

Original

## El té verde en la quimiopreención *in vivo* del daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (cromo [VI])

M. C. García-Rodríguez, R. E. Vilches-Larrea, T. Nicolás-Mendez y M. A. Altamirano-Lozano

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

### Resumen

**Introducción:** Debido a sus componentes antioxidantes, al consumo de infusiones de té verde se le ha asociado con efectos benéficos para la salud, ya que sus 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 (EOx). De ahí que, es posible que el té verde proteja del daño genotóxico inducido por estos compuestos.

**Objetivo:** Se evaluó el efecto de la administración por vía oral del té verde sobre el daño genotóxico inducido por Cr [VI], mediante la cuantificación de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos (EPC).

**Material y método:** Ratones de la cepa CD-1 fueron divididos en forma aleatoria en los siguientes grupos: (i) testigo, (ii) tratados con té verde, (iii) tratados con trióxido de cromo, (iv) tratados con té verde y trióxido de cromo. El té verde se administró por sonda intragástrica cada 12 horas durante dos días (4 dosis de 0,25 ml de infusiones de 1,6 g/7,5 ml) y ad libitum 5,6 ml/día durante 10 días de infusiones de 3,2 g/100 ml, mientras que, el trióxido de cromo se aplicó por vía intraperitoneal (20 mg/kg). Se obtuvieron muestras de sangre de la vena caudal, en las que se evaluó el número de MN en EPC a las 0, 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos.

**Resultados:** El grupo tratado con té verde no presentó cambios estadísticamente significativos en los promedios de MN. Por su parte, el grupo al que se le administró el trióxido de cromo mostró incrementos entre 4 y 8 MN, que resultaron estadísticamente significativos al compararlos con el grupo testigo, lo que corroboró el daño genotóxico. Cuando se combinaron los tratamientos del té verde y trióxido de cromo se observó una disminución en las frecuencias de MN del 31 y 62% a las 72 horas, del 20 y 35% a las 48 horas y del 18 y 31% a las 24 horas con los tratamientos intragástricos y ad libitum respectivamente, en comparación con el grupo tratado solo con el trióxido de cromo. Por lo que, el té verde redujo el daño genotóxico.

**Correspondencia:** María del Carmen García-Rodríguez.  
Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM.  
Lab. 2 planta alta UMIEZ, Campus II.  
A. P. 9020, C.P. 15000 D. F., México.  
E-mail: carmen.garcia@unam.mx

Recibido: 9-XII-2011.  
Aceptado: 2-III-2012.

### GREEN TEA AND ITS ROLE ON CHEMOPREVENTION *IN VIVO* OF GENOTOXIC DAMAGE INDUCED BY CARCINOGENIC METALS (CHROMIUM [VI])

#### Abstract

**Background:** Consumption of green tea, by its antioxidant properties, has been associated with beneficial health effects, because antioxidant may play a role in the risk and pathogenesis of several chronic diseases, especially cardiovascular disease and cancer. On the other hand, it has been reported that metal compounds such as chromium [VI] are carcinogenic and can induce genotoxic damage through the Oxidative Stress. Therefore, it is possible that green tea has a protective effect against the genotoxic damage induced by this compounds.

**Objective:** To evaluate the effect of oral administration of green tea over the genotoxic damage induced by Cr [VI] by quantification of micronucleus (MN) in polychromatic erythrocytes (EPC).

**Materials and methods:** We use mice of CD-1 strain that were randomly divided into the following groups: (i) control, (ii) treatment with green tea, (iii) treatment with chromium trioxide, (iv) treatment with green tea and chromium trioxide. The green tea was administered via intra-gastric tube every 12 hours over two days (4 doses of 0.25 ml infusions 1.6 g/7.5 ml) and ad libitum (5.6 ml/day for 10 days infusions of 3.2 g/100 ml), while chromium trioxide was administered via intraperitoneal (20 mg/kg). Blood samples were obtained from the caudal vein, the number of MN in EPC was assessed at 0, 24, 48 and 72 hours after the treatments.

**Results:** The group treated with green tea showed no significant statistical changes in the average of MN. On the other hand, the group that was dosed with the chromium trioxide showed an increase between 4 and 8 MN, which was statistically significant when compared with control group, which confirmed the genotoxic damage. When the green tea treatment was administered before the application of chromium trioxide, there was a decrease in MN frequencies of 31 and 62% at 72 hours, 20 and 35% at 48 hours and 18 and 31% at 24 hours with intragastric and ad libitum respectively, compared with the group treated only with chromium trioxide. Hence, green tea reduced the genotoxic damage induced by chromium trioxide, and the highest protection was presented at 72 hours.

**Conclusions:** Our findings support the protective effects of green tea against the damage of genetic mate-

xico inducido por el trióxido de cromo, y la mayor protección se presentó a las 72 horas.

**Conclusiones:** Nuestros hallazgos muestran un efecto protector del té verde contra el daño al material genético inducido por compuestos metálicos como los del Cr [VI], sugiriendo que sus componentes antioxidantes son los que tienen un efecto quimiopreventivo sobre el EOx generado por el Cr [VI] durante su reducción a Cr [III]. El hecho de que la mayor disminución de la frecuencia de MN se observe a las 72 horas y con el tratamiento ad libitum, sugiere que el efecto protector depende de la biodisponibilidad, farmacodinámica y farmacocinética del principio activo del té verde, por lo que la administración del té verde durante tiempos más prolongados antes de la exposición con compuestos de Cr [VI] podría tener un efecto preventivo más consistente.

(*Nutr Hosp.* 2012;27:1204-1212)

**DOI:10.3305/nh.2012.27.4.5672**

Palabras clave: *Té verde. Cromo [VI]. Micronúcleos. Antigenotóxico. Antioxidantes.*

## Introducción

Las propiedades antioxidantes que presentan algunas de las sustancias que componen los alimentos de la dieta humana, generan la posibilidad de su uso y aplicación para contrarrestar los daños ocasionados por agentes mutágenos y cancerígenos<sup>1-3</sup>. Al estrés oxidante (EOx), se le ha relacionado con el daño genotóxico, y en este sentido, se ha observado que algunas plantas o sus componentes que presentan potencial antioxidante, tienen efectos protectores de los daños inducidos sobre el material genético<sup>4</sup>. El EOx está relacionado con el envejecimiento, además de favorecer la presencia o las complicaciones de enfermedades como: aterosclerosis, diabetes mellitus, alzheimer, diversos tipos de cáncer, así como de procesos inflamatorios y de isquemia/reperfusión, entre otros; por lo que el EOx constituye uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes. El concepto de EOx es considerado como un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y radicales libres (RL) o por una disminución de los sistemas antioxidantes<sup>5,6</sup>. La generación de ERO's propician la formación de RL, los que al tener un electrón impar o solitario en sus órbitas externas son altamente reactivos y pueden interactuar con macromoléculas biológicas como el ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas; generando daño genotóxico de manera directa o indirectamente que puede conducir a carcinogénesis<sup>6,7</sup>. De ahí que el estudio de sustancias con propiedades antioxidantes surge como una opción para la prevención y como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con el EOx y con el daño genotóxico.

Se estima que las células humanas sufren diariamente alrededor de 10.000 reacciones o "golpes" ("hits") de los RL, y que los antioxidantes (endógenos

y exógenos) los pueden contrarrestar<sup>5,6</sup>. Particularmente, los polifenoles presentan un alto potencial antioxidante relacionado con la disminución de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer, además de propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, inmunomoduladoras, antibacterianas, antivirales, anti-fibróticas y neuroprotectoras. Los polifenoles se encuentran de manera natural en las frutas y los vegetales, así como en el vino tinto, la cerveza e infusiones del té verde<sup>8,9</sup>. Se ha encontrado que el té verde (*Camellia sinensis*) contiene por lo menos 12 derivados de polifenoles, entre ellos las catequinas y la miricetina (flavonoides), que son las que le confieren su principal potencial antioxidante. Dentro de las catequinas, las más estudiadas han sido la galatoepigalocatequina (EGCG), la epigalocatequina (EGC), la galatoepicatequina (ECG) y epicatequina (EC)<sup>10-13</sup>.

(*Nutr Hosp.* 2012;27:1204-1212)

**DOI:10.3305/nh.2012.27.4.5672**

Key words: *Green tea. Chromium [VI]. Micronucleus. Antigenotoxic. Antioxidants.*

En contraparte, los compuestos del cromo [VI] han sido ampliamente estudiados, debido a que forman parte de gran variedad de compuestos utilizados en la industria y de su asociación con la inducción de cáncer<sup>14,15</sup>. Si bien, el Cr [III] es un micronutriente esencial que juega un papel importante en el metabolismo de proteínas, azúcares y grasas<sup>16</sup>, el Cr [VI] puede generar ERO's y RL durante su reducción intracelular a Cr [III] e inducir daño genotóxico, incluso se ha planteado que la carcinogénesis del Cr [VI] puede ser iniciada y promovida por esta reducción intracelular. El Cr [VI] es capaz de entrar en la célula a través de los canales aniónicos, en donde agentes como el ascorbato, el glutatión, y la cisteína lo reducen a Cr [V], Cr [IV] y Cr [III]<sup>17,18</sup>. Las lesiones genéticas estructurales que originan la exposición a compuestos de Cr [VI] incluyen la formación de aductos, rompimientos de cadena sencilla y doble, uniones entre ADN y proteínas, oxidación de bases nitrogenadas, producción de sitios abásicos, así como cruzamientos inter e intracatenarios<sup>17,19</sup>. El

daño del material genético inducido por Cr [VI] también puede presentar efectos sobre la replicación y la transcripción del ADN, desregularizar los puntos de control en el ciclo celular, afectar los mecanismos de reparación del ADN, y generar disrupción en las redes génicas regulatorias relacionadas con la muerte celular e inducir cáncer, ya que, estos cambios genéticos/epigenéticos se relacionan con la progresión neoplásica<sup>18</sup>. De igual manera, en estudios citogenéticos se ha observado que la administración *in vivo* de compuestos de Cr [VI] pueden inducir daño genotóxico mediante el incremento de las aberraciones cromosómicas (AC) y micronúcleos (MN)<sup>19-21</sup>. Por lo que, la prevención o modulación del daño genético puede estar relacionado con la prevención de enfermedades crónico-degenerativas como algunos tipos de cáncer.

La capacidad antioxidante del té verde se ha demostrado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* con diferentes sistemas de prueba<sup>22,23</sup>, no obstante, ha sido escasamente estudiado su posible efecto protector *in vivo* del daño genotóxico inducido por sustancias cancerígenas que generan EROx mediante la formación de ERO's y RL. De ahí que, el presente trabajo fue diseñado para estudiar los efectos de la administración por vía oral (intragástrica y *ad libitum*) del té verde sobre el daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (Cr [VI]), mediante la evaluación de MN en Eritrocitos Policromáticos (EPC) de sangre periférica de ratones de la cepa CD-1 tratados con trióxido de cromo.

## Material y métodos

### Animales

Se emplearon siete grupos de ratones machos (cinco organismos por grupo) sexualmente maduros de la cepa CD-1 entre 45 y 60 días de edad con un peso de 28 a 35 g. Los ratones se obtuvieron del bioterio Harlan de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y fueron aclimatados durante dos semanas en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM. Se alimentaron con nutricubos (Purina), permitiéndoles libre acceso al agua y al alimento. Se mantuvieron bajo condiciones de temperatura y circulación de aire controladas, así como períodos de luz-oscuridad de 12-12 horas.

### Reactivos

Al menos que se indique, todos los reactivos empleados en el estudio fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Trióxido de cromo [CAS No. 1333-82-0]. Se empleó té verde orgánico de una marca comercial obtenido de las altas montañas de la provincia de Fujian en China (USDA organic Uncle Lee's Tea®).

## Tratamientos

El trióxido de cromo fue preparado en solución mediante su disolución en agua destilada estéril. Se administró inmediatamente después de su preparación en un volumen de alrededor de 0,25 ml. Los tratamientos de trióxido de cromo fueron aplicados por vía intraperitoneal, mientras que el té verde fue administrado por vía oral (sonda intragástrica y *ad libitum*). El grupo testigo fue tratado únicamente con el vehículo por la misma vía que los tratamientos de té verde y trióxido de cromo.

La dosis y vía de administración del trióxido de cromo se seleccionaron de acuerdo a estudios previos en los cuales se observó que la administración de trióxido de cromo por vía intraperitoneal induce daño genotóxico en el ratón<sup>19,21,24,25</sup>. El té verde se administró por vía oral, por ser la vía de consumo humano. Para la administración por sonda intragástrica se preparó una infusión durante tres minutos de una "bolsa" de 1,6 g de té verde en 7,5 ml de agua potable en ebullición, el extracto se obtuvo por presión y se administró cada 12 horas (dosis de 0,25 ml durante dos días). Para la administración *ad libitum* se preparó la infusión durante tres minutos del té verde (2 bolsas de té, 3,2 g) en 100 ml de agua potable, una vez transcurrido el tiempo se retiraron las "bolsas" del té, se dejó enfriar durante 10 minutos y se colocó en bebederos oscuros. Se calculó la cantidad consumida del té verde diariamente (el índice de consumo diario de té verde por ratón). Las infusiones del té verde se prepararon en fresco y se administraron inmediatamente durante los días de tratamiento.

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo se establecieron con base en los lineamientos de los programas de la GENOTOX y la FDA<sup>26-28</sup>. El efecto de la administración del té verde sobre el daño genotóxico inducido por el trióxido de cromo, se evaluó mediante el análisis de la cinética de MN en EPC durante 72 horas.<sup>29</sup> Grupos de cinco ratones fueron tratados de la siguiente forma: a) *Grupo testigo sonda intragástrica*, se le administró el vehículo (0,25 ml de agua potable) por vía oral (sonda intragástrica) cada 12 horas durante dos días, b) *Grupo testigo ad libitum*, se le permitió libre acceso al vehículo (agua potable), c) *Grupo té verde sonda intragástrica*, se trató por vía oral (sonda intragástrica) con 0,25 ml de té verde (infusión de 1,6 g/7,5 ml) cada 12 horas durante dos días, d) *Grupo té verde ad libitum*, se trató por vía oral (libre acceso) con una infusión de té verde (3,2 g/100 ml) durante 10 días, e) *Grupo trióxido de cromo*, se les aplicó 20 mg/kg de trióxido de cromo por vía intraperitoneal, f) *Grupo té verde sonda intragástrica-trióxido de cromo*, se les administraron cuatro dosis del té verde (0,25 ml de infusión 1,6 g/7,5 ml) por sonda intragástrica cada 12 horas durante dos días antes de la aplicación del trióxido de cromo (20 mg/kg) y g) *Grupo té verde ad libitum-trióxido de cromo*, al que se le permitió libre acceso a la infusión del té verde (3,2 g/100 ml) durante 10 días antes de la aplicación del trióxido de cromo (20 mg/kg).

## Preparación de laminillas

Se prepararon laminillas cubiertas de naranja de acridina (NA) con base en la técnica de Hayashi (1991)<sup>30</sup>. La NA se preparó en una solución con agua desionizada (1mg/ml), de la cual se tomaron 10 ml y se colocaron en portaobjetos precalentados (alrededor 70° C). Con ayuda de otro portaobjetos se extendió el colorante y se dejó secar a temperatura ambiente. Las laminillas se guardaron en la oscuridad hasta su uso.

## Toma de muestras

Una vez administrados los tratamientos, se les tomaron a los ratones muestras de 5 µl de sangre de la vena caudal cada 24 horas durante 72 horas. Las muestras se colocaron directamente en las laminillas previamente preparadas con NA. Inmediatamente se colocó un cubreobjetos (24 x 50 mm) y fueron selladas las orillas. Todas las preparaciones se guardaron en cajas de plástico en la oscuridad, a una temperatura de aproximadamente 4° C. El análisis de las preparaciones se realizó después de 12 h de haber sido preparadas, procurando no exceder de cinco días. Se hicieron dos laminillas por cada organismo<sup>30</sup>.

## Evaluación

Las evaluaciones se realizaron mediante la identificación de los eritrocitos normocromáticos (ENC), de los EPC y de los MN bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2). La tinción diferencial que se obtuvo con la NA, diferenció a los EPC de los ENC, ya que los EPC se tiñen de rojo fluorescente debido al ARN-ribosomal, y los MN se tiñen de color amarillo fluorescente por su contenido de ADN (fig. 1). Se analizaron 2.000 EPC por cada ratón, en los que se identificó la presencia o ausencia de MN para la evaluación del daño genotóxico<sup>31</sup>.

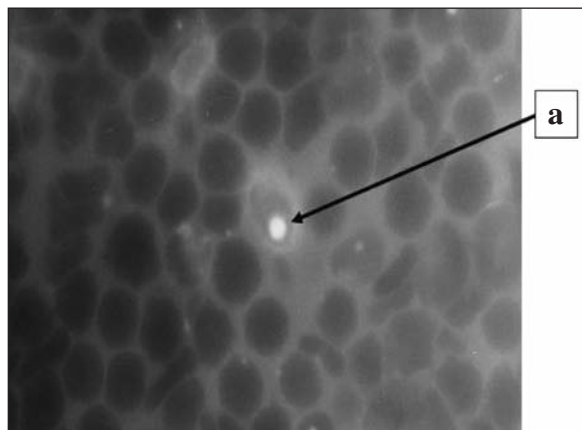


Fig. 1.—Frotis de sangre de ratón teñida con naranja de acridina, donde se muestra un EPC con un MN [a].

## Análisis estadístico

Los resultados de la inducción de MN se presentan como media  $\pm$  desviación estándar y se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey. La Frecuencia Neta de la Inducción de MN (por sus siglas en inglés NIF), se analizó con una Chi-cuadrada<sup>25,32</sup>. Se emplearon los programas SPSS/PC V18<sup>TM</sup> y Statistica/PC V 6.0<sup>TM</sup>, para hacer los análisis estadísticos. Para todos los casos se consideró el nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

## Resultados

Se emplearon dos grupos testigo ya que el té verde se administró por vía oral mediante sonda intragástrica y *ad libitum*. Como se muestra en la tabla I, no se observaron modificaciones significativas en los promedios de MN entre las dos vías de administración en los grupos testigo, al igual que en los grupos que fueron tratados solo con el té verde. Los consumos promedio del té verde por ratón cuando se administró *ad libitum* fueron de 5,6 ml/día y el tratamiento fue durante 10 días, por lo que la dosis total fue de 56 ml de la infusión 3,2 g/100 ml. Mientras que, para la administración intragástrica se emplearon cuatro dosis de 0,25 ml, por lo que la dosis total fue de 1 ml de la infusión de 1,6 g/7,5 ml. Sin embargo, la administración de 20 mg/kg de trióxido de cromo presentó incrementos de 6, 7 y 4 MN a las 24, 48 y 72 horas respectivamente, los cuales resultaron estadísticamente significativos al ser comparados con los grupos testigo (*ad libitum* y sonda intragástrica), con los grupos tratados solo con té verde y con su propia hora 0 (muestra obtenida antes de aplicar el tratamiento) (tabla I). Cuando se combinaron los tratamientos de té verde y trióxido de cromo, se observó una disminución en los MN en comparación con el grupo al que solo se le administró el trióxido de cromo, siendo mayor la disminución con el tratamiento *ad libitum* del té verde (alrededor de 2 MN en todas las horas evaluadas). Sin embargo, aunque se disminuyeron los promedios de MN en el grupo tratado con trióxido de cromo-té verde, al hacer la ANOVA estos resultan estadísticamente significativos a las 24 y 48 horas (grupo trióxido de cromo-té verde sonda intragástrica) y a las 24 horas (grupo trióxido de cromo-té verde *ad libitum*) (tabla I). Tomando en cuenta las desviaciones estándar observadas y dado que el promedio de MN a la hora 0 no fue el mismo para todos los grupos, se calculó el valor absoluto del NIF de MN, partiendo de la premisa de que la inducción de los MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo. Por lo que, se restó la frecuencia de MN observada a la hora 0 a las evaluadas en las siguientes horas<sup>25</sup>. En la fig. 2 se muestra el análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN calculado para 10.000 EPC, se puede observar que, en comparación con el grupo al que se le aplicó solo el tratamiento de trióxido de cromo, los grupos tratados con té verde y trióxido de



**Tabla I**  
Frecuencia de MN en EPC de los grupos tratados con té verde y trióxido de cromo

Tratamiento	Dosis	Hora	n	MN/1.000 células Media ± DE	ANOVA
Testigo (vía sonda)	0	0	5	1,8 ± 1,6	
		24	5	1,8 ± 0,8	
		48	5	1,8 ± 0,8	
		72	5	2,0 ± 1,0	
Testigo (libre acceso)	0	0	5	1,4 ± 1,1	
		24	5	1,4 ± 0,9	
		48	5	1,4 ± 0,5	
		72	5	1,0 ± 1,0	
Té verde (vía sonda)	1 ml*	0	5	1,0 ± 0,7	
		24	5	2,6 ± 2,1	
		48	5	2,2 ± 1,5	
		72	5	1,2 ± 0,8	
Té verde (libre acceso)	56 ml*	0	5	3,0 ± 0,7	
		24	5	1,0 ± 1,0	
		48	5	1,6 ± 2,5	
		72	5	2,6 ± 2,3	
Trióxido de cromo	20 mg/kg	0	5	1,3 ± 0,8	
		24	5	8,1 ± 2,8	a, b, g
		48	5	9,1 ± 2,3	a, c, h
		72	5	5,1 ± 1,5	a, d, i, m
Té verde-Trióxido de cromo (vía sonda- ip)	1 ml* -20 mg/kg	0	5	1,8 ± 2,4	
		24	5	7,0 ± 3,2	e, j
		48	5	7,6 ± 4,9	f, j, l
		72	5	3,8 ± 4,3	
Té verde-Trióxido de cromo (acceso libre- ip)	56 ml* -20 mg/kg	0	5	1,4 ± 1,1	
		24	5	6,2 ± 1,3	g, k, c
		48	5	5,8 ± 3,4	
		72	5	1,6 ± 0,5	

\*p < vs. CrO<sub>3</sub> hora 0; <sup>b</sup>p < vs. testigo ad libitum hora 24; <sup>c</sup>p < vs. testigo ad libitum hora 48; <sup>d</sup>p < vs. testigo ad libitum hora 72; <sup>e</sup>p < vs. testigo sonda hora 24; <sup>f</sup>p < vs. testigo sonda hora 48; <sup>g</sup>p < vs. té verde ad libitum hora 24; <sup>h</sup>p < vs. té verde ad libitum hora 48; <sup>i</sup>p < vs. té verde ad libitum hora 72; <sup>j</sup>p < vs. té verde-trióxido de cromo vía sonda hora 0; <sup>k</sup>p < vs. té verde-trióxido de cromo vía ad libitum hora 0; <sup>l</sup>p < vs. té verde sonda hora 48; <sup>m</sup>p < vs. té verde-trióxido de cromo ad libitum hora 72.

\*Dosis de 0,25 ml cada 12 horas durante dos días (Infusiones de 1,6 g/7,5 ml).

\*\*Consumo promedio diario de 5,6 ml durante 10 días (Infusiones de 3,2 g/100 ml).

cromo, tanto por sonda intragástrica como *ad libitum*, presentan disminuciones en las frecuencias de MN del 31 y 62% a las 72 horas, del 20 y 35% a las 48 horas y del 18 y 31% a las 24 horas respectivamente. Como se muestra en la fig. 2, las frecuencias de MN observadas en el grupo tratado solo con trióxido de cromo también resultan estadísticamente significativas al compararse con el grupo que fue tratado con trióxido de cromo y té verde *ad libitum* a las 72 horas.

#### Discusión de resultados

Aunque al consumo del té verde se le han atribuido efectos benéficos en la salud humana, las investigaciones científicas sobre esta bebida y sus componentes se han desarrollado principalmente durante las dos últimas décadas. Diversos estudios realizados *in vitro*, han

mostrado una fuerte evidencia de que los componentes antioxidantes del té verde (polifenoles) pueden desempeñar un papel importante en el riesgo y la patogénesis de varias enfermedades crónico-degenerativas, especialmente en las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Sin embargo, algunos resultados observados en los estudios epidemiológicos y clínicos son contradictorios, ya que si bien, en algunos se reporta que el consumo del té verde en humanos muestra varios efectos fisiológicos en la modulación de algunas enfermedades, en otros no se han presentado estos mismos efectos<sup>22</sup>. Esto debido a que el efecto del consumo de té verde en humanos puede estar afectado por otras variables como lo son; factores socioeconómicos y el estilo de vida, así como por la metodología empleada en la preparación del té y la forma de la ingesta<sup>22,33</sup>. De ahí que, se proponga realizar estudios *in vivo* empleando animales de experimentación en los que se puedan con-

trolar estos factores o variables. En el presente estudio se empleó un modelo *in vivo*, para estudiar la posible quimiopreención del té verde sobre el daño genotóxico inducido por metales cancerígenos, con la finalidad de contribuir en la generación de estrategias en el tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con el EOX dada la capacidad antioxidante que le confieren algunos de sus componentes al té verde y por otra parte, inferir el modo de acción de los agentes protectores del daño genotóxico (desmutagenesis y bioantimutagénesis), en este caso del té verde.

Se observó que la administración por vía oral (sonda intragástrica y *ad libitum*) del té verde es capaz de modular *in vivo* el daño genotóxico inducido por agentes identificados como cancerígenos inductores de EOX como los compuestos de Cr [VI]. El ensayo de MN ha sido propuesto como una herramienta útil para la medición de genotoxicidad *in vivo*. Los MN son cromosomas completos que se rezagan durante la anafase y no son incorporados al núcleo principal durante la división celular o fragmentos de cromosomas, por lo que los MN son indicativos de daño al ADN<sup>26,27</sup>. Al administrar *in vivo* el té verde tanto por sonda intragástrica como *ad libitum* no se observaron efectos significativos en los promedios de MN, de hecho, en el tratamiento *ad libitum* hay una disminución de alrededor de dos MN (hora 24 y 48) en comparación con la evaluación realizada antes de iniciar el tratamiento con té verde (hora 0), lo cual incluso podía ser indicativo de protección de la inducción de los MN basales que presentaban los organismos. En estudios previos en los que se administró a ratones y ratas, infusiones del té verde o algunos de sus componentes antioxidantes, tampoco se han reportado efectos genéticos, ni tóxicos aparentes, lo que concuerda con nuestras observaciones<sup>22,34-38</sup>. El aumento en los promedios de MN observado por la administración del tratamiento de trióxido de cromo de 7, 8 y 4 MN a las 24, 48 y 72 horas respectivamente es indicativo de daño genotóxico, ya que los lineamientos de la FDA y la OECD señalan que para que una sustancia o compuesto sea considerada como un agente genotóxico, este debe de inducir más de 4 MN/1.000 EPC evaluados<sup>29,39</sup>. El daño genotóxico observado en el presente trabajo por la administración del trióxido de cromo corrobora los resultados reportados previamente tanto por nuestro grupo de trabajo como por otros grupos, quienes también observaron daño genotóxico mediante el incremento en la frecuencia de AC e inducción de MN, así como de rompimientos de cadena sencilla y doble del ADN y de mutaciones puntuales<sup>21,25,40,41</sup>. La inducción del daño genotóxico del Cr [VI] se ha relacionado con los procesos bioquímicos involucrados en el ciclo redox y la generación de ERO's y RL, ya que se ha propuesto que el Cr [VI] al atravesar la membrana celular puede ser reducido intracelularmente y producir reactivos intermedios como el Cr [V], Cr [IV] y finalmente Cr [III]<sup>17</sup>. El mecanismo más importante de la activación del oxígeno por metales de transición, involucra a la reacción

de Fenton/Haber-Weiss, que genera el radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>), el cual es altamente reactivo y capaz de dañar al ADN. En el ciclo de Haber-Weiss, el Cr [VI] puede catalizar la formación de radicales OH<sup>·</sup> a partir del radical superóxido (O<sup>-2·</sup>), esto es, el radical (O<sup>-2·</sup>) puede reducir al Cr [VI] para generar Cr [V], el cual puede reaccionar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para producir el radical OH<sup>·</sup> y generar nuevamente Cr [VI]<sup>17,19</sup>.

Si bien, la vía por la que el Cr [VI] ejerce su principal actividad cancerígena en humanos, es mediante la inhalación, recientemente se ha propuesto considerar otras vías de administración con la finalidad de inferir directamente los posibles mecanismos en la quimiopreención del daño genotóxico<sup>4,42</sup>. En modelos animales *in vivo*, la vía de administración intraperitoneal es aceptada para estudiar las interrelaciones directas de los agentes inductores de daño mutágeno o cancerígeno en los órganos blanco<sup>28,43</sup>.

Al administrar el té verde por vía oral previamente a la aplicación del trióxido de cromo por vía intraperitoneal, se observó una disminución de las frecuencia de MN, lo que sugiere que el té verde presenta efectos protectores sobre el daño genotóxico inducido por el trióxido de cromo. El efecto del té verde sobre la inducción de MN también ha sido observado en ratones tratados durante 28 días por vía oral con infusiones (0,2% de té verde) en los que se redujo el número de MN que inducen mutágenos como el Benzo[a]pyreno<sup>35</sup>. De igual manera, se observó que la administración de extractos de té verde a ratas, suprimió eficazmente las AC inducidas por la aflatoxina B<sub>1</sub> en células de médula ósea<sup>44</sup>. En otros estudios, se encontró que la administración de infusiones al 2% de té verde a ratones y ratas, reduce los aductos en el ADN producidos por la administración de carcinógenos en células de pulmón e hígado<sup>45,46</sup>. La protección del daño genotóxico inducido por el trióxido de cromo puede ser debida al alto contenido de antioxidantes que presenta el té verde, los cuales a su vez pudieron inactivar a las ERO's y RL generados por la reducción de Cr [VI] a Cr [III]. El té verde contiene cantidades relativamente grandes de polifenoles, que son los que le confieren su principal potencial antioxidante. Se ha demostrado *in vitro* que los polifenoles son capaces de capturar RL como el 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), los radicales hidroxilo (OH<sup>·</sup>) y lípidos derivados de los RL, los cuales pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades como el cáncer<sup>47,48</sup>. Por lo que, el uso de antioxidantes como los componentes polifenólicos del té verde, pudiera ser una estrategia importante en la prevención y tratamiento de las enfermedades crónico-degenerativas asociadas con las ERO's y RL como algunos tipos de cáncer.

Debido a la escasa información que hay en relación al efecto del té verde sobre la posible modulación o quimiopreención del daño genotóxico producido por metales cancerígenos, se considera relevante estudiar estas interrelaciones para contribuir en el planteamiento de las vías de inducción de daño genotóxico de

los compuestos del Cr [VI], dado que los compuestos de Cr [VI] generan EOX mediado por la generación de ERO's y RL durante la reducción de Cr [VI] a Cr [III] y el té verde es rico en polifenoles con propiedades antioxidantes. Por otra parte, en estudios *in vitro* en los que se han empleado polifenoles del té verde se ha observado que estos pueden presentar un efecto inhibitorio sobre la activación del NF- $\kappa$ B, el cual se considera un factor de transcripción en la respuesta al EOX de varios genes, incluyendo ciertos oncogenes, como el *c-myc*<sup>48,49</sup>. Estas observaciones resultan interesantes, ya que en otros estudios se ha mostrado que los radicales OH- generados por los compuestos de Cr[VI] en las reacciones mediadas por RL desempeñan un papel importante en la activación del NF- $\kappa$ B<sup>49</sup>. Dado que este factor de transcripción se considera que desempeña un papel clave en el mecanismo de la carcinogénesis del Cr [VI], y dado que los polifenoles del té verde pueden inhibir la activación del NF- $\kappa$ B *in vitro* es posible que este sea uno de los mecanismos por los que el té verde presente su protección contra el daño genotóxico y de la carcinogénesis inducida por el Cr [VI].

Por otra parte, en el presente estudio se observó que la mayor protección del té verde sobre el daño genotóxico inducido por el trióxido de cromo se presenta a las 72 horas, esto puede relacionarse con la distribución, biotransformación y eliminación del trióxido de cromo y con el origen de los MN, ya que aunque se ha reportado que el mayor daño genotóxico de los compuestos de Cr [VI] se presenta alrededor de las 24 horas después de su administración, en algunos estudios se ha observado que puede persistir hasta las 72 horas<sup>14,19,21,50</sup>, y pudiera estar relacionado al origen de los MN; que pueden ser inducidos tempranamente (daño aneuploidógeno) o tardíamente (daño clastógeno). En nuestro laboratorio, hemos observado que el trióxido de cromo es capaz de inducir MN por ambos mecanismos (García-Rodríguez et al., en preparación)<sup>51</sup>. Por otra parte, el té verde presentó mayor efecto protector sobre el daño genotóxico inducido por el trióxido de cromo, con tratamiento *ad libitum* administrado durante 10 días previos a la aplicación del trióxido de cromo, ya que presentó disminución de la frecuencia de MN inducidos por el trióxido de cromo del 62% en comparación con el 31% del tratamiento intragástrico. Esto también puede tener una relación con la distribución, biotransformación y eliminación del té verde, ya que es posible que influyan en su disponibilidad, concentración y actividad antioxidante de los componentes del té verde<sup>33,43</sup>. En estudios previos, se observó que la administración de extractos del té verde (alrededor del 2%) como única fuente de líquidos durante 10 semanas, disminuía el 63% del índice de mutaciones en el hígado de ratones transgénicos de la cepa C57BL/6 después de la séptima semana<sup>52</sup>, por lo que se propone la posibilidad de una mayor efectividad de los tratamientos crónicos de los extractos de *Camellia sinensis*. De igual manera, la administración a ratas F344 de soluciones del 1,25% durante dos ó seis semanas presenta una mayor efecti-

vidad contra el daño causado por la administración de azoxymethane a partir de la quinta semana<sup>53</sup>.

El efecto citotóxico puede ser determinado por la reducción de la frecuencia de EPC, por lo que se ha sugerido evaluar la relación de EPC con respecto a los ENC<sup>54,55</sup>. En nuestro estudio no se observaron modificaciones en la relación entre los EPC con respecto a los ENC en ninguno de los tratamientos administrados a pesar de que los compuestos de Cr [VI] son altamente citotóxicos<sup>14,19</sup>. Sin embargo, es recomendable tomar con reserva la evaluación de la frecuencia de EPC para considerar la citotoxicidad, partiendo del hecho de que cuando se presenta toxicidad en la eritropoyesis pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascararse el efecto<sup>55</sup>.

## Conclusión

En este estudio se observó que la administración *in vivo* a ratones hembra de la cepa CD-1 de té verde (vía oral intragástrica y *ad libitum*) de concentraciones equivalentes a las consumidas en promedio por los humanos, no inducen daño genotóxico ni citotóxico. Mientras que, se corroboró el daño genotóxico de los compuestos de Cr [VI], mediante el incremento de la frecuencia de MN inducido por el tratamiento de 20 mg/kg de peso corporal de trióxido de cromo, de las 24 a las 72 horas después de su aplicación por vía intraperitoneal. Cuando se combinaron los tratamientos del té verde y el trióxido de cromo se observó protección del daño genotóxico limitada por el tiempo y que la administración del té verde *ad libitum* durante 10 días fue más efectiva, que al ser administrado solo por dos días por vía intragástrica. A partir de nuestras observaciones podemos sugerir que el consumo del té verde, que es una bebida popular y consumida en varios países, genera expectativas para su posible aplicación en la quimiopreención del daño genotóxico, lo cual podría conducir a una futura aplicación para prevenir procesos de carcinogénesis y mutagénesis. Por lo que, es necesario ampliar este tipo de estudios para obtener datos concluyentes sobre los posibles beneficios en la salud humana. Cabe señalar que muchos carcinógenos, como los compuestos de Cr [VI], ejercen sus efectos cancerígenos mediante la producción de ERO's y RL, por lo que el té verde y sus componentes antioxidantes podrían actuar como un agente terapéutico contra la carcinogénesis inducida por este tipo de agentes cancerígenos. De igual manera, se sugiere ampliar la información referente a la realización de evaluaciones *in vivo* de la absorción, distribución y metabolismo de té verde, así como de sus principales componentes con propiedades antioxidantes como los polifenoles.

## Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), mediante la DGAPA

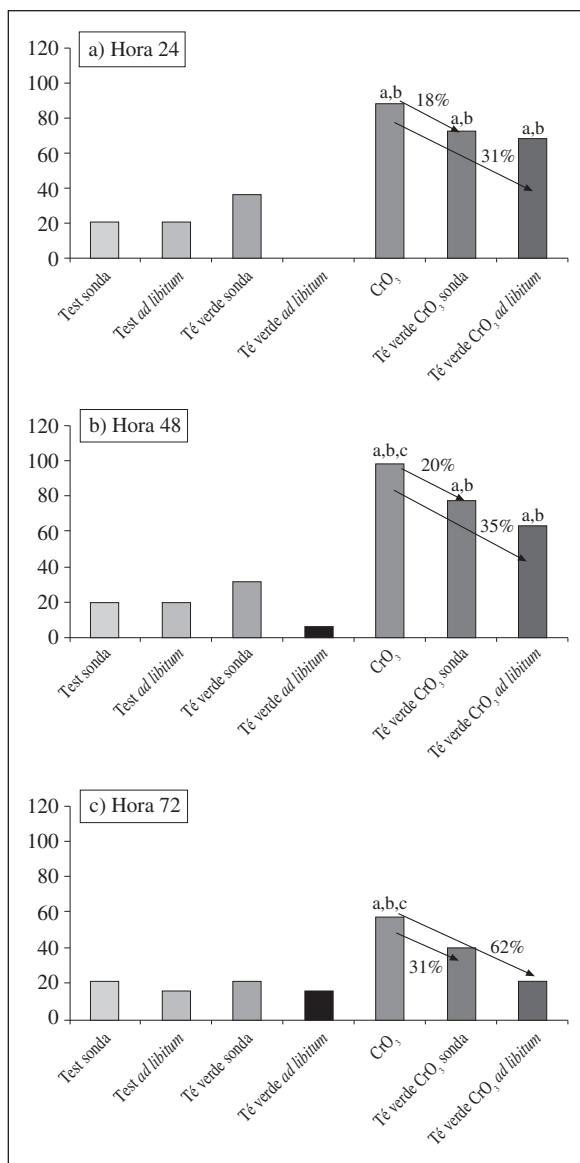


Fig. 2.—Efecto del té verde sobre la inducción de MN por el trióxido de cromo (CrO<sub>3</sub>) en sangre periférica de ratón. Representación del valor absoluto de los datos obtenidos de MN por 10.000 EPC al realizarles el cálculo del NIF; a)  $p < 0,05$  vs. Testigo sonda y ad libitum; b)  $p < 0,05$  vs. té verde sonda y ad libitum; c)  $p < 0,05$  té verde-trióxido de cromo ad libitum).

con el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), No. de Proyecto IN209309. También queremos expresar nuestro particular agradecimiento al M. en C. Alejandro Gordillo Martínez por su apoyo técnico.

## Referencias

- Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308.
- Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 1983; 224: 1256-1262.

- Cadenas E, Packer L. Handbook of antioxidants. Boca Ratón, 2a edición. 2002.
- Surh YJ, Ferguson LR. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential-highlights of a symposium. *Mutat Res* 2003; 523-524: 1-8.
- Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* 1992; 275: 257-266.
- Ames BN, Shigenaga, MK, Hagen, TM. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proc Nat Acad Sci* 1993; 90 (17): 7915-7922.
- Klaunig J, Kamendulis L. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 239-267.
- Piegiorgio P, Gardana C, Pietta A. Flavonoids in Herbs; En Flavonoids in Health and Disease (2a ed.) Marcel Dekker. USA. 2003. pp. 43-70.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 2002; 109; XVII: 271-278.
- Kondo K, Kurihara M, Fukuhara K. Mechanism of antioxidant effect of catechins. *Methods Enzymol* 2001; 335: 203-217.
- Nie G, Jin C, Cao Y, Shen S, Zhao B. Distinct effects of tea catechins on 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptosis in PC12 Cells. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 84-90.
- Sugisawa A, Kimura M, Fenech M, Umegaki K. Anti-genotoxic effects of tea catechins against reactive oxygen species in human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 2004; 559 (1-2): 97-103.
- Babich H, Zuckerbraun H, Weinerman S. In vitro cytotoxicity of (-)-catechin gallate, a minor polyphenol in green tea. *Toxicol Lett* 2007; 171: 171-180.
- EPA, Environmental Protection Agency. Toxicological review of hexavalent chromium: In Support of Summary Information on the Integrated Risk information System (IRIS). Office of Research and Development, Washington, DC.
- Hartwig A. Current aspects in metal genotoxicity. *Biomaterials* 1995; 8: 3-11.
- CDPC Chromium Draft for Public Comment U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry Comment Period Ends: February 18, 1992.
- Shi X, Dalal NS. The role of superoxide radical in Chromium (VI)-generated hydroxyl radical: The Cr (VI) Haber-Weiss cycle. *Arch Biochem Biophys* 1992; 292: 323-327.
- Zhitkovich A, Quievryn G, Messer J, Motylevich Z. Reductive activation with cysteine represent a chromium (III)-dependent pathway in the induction of genotoxicity by carcinogenic (VI). *Environ Health Perspect Suppl* 2002; 110:729-731.
- O'Brien CS, Patierni S. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res* 2003; 533: 3-36.
- McCarroll N, Keshava N, Chen J, Akerman G, Kligerman A, Rinde E. An evaluation of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study II: chromium (VI). *Environ Mol Mutagen* 2010; 51 (2): 89-111.
- García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res* 2001; 496: 145-151.
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea – A review. *J Am Coll Nutr* 2006; 25: 77-99.
- Qiong G, Baolu Z, Meifen L, Shengrong S, Wenjuan X. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 1996; 1304 (3): 210-222.
- Itoh S, Shimada H. Micronucleus induction by chromium and selenium, and suppression by metallo thionein inducer. *Mutat Res* 1996; 367: 233-236.
- García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. Estudio de la cinética de MN-PCE por CrO<sub>3</sub> en sangre periférica de ratón, usando la técnica de naranja de acridina. *Genet Mol Biol* 1998; 21: 146.
- Mavourmin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone



- marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1990; 239: 29-80.
27. Hayashi M, Tice R, MacGregor J, Anderson D, Blakey D, Kirsh-Volders M, Oleson F, Pacchierotti F, Romagna F, Shimada H, Sutou S, Vannier B. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 1994; 312: 293-304.
  28. FDA. Food and Drug Administration: Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. USA. 2000.
  29. Heddle AJ, Hite M, Kirkhart MK, Salamone FM. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, Ed. Elsevier Science Publisher 1983; 165-1110.
  30. Hayashi M. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS. *MMS. Mutat Res* 1991; 278: 83-98.
  31. Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler I, Blakey DH, Dertinge SD, Krishna G, Morita T, Russo A, Sutuo S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Env Mol Mutagen* 2000; 35: 234-252.
  32. Adler I-D, Bootman J, Favor J, Hook G, Schriever-Schwemmer G, Welzl G, Whorton E, Yoshimura I, Hayashi M. Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis. *Mutat Res* 1998; 417: 19-30.
  33. Rietvel A, Wiseman S. Antioxidant effects of tea: Evidence from human clinical trials. *J Nutr* 2003; 133: 3275-3284.
  34. Gupta S, Saha B, Kiri AK. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: A review. *Mutat Res* 2002; 512: 37-65.
  35. Sasaki YF, Yamada H, Shimoi K, Kator K, Kinae N. The clastogen-suppressing effects of green tea, Po-lei tea and Rooibos tea in CHO cells and mice. *Mutat Res* 1993; 286: 221-232.
  36. Abrahams SK, Singh SP, Kesavan PC. In vivo antigenotoxic effects of dietary agents and beverages coadministered with urethane: assessment of the role of glutathione S-transferase activity. *Mutat Res* 1998; 413: 103-110.
  37. Da Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Posa-Marroni N, González-Gallego J, Erdtmann B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxic* 2002; 40: 941-947.
  38. Naghma K, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Science* 2007; 81: 519-533.
  39. Topham J, Albanese R, Bootman J, Scott D, Tweats D. In vivo cytogenetic assays, En: UKEMS Sub-committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part I, Basic test Battery, Ed. B.J. Dean, United Kingdom Environmental Mutagen Society, Swansea, 1983, pp. 119-141.
  40. De Flora S, Bagnaso M, Serra D, Zanacchi P. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res* 1990; 238: 99-172.
  41. Sarkar D, Sharma A, Talukder G. Comparison of the effects of crude extract of spinach-beet leaves and equivalent amounts of chlorophyll and chlorophyllin in modifying the clastogenic activity of chromium (VI) oxide in mice. *Phytother Res* 1994; 9: 199-202.
  42. Nickens KP, Patierno SR, Ceryak S. Chromium genotoxicity: A double-edged sword. *Chemico-Biological Interactions* 2010; 188: 276-288.
  43. Scialli, AR. A Clinical guide to reproductive and developmental toxicology, CRC Press. Florida, USA. 1992, pp 29-54.
  44. Ito Y, Ohnishi S, Fujie K. Chromosome aberrations induced by aflatoxin B1 in rat bone marrow in vivo and their suppression by green tea. *Mutat Res* 1989; 222: 253-261.
  45. Xu Y, Ho C-T, Amin SG, Han C, Chung F-L. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lungtumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res* 1992; 52: 3875-3879.
  46. Hasegawa R, Chujo T, Sai-Kato K, Umemura T, Tanimura A, Kurokawa Y. Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane. *Food Chem Toxic* 1995; 33: 961-970.
  47. Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S, Xin W. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synapotosomes. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1304: 210-222.
  48. Shi X, Ye J, Leonard SS, Ding M, Vallyathan V, Castranova V, Rojasanakul Y, Dong Z. Antioxidant properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its inhibition of Cr(VI)-induced DNA damage and Cr(VI)- or TPA-stimulated NF-KappaB activation. *Mol Cell Biochem* 2000; 206: 125-132.
  49. Shi X, Ding M, Ye J, Wang S, Leonard SS, Zang L, Castranova V, Chiu A, Dalal NS, Liu K. Cr(VI) causes activation of nuclear transcription factor kB, DNA strand breaks and dG hydroxylation via free radical reactions. 2000; 75: 37-44.
  50. García-Rodríguez MC, Altamirano-Lozano M. Study of effects chlorophyllin on genotoxic and teratogenic damage induced by chromium (VI). *Environ Mol Mutagen* 2006; 47 (6): 460.
  51. García-Rodríguez MC, Morales-Ramírez P, Altamirano-Lozano M. Kinetics of induction of micronuclei by chromium trioxide in mice *in vivo*. *En preparación*.
  52. Jiang T, Glickman BW, de Boer JG. Protective effect of green tea against benzo[a]pyrene-induced mutations in the liver of Big Blue transgenic mice. *Mutat Res* 2001; 480/481: 147-151.
  53. Chen W, Sohn OS, Fiala ES, Weisburger JH. Effect of tea on the formation of DNA adducts by azoxymethane. *Xenobiotica* 1998; 28: 213-217.
  54. Vallarino-Kelly T, Morales-Ramírez P. Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast *in vivo*. *Mutat Res* 2001; 495: 51-59.
  55. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 2000; 455: 155-166.