Shibata E, Hoshino E. The long term intake of catechins improves lipid catabolism during exercise. *Prog Med*. 2004; 24: 3371–3379.
- Thomas JA. Oxidative stress, oxidant defense and dietary constituents. Modern nutrition in health and disease. 8 ed. Willians and Wilkins; Philadelphia: 1994; 501-12.
- Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2:1231-1246.
- Valenzuela BA, el consumo té y la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. *Rev Chil Nutr*. 2004; 31(2): On-line version ISSN 0717-7518.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-boil interact*. 2006; 160: 1-40.
- Van Acker SABE, Van-den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, Van der Vijgh WJF, Bast A. Structural aspects of antioxidants activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20:331–342.
- Venables MC, Hulston CJ, Cox HR, Jeukendrup AE. Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87(3): 778–784.
- Venereo J. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes, *Rev Cub Med Mil*. 2002; 31(2):126-133.

- Vinson J, Dabbagh Y, Serry M, Jang J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J Agric Food Sci.* 1995; 43:2800-2802.
- Vinson JA. Black and green tea and heart disease: a review. *Biofactors.* 2000; 13:127-132.
- Wang XF, Xing M-L, Shen Y, Zhhu X, Xu L-H. Oral administration of Cr (VI) induced oxidative stress, DNS damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology.* 2006. 228:16-23.
- Wang ZY, Huang M, Ferraro T, Wong C, Lou Y, Reuhl K, Iatropoulos M, Yang C, Conney A. Inhibitory effect of green tea in the drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in the skin of SKH-1 mice. *Cancer Res.* 1992; 52:1162–1170.
- Wang ZY, Huang M, Lou Y, Jian-Guo X, Reuhl K, Newmark H, Ho C, Yang C, Conney A. Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz[a]anthraceneinitiated SKH-1 mice. *Cancer Res.* 1994; 54:3428–3435.
- Weisburger JH, Rivenson A, Garr K, Aliaga C. Tea, or tea and milk, inhibit mammary gland and colon carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* 1997; 114:323–7.
- World Health Organization. Trace elements in human nutrition and health. *Geneva.* 1996.
- Yokozawa T, Nakagawa T, Kitani K: Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem.* 2002; 50:3549-3552.
- Yoshida T, M. Konishi M, M. Horinaka M, Yasuda T, Goda EA, Taniguchi H, Yano K, Wakada M, Sakai T. Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Res Commun.* 2008; 129–133.
- Yozokawa T, Oura H, Sakanaka S, Kim M. Effect of tannins in green tea on the urinary methylguanidine excretion in rats indicating a possible radical scavenging action. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1992; 56:896–899.
- Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications *Life Sci.* 2006; 78:2073-2080.
- Zhang L, Fang B, Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer, *Cancer Gene Ther.* 2005; 228–237.

10. Anexos

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

i) 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: Effect of polyphenol extract from green tea [P60] on genotoxic and cytotoxic damage induced by Cr (VI) in mice CD-1 strain.

Autores: García-Rodríguez, M.C. Carvente-Juárez, M.M. Montaña-Rodríguez, A.R. and Altamirano-Lozano, M.A.

ii) 12th International Society of Antioxidants in Nutrition and Health. International Conference on Oxidative Stress, Redox States & Antioxidants.

Paris, Francia. Celebrado del 3-4 de julio de 2013.

Título del trabajo: Modulation of DNA damage by phytochemicals (chlorophyllin, ascorbic acid and polyphenols), in CD-1 mice treated with hexavalent chromium.

Autores: M.C. García-Rodríguez, M.M. Carvente-Juárez, G. Serrano-Reyes, C. Macedo-Evaristo, M.A. Altamirano-Lozano.

iii) Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

Iztapalapa. México D.F. Celebrado del 28 al 30 de agosto de 2013.

Título del trabajo: Efecto de los polifenoles extraídos del té verde sobre el daño genotóxico inducido por el trióxido de cromo en ratones de la cepa CD-1.

Autores: Carvente-Juárez Megumi Monserrat, Altamirano-Lozano Mario Agustín y García-Rodríguez María del Carmen.

iv) XIII Foro de Investigación Escolar. Carrera de Biología FES Zaragoza. UNAM.

Iztapalapa. México D.F. Celebrado del 29 al 31 de enero de 2014.

Título del trabajo: Efecto de las Catequinas del té verde sobre el daño genotóxico inducido por el trióxido de cromo en ratones de la cepa CD-1.

Autores: Carvente-Juárez Megumi Monserrat y García-Rodríguez María del Carmen.

El presente trabajo fue publicado en la siguiente revista electrónica:

Hindawi Publishing Corporation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Volume 2013, Article ID 486419, 9 pages.<http://dx.doi.org/10.1155/2013/486419>

Título del artículo: Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-Induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining.

Autores: María del Carmen García-Rodríguez, Megumi Monserrat Carvente-Juárez, and Mario Agustín Altamirano-Lozano.



MEMORIA

**EFFECT OF POLYPHENOL EXTRACT FROM GREEN TEA [P60] ON
GENOTOXIC AND CYTOTOXIC DAMAGE INDUCED BY Cr (IV) IN MICE CD-1
STRAIN**

García-Rodríguez, M.C.*; Carvente-Juárez, M.M., Montañó-Rodríguez, A.R. 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

Green tea's polyphenols have been associated with beneficial effects against the development of diseases related to oxidative stress. These effects include the capture of free radicals and reactive oxygen species (ROS), the regulation of cell growth and the induction of detoxifying enzymes. On the other hand, compounds of Cr (VI) within the cell generate ROS during its reduction to Cr (III), inducing DNA damage. In this study we evaluated the effect of an extract of green tea polyphenols [P60] on the genotoxic and cytotoxic damage induced by Cr (VI). DNA damage was analyzed with the MN assay by scoring the total MN found in 2000 polychromatic erythrocytes (PCE); while cytotoxicity was evaluated by scoring the PCE ratio respect to the normochromatic erythrocytes (NCE) in a total of 1000 cells. We used the acridine orange technique in peripheral blood of mice CD-1 strain. Groups of 5 mice were treated as follows: 1) control group (vehicle administered orally by gavage); 2) P60 group (30 mg/kg P60 orally by gavage); 3) CrO₃ group (20 mg/kg CrO₃ by i.p. route); 4) P60 + CrO₃ (30 mg/kg P60 by gavage 4 hours before the administration of 20 mg/kg CrO₃ by i.p. route). Blood samples were obtained from the tail vein at 0, 24, 48 and 72 hours after each treatment. The results showed that the sole administration of P60 does not increase the frequencies of MN, while the CrO₃ treatment shows a statistically significant increase in the frequencies of MN at 48 and 72 hours after the treatment. The combined treatment (P60 + CrO₃) showed a decrease in MN frequencies at 24, 48, and 72 hours after the treatment with CrO₃, but the MN reduction at 48 hour was statistically significant compared with the control group. These results indicate that the increase of MN by CrO₃ is partially blocked by the P60 extract of green tea in the protocol used. However it requires to perform more experiments using different protocols to have more supported results. On the other hand, the frequency of PCE was not-modified at any of the treatments evaluated, concluding that they do not have a cytotoxic effect.

Financial support was obtained from DGAPA-UNAM IN217712.

*International Society of Antioxidants
in Nutrition and Health*

12th ISANH International Conference on

**Oxidative Stress,
Redox States &
Antioxidants**



July 3-4, 2013 - Paris, France



www.isanh.fr

MODULATION OF DNA DAMAGE BY PHYTOCHEMICALS (CHLOROPHYLLIN, ASCORBIC ACID AND POLYPHENOLS), IN CD-1 MICE TREATED WITH HEXAVALENT CHROMIUM

M.C. GARCÍA-RODRÍGUEZ, M.M. CARVENTE-JUÁREZ, G. SERRANO-REYES, C. MACEDO-EVARISTO,
M. ALTAMIRANO-LOZANO

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN). Facultad de Estudios Superiores
"Zaragoza", UNAM. México.

carmen.garcia@unam.mx

The antioxidant properties present in some substances of the human diet generate the possibility of their use to counteract the DNA damage induced by oxidative stress agents. It has been found that some components of fruits and vegetables that present antioxidant properties such as ascorbic acid and polyphenols might provide protection against diseases associated with DNA damage mediated by reactive oxygen species (ROS) and free radicals (FR)^[1]. Moreover, chlorophyllin (CHL) exhibits antimutagenic activity, against a variety of environmental and dietary complex mixtures. According to previous studies, one of the possible antimutagenic mechanisms of CHL is via FR-scavenging^[2]. On the other hand, hexavalent chromium [Cr (VI)] generates ROS during its reduction to Cr (III) leading to DNA damage, and human exposure to these compounds is associated with the induction of cancer^[3]. As part of our research program to evaluate chemopreventive or chemoprotective potential of diet components, the ability of CHL and antioxidants such as ascorbic acid and polyphenols to reduce DNA damage induction by Cr (VI) in peripheral blood polychromatic erythrocytes (PCE) of mice was evaluated in the present study. Groups of five mice were treated with CHL (20 mg/kg), ascorbic acid (100 mg/kg) and phenolic extracts of green tea [P60] (30 mg/kg) via oral administration. DNA damage was evaluated by the analysis of micronucleus (MN) in PCE using the acridine orange technique. To evaluate the protection against DNA damage, the treatment of CHL and antioxidants were administered previous to the treatment with Cr (VI) (20 mg/kg of CrO₃ via intraperitoneal). 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 CHL, ascorbic acid and P60 did not modify MN-PCE frequency. CrO₃ treatment significantly increased MN-PCE frequency being a greater induction 48 h after the injection (about 7 MN-PCE). When the antioxidants were administrated before the Cr (VI) treatment, the DNA damage decreased about 56.5% at 48 h for ascorbic acid, and 76% at 72 h for P60. While, treatment with CHL prior to Cr (VI), MN-PCE frequencies decreased at 48 h (about 50%). These results indicate that the increase of MN-PCE observed in the group treated with CrO₃ is blocked by CHL and antioxidants in the used protocol. Due to the fact that chromium (VI) compounds induce DNA damage through the generation of ROS during its reduction to Cr (III), it allows us to suggest that the MN-PCE could be induced by this via and that the possible mechanism of protection against genotoxic damage of the antioxidants could be through FR scavenging. On the other hand, the frequency of PCE was not-modified, suggesting a non-cytotoxic effect.

Financial support was obtained from DGAPA-UNAM IN217712.

[1] Cadenas E, Packer L. 2002. *Handbook of Antioxidants*. 2 ed. New York: Dekker, Inc. USA.

[2] Park KK, Park JH, Jung YJ, Chung WY. Inhibitory effects of chlorophyllin, hemin and tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin on oxidative DNA damage and mouse skin inflammation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate as a possible anti-tumor promoting mechanism. *Mutat Res*. 2003; 542(1-2):89-97.

[3] Nickens KP, Patierno SR, Ceryak S. Chromium genotoxicity: A double-edged sword. *Chem Biol Interact*. 2010; 188(2):276-88.



28-30 de Agosto de 2013

**EFFECTO DE LOS POLIFENOLES
EXTRAÍDOS DEL TÉ VERDE SOBRE
EL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO
POR EL TRIÓXIDO DE CROMO EN
RATONES DE LA CEPA CD-1**

*Carvente-Juárez Megumi Monserrat,
Alfamiro-Lozano Mario Agustín,
García-Rodríguez María del Carmen. **

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

A los polifenoles del té verde se han atribuido efectos benéficos para la salud, ya que sus propiedades antioxidantes pueden jugar un papel importante en el riesgo y la patogénesis de algunas enfermedades crónicas, como algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. A su vez, se ha reportado que compuestos metálicos como los del Cr (VI) son carcinogénicos e inducen daño genotóxico mediante Estrés Oxidante. De ahí que, es posible que los polifenoles del té verde protejan del daño genotóxico inducido por los compuestos de Cr (VI). En este estudio se evaluó el efecto de un extracto de polifenoles del té verde [P60] sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por Cr (VI). El daño al ADN se analizó con el ensayo de MN, para lo cual se utilizó la técnica de naranja de acridina en sangre periférica de ratón^[1]. Grupos de cinco ratones macho de la cepa CD-1 fueron divididos al azar de la siguiente forma: 1) grupo control, al cual se le administró solo el vehículo por vía oral con ayuda de una sonda intragástrica; 2) grupo polifenoles, al cual se le administró 30 mg/kg de P60 por vía oral con ayuda de una sonda intragástrica; 3) grupo Cr (VI), al cual se le administró 20 mg/kg de CrO₃ por vía intraperitoneal y 4) grupo polifenoles y Cr (VI), a este grupo se le administraron 30 mg/kg de P60 por sonda cuatro horas

antes de la administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía intraperitoneal. Las muestras de sangre se obtuvieron a las 0, 24, 48 y 72 horas después de cada tratamiento. Los resultados muestran que la administración de P60 no incrementa las frecuencias de MN. El tratamiento con CrO₃ incrementó de manera estadísticamente significativa las frecuencias de MN a las 48 y 72 horas después del tratamiento. El grupo al que se le administraron ambos tratamientos (P60 + CrO₃) mostró una disminución en las frecuencias de MN en todas las horas evaluadas en comparación con el grupo que fue solamente tratado con el CrO₃. Aunque como se mencionó anteriormente se presenta una reducción de MN en todas las horas evaluadas, la frecuencia de MN observada a las 48 horas resulta estadísticamente significativa al compararse con el grupo testigo. Estos resultados nos permiten sugerir que el incremento de MN inducido por la administración del CrO₃ es parcialmente bloqueada por el extracto de té verde P60 en el protocolo utilizado y que el posible mecanismo es mediante la inactivación de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno generados durante la reducción del Cr (VI) al Cr (III). Sin embargo, es necesario llevar a cabo nuevos experimentos usando otros protocolos y ensayos que apoyen estos resultados. Por otra parte, la frecuencias de eritrocitos policromáticos con respecto a los eritrocitos normocromáticos no se afectaron en ninguno de los tratamientos utilizados, lo que sugiere que no hubo efectos citotóxicos al ser evaluado este parámetro con este ensayo. *El apoyo financiero se obtuvo de DGAPA-UNAM IN217712.*

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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA





XIII FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN
BIOLOGÍA



Solicitud de registro de trabajo

Título: (Mayúsculas)

EFFECTO DE LAS CATEQUINAS DEL TÉ VERDE SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO POR EL TRIÓXIDO DE CROMO EN RATONES DE LA CEPA CD-1

Autores: (sepárelos con una coma e indique con superíndice 1 si es alumno, con 2 si es docente)

Carvente-Juárez Megumi Monserrat¹ y García-Rodríguez María del Carmen²

Modalidad y Ciclo:

Por favor marque con una x

X	Oral		Básico
	Cartel		Intermedio
	Video	X	Terminal

Resumen:

(Máximo 300 palabras, Times New Roman 12 pts., interlineado sencillo, renglón seguido, sin sangría y justificado)

El té verde es fuente importante de catequinas, a las que se les atribuyen efectos benéficos para la salud debido a sus propiedades antioxidantes. En contraparte se sabe que compuestos metálicos como los de Cr (VI) son carcinogénicos e inducen daño genotóxico mediante estrés oxidante. Este estudio evaluó el efecto de las catequinas sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por Cr (VI). El daño al ADN se evaluó con el ensayo de micronucleos (MN) y la relación de eritrocitos policromáticos (EPC) con respecto a los normocromáticos (ENC) en sangre periférica. Grupos de cinco ratones macho fueron divididos en: 1) control, tratado con el vehículo vía intraperitoneal; 2) catequinas, tratado con 500 mg/kg de catequinas vía intraperitoneal, 3) Cr (VI), tratado con 20 mg/kg de CrO₃ vía intraperitoneal y 4) catequinas y Cr (VI), tratado tanto con las catequinas como con el CrO₃. Las muestras se obtuvieron a las 0, 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. Los resultados muestran que el tratamiento con catequinas no incrementa las frecuencias de MN. El tratamiento con CrO₃ incrementó las frecuencias de MN a las 48 y 72 horas. El grupo tratado con catequinas y CrO₃ disminuyó significativamente las frecuencias de MN en todas las horas evaluadas. No se observó modificación en la relación de EPC con respecto a ENC, sin embargo se presentó la muerte de un organismo a la hora 48. Esto nos sugiere que el incremento de MN inducido por CrO₃ puede ser bloqueado por las catequinas, pero la combinación de catequinas y CrO₃ presenta un efecto tóxico sinérgico generalizado ya que induce letalidad. **[Proyecto financiado por PAPIIT-IN217712].**

Palabras clave: (3-5 palabras): catequinas, micronúcleos, CrO₃, antigenotóxico, té verde

Research Article

Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-Induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining

Marta del Carmen García-Rodríguez, Megumi Monserrat Carvente-Juárez, and Mario Agustín Altamirano-Lozano

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Batalla 5 de Mayo s/n, 09230, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Marta del Carmen García-Rodríguez; carmen.garcia@unam.mx

Received 5 August 2013; Revised 29 October 2013; Accepted 30 October 2013

Academic Editor: David Vauxeur

Copyright © 2013 Marta del Carmen García-Rodríguez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study was conducted to investigate the modulating effects of green tea polyphenols on genotoxic damage and apoptotic activity induced by hexavalent chromium [Cr (VI)] in CD-1 mice. Animals were divided into the following groups: (I) injected with vehicle; (II) treated with green tea polyphenols (30 mg/kg) via gavage; (III) injected with CrO₃ (20 mg/kg) intraperitoneally; (IV) treated with green tea polyphenols in addition to CrO₃. Genotoxic damage was evaluated by examining micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCEs) obtained from peripheral blood at 0, 24, 48, and 72 h after treatment. Induction of apoptosis and cell viability were assessed by differential acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining. Treatment of green tea polyphenols led to no significant changes in the MN-PCEs. However, CrO₃ treatment significantly increased MN-PCEs at 24 and 48 h after injection. Green tea polyphenols treatment prior to CrO₃ injection led to a decrease in MN-PCEs compared to the group treated with CrO₃ only. The average of apoptotic cells was increased at 48 h after treatment compared to control mice, suggesting that apoptosis could contribute to eliminate the DNA damaged cells induced by Cr (VI). Our findings support the proposed protective effects of green tea polyphenols against the genotoxic damage induced by Cr (VI).

1. Introduction

Green tea (*Camellia sinensis*) is one of the most ancient beverages, consumed by over two-thirds of the world's population. The principal constituents are caffeine, tannins, and essential oils. The tannins encompass a variety of polyphenolic compounds, including important flavonoids such as catechins: (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC) and their gallate forms (+) gallicocatechin (GC), (-) epicatechin-3-gallate (ECG) and (-) epigallocatechin-3-gallate (EGCG) [1, 2]. These compounds are chemically classified as dibenzopyrans, pyrones, and their derivatives. The core structure contains a diphenylpropane skeleton (Figure 1(a)). The primary flavonoids found in fresh green tea leaves are catechins

(flavan-3-ols or flavanols) and the flavonols (Figures 1(b) and 1(c), resp.) [1]. In addition, green tea contains other polyphenols such as theaflavins (Figure 1(d)) but at lower concentration than catechins. The polyphenols are also naturally found in fruits and vegetables, as well as in drinks such as red wine and beer [1, 2].

Green tea has attracted significant attention recently, both in the scientific and in consumer communities for its health benefits for a variety of diseases associated with oxidative stress such as cancer, cardiovascular, and neurodegenerative diseases [3, 4]. The beneficial effects of green tea are attributed to the antioxidant properties of the polyphenolic compounds. In addition to the cancer chemopreventive properties, green

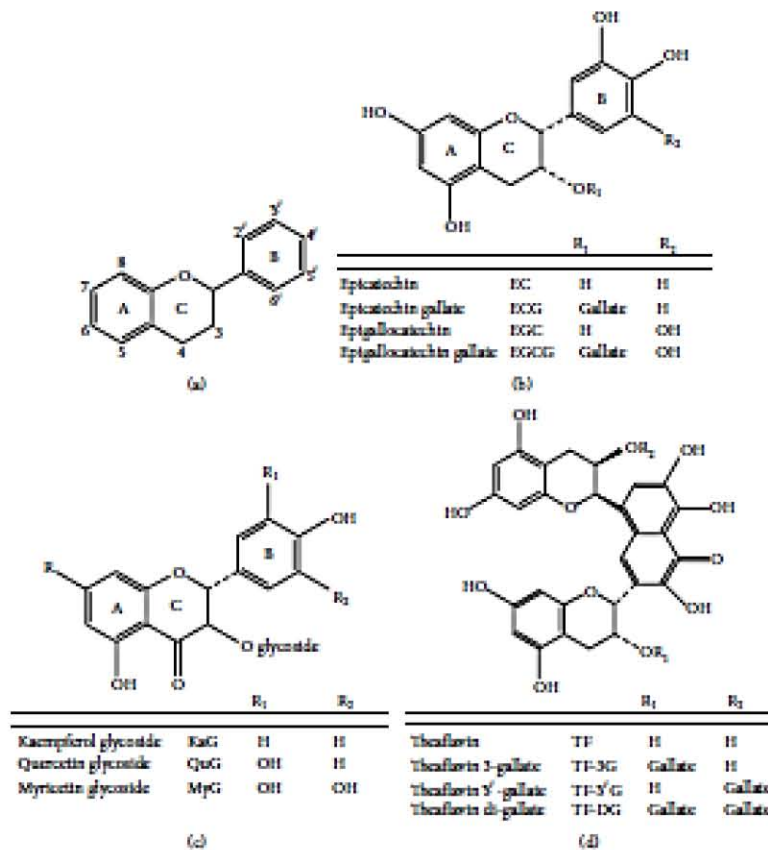


FIGURE 1 | Classification of flavonoids. (a) Flavonoid diphenylpropane skeleton; (b) tea flavanols (flavan-3-ols); (c) tea flavonols; (d) tea theaflavins.

tea polyphenols have shown anti-inflammatory, anti-allergic, antibacterial, and antiviral properties [4–6], as well as antimutagenic activity [7].

The polyphenol compounds have shown direct effects as radical scavengers and metal chelators and indirect effects via the modulation of transcription factors and enzymes [8, 9]. In fact, these antioxidants can inhibit the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG, 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine) *in vivo* [10, 11]. Thus, substances with antioxidant properties have emerged as putative preventives and adjuvants in the treatment of chronic degenerative diseases related to oxidative stress and DNA damage.

In contrast, hexavalent chromium [Cr (VI)] compounds are particularly effective at inducing genotoxicity by causing several types of DNA lesions and gene mutations. Cr (VI) compounds have been widely studied because they have various industrial applications, including chromium plating,

metallurgy, pigment manufacturing, leather tanning, and wood preservation, and because they are associated with the induction of cancer [12]. Cr usually exists in various oxidation states, primarily Cr (III) and Cr (VI). Nonetheless, Cr (III) is an essential micronutrient and plays an important role in protein, sugar, and fat metabolism [13]. Cr (VI) is particularly effective at inducing genotoxicity by causing several types of DNA lesions and gene mutations. Cr (VI)-induced DNA-DNA interstrand cross-links, oxidative DNA damage, and mutations in the tumor suppressor gene p53 are some of the major factors that may play a significant role in determining cellular genotoxicity [14, 15]. According to previous studies, Cr-induced genomic DNA damage includes 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG, 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine), which is a form of oxidative DNA damage [16]. Maeng et al. [17] observed changes in 8-OH-dG levels in DNA when rats were exposed to Cr (VI) and

suggest that DNA damage caused by Cr (VI) compounds may be partially associated with oxidative stress. Cr (VI) generates reactive oxygen species (ROS) and free radicals (FRs) via its intracellular reduction to Cr (III) via the Fenton and Haber-Weiss reaction [15, 18, 19]. Although the direct relationship between DNA-ROS and chromium-induced DNA damage is heavily debated and unclear, there have been several studies supporting the role of ROS in Cr (VI)-induced genotoxicity and cytotoxicity [20]. Moreover, it has been observed that Cr (VI) given orally to mice could induce dose- and time-dependent effects on hepatic oxidative stress and hepatocyte apoptosis [21]. Apoptosis is a process in which cell death is initiated and completed in an orderly manner through the activation and/or synthesis of gene products necessary for cell destruction [22]. Apoptosis plays a crucial role in a number of physiological and pathological processes and is accompanied by characteristic morphological changes, which include cytoplasmic shrinkage, plasma membrane blebbing, condensation or fragmentation of nuclei, and extensive degradation of chromosomal DNA. Indeed, many chemopreventive agents act by inducing apoptosis as a mechanism to suppress carcinogenesis [23]. Roy et al. [24] observed that EGCG not only protects normal cells against genotoxic alterations induced by MNNG but also eliminates cancer cells via the induction of apoptosis *in vitro*. We previously observed that *in vivo* administration of green tea (*ad libitum* for 10 days) decreased the induction of MN-PCEs upon treatment with CrO₃. This result supports the protective effects of green tea against the genotoxic damage induced by metal compounds such as Cr (VI). However, the MN-PCEs induced by CrO₃ were only partially blocked by the addition of green tea (approximately 42%) at days 1 and 2 [25]. This finding may be related to factors such as the origin of the tea because it has been observed that the amount of polyphenols in tea plants is influenced by environmental factors (i.e., weather, light, nutrients, preparation process, storage, horticulture leaf age, etc.). Also, it has been reported that polyphenols make up more than 30% of the dry weight of tea leaves; 90% of these compounds are catechins, and 10% are flavonols [26–28]. Therefore, as part of our research program that evaluates chemopreventive and chemoprotective components in the diet, to obtain a more efficient modulation of the genotoxic damage induced by Cr (VI) *in vivo*, we directly studied green tea polyphenol extracts that contain a mixture of polyphenolic compounds (minimum 60% total catechins with higher antioxidant activity [Polyphenon 60]), and we analyzed its apoptotic activity in the peripheral blood of CD-1 mice using analysis with differential acridine orange/ethidium bromide staining.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals. The following test chemicals and reagents were obtained from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA): CrO₃ [CAS no. 1333-82-0], acridine orange (AO) [CAS no. 10127-02-3], ethidium bromide (EB) [CAS no. 1239-45-8], and green tea polyphenol extracts (Polyphenon 60) [CAS no. 138988-88-2].

2.2. Animals. Two- to three-month-old CD-1 male mice (28–35 g) were used in the experiments. The animals were kept under controlled temperature (22°C) with a 12–12 h light–dark period (light 07:00–19:00 h). Mice had free access to food (Purina-México chow for small rodents) and water. All of the mice were obtained from Harlan at “Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México” (UNAM) and were acclimated for a two-week period. The Bioethics Committee of the “Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza”, UNAM approved the experimental protocols used in this study.

2.3. Experimental Design. The dosage of green tea polyphenols extract (Polyphenon 60) was based on results obtained in previous studies, which utilized other commercially available Polyphenon 60 (0.625–1.25% body weight) [29] and our preliminary studies to determine the maximum tolerated dose (MTD) that did not induce MN-PCEs. The CrO₃ dose was selected according to previous studies that intraperitoneally (i.p.) administered 20 mg/kg. This CrO₃ dosage induced MN-PCEs in the peripheral blood of mice [30].

The green tea polyphenol extracts and CrO₃ were prepared in solution by dissolving the dry compounds in sterile distilled water. Following preparation of the compounds, the solutions (0.25 mL) were administered immediately. The control group was treated in an identical manner with vehicle only. The evaluation criteria and work conditions were set up according to the OECD guideline (04), Food and Drug Administration (FDA) guidelines, Environmental Protection Agency (EPA) guidelines, and guidelines for the testing of chemicals specified by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) and the Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Society of Japan (JEMS/MMS) for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test [31–33].

After establishing treatment doses, the effects of green tea polyphenol extracts on genotoxic damage in CrO₃-treated mice were evaluated. This assessment was performed using MN-PCEs kinetic analysis [34]. Mice were assigned at random to one of the following groups (*n* = 5 mice per group).

- (1) Animals injected with vehicle (control group).
- (2) Animals treated with green tea polyphenol extract (30 mg/kg) by gavage.
- (3) Animals injected with CrO₃ (20 mg/kg).
- (4) Animals treated with green tea polyphenol extract (30 mg/kg) by gavage and then (6 h later) injected with CrO₃ (20 mg/kg).

2.4. Micronucleus Assay. Slides were covered with AO and prepared according to the technique described by Hiyashi et al. [36]. Briefly, AO was dissolved in distilled water at a concentration of 1 mg/mL, and 10 μ L of this solution was placed on a preheated (approximately 70°C) clean glass slide. The AO was spread evenly on the slide by moving a glass rod back and forth over the slide, which was then air-dried.

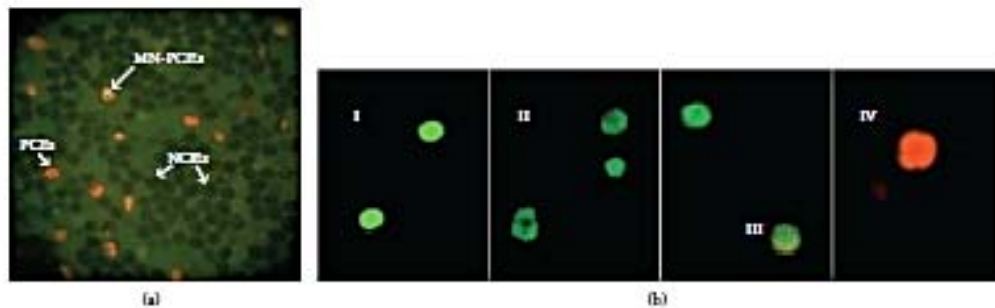


FIGURE 2: (a) Fluorescent microphotograph of CD-1 mouse peripheral blood cells using the AO coating method (NCEs, PCEs, and MN-PCEs). (b) Morphology of viable cells (apoptotic and nonapoptotic cells) and nonviable cells (apoptotic and nonapoptotic cells) as assessed by acridine orange/ethidium bromide staining. Viable cells stain uniformly green (I), early apoptotic cells with intact plasma membranes appear green, with "dots" of condensed chromatin that are highly visible within (II), late apoptotic cells are stained bright green-orange because membrane blebbing starts to occur, EB can enter the cell (III), and apoptotic nonviable cells are stained bright orange because of the entry of ethidium bromide into these cells (IV).

The AO-coated glass slides were stored in a dark, dry location at room temperature prior to experimental use.

To evaluate MN after treatment, 5 μ L peripheral blood samples were collected by piercing a tail blood vessel of the mice every 24 h during a four-day period (0 to 72 h). The samples were placed directly on slides previously treated with AO according to Hayashi et al. [36]. After the sample was placed on the slide, a coverslip (24 \times 50 mm) was immediately placed on the slide, and its edges were sealed with rubber cement. All of the slide preparations were kept in plastic boxes in the dark at 4°C. These slide preparations cannot be stored permanently, but they can be stored for several days in a refrigerator if the coverslip has been sealed. Two slides were prepared for each mouse, and analysis of the slides was conducted after 12 h.

PCEs, NCEs, and MN-PCEs were identified under a fluorescent microscope (Nikon OPTIPHOT-2) using a blue excitation filter and a yellow barrier filter. The differential AO staining distinguished PCEs from NCEs, as PCEs were stained a fluorescent red-orange color due to the presence of ribosomal RNA. The AO staining also identified MN-PCEs, which were stained a fluorescent green color due to their DNA content (Figure 2(a)). The MN-PCEs analysis was based on the results from 2,000 cells per mouse, and the presence of MN-PCEs was used as a marker for genotoxic damage [36].

2.5. Apoptosis and Cell Viability Analyses. To evaluate apoptosis and cell viability we used the differential acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining. Blood samples (100 μ L) were collected by piercing a tail blood vessel of the mice prior to treatment and 48 h after treatment. Heparin (10 μ L) was added to the blood samples, and 20 μ L of AO/EB dye mix (100 μ L/mL AO and 100 μ L/mL EB, both prepared in PBS) was then added. The suspension was concentrated via centrifugation (5,000 rpm), and the cell pellet was resuspended in 10 μ L and plated on a clean slide; a coverslip (24 \times 24 mm) was immediately placed on the slide. Two slides

were prepared per mouse, and the analysis was conducted immediately.

Apoptosis was assessed by identifying apoptotic, viable and nonviable cells under a fluorescent microscope (Nikon OPTIPHOT-2) with a blue excitation (480 nm) and a barrier filter (515–530 nm). The differential AO/EB staining is capable of distinguishing between viable and nonviable cells based on membrane integrity. When the cell is viable, the AO intercalates into the DNA, giving the cell a green appearance. Conversely, when the cell is nonviable, the EB also intercalates into the DNA, making the cell appear orange. Thus, a nonviable cell will contain a bright orange nucleus as EB overwhelms AO staining. Both healthy and apoptotic nuclei in viable cells will fluoresce bright green. In contrast, healthy or apoptotic nuclei in nonviable cells will fluoresce bright orange [33]. The apoptotic and cell viability assessments were based on 200 cells per mouse.

2.6. Statistical Analysis. The MN-PCEs induction results and the viable cells (apoptotic and nonapoptotic) and nonviable cells (apoptotic and nonapoptotic) data are expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.), and results from the various treatment groups were compared by an ANOVA test followed by a Tukey test. The net induction frequency (NIF) of MN-PCEs was analyzed using a Chi-square test [30, 37]. SPSS/PC V18™ and Statistica/PC V 6.0™ software were used for the statistical analyses. For all of the analyses, $P < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

The results obtained in the present study are shown in Table 1. Vehicle and green tea polyphenol extract did not modify the average number of induced MN-PCEs in the treated mice. CrO₃ treatment increased the average number of MN-PCEs in all of the samples, but statistical significance was only

TABLE 1: Averages of the induction MN-PCEs in peripheral blood of mice treated with polyphenol extracts of green tea and CrO₃.

Treatment	Dose (mg/kg)	n	Time analysis (hours)	MN-PCEs 2,000 cells (mean ± S.D.)	ANOVA
Control	0	5	0	0.6 ± 0.9	
			24	0.8 ± 0.8	
			48	1.2 ± 0.8	
			72	1.6 ± 1.5	
Polyphenol extracts of green tea	30	5	0	1.0 ± 1.2	
			24	1.8 ± 1.9	
			48	1.2 ± 1.3	
			72	1.4 ± 0.5	
CrO ₃	20	5	0	0.2 ± 0.5	a, b, c, d
			24	3.0 ± 1.6	
			48	15.2 ± 3.8	
			72	3.4 ± 1.1	
Polyphenol extracts of green tea-CrO ₃	30-20	5	0	1.2 ± 1.3	a, b, c
			24	0.6 ± 0.5	
			48	5.2 ± 1.8	
			72	1.2 ± 1.1	

*P < versus control 48 h; ^bP < versus polyphenol extracts of green tea 48 h; ^cP < versus CrO₃ 0 h; ^dP < versus polyphenol extracts of green tea-CrO₃ 48 h; ^eP < versus polyphenol extracts of green tea-CrO₃ 0 h.

observed at the 48 h time point when compared to the 0 h samples and the control group. Furthermore, CrO₃ treatment increased the average number of MN-PCEs (approximately 13 MN-PCEs) compared to vehicle-treated mice. When the treatment included both green tea polyphenol extract and CrO₃, we observed a decrease in the average number of MN-PCEs at 24, 48, and 72 h after treatment when compared to MN-PCEs induction in the CrO₃ only treatment group, but the MN-PCEs induction observed at 48 remains statistically significant compared with the control group (Table 1). To compare the kinetics of MN-PCE induction in the various treatment groups, the data were analyzed by calculating the NIF value, which was calculated as follows [30]:

$$\text{NIF} = \text{number of MN-PCEs measured at time } x_i - \text{number of MN-PCEs measured at time 0}, \quad (1)$$

where x_i = evaluation at 24, 48, or 72 h. Time 0 = evaluation at 0 h (before treatment).

When the NIF is calculated, the net MN-PCEs induction can be more readily observed. This calculation subtracts the frequency of MN-PCEs prior to treatment from the frequency following treatment, thereby eliminating the baseline MN-PCEs variability that occurs between the treatment groups at time 0 (see S.D. Table 1). Figure 3 presents the NIF values for all treatments at 24, 48, and 72 h after treatment. The groups treated with green tea polyphenol flavonoid extracts exhibited a principal MN-PCEs reduction at 24 and 72 h after treatment (approximately 121% and 100%, resp.).

Apoptosis and cell viability were evaluated directly in the peripheral blood of mice before (0 h) and after (48 h) treatment. Induction of apoptosis and cell viability were assessed via AO/EB staining of peripheral blood collected from treated mice. This technique shows the differential

uptake of the fluorescent DNA-binding dyes AO and EB to determine viable and nonviable cells. These dyes were used to identify cells that have undergone apoptosis and to distinguish between cells in the early or late stages of apoptosis based on membrane integrity (Figure 2(b)). AO intercalates into the DNA, giving it a green appearance. This dye also binds to RNA, but because it cannot intercalate, the RNA stains red orange. Thus, a viable cell will have a bright green appearance. EB is only taken up by nonviable cells. This dye also intercalates into DNA, making it appear orange; however, EB only binds weakly to RNA, which may appear slightly red. Thus, a nonviable cell will have a bright orange nucleus, as EB overwhelms AO staining, and its cytoplasm will appear dark red (if any content remains). Both normal and apoptotic nuclei in viable cells will fluoresce bright green (Figure 2(b), I-III). In contrast, normal or apoptotic nuclei in nonviable cells will fluoresce bright orange (Figure 2(b), IV). Therefore, one can differentiate between early and late apoptotic cells using this system. Viable cells with intact membranes will have a uniformly stained green nucleus (Figure 2(b), I). Early apoptotic cells with intact membranes but that have started to fragment their DNA will still have green nuclei because EB cannot enter the cell, but chromatin condensation can be visualized as bright green patches in the nuclei (Figure 2(b), II). As the cell progresses through the apoptotic pathway and membrane blebbing starts to occur, EB can enter the cell, causing the cell to stain green orange (Figure 2, III). Late apoptotic cells will have bright orange patches of condensed chromatin in the nucleus that will distinguish these cells from necrotic cells, which will be uniformly stained orange (Figure 2, IV).

All of the treatments increased the average number of apoptotic viable cells, but statistical significance was achieved only in the CrO₃ treatment group and the combined green

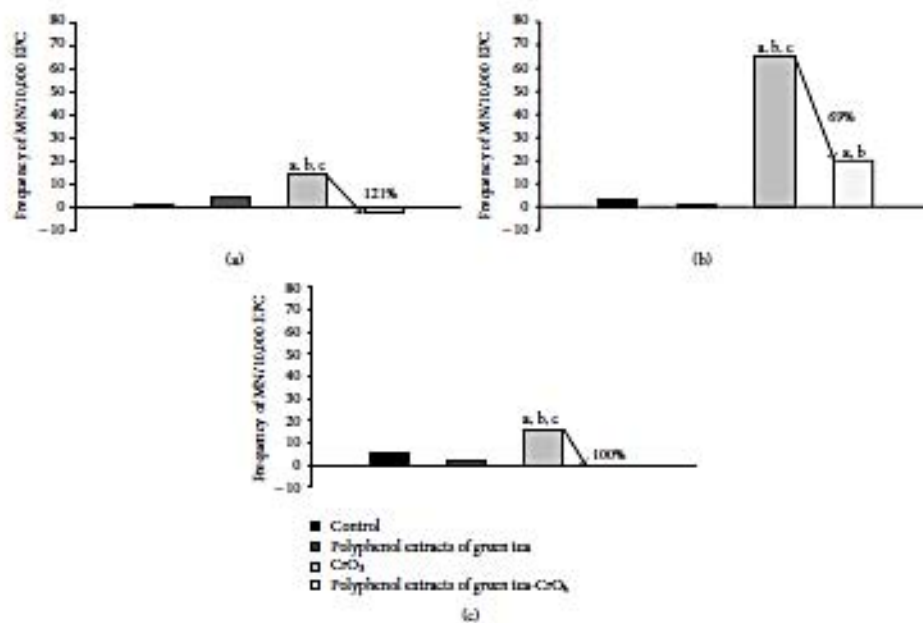


FIGURE 3: Effects of polyphenol extracts of green tea on the MN-PCs frequency (% reduction) in mice peripheral blood at different times: (a) 24 h, (b) 48 h, and (c) 72 h after treatment with CrO₃. Data represent MN-PCs frequency obtained at 24, 48, and 72 h minus the MN-PCs frequency at 0 h (NIF). *P < 0.05 versus control group; ^aP < 0.05 versus polyphenol extracts of green tea group; ^bP < 0.05 versus CrO₃-polyphenol extracts of green tea group. n = 5 (2000 cells for mouse).

TABLE 2: Averages of viable cells (apoptotic and nonapoptotic) and nonviable cells (apoptotic and nonapoptotic) in peripheral blood of mice treated with polyphenol extract of green tea and CrO₃.

Treatment	Dose(mg/kg)	n	Nonapoptotic viable cells ^a (mean ± S.D.)	Apoptotic viable cells ^a (mean ± S.D.)	Apoptotic nonviable cells ^a (mean ± S.D.)	Nonapoptotic nonviable cells ^a (mean ± S.D.)
Control	0	5	197.2 ± 2.2	2.4 ± 1.8	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9
Polyphenol extracts of green tea	30	5	192.8 ± 4.9	6.0 ± 4.1	0.8 ± 1.3	0.4 ± 0.6
CrO ₃	20	5	189.2 ± 3.3 ^a	10.2 ± 3.6 ^a	0.2 ± 0.5	0.4 ± 0.6
Polyphenol extracts of green tea-CrO ₃	30-20	5	187.2 ± 6.3 ^b	12.8 ± 6.3 ^d	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

^aP < 0.05 versus control; ^bP < 0.01 versus control; ^cP < 0.04 versus control; ^dP < 0.007 versus control. ^eEvaluation in 200 cells.

tea polyphenol extract-CrO₃ group compared to the control group. The increase in apoptosis was greater in the combined green tea polyphenol extract-CrO₃ group than in the CrO₃ group (12.8 versus 10.2 cells, resp.). The green tea polyphenol extract only treatment group had an increase of approximately four apoptotic viable cells compared to the control group. The average numbers of apoptotic nonviable cells and nonapoptotic cells were unchanged in all of the treatment groups (Table 2).

4. Discussion

The antioxidant properties present in polyphenols make them potentially useful for counteracting the DNA damage induced by oxidative stress agents such as Cr (VI) compounds. In this study, we evaluated the capability of polyphenol extracts from green tea to inhibit the genotoxic damage induced by Cr (VI) *in vivo* and analyzed apoptosis in peripheral blood of CD-1 mice.

The genotoxicity of Cr (VI) was demonstrated by the observation of a significant increase in MN-PCEs at 24 and 48 h after treatment in the CrO₃-treated group (Table 1). This increase was clearly observed in all samples compared to the negative control, and this finding corroborates the previously reported genotoxicity of Cr (VI) and particularly CrO₃ [15, 30, 38]. The mechanism of genotoxicity for Cr (VI) compounds has been linked to the intracellular reduction of Cr (VI) to Cr (III). Cr (VI) compounds can cross cell membranes via nonspecific anion transporters and are reduced by their interaction with intracellular cytoplasmic molecules. During this process, FRs are generated, which are capable of inducing genotoxic alterations [15, 18, 19]. Hence, we suggest that these effects can lead to the formation of MN-PCEs.

However, the average number of MN-PCEs revealed an increase of less than 1 MN-PCEs at 24 h after treatment in the group treated with green tea polyphenol extracts (Table 1), and the calculated NIF value corroborates the nongenotoxic effect of these extracts (Figure 3). It has been reported that the administration of polyphenol or flavonoids from green tea does not induce genotoxicity; additionally, the administration of these compounds over a long period of time at high doses in experimental animals has no effect on genotoxicity [4, 39, 40].

The *in vivo* administration of green tea polyphenol extracts prior to CrO₃ injection decreased MN-PCEs formation by 12%, 69% and 100% at 24, 48, and 72 h after treatment, respectively, compared to MN-PCEs formation in the group treated with CrO₃ alone (Figure 3). This result demonstrates that green tea polyphenol extracts protected cells against Cr (VI)-induced genetic damage more effectively than the administration of green tea *ad libitum* [25]. Due to the phenolic structure of green tea polyphenol extracts (Figure 1), it is possible that these flavonoids may act as hydrogen donors to suppress the formation of lipid radicals and FRs, including the superoxide and hydroxyl radicals generated by the Fenton reaction. These flavonoids may also chelate metals via their ortho-hydroxy-phenolic groups [41, 42]. Therefore, therapeutic agents that enhance intra- and extracellular antioxidant levels and block the Cr (VI)-mediated generation of ROS and FRs may prevent or attenuate Cr (VI)-induced genotoxicity.

In our experiments, the average number of apoptotic viable cells was increased at 48 h after treatment (Table 2). This increase was observed in all treatment groups compared to the negative control, and this finding supports the previously reported observations following Cr (VI) treatment [43–45]. The alteration of intracellular oxidative states has a potential to trigger or sensitize a cell to undergo apoptosis; thus, the ROS generated from Cr (VI) during its reduction plays an important role in the apoptotic signaling pathway [45, 46]. The administration of green tea polyphenol extracts alone led to an increase in the average number of apoptotic viable cells (approximately 4), but this increase was not statistically significant. Other studies have shown that green tea polyphenols such as EGCG and ECG inhibit the growth of the human lung cancer (cell line PC-9) [47]. The study further demonstrated that growth inhibition was accompanied by cell cycle arrest at the G2/M phase [48], which could be related to the apoptotic

activity of these polyphenols. The induction of apoptosis by catechins has also been demonstrated in human lymphoid leukemia cells, human epidermoid carcinoma cells, human carcinoma keratinocytes, and human prostate carcinoma cells [3, 49, 50]; thus, apoptosis plays an essential role as a protective mechanism against carcinogenesis by eliminating genetically damaged cells.

When the green tea polyphenol extracts were administered prior to the injection of CrO₃, the average number of apoptotic viable cells was increased to a level that was higher than that observed following CrO₃ treatment alone, but these interactions have shown that the effects are not additive or antagonistic (Table 2). Gao et al. [51] observed that ascorbic acid could enhance the EGCG and theaflavin-3-30-digallate induced apoptosis in human lung adenocarcinoma SPC-A-1 cells and esophageal carcinoma Eca-109 cells. Other studies have shown that the apoptosis-inducing activity of EGCG in human lung adenocarcinoma (PC-9 cells) can be synergistically enhanced by combined treatment with chemopreventive agents (including sulindac, cisplatin, and tamoxifen) [3, 52, 53]. The enhanced induction of apoptosis following a combined treatment suggests that this process may contribute to eliminate the cells with damaged DNA induced by Cr (VI).

In summary, the current study demonstrates that administration of CrO₃ via i.p. injection of mice could induce DNA damage in peripheral blood and apoptosis, and these effects were time dependent. ROS and FRs formation may play an essential role in Cr (VI)-mediated DNA damage and apoptosis *in vivo*. Moreover, the polyphenol extracts derived from green tea are capable of reducing genotoxic damage induced by Cr (VI). The greatest degree of protection was observed at 24 h after injection of CrO₃. The magnitude of protection is given in the following order: 12% at 24 h, >69% at 48 h, and >100% at 72 h after injection. Based on these results, polyphenol extracts from green tea can effectively protect against genotoxic damage in mice treated with Cr (VI). The beneficial effects of green tea polyphenol extracts could result from the inhibition of ROS and FRs chain reactions generated by the oxidative stress caused by Cr (VI) and by the extract's apoptotic activity.

There is limited evidence demonstrating that the regular consumption of green tea may reduce genotoxic damage. Therefore, this study contributes *in vivo* evidence showing that green tea polyphenol extracts can protect against genotoxic damage induced by carcinogens related to oxidative stress, such as Cr (VI) compounds.

Abbreviations

AO:	Acridine orange
Cr (VI):	Hexavalent chromium
EB:	Ethidium bromide
EC:	Epicatechin
ECC:	Epicatechin-3-gallate
EGC:	Epigallocatechin
EGCG:	(-)-epigallocatechin-3-gallate
FDA:	Food and Drug Administration
FRs:	Free radicals

GC:	(+) gallicocatechin
I.p.:	Intraperitoneal
MNNG:	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MN-PCEs:	Micronucleated polychromatic erythrocytes
NCEs:	Normochromatic erythrocytes
NIF:	Net induction frequency
PCEs:	Polychromatic erythrocytes
ROS:	Reactive oxygen species.

Conflict of Interests

The authors of the paper declare that they have no direct financial relationship with the commercial identities mentioned in the present paper that might lead to a conflict of interests.

Acknowledgments

The authors wish to thank Alejandro Gordillo Martínez for his considerable help in the preparation of this paper and Lourdes Hernández Sánchez for her excellent technical assistance. Financial support was obtained from DGAPA-UNAM IN217712.

References

- [1] E. Cadenas and L. Packer, *Handbook of Antioxidants*, Dekker New York, NY, USA, 2 edition, 2002.
- [2] H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, and K. Kanazawa, "Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 3, pp. 571-581, 2003.
- [3] M. Roy, M. Siddiqi, and R. K. Bhattacharya, "Cancer chemoprevention: tea polyphenols induced cellular and molecular responses," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 2, pp. 109-116, 2001.
- [4] N. T. Zaveri, "Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications," *Life Sciences*, vol. 78, no. 18, pp. 2073-2080, 2006.
- [5] C. Braka, M. R. Ladomery, V. S. Chedea, A. Irimie, and I. Berindan-Neagoe, "The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins," *Food Chemistry*, vol. 141, pp. 3282-3289, 2013.
- [6] S. Ellinger, N. Müller, P. Stehle, and G. Ulrich-Merzenich, "Consumption of green tea or green tea products: is there an evidence for antioxidant effects from controlled interventional studies?" *Phytotherapy Research*, vol. 18, no. 11, pp. 903-915, 2011.
- [7] Y. Kuroda and Y. Hara, "Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols," *Mutation Research*, vol. 436, no. 1, pp. 69-97, 1999.
- [8] C. Cabrera, R. Artacho, and R. Giménez, "Beneficial effects of green tea—a review," *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 25, no. 2, pp. 79-99, 2006.
- [9] A. A. Khalaf, W. A. Moslihy, and M. I. Abdel-Hamed, "The protective effect of green tea extract on lead induced oxidative and DNA damage on rat brain," *Neurotoxicology*, vol. 33, no. 3, pp. 280-289, 2012.
- [10] M. Inagaki, T. Yamane, Y. Kitao et al., "Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage by green tea extract in rat," *Japanese Journal of Cancer Research*, vol. 86, no. 11, pp. 1106-1111, 1995.
- [11] M. Xu, A. C. Bailey, I. F. Hernandez, C. R. Tsoka, H. A. J. Schut, and R. H. Dashwood, "Protection by green tea, black tea, and indole-3-carbinol against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced DNA adducts and clonogenic aberrant crypts in the F344 rat," *Carcinogenesis*, vol. 17, no. 7, pp. 1429-1434, 1996.
- [12] IACR, *International Agency of Research on Cancer: Monograph on the Evaluation of Carcinogens Risk To Humans: Chromium, Nickel and Welding*, Lyon, France, 1990.
- [13] EPA (US Environmental Protection Agency), "Toxicological review of hexavalent chromium," CA518540-29-9, Washington, DC, USA, 2010.
- [14] J. Singh, D. L. Carlisle, D. E. Pritchard, and S. R. Patierno, "Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis (review)," *Oncology Reports*, vol. 5, no. 6, pp. 1307-1318, 1998.
- [15] T. J. O'Brien, S. Ceryak, and S. R. Patierno, "Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms," *Mutagen Research*, vol. 533, no. 1-2, pp. 3-36, 2003.
- [16] T.-C. Tsou, C.-I. Chen, T.-Y. Liu, and J.-I. Yang, "Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by chromium(III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers," *Carcinogenesis*, vol. 17, no. 1, pp. 103-108, 1996.
- [17] S. E. Maeng, H. W. Chung, I. J. Yu et al., "Changes of 8-OH-dG levels in DNA and its base excision repair activity in rat lungs after inhalation exposure to hexavalent chromium," *Mutation Research*, vol. 539, pp. 109-116, 2003.
- [18] X. Shi, Y. Mao, A. D. Knapton et al., "Reaction of Cr(VI) with ascorbate and hydrogen peroxide generates hydroxyl radicals and causes DNA damage: role of a Cr(IV)-mediated Fenton-like reaction," *Carcinogenesis*, vol. 15, no. 11, pp. 2475-2478, 1994.
- [19] X. Shi and N. S. Dalal, "The role of superoxide radical in chromium(VI)-generated hydroxyl radicals: the Cr(VI) Haber-Weiss cycle," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 292, no. 1, pp. 323-327, 1992.
- [20] A. K. Patilola, C. Barnes, D. Hackett, and P. B. Tchourwou, "Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 6, no. 2, pp. 643-653, 2009.
- [21] M. Ding and X. Shi, "Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 234-235, pp. 293-300, 2002.
- [22] E. White, "Life, death, and the pursuit of apoptosis," *Genes and Development*, vol. 10, no. 1, pp. 1-15, 1996.
- [23] A. K. Taraphdar, M. Roy, and R. K. Bhattacharya, "Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention," *Current Science*, vol. 80, no. 11, pp. 1387-1396, 2001.
- [24] M. Roy, S. Chakrabarty, D. Sinha, R. K. Bhattacharya, and M. Siddiqi, "Anticlastogenic, anti-genotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol," *Mutation Research*, vol. 523-524, pp. 33-41, 2003.
- [25] M. C. Garcia-Rodríguez, R. E. Viches-Larrea, T. Nicolás-Mendez, and M. A. Allamirano-Lozano, "El té verde en la quimioprevención in vivo del daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (cromo(VI)), " *Nutrición Hospitalaria*, vol. 27, no. 4, pp. 1188-1196, 2012.

- [26] D. Komes, D. Horčić, A. Belščak, G. K. Kovacević, and I. Vulić, "Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds," *Food Research International*, vol. 43, pp. 167–176, 2010.
- [27] T. Neckvapil, V. Kopriva, V. Boudiny, M. Hostovský, P. Dvorák, and L. Malá, "Decrease in the antioxidant capacity in beverages containing tea extracts during storage," *Scientific World Journal*, vol. 2012, Article ID 361698, 5 pages, 2012.
- [28] V. K. Ananingsih, A. Sharma, and W. Zhou, "Green tea catechins during food processing and storage: a review on stability and detection," *Food Research International*, vol. 50, pp. 469–479, 2013.
- [29] Y. Sakamoto, H. Mikuriya, K. Tiyama et al., "Cotrogenic effects of green tea extract catechins by dietary administration in rats," *Archives of Toxicology*, vol. 75, no. 10, pp. 596–596, 2001.
- [30] M. C. García-Rodríguez, V. López-Santiago, and M. Allamirano-Lozano, "Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood," *Mutation Research*, vol. 496, no. 1-2, pp. 145–151, 2001.
- [31] J. A. Heddle, M. Hite, and B. Kirkhart, "The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency gene-tox program," *Mutation Research*, vol. 123, no. 1, pp. 61–118, 1983.
- [32] M. Aida, Y. Hirukawa, N. Hachiya et al., "Protocol recommended by the CSGMT/EMS/MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test," *Mutagenesis*, vol. 10, no. 3, pp. 153–159, 1995.
- [33] A. J. McGahon, S. I. Martin, R. P. Bissonnette et al., "Chapter 9 the end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro," *Methods in Cell Biology*, vol. 46, pp. 153–185, 1995.
- [34] OECD, *Guideline for Testing of Chemicals. No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*, 1997.
- [35] FDA, "Food and Drug Administration: Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use," Silver Spring, Md, USA, 2000 <http://www.oecd.org/emv/ehs/testing/healtheffects.htm>.
- [36] M. Hayashi, T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni, and M. Ishidate Jr., "The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides," *Mutation Research*, vol. 245, no. 4, pp. 245–249, 1990.
- [37] L.-D. Adler, J. Bootman, I. Faver et al., "Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis," *Mutation Research*, vol. 417, no. 1, pp. 19–30, 1998.
- [38] M. C. García-Rodríguez and M. Allamirano-Lozano, "Study of effects chlorophyllin on genotoxic and teratogenic damage induced by chromium (VI)," *Environmental Molecular Mutagenesis*, vol. 47, no. 6, article 460, 2006.
- [39] R. A. Istrucker, J. Bausch, I. A. Edwards, and E. Wolf, "Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part I: genotoxicity," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 44, no. 5, pp. 626–635, 2006.
- [40] Y.-W. Hsu, C.-F. Tsai, W.-K. Chen, C.-F. Huang, and C.-C. Yen, "A subacute toxicity evaluation of green tea (*Camellia sinensis*) extract in mice," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 10, pp. 2624–2630, 2011.
- [41] S. A. Aherne and N. M. O'Brien, "Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 29, no. 6, pp. 507–514, 2000.
- [42] S. Cafflet, H. Yu, S. Lessard, G. Lamoureux, D. Ajdukovic, and M. Lacroix, "Fenton reaction applied for screening natural antioxidants," *Food Chemistry*, vol. 100, no. 2, pp. 542–552, 2007.
- [43] D. L. Carlisle, D. E. Pritchard, I. Singh, and S. R. Patierno, "Chromium (VI) induces p53-dependent apoptosis in diploid human lung and mouse dermal fibroblasts," *Molecular Carcinogenesis*, vol. 28, pp. 111–118, 2000.
- [44] D. Bagchi, M. Bagchi, and S. I. Stohs, "Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 222, no. 1-2, pp. 149–158, 2001.
- [45] Y. Hayashi, T. Kondo, Q.-L. Zhao et al., "Signal transduction of p53-independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 197, no. 2, pp. 96–106, 2004.
- [46] J. Ye, S. Wang, S. S. Leonard et al., "Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 49, pp. 34974–34980, 1999.
- [47] S. Okabe, M. Suganuma, M. Hayashi, E. Sueoka, A. Komori, and H. Fujiki, "Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, PC-9, by tea polyphenols," *Japanese Journal of Cancer Research*, vol. 88, no. 7, pp. 639–643, 1997.
- [48] H. Fujiki, M. Suganuma, S. Okabe et al., "Cancer inhibition by green tea," *Mutation Research*, vol. 402, no. 1-2, pp. 307–310, 1998.
- [49] H. Hibasami, Y. Achiwa, T. Fujikawa, and T. Komiya, "Induction of programmed cell death (Apoptosis) in human lymphoid leukemia cells by catechin compounds," *Anticancer Research*, vol. 16, no. 4 A, pp. 1943–1946, 1996.
- [50] N. Ahmad, D. K. Foyes, A.-L. Nieminen, R. Agarwal, and H. Mukhtar, "Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 89, no. 24, pp. 1881–1886, 1997.
- [51] Y. Gan, W. Li, B. Li, Y. C. Chen, and Y. Tu, "Enhancement of (-)-epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3'-3'-digallate induced apoptosis by ascorbic acid in human lung adenocarcinoma SPC-A-1 cells and esophageal carcinoma Eca-109 cells via MAPK pathways," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 438, pp. 370–374, 2013.
- [52] M. Suganuma, S. Okabe, Y. Kai, N. Sueoka, E. Sueoka, and H. Fujiki, "Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with (-)-epicatechin, salindac, or larnedifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9," *Cancer Research*, vol. 59, no. 1, pp. 44–47, 1999.
- [53] M. Singh, K. Bhat, R. Singh, and Y. Shukla, "Tea polyphenols enhance cisplatin chemosensitivity in cervical cancer cells via induction of apoptosis," *Life Sciences*, vol. 93, pp. 7–16, 2013.