



Original/Investigación animal

# Efecto *in vivo* del vino tinto sin diluir, diluido (75%) y sin alcohol sobre el daño genotóxico inducido por metales pesados con potencial cancerígeno: cromo [VI]

María del Carmen García Rodríguez, Rodrigo Aníbal Mateos Nava y Mario 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:** la carcinogénesis puede ser iniciada y promovida por el daño oxidativo al ADN. Los compuestos de cromo (Cr) [VI] generan estrés oxidativo (EOx) y son reconocidos como cancerígenos en humanos. En este sentido, se plantea que bebidas que presentan un alto potencial antioxidante, como el vino tinto, pudieran tener efectos protectores o moduladores del daño oxidativo al ADN.

**Objetivo:** estudiar los efectos de la administración *in vivo* de vino tinto sin diluir, diluido (75%) y sin alcohol, sobre el daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (Cr [VI]), mediante la evaluación de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos (EPC) de ratones (CD-1).

**Material y método:** se conformaron aleatoriamente los siguientes grupos: (i) testigo, (ii) vino tinto sin diluir, diluido o sin alcohol (libre acceso), (iii) CrO<sub>3</sub> (20 mg/kg por vía intraperitoneal) y (iv) vino tinto-CrO<sub>3</sub>. Las evaluaciones se realizaron en muestras de sangre obtenidas de la vena caudal, en las que se identificaron los MN en EPC antes, durante y después de los tratamientos.

**Resultados y discusión:** el vino tinto (diluido y sin alcohol) fue capaz de disminuir los promedios de MN inducidos por el CrO<sub>3</sub>, lo que muestra su capacidad para modular *in vivo* el daño oxidativo al ADN causado por cancerígenos inductores de EOx. La administración únicamente de vino tinto sin diluir presentó efectos tóxicos.

**Conclusiones:** nuestros resultados generan expectativas sobre el empleo de sustancias como el vino tinto en la protección o modulación del daño genotóxico, lo que podría conducir a su aplicación en los procesos de carcinogénesis y mutagénesis.

(Nutr Hosp. 2015;32:1645-1652)

DOI:10.3305/nh.2015.32.4.9520

Palabras clave: *Vino tinto. Alcohol. Cromo [VI]. Antigenotóxico. Prevención del cáncer.*

## IN VIVO EFFECT OF RED WINE UNDILUTED, DILUTED (75%) AND ALCOHOL-FREE ON THE GENOTOXIC DAMAGE INDUCED BY POTENTIAL CARCINOGENIC METALS: CHROMIUM [VI]

### Abstract

**Introduction:** the carcinogenesis may be initiated and promoted by the oxidative DNA damage. The compounds of chrome (Cr [VI]) cause oxidative stress (EOx) and are recognized as carcinogens in humans. In this sense, it is proposed that drinks with a high antioxidative potential, such as red wine, may have protective or modulatory effects on the oxidative DNA damage.

**Objective:** to study the effects of the administration *in vivo* of undiluted, diluted (75%) and alcohol-free red wine on the genotoxic damage induced by carcinogenic metals (Cr [VI]), by evaluating the micronucleus (MN) in polychromatic erythrocytes (EPC) in mice (CD-1).

**Material and method:** it was randomly organized the follow groups: (i) control, (ii) undiluted, diluted and alcohol-free red wine (free access), (iii) CrO<sub>3</sub> (20 mg/kg by intraperitoneal route) and (iv) CrO<sub>3</sub>-red wine. The evaluations were made in blood samples obtained from the caudal vein, in which it was identified the MN and EPC before, during and after treatments.

**Results and discussion:** the red wine (diluted and alcohol-free) was capable of decreasing the averages of MN induced by CrO<sub>3</sub>, demonstrating its modular capacity *in vivo* in the oxidative DNA damage caused by EOx-induced carcinogens. The administration of only undiluted red wine presented toxic effects.

**Conclusions:** our results raises expectations on the use of substances like the red wine for the protection or modulation of genotoxic damage, encouraging its application in the carcinogenic and mutagenic processes.

(Nutr Hosp. 2015;32:1645-1652)

DOI:10.3305/nh.2015.32.4.9520

Key words: *Red wine. Alcohol. Chrome [VI]. Antigenotoxic. Cancer prevention.*

**Correspondencia:** María del Carmen García-Rodríguez.  
Lab. 2 planta alta UMIEZ, Campus II,  
Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM,  
A.P. 9-020, C.P. 15000, D.F., México.  
E-mail: carmen.garcia@unam.mx

Recibido: 13-VII-2015.

Aceptado: 15-VIII-2015.

## Introducción

La exposición de las poblaciones humanas a los compuestos del cromo (Cr) [VI] representa un problema de salud, por lo que el Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH, por sus siglas en inglés) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) los consideran agentes carcinógenos<sup>1,2</sup>. Los compuestos de Cr [VI] se pueden encontrar en el aire, el suelo y el agua después de ser liberados por industrias que usan Cr, tales como las de galvanoplastia, metalurgia, curtido de cuero, producción de textiles, fabricación de pigmentos, preservación de madera y en la manufactura de productos a base de Cr. Los compuestos de Cr [VI] también pueden ser liberados al ambiente al quemar gas natural, petróleo o carbón. Si bien, el Cr [III] es un micronutriente esencial que juega un papel importante en el metabolismo de proteínas, azúcares y grasas, el Cr [VI] puede inducir daño genético<sup>3</sup>. Se ha propuesto como mecanismo de daño al estrés oxidante (EOx) generado durante la reducción intracelular del Cr [VI] a Cr [III]. Durante la reducción se forman Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) y Radicales Libres (RL), que pueden interactuar con el ADN<sup>4</sup>. El Cr [VI] reacciona con el peróxido de hidrógeno intracelularmente y se produce el tetraperoxo-Cr (V), que genera al radical hidroxilo (OH·) por una reacción de tipo Fenton. En presencia del peróxido de hidrógeno, el Cr [VI] induce rompimientos de una sola hebra al ADN. Se ha planteado que la carcinogénesis del Cr [VI] puede ser iniciada y promovida por el daño oxidativo al ADN<sup>5,6</sup>. Dentro de los compuestos de Cr [VI] que presentan mayor daño genotóxico, se encuentran las especies oxo tales como el trióxido de cromo (CrO<sub>3</sub>) y el ion CrO<sub>4</sub><sup>-2</sup> que son fuertemente oxidantes<sup>1,7</sup>.

El EOx, además de relacionarse con procesos carcinogénicos, también se asocia con el envejecimiento, el favorecimiento de la presencia o las complicaciones de enfermedades como: aterosclerosis, diabetes mellitus, alzheimer, así como de procesos inflamatorios y de isquemia/reperfusión, entre otros<sup>8</sup>. En este sentido, se plantea que bebidas que presentan un alto potencial antioxidante como el vino tinto, pudieran tener efectos protectores o moduladores del daño oxidativo al ADN.

Los polifenoles del vino tinto presentan un alto potencial antioxidante relacionado con la disminución de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer. Además de presentar propiedades anti-inflamatorias, anti-alérgicas, inmuno-moduladoras, anti-bacterianas, anti-virales, anti-fibróticas y neuro-protectoras<sup>9-11</sup>. Los vinos tintos pueden contener hasta 3000 mg/L de compuestos fenólicos (hidroxi-benzoicos y ácidos hidroxicinámicos, flavanoles, antocianinas, flavonoles, estilbenos y taninos)<sup>12</sup>, siendo las variedades *Cabernet Sauvignon* y *Pinot Noir*<sup>12,13</sup>, las que presentan una mayor concentración.

A pesar de que al vino tinto se le ha estudiado ampliamente, sus posibles efectos protectores o modu-

ladores del daño genotóxico inducido por sustancias cancerígenas que generan EOx han sido escasamente investigados *in vivo*. Por lo que, el presente trabajo fue diseñado para estudiar los efectos de la administración *in vivo* del vino tinto sin diluir, diluido (75%) y sin alcohol sobre el daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (Cr [VI]), mediante la evaluación de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos (EPC) de ratones de la cepa CD-1 tratados con CrO<sub>3</sub>.

## Material y método

### Reactivos

Los reactivos químicos se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). CrO<sub>3</sub> [CAS No. 1333-82-0], naranja de acridina (NA) [CAS No. 10127-02-3]. Los vinos tintos fueron de las marcas comerciales: XA Premium, Pedro Domecq®, variedad de la uva *Cabernet Sauvignon* cosecha 2003, y de Free Premium, Sutter®, variedad de la uva *Red Premium*, cosecha 2003.

### Animales

Se emplearon grupos de cinco ratones machos seleccionados al azar de la cepa CD-1, de entre 45 y 60 días de edad, con un peso entre 28 a 35 g. Fueron obtenidos de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA-Harlan®) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los organismos fueron aclimatados durante dos semanas en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza (FES-Z), UNAM. Se les permitió el libre acceso al alimento (NUTRI-CUBOS para roedores pequeños Purina®-México) y al agua. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (22 °C), circulación de aire y períodos de luz-oscuridad de 12-12 horas (7:00-19:00 h luz). El Comité de Bioética de la FES-Z, UNAM, aprobó los protocolos experimentales utilizados en este estudio.

### Diseño experimental

Se seleccionó a los compuestos de Cr [VI] por ser considerados cancerígenos en humanos<sup>2,3</sup>. En particular, se empleó al CrO<sub>3</sub>, ya que al ser administrado por vía intraperitoneal (i.p.) induce daño genotóxico en el ratón<sup>14</sup>. El CrO<sub>3</sub> 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 por vía i.p.

Se seleccionó la variedad *Cabernet Sauvignon* por ser una de las variedades de vino tinto más consistentes en cuanto a la cantidad de antioxidantes totales<sup>12</sup>.

También se seleccionó la variedad de uva *Red Premium* (< 0.5% de etanol) de la misma cosecha (marca comercial Free Premium, Sutter®). El vino tinto se administró en “fresco” por vía oral (libre acceso), por ser la vía común de “exposición” de los humanos, y fue la única fuente de líquidos a la que tuvieron acceso los ratones. Los grupos de vino tinto se clasificaron de la siguiente manera:

- a) Grupo VT; libre acceso al vino tinto sin diluir *Cabernet Sauvignon*.
- b) Grupo VT-dil; libre acceso al vino tinto *Cabernet Sauvignon* diluido al 75%.
- c) Grupo VT-sOH; libre acceso al vino tinto *Red Premium* (< 0.5% de alcohol).

Se calculó la cantidad consumida del vino tinto durante tres días (índice de consumo diario de vino tinto por ratón). Los grupos testigo fueron tratados únicamente con el vehículo.

Para estudiar el efecto del vino tinto sobre el daño genotóxico inducido por el Cr [VI] se empleó el protocolo descrito en la Fig. 1. Previamente, se establecieron los grupos y las “dosis” de vino tinto que no indujeran MN (de 3 a 17 días).

El efecto del vino tinto sobre el daño genotóxico inducido por el Cr [VI] se evaluó mediante la cuantificación de los MN durante 3 días después de la administración del CrO<sub>3</sub>. Los criterios de evaluación y

condiciones de trabajo se establecieron de acuerdo a los lineamientos de la OCDE (474), de la “Food and Drug Administration” (FDA), de la “Environmental Protection Agency” (EPA), del “Collaborative Study Group for the Micronucleus Test” (CSGMT) y del “Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Society of Japan” (JEMS.MMS) para ensayos de micronúcleos a corto plazo en sangre periférica de ratón<sup>15,16</sup>.

#### Preparación de laminillas cubiertas con NA

Las laminillas cubiertas de NA (LC/NA), se prepararon extendiendo 10 µl de una solución de NA (1mg/ml) en los portaobjetos precalentados (70° C), de acuerdo a la técnica propuesta por Hayashi (1990)<sup>17</sup>. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en la oscuridad hasta su uso.

#### Toma de muestras de sangre periférica

Las muestras de sangre (5µL) se tomaron de la vena caudal cada 24 horas de 3 a 17 días (dependiendo del protocolo). Las muestras se colocaron directamente en las LC/NA previamente preparadas. Inmediatamente

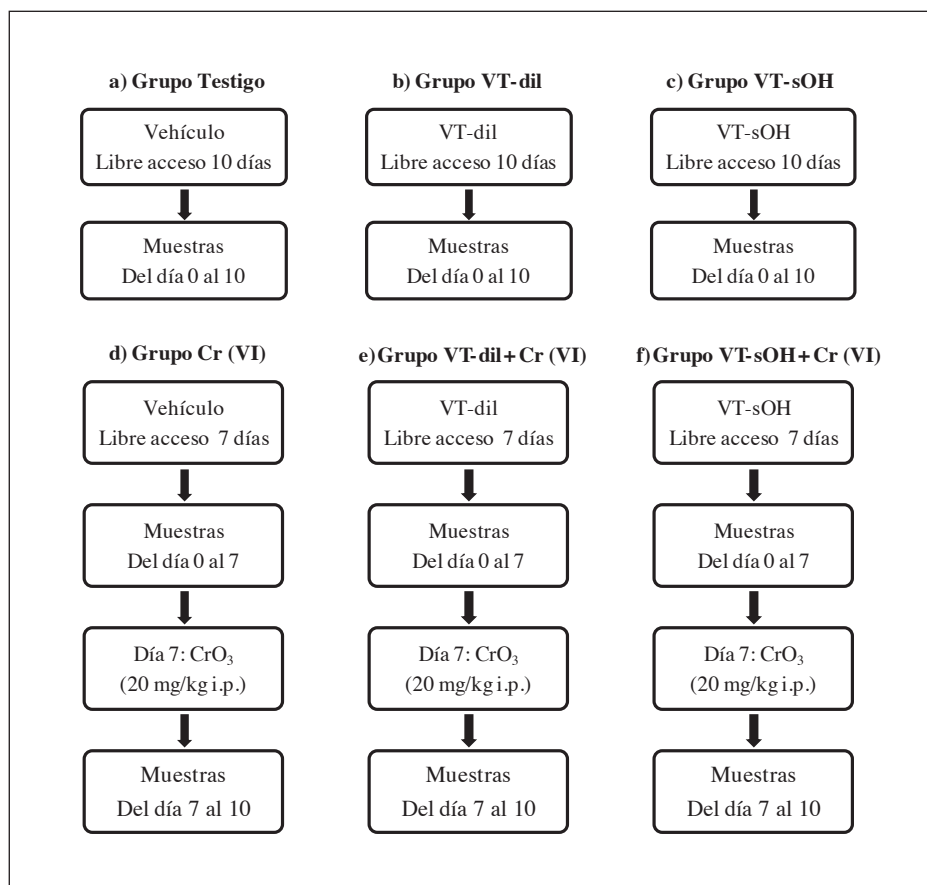


Fig. 1.—Protocolo para estudiar el efecto del vino tinto sobre el daño genotóxico inducido por el Cr [VI]. Al Grupo testigo, solo se le administró el vehículo. Al Grupo VT-dil, se les administró el vino tinto *Cabernet Sauvignon* diluido al 75% y al Grupo VT-sOH se les administró vino tinto *Red Premium* (< 0.5% de alcohol). Al Grupo CrO<sub>3</sub>, se les aplicó 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub> por vía i.p. y a los grupos Grupo VT-dil+CrO<sub>3</sub> y VT-sOH+CrO<sub>3</sub> se administró vino tinto *Cabernet Sauvignon* diluido al 75% y *Red Premium* (< 0.5% de alcohol) antes de la aplicación del CrO<sub>3</sub> (20 mg/kg). A los grupos de vino tinto se les permitió el libre acceso durante el tiempo que duró el estudio (10 días).

se colocó un cubreobjetos (24x50mm) y se sellaron las orillas con pegamento universal de goma. Las preparaciones se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de aproximadamente 4° C. El análisis de las preparaciones se realizó 12 h después de su preparación para permitir que se intercalara adecuadamente la NA.

### Evaluación de MN

Las evaluaciones se realizaron mediante la identificación de los eritrocitos normocromáticos (ENC), EPC y MN bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2) con excitación azul (480 nm) y un filtro de barrera (515-530 nm). La tinción diferencial que se obtuvo con la NA permitió diferenciar a los EPC de los ENC, ya que los EPC se tiñen de anaranjado fluorescente debido a la presencia aún de ARN-ribosomal, mientras que los MN se tiñen de color amarillo fluorescente por su contenido de ADN. Se analizaron 2 000 EPC por cada ratón, en los que se identificó la presencia o ausencia de MN.

### Análisis Estadístico

Los promedios de MN se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (D.E.) y se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey. Mientras que las frecuencias de MN se analizaron con una Chi-cuadrada. Se emplearon los programas SPSS/PC V18™ y Statistica/PC V 6.0™ para hacer los análisis estadísticos. Para todos los casos se consideró el nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## Resultados

En la tabla I se muestran los consumos promedio de vino tinto por ratón. Se observa que el consumo promedio de líquidos disminuyó significativamente (alrededor del 40%) en los grupos VT y VT-dil, al ser comparados con el consumo promedio de agua del grupo testigo. Por el contrario, el consumo del grupo VT-sOH se incrementó alrededor del 50%, al compararse con el consumo de agua del grupo testigo y con los consumos de los grupos VT y VT-dil.

En la tabla II, se muestra la cinética de los promedios de MN evaluados en el grupo al que se le permitió el libre acceso al vino tinto Cabernet Sauvignon sin diluir (Grupo VT). Se observa un ligero incremento (1 MN) al siguiente día de iniciado el tratamiento, que al compararlo con el grupo testigo y contra su propio día 0 (cuando aún no se iniciaba el tratamiento) resultó significativo. Sin embargo, en los grupos VT-dil y VT-sOH no se observan efectos significativos sobre los promedios de MN durante los 3 días después de iniciado el tratamiento (Tabla III).

**Tabla I**  
Consumo promedio diario por ratón (ml) de VT, VT-dil y VT-sOH

Testigo	VT	VT-dil	VT-sOH
Media $\pm$ DE <sup>a</sup>	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ D.E.	Media $\pm$ D.E.
8.5 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	5.1 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	12.7 $\pm$ 1.2 <sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>p < vs. testigo; <sup>b</sup>p < vs. VT; <sup>c</sup>p < vs. VT-dil.

<sup>^</sup>: Consumo de agua potable.

**Tabla II**  
Promedios de MN evaluados durante dos semanas de consumo de VT en sangre periférica de ratones

Tiempo (días)	N	Testigo Media $\pm$ D.E.	VT Media $\pm$ D.E.
0	5	0.9 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.6
1	5	1.0 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.7 <sup>a,b</sup>
2	5	0.6 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.7
3	5	0.8 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.8
7	5	0.8 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.7
8	5	0.8 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.5
9	5	0.6 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.5
10	5	0.8 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.4
14	5	0.9 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.7
15	5	0.7 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.5
16	5	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2
17	5	0.8 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.5

<sup>a</sup>p < vs. testigo; <sup>b</sup>p < vs. grupo VT día 0.

**Tabla III**  
Comparación de los promedios de MN evaluados en la sangre periférica de ratones que consumieron VT-dil y VT-sOH durante tres días

Tiempo (días)	N	Testigo Media $\pm$ DE	VT-dil Media $\pm$ D.E.	VT-sOH Media $\pm$ D.E.
0	5	0.9 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.4
1	5	1.0 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.6
2	5	0.9 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.4
3	5	1.3 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.6

Cuando se mantuvieron los tratamientos durante 10 días con VT-dil y VT-sOH (Tabla IV) tampoco se presentaron efectos significativos al compararse con el grupo testigo y con su propio testigo. Sin embargo, en el grupo que se le aplicaron 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub> en el día 7 se observaron incrementos de alrededor de 4 y 3 MN (48 y 72 horas respectivamente) después de la aplica-



**Tabla IV**

*Efecto de la administración de VT-dil y VT-sOH sobre los MN inducidos por el CrO<sub>3</sub> en sangre periférica de ratones*

Tiempo (días)	N	Testigo Media ± D.E.	VT-dil Media ± D.E.	VT-sOH Media ± D.E.	CrO <sub>3</sub> Media ± D.E.	VT-dil+CrO <sub>3</sub> Media ± D.E.	VT-sOH+CrO <sub>3</sub> Media ± D.E.
0	5	0.7 ± 0.4	0.9 ± 0.4	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.7	0.6 ± 0.4	1.1 ± 0.4
1	5	1.0 ± 0.3	1.2 ± 0.6	1.1 ± 0.5	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.4
2	5	1.1 ± 0.5	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.4	1.2 ± 0.3	1.0 ± 0.6
3	5	1.1 ± 0.6	1.3 ± 0.4	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.7	1.3 ± 1.0
7	5	1.2 ± 0.3	1.0 ± 0.5	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.6	0.8 ± 0.3	1.2 ± 0.3
↓ ↓ ↓ Administración de 20 mg/kg de CrO <sub>3</sub> ↓ ↓ ↓							
8	5	1.1 ± 0.5	1.4 ± 0.4	1.1 ± 0.7	1.6 ± 0.4	1.5 ± 0.4	1.8 ± 0.9
9	5	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.8	1.1 ± 0.2	4.5 ± 1.5 <sup>a,b,c,d</sup>	2.5 ± 0.9 <sup>e</sup>	3.0 ± 1.4 <sup>a,h</sup>
10	5	1.5 ± 0.4	1.7 ± 0.3	1.1 ± 0.5	3.4 ± 0.5 <sup>a,b,e,f</sup>	1.9 ± 0.7	1.9 ± 0.7

<sup>a</sup>p < vs. testigo; <sup>b</sup>p < vs. CrO<sub>3</sub> día 0; <sup>c</sup>p < vs. VT-dil+CrO<sub>3</sub> día 9; <sup>d</sup>p < vs. VT-sOH+CrO<sub>3</sub> día 9; <sup>e</sup>p < vs. VT-dil+CrO<sub>3</sub> día 8; <sup>f</sup>p < vs. VT-sOH+CrO<sub>3</sub> día 10; <sup>g</sup>p < vs. VT-dil+CrO<sub>3</sub> día 0; <sup>h</sup>p < vs. VT-sOH día 0.

ción del CrO<sub>3</sub>, estos incrementos resultaron significativos al ser comparados con el grupo testigo y contra su propio testigo. A los grupos que se les inició con los tratamientos de VT-dil y VT-sOH y que en el día 7 se les aplicaron 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub>, se les disminuyeron los promedios de MN (alrededor de 2) en comparación con el grupo al que solo se le administró el CrO<sub>3</sub>. La mayor disminución se presentó en el grupo VT-dil+CrO<sub>3</sub>. Sin embargo, aunque el vino tinto disminuye los promedios de MN inducidos por el por CrO<sub>3</sub>, al hacer el análisis estadístico aún resultan significativos al compararlos con el día 0 (Tabla IV).

Tomando en cuenta la variabilidad de los promedios de MN en el día 0 en todos los grupos, se calculó el valor absoluto de la Frecuencia Neta de la Inducción de MN (NIF-MN, por sus siglas en inglés), partiendo de la premisa de que la inducción de los MN en el día 0 de cada grupo es su propio testigo. De ahí que se restó la frecuencia de MN observada en el día 0 a las evaluadas en los siguientes días<sup>14</sup>:

NIF-MN = Número de MN evaluados en el tiempo Xi - Número de MN evaluados en el tiempo 0

Xi = evaluaciones después de la administración de los tratamientos.

Tiempo 0 = evaluación en el día 0 (antes de la administración de los tratamientos).

En la Fig. 2 se muestra el análisis por tiempo y por grupo del NIF-MN calculado para 10,000 EPC, se observa que en los grupos VT-dil+CrO<sub>3</sub> y VT-sOH+CrO<sub>3</sub>, si bien hay una disminución del 47 % en el día 9 (dos días después del tratamiento con CrO<sub>3</sub>) ésta disminución es parcial ya que aún resulta significativa al compararse con el grupo testigo. Sin embargo, las frecuencias que se observan en el día 10 (tres días después del tratamiento con el CrO<sub>3</sub>) aunque son del 48 y 68 % (grupos VT-dil+CrO<sub>3</sub> y VT-sOH+CrO<sub>3</sub> respectivamente) ya no resultan

significativas al compararlas con el grupo testigo. Los incrementos observados en el grupo CrO<sub>3</sub> resultan significativos al compararse tanto con el grupo testigo como con los VT-dil+CrO<sub>3</sub> y VT-sOH+CrO<sub>3</sub>. A diferencia del análisis estadístico con la ANOVA de los promedios de MN, con este análisis se observa un incremento en las frecuencias de MN en el grupo VT-dil+CrO<sub>3</sub> (día 8) que resulta significativo al compararse con el grupo testigo.

## Discusión

Si bien el consumo de alcohol ha sido ampliamente cuestionado por los profesionales de la salud, el consumo moderado de vino tinto ha mostrado efectos benéficos en la incidencia de algunas enfermedades, tales como el riesgo de enfermedad coronaria y la aterosclerosis<sup>9</sup>. Evidencias recientes han mostrado que el consumo a largo plazo de vino tinto también está correlacionado con la reducción en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas asociadas al EOx, tales como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, e incluso con la inducción de algunos tipos de cáncer<sup>9,10</sup>. Sin embargo, aunque existen varios estudios sobre las propiedades benéficas del consumo del vino tinto, hay pocos estudios *in vivo* empleando modelos experimentales, y en particular no se han estudiado sus posibles efectos protectores o moduladores del daño genotóxico inducido por sustancias cancerígenas que generan EOx mediante la formación de ERO's y RL. Aunado a esto, las dosis farmacológicas han generado dudas sobre la extrapolación clínica, debido a la limitación de los estudios clínicos por su naturaleza observacional. De ahí que, con la finalidad de contribuir en los avances en estos estudios, en el presente trabajo se emplearon ratones como modelo *in vivo* experimental para estudiar los efectos del vino tinto sobre el daño genotóxico inducido por metales cancerígenos.

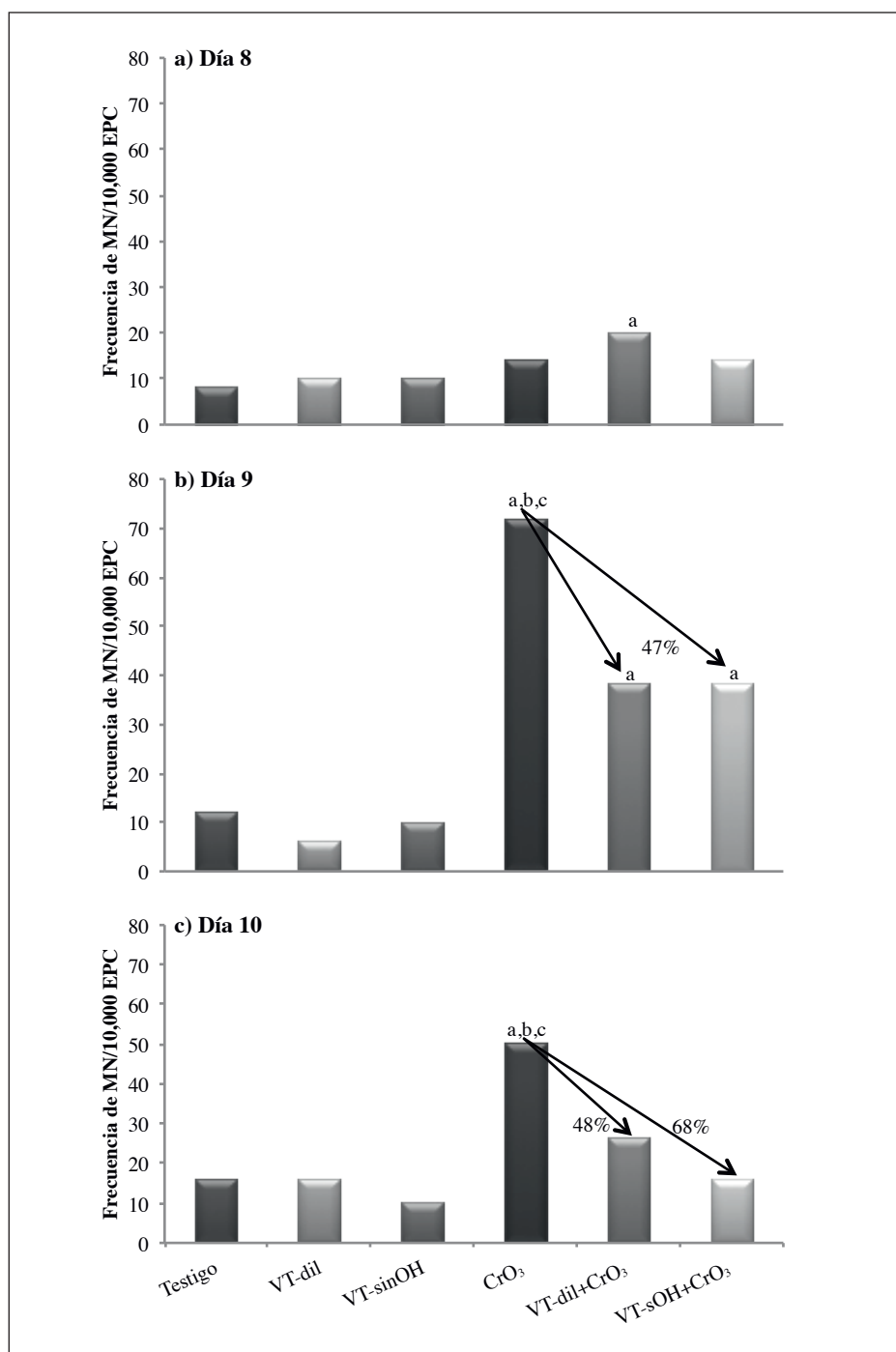


Fig. 2.—Frecuencias de MN en sangre periférica observadas cuando se combinaron los tratamientos de VT, VT-dil y VT-sOH con CrO<sub>3</sub>. Representación del cálculo del NIF-MN en los días 8, 9 y 10, que representan a los tres días después de la aplicación del CrO<sub>3</sub>; <sup>a</sup>p<vs. testigo; <sup>b</sup>p<vs. VT-dil+CrO<sub>3</sub>; <sup>c</sup>p< vs. VT-sOH+CrO<sub>3</sub>.

Al permitir a los ratones el libre acceso al vino tinto sin diluir (VT), se observó un incremento de 1 MN al día siguiente de iniciar el tratamiento. Sin embargo, este incremento no es indicativo de daño genotóxico, ya que los lineamientos de la FDA y la OECD consideran un agente genotóxico aquel que induce más de 3 MN/1000 EPC<sup>18,19</sup>. Roig *et al* (1999)<sup>20</sup> observaron en ratas, que el consumo prolongado (45 días a 6 meses) de vino tinto no inducía efectos tóxicos, sino por el contrario, era capaz de proteger del daño oxidativo.

Aunque se ha descrito que el etanol por sí solo inhibe la inducción de MN de agentes como el uretano<sup>21</sup>, la exposición a concentraciones tóxicas puede inducir daño al ADN<sup>22,23</sup>. Nosotros diluimos el vino tinto al 75% (VT-dil) y empleamos otro con menos del 0.05% de alcohol (VT-sOH). Al administrar estos vinos ya no se presentaron efectos significativos en los promedios de MN, lo que nos permite sugerir que los MN observados en el grupo tratado con VT concentrado fueron por efecto tóxico del alcohol.

Los promedios de MN por la aplicación del  $\text{CrO}_3$  presentaron un incremento mayor a tres, que es indicativo de daño genotóxico de acuerdo a los lineamientos de la FDA y la OECD<sup>18,19</sup>, además corrobora el daño genotóxico reportado mediante el incremento en la frecuencia de AC y MN, así como de rompimientos de cadena sencilla y doble del ADN y de mutaciones puntuales<sup>7,14,24</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 el Cr [VI] al atravesar la membrana celular por los canales aniónicos puede ser reducido intracelularmente<sup>5</sup>. El mecanismo más importante de la activación del oxígeno por metales de transición, involucra a la reacción de Fenton/Haber-Weiss, que genera  $\text{OH}\cdot$ , el cuál es altamente reactivo y capaz de dañar al ADN. En el ciclo de Haber-Weiss, el Cr [VI] puede catalizar la formación de radicales  $\text{OH}\cdot$  a partir del radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), esto es, el radical ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) puede reducir al Cr [VI] para generar Cr [V], el cual puede reaccionar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para producir el radical  $\text{OH}\cdot$  y generar nuevamente Cr [VI]<sup>5,7</sup>. Este mecanismo de daño al ADN puede estar relacionado con los MN observados con el tratamiento *in vivo* del  $\text{CrO}_3$ .

Al permitirle a los ratones el libre acceso al vino tinto (durante 7 días) antes de aplicarles 20 mg/kg de peso corporal de  $\text{CrO}_3$  por vía i.p., se disminuyeron los promedios de MN en ambos grupos VT-dil+ $\text{CrO}_3$  y VT-sOH+ $\text{CrO}_3$ , lo que indica que el vino tinto presenta efectos protectores o moduladores del daño genotóxico inducido por el  $\text{CrO}_3$ . El vino tinto 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  $\text{OH}\cdot$  y lípidos derivados de los RL, que desempeñan un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades como el cáncer<sup>25,26</sup>. Nosotros previamente observamos que la administración *in vivo* de té verde disminuye la inducción de MN inducidos por  $\text{CrO}_3$ . Si bien este resultado apoya los efectos protectores del té verde contra el daño genotóxico inducido por compuestos metálicos, los MN inducidos por  $\text{CrO}_3$  fueron sólo parcialmente bloqueados (aproximadamente 42%)<sup>27</sup>. En el presente estudio a diferencia del que realizamos con el té verde, observamos una mayor protección o modulación del daño genotóxico inducido por el  $\text{CrO}_3$ . Este hallazgo está relacionado con factores tales como la cantidad y tipo de polifenoles presentes en las plantas de té y en las uvas<sup>28,29</sup>. Para corroborar que la protección o modulación *in vivo* del daño genotóxico inducido por el  $\text{CrO}_3$  esta relacionada con los polifenoles, realizamos estudios en los que administramos extractos polifenólicos, (-)-epigallocatequina-3-galato, quercetina, y rutina, y observamos que son capaces de proteger del daño genotóxico inducido por compuestos de Cr [VI]<sup>30,31</sup>.

Estos hallazgos nos permiten sugerir que los compuestos polifenólicos del vino tinto podrían inactivar las ERO's y RL generados por la reducción de Cr [VI] a Cr [III].

En estudios *in vitro* se ha observado que los polifenoles presentan un efecto inhibidor del NF-kB, que es un factor de transcripción en la respuesta al EOX de varios genes, incluyendo oncogenes, como el *c-myc*<sup>26,32</sup>. Estas observaciones resultan interesantes, ya que se ha mostrado que los radicales  $\text{OH}\cdot$  generados por los compuestos de Cr [VI] en las reacciones mediadas por RL desempeñan un papel importante en la activación del NF-kB<sup>32</sup>. Por lo tanto, ya que este factor de transcripción desempeña un papel clave en el mecanismo de la carcinogénesis del Cr [VI], y dado que los polifenoles pueden inhibir la activación NF-kB *in vitro*, es posible que mediante este mecanismo el vino tinto presente su protección contra la carcinogénesis inducida por el Cr [VI].

La mayor protección del vino tinto se observó a las 72 horas después de la aplicación del  $\text{CrO}_3$ , esto puede relacionarse con la distribución, biotransformación y eliminación del vino tinto, que pudiera influir en la disponibilidad, concentración y actividad antioxidante de los componentes del vino tinto. Cabe señalar que en nuestro estudio no se observaron modificaciones en la relación entre los EPC con respecto a los ENC en ninguno de los tratamientos a pesar de que los compuestos de Cr [VI] son altamente citotóxicos<sup>3,7</sup>. Sin embargo, es recomendable tomar con reserva este parámetro para considerar citotoxicidad, ya que cuando se presenta muerte celular durante la eritropoyesis pueden activarse mecanismos de división celular y enmascarse el efecto<sup>33</sup>.

## Conclusiones

Se observó que la administración por vía oral (libre acceso) del vino tinto diluido al 75 % y sin alcohol (<0.05 %) es capaz de proteger o modular *in vivo* el daño genotóxico inducido por agentes identificados como cancerígenos inductores de EOX como los compuestos de Cr [VI], particularmente  $\text{CrO}_3$ . Que la administración como única fuente de líquidos de vino tinto sin diluir presenta un ligero incremento en la frecuencia de MN, relacionada con un efecto tóxico indirecto del contenido alcohólico del vino. Al comparar la protección de daño genotóxico inducido por el  $\text{CrO}_3$ , se observó que el tratamiento de vino tinto es más efectivo que el de té verde. La protección que mostró el vino tinto del daño genotóxico puede ser debida a que los compuestos polifenólicos pudieron inactivar a las ERO's y RL generados por la reducción de Cr [VI] a Cr [III]. Estos resultados generan grandes expectativas de la posible aplicación de sustancias con propiedades antioxidantes para prevenir procesos de carcinogénesis y mutagénesis.

## Agradecimientos

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

Los autores declaramos que no tenemos ninguna relación financiera directa con las identidades comerciales mencionadas en el presente trabajo que podría dar lugar a un conflicto de intereses.

## Referencias

1. 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.
2. IARC, International Agency for Research on Cancer. Chromium, Nickel and Welding: Summary of Data Reported and Evaluation. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, WHO 1997; 49: pp. 257.
3. EPA, Environmental Protection Agency. Toxicological review of hexavalent chromium: In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), 2010. Office of Research and Development, Washington, DC.
4. 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.
5. Shi XL, 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.
6. Lee JC, Son YO, Pratheeshkumar P, Shi X. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 2012; 53:742-757.
7. O'Brien CS, Patierni S. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res* 2003; 533:3-36.
8. Ames BN, Shigenaga, MK, Hagen, TM. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proc Nat Acad Sci* 1993; 90(17):7915-7922.
9. Artero A, Artero A, Tarín JJ, Cano A. The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas* 2015; 80:3-13.
10. Sancho M, Mach N. Efecto de los polifenoles del vino sobre la prevención del cáncer. *Nutr Hosp* 2015; 31(2):535-551.
11. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 2002; 109: XVII:271-278.
12. Van Leeuw R, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *J Food Comp Anal* 2014; 36(1-2):40-50.
13. Stockham K, Sheard A, Paimin R, Buddhadasa S, Duong S, Orbell JD, Murdoch T. Comparative studies on the antioxidant properties and polyphenolic content of wine from different growing regions and vintages, a pilot study to investigate chemical markers for climate change.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidat M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res* 1990; 245:245-249.
18. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavourmin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1983; 123:61-118.
19. Topham J, Albanese R, Bootman J, Scott D, Tweats D. *In vivo* cytogenetic assays, En: UKEMS Sub-committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part I, Basic test Battery, Ed. B.J. Dean, United Kingdom Environmental Mutagen Society, Swansea, 1983. pp. 119-141.
20. Roig R, Cascón E, Arola L, Bladé C, Salvadó MJ. Moderate red wine consumption protects the rat against oxidation *in vivo*. *Life Sci* 1999; 64(17):1517-1524.
21. Choy WN, Black W, Mandakas G, Mirro EJ, Black HE. A pharmacokinetic study of ethanol inhibition of micronuclei induction by urethane in mouse bone marrow erythrocytes. *Mutat Res* 1995; 341(4):255-263.
22. Brooks PJ. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity-a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21(6): 1073-1082.
23. Biagi M, Bertelli AA. Wine, alcohol and pills: What future for the French paradox?. *Life Sci* 2015; 131:19-22.
24. De Flora S, Bagnaso M, Serra D, Zancchi P. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res* 1990; 238:99-172.
25. 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.
26. Shi X, Ye J, Leonard SS, Ding M, VallyathanV, Castranova V, Rojasanakul Y, Dong Z. Antioxidant properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its inhibition of Cr(VI)-induced DNA damage and Cr(VI)- or TPA-stimulated NF-KappaB activation. *Mol Cell Biochem* 2000; 206: 125-132.
27. 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):1204-1212.
28. Jacob JK, Hakimuddin F, Paliyath G, Helen F. Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols in novel high-polyphenol grape lines. *Food Res Int* 2008; 41(4):419-428.
29. Komes D, Horžic D, Belščak A, Ganic KK, Vulic I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Res Int* 2010; 43:167-176.
30. García-Rodríguez MC, Carvente-Juárez M, Altamirano-Lozano MA. Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-Induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:1-9.
31. García-Rodríguez MC, Nicolás-Méndez T, Montañó-Rodríguez AR, Altamirano-Lozano MA. Antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), quercetin, and rutin on chromium trioxide-induced micronuclei in the polychromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *J Toxicol Environ Health A* 2014; 77(6):324-336.
32. 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-kappa B, DNA strand breaks and dG hydroxylation via free radical reactions. *J Inorg Biochem* 1999; 75:37-44.
33. Krishna G, Hayashi M. *In vivo* rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 2000; 455(1-2):155-166.