

EVALUACIÓN DEL EFECTO MODULADOR DE DAÑO CROMOSOMICO DE LA
VITAMINA C, EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

ROGER ADRIAN FIGUEROA PAZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA GENETICA Y CITOGENETICA
POPAYAN
2005

EVALUACIÓN DEL EFECTO MODULADOR DE DAÑO CROMOSOMICO DE LA
VITAMINA C, EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

ROGER ADRIAN FIGUEROA PAZ

Trabajo presentado como requisito parcial para optar el título de Biólogo

Director
SILVIO MARINO CARVAJAL VARONA
Magíster

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA GENETICA Y CITOGENETICA
POPAYAN
2005

Nota de aceptación:

DIRECTOR:

Mag. SILVIO MARINO CARVAJAL

JURADO:

Mag. PATRICIA EUGENIA VELEZ

JURADO:

Mag. EDNA LOURDES OROZCO

Lugar y fecha de sustentación: Popayán, 19 de octubre de 2005

DEDICATORIA

En primera instancia, dedico este trabajo a Dios, quien sabiamente me ha orientado y que, con su infinito amor, me ha brindado la paciencia, la tranquilidad y la comprensión para saber afrontar las diferentes etapas de mi vida.

Sin lugar a duda, a mi familia, mis padres Libardo y Nancy y mi hermana Mabel, quienes con su amor y apoyo incondicional hicieron posible llevar a buen termino este proceso.

Y finalmente, dedico este trabajo a quien estas líneas escribe pues, al finalizar este ciclo, he podido darme cuenta de que puedo lograr lo que me proponga.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a mi familia, por estar a mi lado, por respetar y apoyar mis decisiones y brindar a su hijo y hermano, más de lo que habría podido pedir en los momentos en que los necesite.

Al profesor Mg. Silvio Carvajal, por su paciente, diligente y profesional dirección en la elaboración del presente trabajo.

Al Grupo de Investigaciones en Toxicología Genética y Citogenética, por su apoyo económico, logístico y humano y a sus profesores por su profesional labor docente e investigativa.

A la Universidad del Cauca, por brindarme la oportunidad de instruirme profesionalmente y al Departamento de Biología, por su apoyo económico, logístico y humano que permitieron finalizar exitosamente este trabajo.

A Catarina Takahashi y Andrea Cechi por su inspirador trabajo y valiosa orientación e información.

A Sandra Quelal, por su cariño incondicional y valiosa compañía, a mis amigos y compañeros, Lorena Niño, Viviana Pizo, Néstor Molano, Mauricio González, Julián Narváez, Nancy Guerrero, Diana Muñoz, Claudia Sanjuán y Sandra Ordóñez quienes estuvieron junto a mí, afectiva y académicamente, compartiendo esta senda que hoy finalizo con satisfacción.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GENERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
3. MARCO TEORICO	16
3.1 MUTACIONES	16
3.2 LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO	16
3.3 CITOTOXICIDAD	16
3.3.1 Indice Mitótico (IM)	16
3.4 GENOTOXICIDAD	17
3.4.1 Prueba de Aberraciones Cromosómicas (AC)	17
3.5 REPARACION DEL ADN	19
3.6 RADICALES LIBRES (RL)	20
3.6.1 Radicales libres de oxígeno	21
3.6.1.1 Radicales primarios o inorgánicos	21
3.6.1.2 Radicales secundarios u orgánicos	22
3.7 ANTIOXIDANTE	23
3.8 VITAMINA C	24

4. METODOLOGÍA	26
4.1 MATERIALES Y METODOS	26
4.1.1 Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	26
4.1.2 Vitamina C	27
4.2 CULTIVO DE LINFOCITOS	28
4.3 CITOTOXICIDAD DE LA VC Y EL H ₂ O ₂	31
4.4 EFECTO MODULADOR DE DAÑOS (AC) DE LA VC	31
4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADISTICO	32
5. RESULTADOS Y DISCUSION	34
5.1 CITOTOXICIDAD	34
5.1.1 Citotoxicidad en VC	34
5.1.2 Citotoxicidad en H ₂ O ₂	36
5.2 EFECTO MODULADOR DE LA VC DE LOS DAÑOS INDUCIDOS EN EL ADN POR H ₂ O ₂	39
6. CONCLUSIONES	48
7. RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	56
ANEXO	57

LISTA DE ABREVIATURAS

VC: Vitamina C

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

AC: Aberraciones cromosómicas

IM: Índice mitótico

RL: Radicales libres

RLO: Radicales libres de oxígeno

chtb: (chromatid break) Ruptura cromatídica

chrb: (chromose break) Ruptura cromosómica

LISTA DE TABLAS

	pág
Tabla 1. Ficha técnica del Peróxido de hidrógeno	26
Tabla 2. Concentraciones del Peróxido de hidrógeno	27
Tabla 3. Concentraciones de vitamina C	27
Tabla 4. Índice mitótico obtenido de las concentraciones de VC	35
Tabla 5. Índice mitótico registrado para H ₂ O ₂	38
Tabla 6. Genotoxicidad previa registrada para H ₂ O ₂	39
Tabla 7. Registro de AC obtenidas en prueba con VC y H ₂ O ₂ , con sus respectivos controles en los cuatro bloques	40
Tabla 8. Prueba de comparaciones múltiples (Duncan) de los tratamientos con VC y/o H ₂ O ₂	41

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Tipos de aberraciones estructurales y su correspondencia con las etapas del ciclo celular	19
Figura 2. Mecanismo básico de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que causan daño genético	21
Figuras 3 y 4. Estructura química de la VC	24
Figura 5. Presentación comercial y diluciones de VC y H ₂ O ₂	28
Figura 6. Siembra de linfocitos humanos en cámara de flujo laminar	29
Figura 7. Portaobjetos teñidos con Giemsa	30
Figura 8. Protocolo para cultivo de linfocitos humanos aplicado a pruebas de IM y AC (Modificado por Figueroa Paz, 2005)	32
Figura 9. Análisis de asociación entre el IM y la concentración de VC	35
Figura 10. Proliferación celular en linfocitos tratados con 50-400 µg/mL de VC	36
Figura 11. Proliferación celular en linfocitos tratados con 0.625 – 50 µM de H ₂ O ₂	37
Figura 12. Proliferación celular en linfocitos tratados con 500 µM de H ₂ O ₂	37
Figura 13. Análisis de asociación entre el IM y la concentración de H ₂ O ₂	38
Figura 14. Aberraciones cromosómicas (AC) identificadas en cultivos <i>in vitro</i> de linfocitos humanos en los tratamientos con VC y H ₂ O ₂ .	42
Figura 15. Aberraciones cromosómicas (AC) identificadas en cultivos <i>in vitro</i> de linfocitos humanos en el tratamiento con H ₂ O ₂	43
Figura 16. Comparación de los efectos de los tratamientos con VC y/o H ₂ O ₂ sobre la frecuencia de AC inducidas, incluido el control negativo	44

RESUMEN

Los efectos citogenéticos de la exposición a agentes físicos y químicos peligrosos para la salud humana están bien documentados. Es necesario, por tanto, identificar problemas relacionados con la reparación de daños genéticos evaluando el papel antioxidante de la vitamina C (VC), en la reparación del ADN, afectado por la acción del oxidante Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), motivado por la polémica mundial generada por el uso de antioxidantes. La VC es un micronutriente que protege contra los radicales libres que atacan las células del organismo.

En el análisis se identifica el efecto citotóxico de diferentes concentraciones de VC y H_2O_2 , en cultivos *in vitro* de linfocitos de sangre periférica de una misma persona, mediante la prueba de índice mitótico (IM), con el fin de determinar las concentraciones requeridas para llevar a cabo la fase dos; en esta fase, mediante prueba de AC, se determinó el efecto modulador de la VC.

Se encontró que la VC, a concentraciones entre 50 y 400 $\mu\text{g/mL}$, no deprime drásticamente el IM, por lo tanto se seleccionaron concentraciones de 100, 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$ para investigar su efecto modulador de daños. A su vez, el H_2O_2 , a concentraciones entre 0,625 y 500 μM ., deprime linealmente el IM ($p < 0,05$). Por esta razón se seleccionó la concentración de 5 μM (más baja) para enfrentar a la VC en la prueba de efecto modulador (Fase dos).

El H_2O_2 , indujo un promedio de $6,6 \pm 1,3$ AC/100 células, significativamente mayor a $1,12 \pm 0,6$ AC/100 células, inducidas por el control negativo. No obstante, cuando las células se tratan simultáneamente con el peróxido y la VC a las concentraciones antes anotadas, se observan entre 2,2 y 1,6 AC/100 células. En consecuencia, se concluye que la VC modula el efecto dañino del peróxido, disminuyendo el número de AC.

Palabras claves. Vitamina C, Peróxido de Hidrógeno, Citotoxicidad, Efecto modulador, Genotoxicidad, Aberraciones Cromosómicas.

INTRODUCCIÓN

La importancia de este estudio implica tres aspectos estrechamente relacionados: el científico, el médico y el social. Al realizarse un estudio citogenético sobre la VC se esta aportando información adicional valiosa a la numerosas y contradictorias investigaciones sobre el rol protector de este compuesto frente al agresivo desgaste biológico producido por el estrés oxidativo (Guerra, 2001; Padayatty *et al*, 2000). Esto conlleva a que estudios relacionados con antioxidantes como la VC puedan contribuir al desarrollo de tratamientos complementarios, preventivos y curativos en procesos patológicos, derivados del daño oxidativo, como algunos tipos de cáncer y enfermedades degenerativas y circulatorias. Todo nuevo y pequeño aporte en la investigación de los antioxidantes contribuirá a su mejor conocimiento y utilización, llevando consigo una oportunidad de mejorar la calidad de vida de personas que padecen estas enfermedades y de prevenir el desarrollo de las mismas en la comunidad en general, de una manera factible y sencilla.

Los efectos citogenéticos de la exposición a gran cantidad de agentes físicos y químicos peligrosos para salud humana están bien documentados (Au, 1991), no obstante, suelen ser repetitivos. Los nuevos estudios deben dirigirse a solucionar problemas tales como la incidencia de los radicales libres en los procesos de mutagénesis. Por esta razón, el presente estudio propone la evaluación del efecto modulador de un antioxidante, la vitamina C (VC), sobre el daño oxidativo inducido en el ADN mediante peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en cultivo de linfocitos.

Dentro del amplio espectro de antioxidantes exógenos, la VC se ha destacado como uno de los más comprobados “capturadores” de radicales libres (Cozzy *et al*, 1997; Sies *et al*, 1992) que son los causantes de un considerable daño al ADN. Sin embargo, sus efectos terapéuticos a nivel genético no han sido del todo comprobados (Leung *et al*, 1993; Kaegi, 1998), para lo cual se hacen necesarios numerosos estudios. El que aquí se expone pretende dar un aporte en esta tarea. Este trabajo de grado permitirá la apertura de un nuevo campo de estudio en la Unidad de Toxicología Genética y Citogenética (UTGC), como es la identificación de compuestos moduladores de daño genético

El estudio se dividió en dos fases. En la primera fase se realizaron los ensayos de citotoxicidad en cultivos de linfocitos expuestos a VC y H_2O_2 , ensayos que aportaron las concentraciones experimentales optimas para realizar la fase II. En la segunda fase se analizó el efecto modulador de la VC sobre los daños inducidos en ADN por H_2O_2 . Las dos fases fueron realizadas sobre cultivos de linfocitos de sangre periférica de un mismo sujeto.

La selección del H₂O₂ como agente inductor de daños en el ADN obedece a la especificidad del tipo de daño causado, que es de carácter oxidativo, y a la posibilidad de evaluarlo mediante un biomarcador citogenético (Phillips *et al*, 1984).

La oportunidad de innovación en la aplicación de las pruebas toxicológicas dentro de la UTGC para evaluar otra gama de compuestos y su rol modulador frente a los daños genéticos, brinda una pauta para otro tipo de investigación, así como para la implementación de nuevos ensayos citogenéticos

A pesar de que se trata de un estudio con características novedosas a nivel de la UTGC, también debe decirse que fue un estudio preliminar y general que solo pretende aportar nueva información en el campo investigativo de los antioxidantes, con una muestra muy pequeña y abarcando únicamente la categoría de ensayos *in vitro*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Teniendo en cuenta que la exposición a peróxido de hidrógeno tiene efecto genotóxico, generando modificaciones oxidativas en el ADN, producto de la interacción de moléculas reactivas con las del material genético (Cardoso *et al*, 1990; Larramendy *et al*, 1987), y que la VC posee una gran habilidad para capturar estos radicales libres, posiblemente inhibiendo la acción de pro-mutágenos (Cechi *et al*, 1999), el estudio plantea responder las siguientes preguntas:

¿La vitamina C, tiene algún efecto tóxico para los linfocitos humanos en cultivo *in vitro*, dependiente de la concentración?

¿El tratamiento con Vitamina C de cultivos de linfocitos humanos, ejercerá acción antioxidante y protectora ante las lesiones inducidas por el peróxido de hidrógeno en el ADN?

En consecuencia, en esta investigación se sometieron a prueba las siguientes hipótesis:

Si la vitamina C tiene efecto citotóxico para los linfocitos humanos en cultivos *in vitro*, se espera que la proliferación celular identificada mediante la proporción de células en mitosis (IM), se reduzca respecto de un grupo control no tratado con VC; en caso contrario, este índice será igual e incluso mayor.

Si el tratamiento con Vitamina C ejerce acción antioxidante y protectora sobre el ADN, se espera una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de Aberraciones Cromosómicas (AC) inducidas por H₂O₂, en los cultivos tratados con diferentes concentraciones de VC, respecto de los no tratados (grupo control). De lo contrario, la diferencia encontrada no será estadísticamente significativa.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto citotóxico de la VC y del H₂O₂ y el efecto modulador de la VC de los daños inducidos por el H₂O₂ en el ADN, en linfocitos humanos con cultivos *in vitro*

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Υ Identificar el efecto tóxico de la Vitamina C para los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, mediante la prueba de IM.
- Υ Identificar el efecto tóxico del peróxido de hidrógeno para los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, mediante la prueba de IM.
- Υ Determinar si la VC tienen efecto modulador de los daños causados en el ADN por H₂O₂, en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos.

3. MARCO TEORICO

3.1 MUTACIONES

Una mutación –del latín *mutare* que significa cambiar- es una alteración en el material genético que incluye manifestaciones tales como cambios en la estructura y el número de cromosomas y cambios dentro de los genes. Un mutágeno es una sustancia que genera un defecto en el material genético que puede ser transmitido a las siguientes generaciones (IAEA, 1986).

3.2 LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

Los linfocitos humanos son un subgrupo de células sanguíneas que se encuentran circulando principalmente en la sangre. Normalmente estos linfocitos se encuentran en un estado G0 o de no división celular; sin embargo, los linfocitos pueden ser inducidos a entrar en el ciclo de división celular por medio de un estímulo inmunológico con el antígeno fitohemaglutinina (PHA). Esta condición ha convertido a los linfocitos en un sistema muy útil para el estudio del ciclo de división celular y del proceso de replicación del ADN permitiendo investigar el efecto que pueden ejercer ciertos tóxicos ambientales (radiaciones, drogas, plaguicidas, cigarrillo, etc.) sobre el material genético (genotoxicidad) y la regulación normal de división celular (citotoxicidad), además de su mecanismo de acción, ya sea *In vitro* o *In vivo* (Nowell, 1960).

Los tratamientos *In vitro* se ejecutan mediante la exposición de las células al químico de interés en condiciones de laboratorio controladas. Las posibles lesiones experimentalmente inducidas por el químico pueden ser determinadas por medio de biomarcadores genotóxicos de exposición y de efecto tales como el intercambio de cromátidas hermanas (ICHs), micronúcleos (MN) y aberraciones cromosómicas (AC) después de pasar por una fase de síntesis del ciclo celular (Hsu, 1952).

3.3 CITOTOXICIDAD

Es la capacidad de un agente químico, físico o biológico de afectar la morfología o fisiología celular, expresándose en alteraciones del ciclo de las células y, en casos extremos, en la muerte de las mismas.

3.3.1 Índice Mitótico (IM). El Índice mitótico es la técnica que permite evaluar una sustancia con efecto bloqueador premitótico, sobre todo en la fase S, una de las fases más sensibles del ciclo celular. Para detener las células en mitosis se

emplea un veneno del huso acromático, como el Colcemid, que inhibe el ensamble de estas fibras, lo que evita la distribución del material genético hacia las células hijas (Pratt *et al*, 1979).

El uso de la técnica permite establecer la citotoxicidad de la sustancia en estudio mediante comparación del grupo control y el grupo experimental (Rojas *et al*, 1993).

3.4 GENOTOXICIDAD

La genotoxicidad se define como la capacidad de un agente químico, físico o biológico para inducir efectos tóxicos, letales o heredables al material genético nuclear o extranuclear en células somáticas y germinales.

Las pruebas para evaluar genotoxicidad permiten detectar daños a nivel cromosómico, de un gen y del genoma entero. Las pruebas de genotoxicidad más frecuentemente empleadas se pueden clasificar como indirectas y directas. Las primeras consisten en determinar la cantidad del compuesto mutagénico o de sus metabolitos en diferentes muestras biológicas. Este tipo de pruebas aportan poca información de la forma como el compuesto y sus metabolitos reaccionan con el ADN en los diferente tejidos.

Las pruebas directas evalúan el mutágeno permitiendo obtener una estimación del daño genético, el cual puede ser evaluado a nivel citogenético y molecular. Uno de estos ensayos es la prueba de aberraciones cromosómicas (AC) de tipo numérico y estructural.

3.4.1 Prueba de Aberraciones Cromosómicas (AC). Las aberraciones cromosómicas son cambios irreversibles en el número y/o estructura de los cromosomas. Determina daños a nivel cromosómico originados en lesiones primarias en el ADN y por errores en la reparación y replicación; así permite monitorear las anomalías presentes en el genoma entero. Estos cambios son usados como biomarcadores e indicadores de exposición a agentes genotóxicos y carcinogénicos (Carvajal *et al*, 2002; Auletta *et al*, 1988).

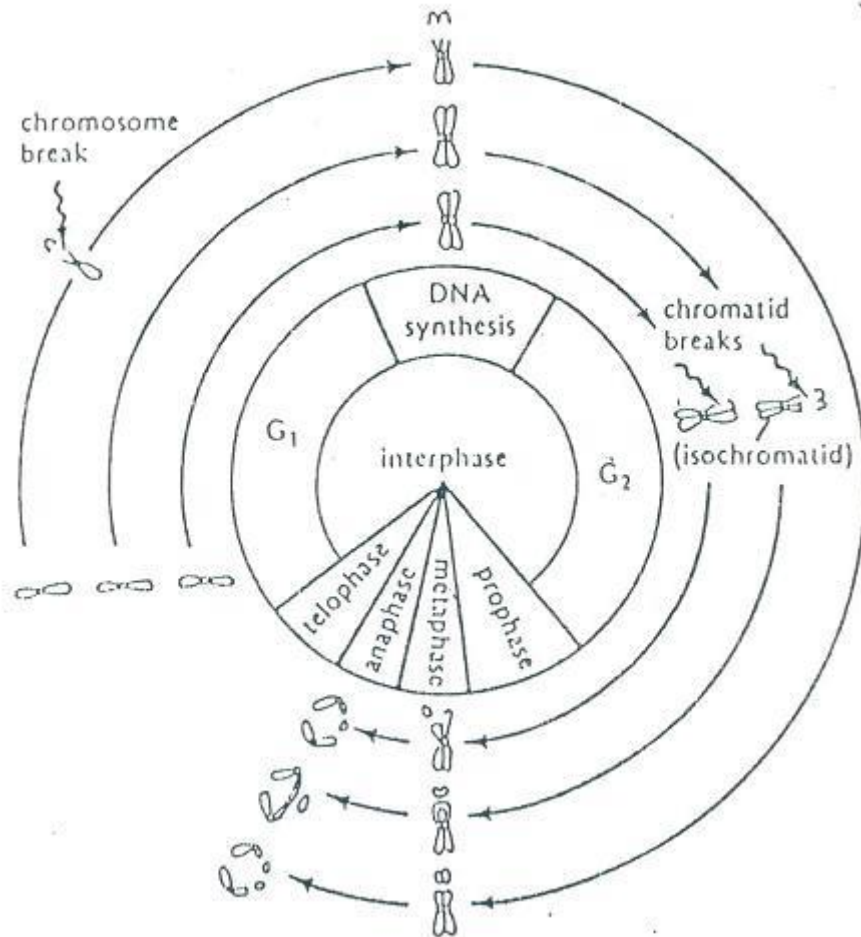
Las aberraciones de tipo numérico son originadas por la no disyunción de los cromosomas durante la división celular. A este tipo pertenecen las euploidías y aneuploidías (Evans, 1982).

Las aberraciones de tipo estructural se presentan por daños en la estructura cromosómica. Estas pueden ser de tipo cromosómico donde sus dos cromátidas sufren el daño o, cromatídico donde solo una cromátida está comprometida. La generación de este tipo de aberraciones puede depender del tipo de químico y del estadio del ciclo celular en la cual fue expuesta. Las aberraciones de tipo

cromosómico son provocadas cuando la célula es expuesta en las fases G_0 y G_1 y la de tipo cromatídico en la fase G_2 (Figura 1). Las aberraciones incluyen rupturas, traslocaciones, inserciones, duplicaciones, rearrreglos, etc (Evans, 1982).

Las consecuencias de mutaciones y aberraciones cromosómicas no dependen exclusivamente del tipo de cambios genéticos producidos, sino también del tipo de célula que es afectada y de las etapas de desarrollo del organismo. Un ejemplo de esto son las aberraciones cromosómicas en células que no se dividen dentro de un tejido diferenciado; son prácticamente inofensivas. Una situación diferente ocurre con las células en división del tejido embrionario donde pueden llegar a ser letales debido a la pérdida de material genético. Es importante anotar que el ADN es la única molécula con capacidad de autorreparación. La característica común de este proceso es la habilidad de remover y reemplazar el ADN dañado. Por lo tanto, si una lesión en el ADN inducida por un mutágeno puede ser reparada antes de la fijación y estabilización, el efecto neto puede ser nulo (IAEA, 1986).

Figura 1. Tipos de aberraciones estructurales y su correspondencia con las etapas del ciclo celular



IAEA, 1986

3.5 REPARACIÓN DEL ADN

El genoma está bajo una amenaza constante, los productos químicos tóxicos, la radiación ionizante e incluso los subproductos del metabolismo celular normal pueden desencadenar la degradación del ADN. Una ruptura no reparada trae consecuencias para la célula que pueden ser desastrosas, partiendo desde reordenamientos genéticos globales hasta fallas cromosómicas masivas. Sin embargo, la molécula de ADN es muy estable al momento de conservar la información que contiene.

Los seres humanos y otros organismos poseen varios sistemas de reparación que inspeccionan al ADN en busca de indicios de daños e inicia la reparación cuando

es necesario. La importancia de estos mecanismos de reparación de daños se refleja en el hecho de que aun la simple sustitución de una base en un gen puede modificar la función de la proteína correspondiente causando alteraciones que pueden ser letales (Espinosa-Lara *et al*, 1993).

Con frecuencia, un solo agente genotóxico genera más de un tipo de daño, por esto, muchas enzimas de reparación del ADN participan en varios mecanismos de reparación y otros eventos celulares. Algunos de estos genes y sistemas son frecuentemente expresados, pero hay otros que solo se expresan cuando se presenta el daño. Muchos de los mecanismos que son inducidos son poco conocidos, posiblemente por la existencia de múltiples rutas de señalización y ramificaciones que controlan varias respuestas (Yu *et al*, 1999)

3.6 RADICALES LIBRES (RL)

El cuerpo humano, al igual que todos los demás organismos y seres naturales, esta constituido por átomos que se agrupan en moléculas. Una molécula estable contiene átomos con electrones emparejados mientras que una molécula inestable -un radical libre- tiene un electrón no emparejado o, lo que es lo mismo, libre. Estas moléculas inestables recorren nuestro cuerpo intentando robar un electrón con vistas a recuperar su estabilidad electroquímica, lo que las hace muy peligrosas porque para conseguirlo atacan moléculas estables. Una vez que el radical libre ha conseguido robar el electrón que necesita para emparejar su electrón libre, la otra molécula se convierte a su vez en un radical libre, iniciándose así un ciclo destructivo para nuestras células.

Los radicales libres no son intrínsecamente malos. De hecho, nuestro propio cuerpo los fabrica en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus. Los radicales libres producidos por el cuerpo para llevar a cabo determinadas funciones son neutralizados fácilmente por nuestro propio sistema. Con este fin, nuestro cuerpo produce unas enzimas (como la catalasa o la dismutasa) que son las encargadas de neutralizarlos. Estas enzimas tienen la capacidad de desarmar los radicales libres sin desestabilizar su propio estado.

El problema para nuestras células se produce cuando se da un exceso sostenido (durante años) de radicales libres en nuestro sistema conocido como estrés oxidativo. El exceso tiende a ser producido mayormente por contaminantes externos que penetran en nuestro cuerpo. La contaminación atmosférica, el humo del tabaco, los herbicidas, pesticidas o ciertas grasas son algunos ejemplos de elementos que generan radicales libres que ingerimos o inhalamos.

En su labor de captación de electrones, los radicales libres dañan las membranas de las células y a sus macromoléculas constitutivas alterando su estructura y

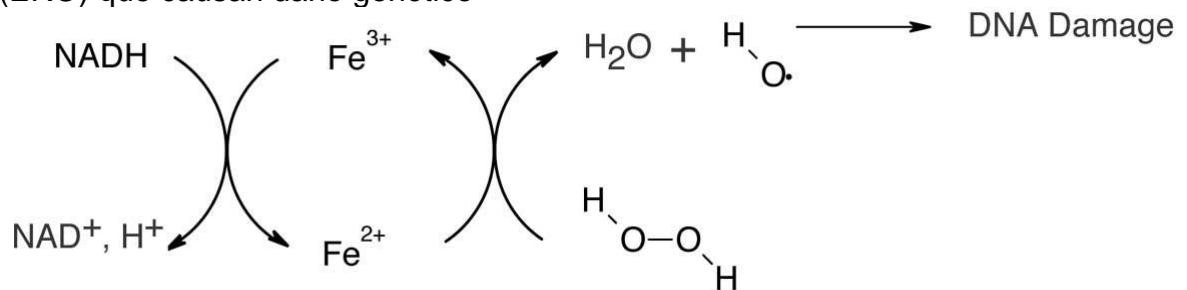
función, llegando incluso a destruir y mutar la información genética, facilitando así el camino para que se desarrollen diversos tipos de enfermedades (Serrano del Castillo *et al*, 1991).

3.6.1 Radicales libres de oxígeno. Dentro del estrés oxidativo juegan un papel destacado las especies reactivas de oxígeno (ERO) o radicales libres de oxígeno (RLO). Estas especies químicas presentan una alta reactividad que son capaces de reaccionar con una amplia gama de estructuras celulares (Zorrilla *et al*, 1999). Entre estos radicales encontramos:

3.6.1.1 Radicales primarios o inorgánicos: a) el oxígeno molecular O_2 ; el radical-anión superóxido (O_2^-), variedad producto de la captura de un electrón por el oxígeno molecular; c) peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($HO\cdot$); este último es uno de los más reactivos y, por tanto, uno de los más lesivos. El peróxido de hidrógeno es su precursor inmediato generándolo por reducción simple. La fuente de electrones para originar el radical hidroxilo puede ser el NADH. Sin embargo, el NADH es un portador de dos electrones y la adición directa de ambos electrones al H_2O_2 produciría dos inofensivas moléculas de agua. En cambio, si el NADH reduce primero el Fe^{3+} a Fe^{2+} , se genera entonces un portador de un solo electrón. El Fe^{2+} puede entonces reducir al H_2O_2 para producir el radical hidroxilo (Horvath *et al*, 2005) (Figura 2).

Además, el peróxido de hidrógeno es el mayor intermediario del estrés oxidativo y un potente mutágeno. Grandes cantidades de H_2O_2 pueden ser producidas endógenamente por medio de la cadena respiratoria y otras vías metabólicas en las células blanco y exógenamente por actividad inflamatoria en las células. Aunque el H_2O_2 es un oxidante débil, puede ser convertido, en presencia de metales de transición como iones de hierro y cobre, a radicales hidroxilo altamente reactivos que pueden llegar a facilitar su actividad genotóxica (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Figura 2. Mecanismo básico de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que causan daño genético



Horvath/Blair. University of Utah

3.6.1.2 Radicales secundarios u orgánicos: a) radical peroxilo (ROO⁻): Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos como lípidos o por pérdida de un hidrógeno del ROOH; b) hidroperóxidos orgánicos (ROOH); c) peroxidación de lípidos: Los RL inician y causan peroxidación de los lípidos (triglicéridos, fosfolípidos, lipoproteínas), particularmente aquellos que componen las membranas celulares, siendo los insaturados los más susceptibles (Pryor, 1994).

Los RLO se producen espontáneamente en la mayoría de procesos redox celulares tales como la cadena de transporte mitocondrial y las oxidaciones microsomales, en el proceso de fagocitosis en la defensa frente a microorganismos y en el metabolismo en general. También es necesario considerar que las alteraciones producidas por los RLO dependen de factores como: a) tipo celular; b) tipo y toxicidad de los RLO o de la sustancia generadora de los mismos, y c) naturaleza y resistencia de la proteína sustrato a ser oxidada y degradada.

Este daño oxidativo sobre las macromoléculas acarrea diversas alteraciones. Si se dañan las proteínas se producen alteraciones de las permeabilidades iónicas de membranas y de la transducción de señales intercelulares e intracelulares. La afectación de los lípidos, mediante la peroxidación lipídica altera los fosfolípidos, produciendo alteraciones a nivel de la homeostasis y la estructura celular con la consecuente rotura de la bicapa constitutiva de todas las membranas celulares. También sufren peroxidación los lípidos ingeridos en la dieta, lo que supone la incorporación de lípidos alterados en diferentes estructuras celulares, añadiendo a esto que la peroxidación lipídica genera una reacción en cadena.

Los ácidos nucleicos, tanto el ADN nuclear, que puede causar alteraciones genéticas, mutaciones, enfermedades autoinmunes y cáncer, como el DNA mitocondrial, involucrado en los procesos de envejecimiento pueden ser afectados por modificaciones oxidativas (Guerra, 2001) tales como generación de sitios AP (Teebor *et al*, 1988), rupturas en la doble hebra (Horvath *et al*, 2005) y oxidación del esqueleto desoxirribosa-fosfato del ADN (Henle and Linn 1997). A nivel macro se registran daños de tipo cromatídico (Cardoso *et al*, 1990) y cromosómico (Phillips *et al*, 1984).

La autooxidación completa de la glucosa puede favorecer la formación de RLO y peróxido de hidrógeno. Los carbohidratos que sufren modificaciones de tipo redox intervienen en la producción de la patología secundaria de la diabetes, en los procesos causados por el humo del tabaco y en general donde el ácido hialurónico existe en concentraciones anormales, como las enfermedades reumáticas y las cataratas (Veiga *et al*, 1997).

La incapacidad de nuestro cuerpo para neutralizar los radicales libres a los que nos exponemos diariamente nos obliga a recurrir a nutrientes con la propiedad de neutralizarlos. Estos nutrientes actúan liberando electrones en nuestra sangre que

son captados por los radicales libres convirtiéndose así en moléculas estables. Los compuestos con esta capacidad reciben el nombre de antioxidantes y recientes estudios han demostrado que pueden ser la protección más eficaz contra el envejecimiento celular y las enfermedades degenerativas.

3.7 ANTIOXIDANTE

Se define como cualquier sustancia que, a bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato. La importancia de un antioxidante depende de su concentración, del medio donde actúa y de su habilidad para interaccionar con sistemas regeneradores. La célula posee sistemas enzimáticos capaces de metabolizar los RL generados en los procesos redox celulares. La catalasa y la glutatión peroxidasa (GHP) que descomponen H_2O_2 y la superóxido dismutasa (SOD) que descompone O_2 , son los más importantes (Guerra, 2001).

Los llamados rastrillos de radicales (radical scavengers) son especies químicas cuya posibilidad antioxidante reside en su capacidad para destruir directamente los RL. Los principales rastrillos de radicales son: El glutatión (GHS): en presencia de la glutatión peroxidasa, reduce el H_2O_2 a agua, transformándose en glutatión oxidado. El glutatión se emplea para mitigar los efectos de las radiaciones nucleares causantes de la formación de RLO y facilitar la destrucción de éstos en el organismo. La vitamina C o ácido ascórbico: actúa principalmente en la materia acuosa del organismo. Destruye ciertos RL formados en el organismo o de productos que se ingieren o inhalan, así como aquellos causados por radiaciones. La vitamina E (alfa tocoferol): interrumpe las cadenas de peroxidación de los lípidos insaturados, siendo esencial su presencia para la protección de las membranas celulares. Otros rastrillos de radicales son: los taninos, los antocianinos y las flavonas.

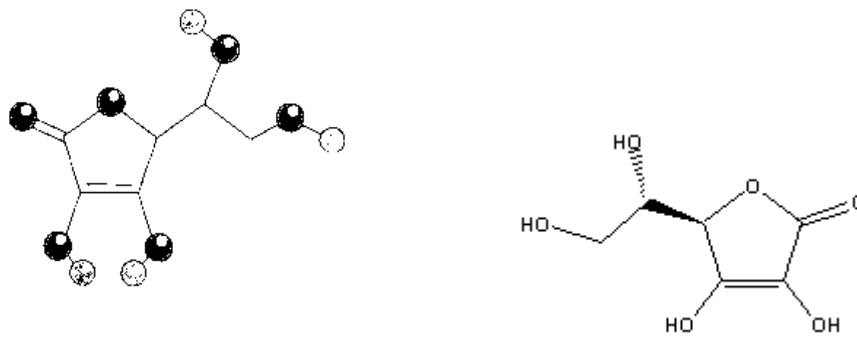
Las proteasas celulares son las encargadas de la eliminación de las proteínas alteradas oxidativamente, que son a su vez fuente generadora de más RLO. Los antioxidantes terciarios se encargan de reparar las biomoléculas dañadas por los RLO. Estos incluyen enzimas reparadoras de DNA y metionina sulfóxido reductasa que podría estar implicada en la reparación de productos oxidados estables (Guerra, 2001).

Podemos decir que un nutriente tiene propiedades antioxidantes cuando es capaz de neutralizar la acción oxidante de una molécula inestable (radical libre) sin perder su propia estabilidad electroquímica. La importancia del estrés oxidativo y la defensa antioxidante de los constituyentes de la dieta es motivo constante de revisión. Las vitaminas se han introducido últimamente en patología humana, no por su carencia o avitaminosis sino como antioxidantes en ciertas afecciones ligadas al estrés oxidativo.

Se considera que el retinol y la riboflavina son antioxidantes “preventivos”, es decir que mantienen la integridad estructural de los tejidos. En cambio, la vitamina E, C y los carotenoides son antioxidantes que impiden la propagación de la reacción en cadena que provocan los radicales libres, reduciendo la magnitud de la peroxidación lipídica y el daño tisular (Bissett *et al*, 1990).

3.8 VITAMINA C

Figuras 3 y 4. Estructura química de la VC



(Disponible en <http://www.um.es/~molecula/vit-c.htm>)

La vitamina C o ácido ascórbico es una querolactona con diversas actividades fisiológicas. La vitamina C se encuentra fundamentalmente en los vegetales frescos, destacando las fresas, grosella, los cítricos, latos, el pimiento, perejil, nabo.

También se puede encontrar en el hígado, riñón y leche, siempre y cuando la cocción u otras manipulaciones no la hayan destruido. Al ser una vitamina hidrosoluble se considera que es el antioxidante más importante del líquido extracelular, aunque participe también en el sector intracelular.

Aunque el papel de esta vitamina en muchos procesos metabólicos no está del todo aclarado, es indispensable para mantener la estructura de la sustancia intercelular del tejido conectivo. También esta relacionada con:

- Actividad como cofactor de múltiples enzimas implicados en la síntesis de colágeno, carnitina, catecolaminas, hormona antidiurética, oxitocina, colecistocinina, y en el metabolismo de algunos medicamentos.
- Protección de la p-fenil-pirúvico-oxidasa.
- Estimula la síntesis de componentes de la matriz intercelular.

- Es antioxidante, neutralizando los radicales libres oxigenados.
- Favorece la absorción intestinal del hierro.
- Acción moduladora del sistema inmune.

Los requerimientos de vitamina C debemos recibirlos del exterior, ya que el hombre es incapaz de sintetizarla. Diariamente se precisa entre 60-100 mg/día según la FDA; sin embargo, en determinadas circunstancias son necesarios aportes más elevados, como es el caso de intervenciones quirúrgicas, procesos infecciosos, ingesta de anticonceptivos y fumadores.

La VC como compuesto hidrosoluble forma la primera línea de defensa contra los radicales libres generados por el metabolismo. El ácido ascórbico ha sido encontrado reaccionando con peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo, radicales peróxilo y oxígeno molecular en la forma de radicales semihidroascorbato y dehidroascorbato. La VC actúa en el plasma barriendo los radicales libres previniendo que estas especies químicas puedan reaccionar con las membranas biológicas y las lipoproteínas. También se le asigna un doble rol como antioxidante en los sistemas biológicos: Inactivar los radicales dañinos en el plasma y preservar la actividad de los antioxidantes lipofílicos (Basu *et al*, 1999).

Se demostró en ratones que la aplicación tópica de ácido ascórbico en la piel, reducía los cambios visibles, histológicos y la formación de tumores secundarios a la exposición crónica a la luz UVB (Au, 1991). Se podría considerar que es un fotoprotector biológico de amplio espectro, que actuaría neutralizando los radicales libres inducidos por la radiación lumínica y favoreciendo la síntesis y reparación del colágeno dérmico dañado. Aunque la vitamina C es un valioso captador de los radicales libres, por sí misma es susceptible de ser destruida por la radiación UV (Bissett *et al*, 1990). El efecto anti-infeccioso de la vitamina C es controvertido, así como su acción como anticancerígeno y su acción preventiva frente al estrés oxidativo. Muchos estudios *in vitro* e *in vivo* reportan los efectos antioxidantes y antimutagénicos del ácido ascórbico. De otro lado, otros estudios muestran que, bajo ciertas condiciones, la VC actúa como un prooxidante e incrementa el daño al ADN (Leung *et al*, 1993). Se sabe que es eficaz para bloquear la formación de nitrosaminas sean de origen endógeno o exógeno por el tabaco (Cechi *et al*, 1999) y dieta, y nitrosamidas con actividad carcinogénica. Su efecto inhibitorio se basa en la reducción del nitrito por el ácido ascórbico. Los radicales libres que se forman en la oxidación de grasas insaturadas y en el mecanismo celular son los agentes que causan más daño al DNA y a la membrana celular, lo que podría ser una de las causas de inhibición de la intercomunicación celular o de la actividad de la proteinquinasa, factores que pueden determinar el desarrollo de una neoplasia. Se ha encontrado que el ácido ascórbico es capaz de capturar a los radicales libres neutralizándolos, ejerciendo por lo tanto un papel protector de la membrana frente a los procesos degenerativos.

4. METODOLOGÍA

Para la ejecución del proyecto se realizaron varios ensayos que se distribuyeron en dos fases principales a saber:

FASE 1: Ensayos de citotoxicidad de VC y H₂O₂

FASE 2: Prueba para identificar el efecto modulador de la VC de los daños inducidos en el ADN por el H₂O₂

4.1 MATERIALES Y METODOS

4.1.1 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Tabla 1. Ficha técnica del Peróxido de hidrógeno

Nomenclatura	H ₂ O ₂
Otros nombres	Agua oxigenada, Hidroperóxido, Perhidrol
Concentración	30% en solución
CAS	7722-84-1
Casa comercial	Antibióticos s.p.A.
Densidad 18°/4°	1.122
Peso molecular	34.015
Aspecto*	Líquido incoloro
Punto de fusión*	-0.89°C
Punto de ebullición*	151.4°C a 760mm
Solubilidad en 100 partes de agua fría*	∞
Precauciones	Debe almacenarse en un recipiente oscuro y mantenerse a baja temperatura.

* Tomado de: Perry. Manual del Ingeniero químico. 6 ed. Tomo 1. McGraw-Hill. México, 1992. p 3-17

Se tomaron 0.1 mL de H₂O₂ a la concentración 10M (30%) (solución madre) y se diluyeron en 40 mL de agua estéril para obtener una concentración de 25 mM a partir de la cual se prepararon las diluciones del experimento empleando factores de 1/10 y ½ según se detalla en la Tabla 2. Las diluciones fueron realizadas bajo condiciones de esterilidad y el H₂O₂ se mantuvo a baja temperatura y protegido de la luz.

Tabla 2. Concentraciones del Peróxido de hidrógeno.

Solución de trabajo (mM)	Concentración final en el medio (μM)
Control negativo o solvente puro	0
25	500
2.5	50
0.25	5
0.125	2.5
0.0625	1.25
0.03125	0.625

4.1.2 Vitamina C. Cebión®, una marca comercial de la vitamina C, elaborada por Merck S.A. Industria Colombiana. Adquirida directamente de una farmacia. El compuesto es vendido en forma líquida a una concentración de 100 mg/mL.

Se tomaron 8 mL del compuesto y se aforó a 10 mL con 2 mL de agua estéril para obtener una solución con una concentración de 80 mg/mL que, diluida por un factor de $\frac{1}{2}$ permitió obtener las soluciones de trabajo. Las diluciones fueron realizadas bajo condiciones estériles. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de vitamina C.

Solución de trabajo (mg/mL)	Concentración final en el medio ($\mu\text{g/mL}$)
Control negativo (agua)	0
80	1600
40	800
20	400
10	200
5	100
2.5	50

Figura 5. Presentación comercial y diluciones de VC y H₂O₂



4.2 CULTIVO DE LINFOCITOS

Todas las pruebas con VC y H₂O₂ se realizaron en cultivos de linfocitos en sangre periférica humana, según protocolo de Moorehead *et al* (1960), modificado por Carvajal *et al* (2002).

Para todo el estudio se empleó entre 5-10 mL de sangre heparinizada (por experimento) de un mismo individuo colectada del antebrazo según las normas de bioseguridad requeridas. Para ser apto a la investigación, el individuo cumplió con los siguientes requisitos mínimos:

- No padeció de enfermedades graves de origen viral durante los tres meses anteriores a los experimentos.
- No tuvo exposición excesiva y habitual a agentes tóxicos como alcohol etílico, cigarrillo o drogas psicoactivas e ilegales
- Sin antecedentes genéticos patológicos.

Para la siembra de los linfocitos se usó medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma), 1% de L-Glutamina (Sigma) y 1% de Penicilina – estreptomicina (Sigma)

Para preparar un litro de medio de cultivo, se pesan 10,4 g de medio RPMI-1640 y se disuelven en 800 mL de agua estéril, se adicionan 2 g de NaHCO₃ y se completa con 200 mL de agua estéril. Se agita permanentemente para obtener una mezcla homogénea y se lleva a un pH entre 7,15 y 7,20 usando HCl 1N. Posteriormente se adiciona 1 mL de penicilina – estreptomicina a las concentraciones finales de 100 U/mL y 100 µg/mL respectivamente. Finalmente el

medio obtenido se esteriliza a través de un filtro miliporo 0.22 μm en cámara de flujo laminar (FLOW12LV 16394).

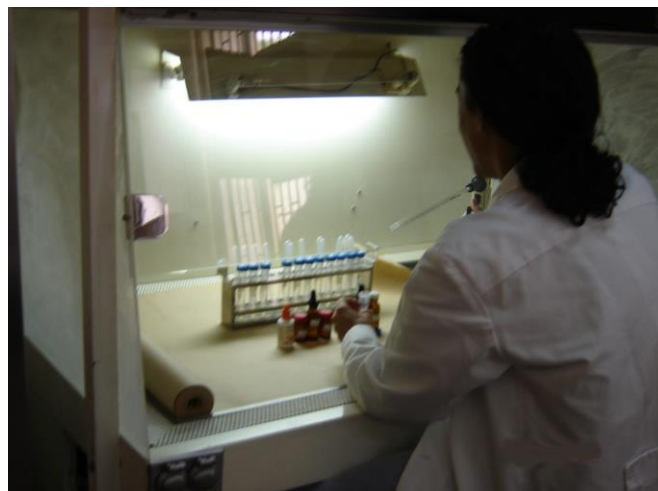
La siembra se realiza en tubos para centrífuga estériles de 15 mL (Falcon). El medio de cultivo completo es distribuido en estos tubos a razón de 4,5 mL/tubo bajo condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar (Ver foto Figura 6). Posteriormente se adicionan 0.5 mL de sangre heparinizada a cada tubo de ensayo y finalmente se agrega fitohemaglutinina (PHA, preparada en el laboratorio a partir de *Phaseolus vulgaris*) a una concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$. Los tubos son llevados a incubadora (Memmert BM800) a una temperatura de 37°C durante 50 horas.

Transcurridas 24h después de la siembra, los tubos de cultivo son retirados de la incubadora y llevados a la cámara de flujo laminar donde se llevan a cabo los tratamientos con VC y/o H_2O_2 y se colocan de nuevo a incubar. Dos horas antes de la cosecha se añade 0.1 mL de Colcemid (Sigma) a cada cultivo a una concentración final de 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

La cosecha es el procedimiento mediante el cual se aíslan los linfocitos del resto de componentes celulares que se encuentran en la sangre. Se realiza 50h después de la siembra de los cultivos. Se centrifugan los cultivos a 1200 rpm por 7 min. y se remueve el sobrenadante con pipeta pasteur; se dejan 0.5 mL de sobrenadante, cuidando de no perturbar el botón celular.

El botón celular se resuspende agitando los tubos suavemente con los dedos. A cada tubo de cultivo se agregan 6 mL de solución hipotónica (0.075 M KCl), previamente calentada a 37°C, por las paredes del tubo y se agita suave y permanentemente. Las células se resuspenden cuidadosamente y se pipetea suavemente para destruir los grumos. La suspensión celular se deja durante 30 min. a 37°C en incubadora.

Figura 6. Siembra de linfocitos humanos en cámara de flujo laminar.



Después de los 30 min. de la hipotonización, se agrega con fuerza 1mL de fijador Carnoy (1:3 Acido acético - Metanol) dentro de cada tubo, se mezcla bien y se deja reposar por un minuto (prefijación). La mezcla se centrifuga a 1200 rpm por 8 min. y el sobrenadante se remueve y se resuspende el botón celular.

La fijación se realiza adicionando 5 mL del fijador Carnoy y colocando en refrigeración durante 20 min. La suspensión celular se centrifuga a 1200 rpm durante 7 min., se remueve el sobrenadante y se repite el proceso dos veces. Después de la tercera centrifugación se remueve el sobrenadante dejando una pequeña cantidad (0.2 – 0.5 mL) del fijador.

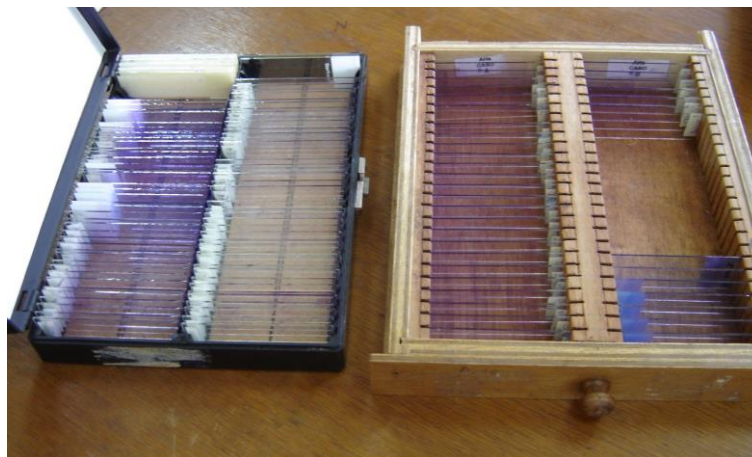
El botón celular se resuspende y se agrega fijador hasta obtener una suspensión homogénea de células con apariencia ligeramente lechosa

Para la obtención de los extendidos celulares se toma un portaobjetos frío y humedecido con ácido acético al 60% previamente refrigerado y se dejan caer 3-5 gotas de suspensión celular en diferentes zonas de la placa usando una pipeta pasteur. Los portaobjetos se colocan sobre una toalla de papel formando un ángulo de 45° para obtener un mejor extendido de los cromosomas.

Los portaobjetos se colocan sobre la plancha caliente a 40-45°C para secado durante 6 minutos y para mejorar el extendido.

Transcurridos 1-2 días, los portaobjetos se tiñen con colorante Giemsa a una concentración del 10% durante 5-7 minutos (Figura 7).

Figura 7. Portaobjetos teñidos con Giemsa



4.3 CITOTOXICIDAD DE LA VC Y EL H₂O₂

Esta prueba se realizó en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana. El ensayo consistió en tratar los cultivos con las diferentes concentraciones de VC o de H₂O₂, 24h después de la siembra, incluyendo agua estéril como control negativo, adicionada bajo las mismas condiciones y volúmenes de los diferentes tratamientos. Posteriormente en los extendidos celulares se cuantificaron el número de células metafásicas (IM) para identificar la citotoxicidad y seleccionar las concentraciones adecuadas para realizar la prueba moduladora de daño mediante AC.

Para la evaluación citotóxica de la VC se emplearon siete concentraciones tomando como guía lo reportado por Cechi *et al* (1999). Este experimento se realizó tres veces mas para efectos de validez estadística. El volumen de VC agregado a cada cultivo de 5 mL fue de 0.1mL. Se eligieron tres concentraciones de VC procurando cumplir los siguientes requisitos mínimos: una concentración semejante al control negativo, otra con un IM del 50% respecto del mismo control y otra con un 20-30% de IM respecto del control negativo.

En lo que respecta al H₂O₂, se evaluaron siete concentraciones cada uno con su respectiva repetición. El volumen de H₂O₂ agregado a cada cultivo de 5 mL fue de 0.1mL. Se escogieron tres concentraciones para realizar una prueba extra de genotoxicidad y elegir la concentración única para ser utilizada en la fase II. Las concentraciones fueron: una que redujo el IM a un 75% respecto al grupo control y dos mas que disminuyeron el IM en un rango de 40 - 60% en relación al grupo control. Finalmente fue elegida una de estas dos ultimas concentraciones por exhibir metafases claramente analizables en comparación a las otras dos concentraciones y por estar alrededor de 50%.

El análisis microscópico se realizó bajo un aumento de 10x.

4.4 EFECTO MODULADOR DE DAÑOS (AC) DE LA VC.

Después de 24h de la siembra se efectuó el tratamiento con VC y H₂O₂. Por medio de esta prueba se estimó el efecto modulador de la VC frente a los daños inducidos por el H₂O₂. El protocolo se resume en la figura 8. (Modificación realizada por Figueroa Paz (2005) del protocolo de Carvajal *et al* (2002).

El registro de aberraciones cromosómicas se realizó en microscopio bajo un aumento de 100x.

Figura 8. Protocolo para cultivo de linfocitos humanos aplicado a pruebas de IM y AC (Modificado por Figueroa Paz, 2005)



Col: Colcemid; Tto: Tratamiento; Cos: Cosecha

4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la presente investigación el factor principal o variable independiente es la concentración de VC y como variable dependiente están el IM (Indicador de citotoxicidad) y las AC (Indicador de daños en el ADN producto del daño inducido por H₂O₂). Para identificar el efecto citotóxico se evaluaron siete concentraciones de VC (incluido el control negativo o concentración cero). Para el H₂O₂ también se evaluaron siete concentraciones. El dato se expresó en forma de IM identificado en 2000 células por cultivo y se calculó mediante la formula

$$IM = \frac{\# \text{ de metafases}}{\# \text{ total de células}}$$

Los datos se tabularon y analizaron mediante asociación lineal con las pruebas de correlación de Pearson (paramétrica) o de Spearman (no paramétrica) y se determinó la curva de mejor ajuste.

Para la identificación del efecto modulador de la VC sobre los daños inducidos en el ADN por H₂O₂, se emplearon cuatro concentraciones de VC, incluido el control negativo o concentración cero. En cada experimento se realizaron dos cultivos por cada tratamiento y los datos obtenidos se interpretaron en número de AC en 100 células metafásicas para cada cultivo, con el objetivo de establecer diferencias de los daños genéticos inducidos en los diferentes tratamientos. El registro de AC se realizó detalladamente en tabla según modelo (Ver anexos)

El experimento antes indicado se repitió cuatro veces para un total de 64 cultivos. Los datos fueron consignados en una tabla de dos vías. El análisis estadístico se

realizó mediante prueba de ANOVA para un diseño de Bloques Aleatorizados (teniendo en cuenta que los experimentos realizados en diferente tiempo son los bloques) o mediante la prueba no paramétrica de Friedman y de Kruskal-Wallis. También fueron aplicadas pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov, la prueba de igualdad de varianza de Levene y el test de comparaciones múltiples de Duncan.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa estadístico SPSS versión 10 (SPSS Inc.), con un nivel de significancia máximo de 0.05.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 CITOTOXICIDAD

5.1.1 Citotoxicidad de la VC. En la Tabla 4 se resumen los resultados de la prueba de IM, correspondiente al análisis de citotoxicidad de la VC. El análisis de los datos mediante correlación de Spearman (no paramétrica) y Pearson (paramétrica), no muestran una asociación entre el IM y la concentración de la VC, por debajo de 800 µg/mL ($p > 0.05$) (Ver Figura 9). Esto sugiere que la VC no afecta la proliferación celular de una manera significativa en este rango de concentraciones. No obstante, entre las concentraciones de VC de 800 y 1600 µg/mL, debido a un cambio en el color y constitución del medio de cultivo, se presentó un efecto tóxico que afectó drásticamente la proliferación celular. La naturaleza de la toxicidad mencionada parece tener relación con un aumento en la dosis pues el fenómeno tuvo lugar en los cultivos con las concentraciones de VC más elevadas, aunque esta idea no se puede vislumbrar con claridad, ya que no se realizaron ensayos con concentraciones mayores a 1600 µg/mL. Por otra parte, los resultados inofensivos obtenidos a las concentraciones 50-400 µg/mL hace pensar que la acción toxica observada a las concentraciones más altas esta relacionada más con un efecto directo de la VC sobre el pH de la solución (Wunderlich *et al*, 1992), cambiando las características químicas, que con la actividad metabólica de la vitamina a nivel celular (Leung, 1993).

De acuerdo a los datos obtenidos, se eligieron las tres concentraciones necesarias para la prueba de AC. Las soluciones de VC a 100, 200 y 400 µg/mL fueron las escogidas. De acuerdo a Cechi *et al* (1999) estas mismas concentraciones tampoco han exhibido efectos citotóxicos, aun en combinación con otros compuestos como la bleomicina (BLM).

La citotoxicidad de la VC ha sido evaluada en múltiples condiciones experimentales y sobre diferentes células blanco, brindando así, un amplio espectro de resultados. La combinación de la VC con otros compuestos comprobadamente citotóxicos ha resultado en la potenciación del poder dañino de sustancias como el peroxido de hidrógeno (Crott *et al*, 1999). De la misma forma, mediante ensayos *in vivo*, Vogel *et al* (1989) han mostrado su inocuidad citotóxica.

El tiempo de administración de un tratamiento basado en VC es también un factor que influye, ya que su variación ha generado respuestas diferentes dentro de una misma investigación sobre estrés oxidativo (Bijur *et al*, 1997). Es también claro que el tipo celular empleado para evaluar el efecto de la VC permite vislumbrar diferentes respuestas metabólicas, con algún beneficio en la investigación terapéutica. En relación a este ítem existen investigaciones relacionadas con

terapias alternativas contra el cáncer, donde se encuentran efectos citotóxicos de la VC sobre varios tipos de células cancerosas (Leung *et al*, 1993) y otras donde, paradójicamente, se registra efecto estimulante y promotor de crecimiento de estas células malignas (Medina *et al*, 1994) .

Tabla 4. Índice mitótico obtenido de las concentraciones de VC.

Experimento 1			Experimento 2		
Conc (ug/mL)	N° Metafases	IM	Conc (ug/mL)	N° Metafases	IM
0	41	0.0205	0	36	0.018
0	71	0.0355	0	68	0.034
50	66	0.033	50	43	0.0215
100	36	0.018	100	29	0.0145
100	92	0.046	100	62	0.031
200	50	0.025	200	32	0.016
200	74	0.037	200	54	0.027
400	67	0.0335	400	35	0.0175
400	87	0.0435	400	49	0.0245

Figura 9. Análisis de asociación entre el IM y la concentración de VC

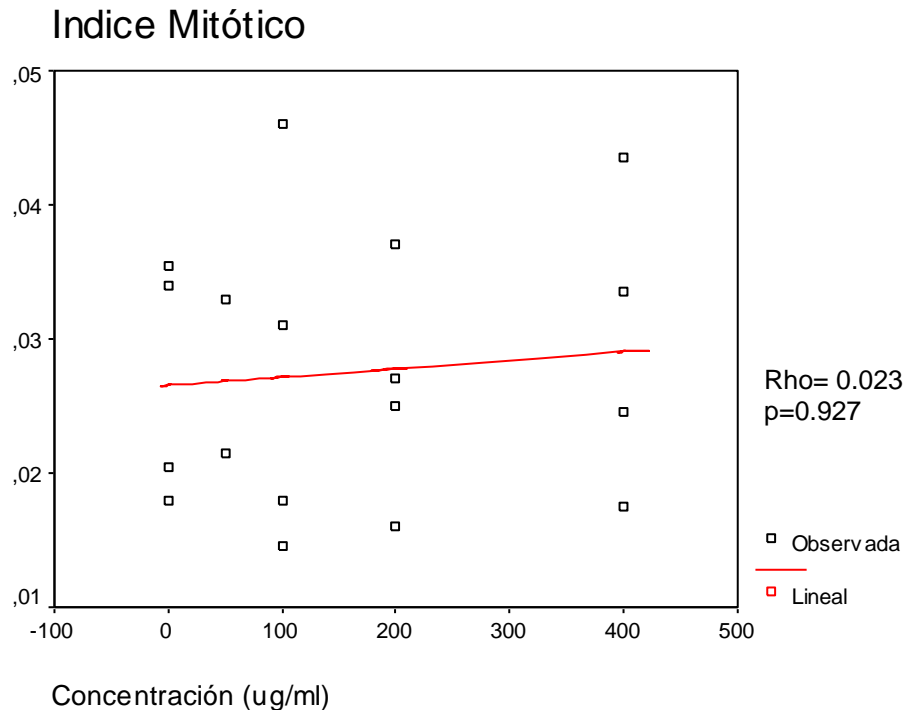


Figura 10. Proliferación celular en linfocitos tratados con 50-400 µg/mL de VC



5.1.2 Citotoxicidad del H₂O₂. En la Tabla 5 se resumen los resultados de la prueba de IM, correspondiente al análisis de citotoxicidad del H₂O₂. En la Figura 13 se observa claramente la disminución en la proliferación celular (IM) a medida que la concentración aumenta; el análisis de los datos realizado mediante correlación de Spearman (no paramétrica) y Pearson (paramétrica) confirma una asociación lineal negativa estadísticamente significativa entre el IM y la concentración de la H₂O₂ ($p < 0.05$). Esta relación denominada dosis – efecto (Jackson *et al*, 1979), pudo ser el resultado de un efecto citotóxico premitótico (fases G1, G2, S), que genera un bloqueo en el ciclo celular y como consecuencia una disminución en el número de células que pasan a la etapa de mitosis.

Los resultados muestran una reducción mínima del 50% y máxima del 75% del IM con respecto del control negativo. A pesar del efecto drástico sobre la proliferación celular, solo la más alta de las concentraciones (500 µM) exhibe la mayor citotoxicidad. Las demás concentraciones se mantienen en un rango entre 40 y 60%, confirmando la acción citotóxica del compuesto (Ver fotos Figuras 11 y 12). Con el fin de escoger una concentración adecuada para inducir daños al ADN, se procedió a elegir tres de las seis concentraciones evaluadas las cuales fueron: 500, 50 y 5 µM, las cuales fueron sometidas a una prueba previa de genotoxicidad para confirmar su potencial genotóxico y así elegir la concentración única. Como se puede apreciar en la Tabla 6, estas concentraciones generaron daño significativo expresado en AC; sin embargo, se eligió aquella concentración que permitió una mejor visualización en el extendido de las metafases, es decir, que no causó daño a la estructura celular para el análisis y conteo en la prueba de AC

según criterio reportado por Cardoso *et al* (1990). La concentración elegida fue la de 5 μM .

La citotoxicidad del H_2O_2 esta ligada a su alta reactividad y los subproductos que de él se derivan. Su actividad citotóxica ha sido relacionada con su potencial genotóxico (Fenech *et al*, 1999). Larramendy *et al* (1987) ha registrado su influencia depresora en la proliferación celular mediante la prueba de IM. Aunque muchos estudios se centran en su capacidad de causar daño en el material genético y en la peroxidación de los lípidos de membrana, existen registros de su efecto citotóxico en otras células, por ejemplo, a nivel neuronal (Hyslop *et al*, 1995). Además, Fenech *et al* (1999, 2003), a realizado múltiples investigaciones a través de micronúcleos evaluando el rol citotóxico del H_2O_2 .

Figura 11. Proliferación celular en linfocitos tratados con 0.625 – 50 μM de H_2O_2

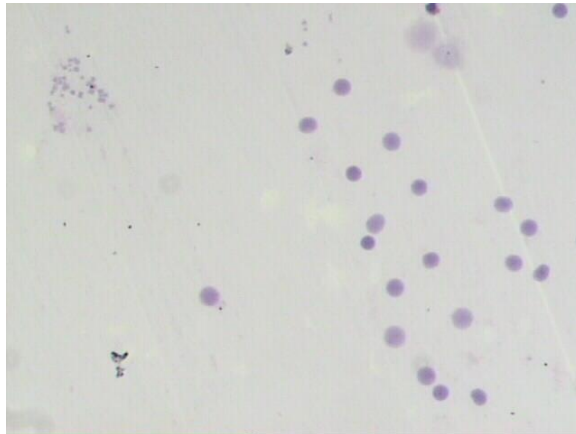


Figura 12. Proliferación celular en linfocitos tratados con 500 μM de H_2O_2

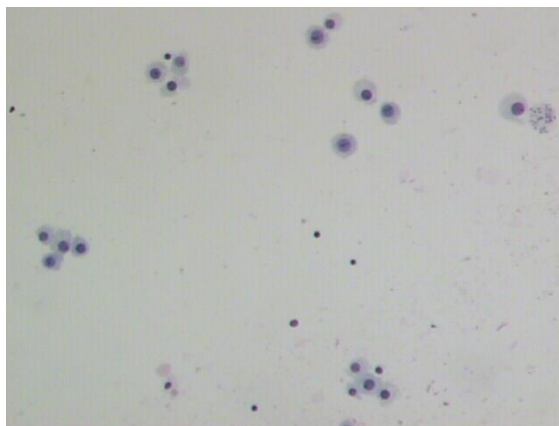


Tabla 5. Índice mitótico registrado para H₂O₂.

Concentración (μM)	N° Metafases/2000 células	IM	Concentración (μM)	N° Metafases/2000 células	IM
0	127	0.067	2.5	53	0.0265
0	123	0.0615	2.5	41	0.0205
0	71	0.038	5	41	0.0205
0	76	0.038	5	47	0.0235
0.625	41	0.0205	5	50	0.025
0.625	31	0.0155	5	47	0.0235
0.625	46	0.023	50	34	0.017
0.625	56	0.028	50	18	0.009
1.25	41	0.0205	50	16	0.008
1.25	54	0.027	50	44	0.022
1.25	34	0.017	500	10	0.005
1.25	39	0.0195	500	13	0.0065
2.5	61	0.0305	500	11	0.0055
2.5	34	0.017	500	9	0.0045

Figura 13. Análisis de asociación entre el IM y la concentración de H₂O₂.

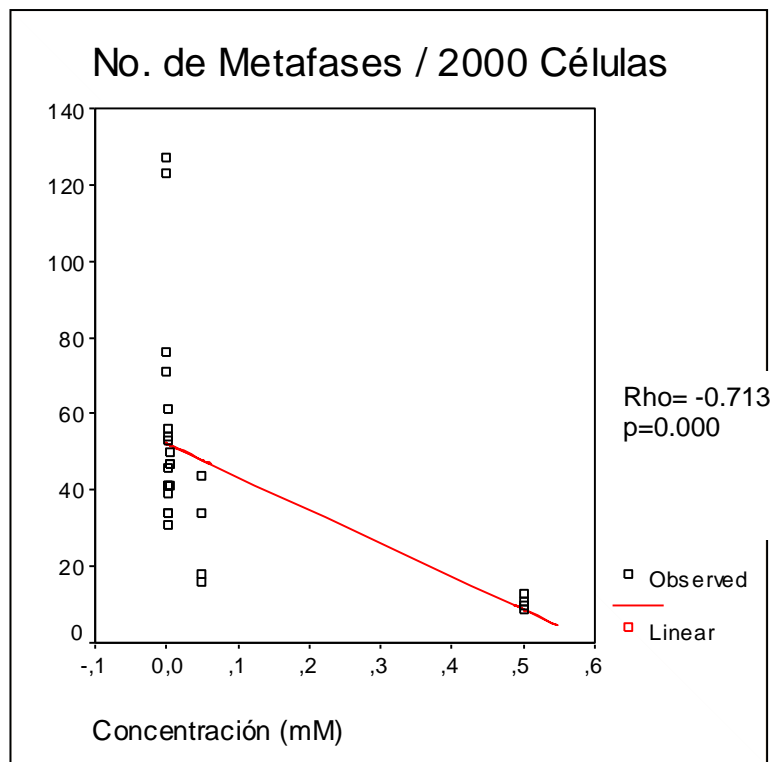


Tabla 6. Genotoxicidad previa registrada para H₂O₂

Concentración (μM)	N° AC
0	1
0	1
500	5
500	10
50	7
50	6
5	7
5	7
Control + (MMC)	11
Control + (MMC)	8

5.2 EFECTO MODULADOR DE LA VC DE LOS DAÑOS INDUCIDOS EN EL ADN POR H₂O₂

En la Tabla 7 se registran el número promedio de AC identificadas en 100 células por cultivo con sus respectivos errores estándar (EE) y tamaño de muestra (N), en cuatro experimentos con dos repeticiones cada uno, para un total de ocho repeticiones por tratamiento. Estos datos fueron sometidos a los tests de normalidad y de homogeneidad de varianza para verificar el tipo de análisis estadístico a seguir. Aunque el resultado para la prueba de varianza no fue significativo ($p > 0.05$), algunos datos no se ajustaron a la distribución normal. De acuerdo a lo anterior, el análisis pertinente se realizó mediante pruebas no paramétricas.

Mediante la prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrica) y el test de ANOVA (paramétrica) se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.000$ y $p < 0.000$) entre los ocho tratamientos incluidos en el estudio. Mediante la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (Ver tabla 8) se pudo establecer lo siguiente: una diferencia claramente significativa ($p < 0.05$) entre tres subgrupos de datos. Al control negativo (0 μg/mL de VC) le corresponde la frecuencia más baja de AC ($1.12 \pm 0.22/100$ células). En el segundo grupo se encuentran los tratamientos con VC (100, 200 y 400 μg/mL) y VC + H₂O₂ los cuales no muestran una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p = 0.079$), pero que si difieren significativamente del grupo control y del tercer subgrupo representado por el tratamiento con solo peróxido (H₂O₂), tratamiento que incrementa de manera significativa la frecuencia de AC inducidas ($6.62 \pm 0.46/100$ células).

Establecidos estos tres subgrupos: 1. Control negativo; 2. Tratamientos con solo VC y VC + H₂O₂ y 3. Tratamiento con H₂O₂, y comparados los resultados (Ver Figura 16), se puede señalar el aumento significativo que ejerce el tratamiento de solo H₂O₂ sobre el número de AC en relación a todos los demás tratamientos (6.62 ±0.46/100 células). No obstante, también se puede apreciar una reducción significativa en la frecuencia de AC en los tratamientos simultáneos de VC + H₂O₂ (1.62 ±0.26 a 2.25 ± 0.36/100 células) con relación a H₂O₂ solo. Esta reducción no difiere significativamente de los datos obtenidos para el grupo control, excepto para el tratamiento de VC 100 µg/mL + H₂O₂. Asimismo, se puede observar una diferencia significativa respecto del control de dos concentraciones de VC (200 y 400 µg/mL).

Entre los tipos de AC más frecuentemente inducidos por el H₂O₂, con o sin VC, estuvieron las rupturas cromatídicas. También se observaron aberraciones como rupturas cromosómicas y cromosomas dicéntricos, pero a una menor frecuencia (Ver fotos en Figuras 14 y 15).

Tabla 7. Registro de AC obtenidas en prueba con VC y H₂O₂, con sus respectivos controles en los cuatro bloques.

Tratamiento			No Ξ		No $\Xi \pm EE^1$	
H ₂ O ₂ (µM)	+	VC (µg/mL)	chtb	chrB	Total /100 cells (EE)	N
0	+	0	1	0.17	1.12 (±0.22)	8
0	+	100	1.5	0	1.50 (±0.26)	8
0	+	200	2	0.37	2.38 (±0.26)	8
0	+	400	2.12	0.17	2.25 (±0.25)	8
5	+	0	4.5	2	6.63 (±0.46)	8
5	+	100	1.75	0.5	2.25 (±0.36)	8
5	+	200	1.5	0.5	2.00 (±0.26)	8
5	+	400	1.5	0.17	1.62 (±0.26)	8

¹Nº promedio de AC en 100 células; EE: Error estándar; N: Nº de repeticiones

chtb: Ruptura cromatídica (chromatid break)

chrB: Ruptura cromosómica (chromosome break)

Tabla 8. Prueba de comparaciones múltiples (Duncan) de los tratamientos con VC y/o H₂O₂

No. PROMEDIO DE AC/100 CÉLULAS

Duncan^a

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
CONTROL NEGATIVO	8	1,1250		
VITAMINA C 100 ug/ml	8	1,5000	1,5000	
PEROXIDO + VITAMINA C (400 ug/ml)	8	1,6250	1,6250	
PEROXIDO + VITAMINA C (200 ug/ml)	8	2,0000	2,0000	
VITAMINA C 400 ug/ml	8		2,2500	
PEROXIDO + VITAMINA C (100 ug/ml)	8		2,2500	
VITAMINA C 200 ug/ml	8		2,3750	
SOLO PERÓXIDO	8			6,6250
Sig.		,067	,079	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

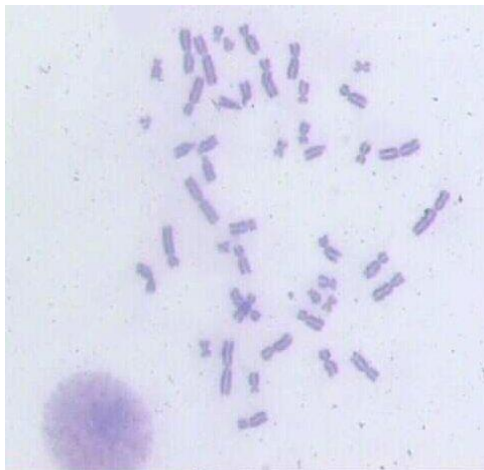
a. Usa tamaño de la muestra de la media armónica = 8,000.

N: N° de repeticiones

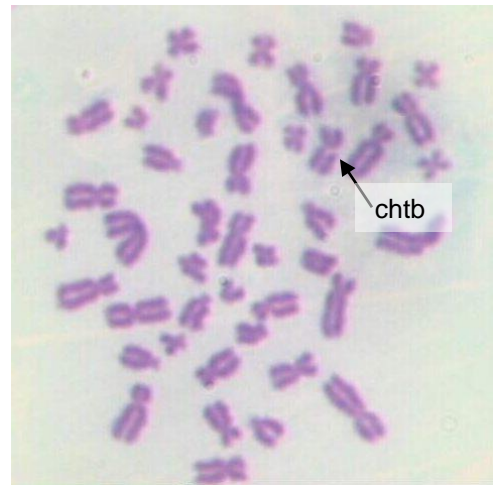
Figura 14. Aberraciones cromosómicas (AC) identificadas en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos en los tratamientos con VC y H₂O₂.



Control negativo: solvente puro (H₂O)

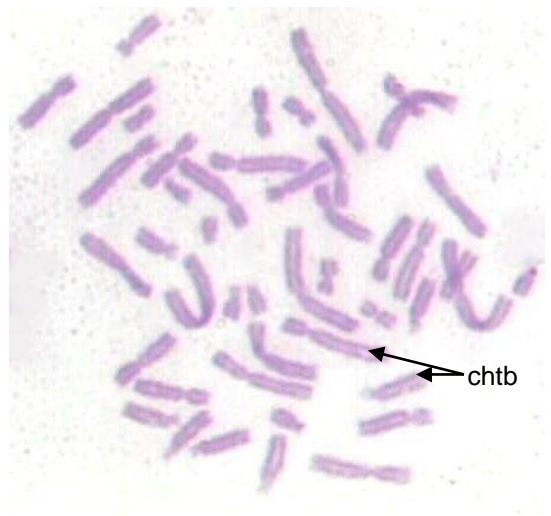


Tratamientos con VC
100, 200, 400 µg/mL



Tratamientos con VC + H₂O₂
chtb: ruptura cromatídica

Figura 15. Aberraciones cromosómicas (AC) identificadas en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos en el tratamiento con H₂O₂ 5 μM



dc: cromosoma dicéntrico

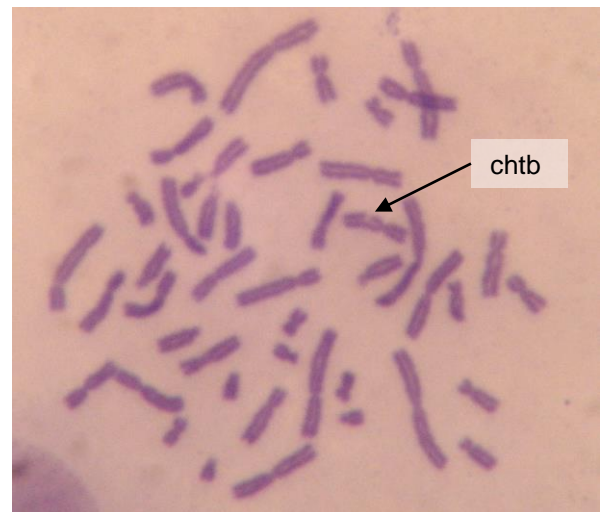
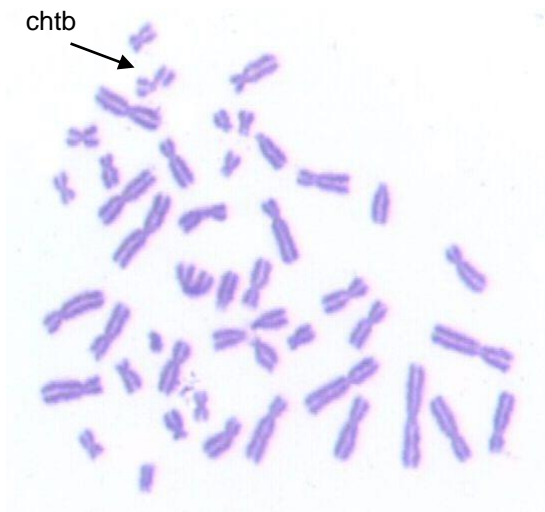
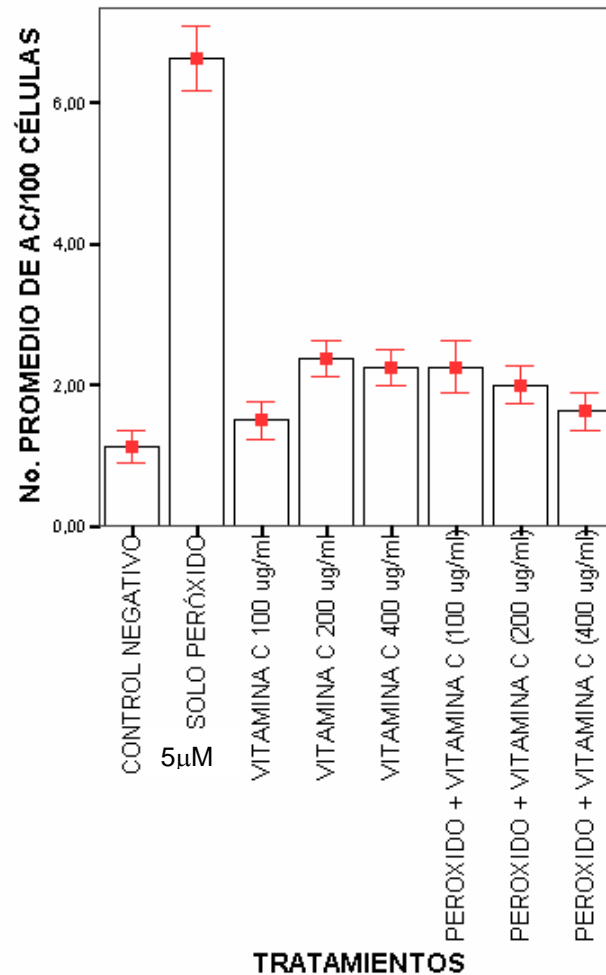


Figura 16. Comparación de los efectos de los tratamientos con VC y/o H₂O₂ 5 μM sobre la frecuencia de AC inducidas, incluido el control negativo.



El uso cada vez más frecuente de la VC como terapia alternativa o complementaria para diversas enfermedades y procesos degenerativos, como el cáncer y envejecimiento, y la controversia que de su potencial efectividad se genera, señala la importancia de investigar cualquier posible efecto e interacción que se derive de su utilización. Los resultados de la fase II del presente estudio muestran que la VC reduce significativamente las AC inducidas mediante H₂O₂. Para explicar este efecto hay que considerar la concentración de H₂O₂ utilizada para inducir el daño genético (5 μM), concentración bastante baja si se compara

con otras investigaciones que han usado concentraciones en un rango de 50 a 1000 μM (Crott *et al*, 1999; Fenech *et al*, 1999) donde se han encontrado efectos citotóxicos, necróticos y apoptóticos, antes que genotóxicos. La realización de la prueba de citotoxicidad de H_2O_2 , permitió controlar este tipo de efecto en la prueba de AC dando lugar a la selección de una concentración de H_2O_2 con una proliferación celular adecuada que indujo daño cromosómico. De acuerdo con Larramendy *et al* (1987), la acción genotóxica del H_2O_2 se debe a su difusión al interior de la célula, en donde da origen, entre otros, al radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) mediante una reacción tipo Haber-Weiss, el cual es uno de los más dañinos.

Fue una ventaja realizar los tratamientos simultáneos de VC y H_2O_2 ya que permitieron a la VC ejecutar procesos que podrían compararse con lo afirmado por Cechi *et al* (1999) y Guaiquil *et al* (2001), donde se presenta a la VC como un compuesto de acción rápida con propiedades antioxidantes y desmutágenicos que evita las veloces reacciones oxidantes y genotóxicas de los radicales libres, desactivándolos y neutralizándolos. Ejemplos de este efecto son los tratamientos simultáneos de VC con agentes quimioterapéuticos como adriamicina (Kaegi, 1998) y doxorubicina (Amara-Mokrane *et al*, 1996) que han demostrado la reducción de sus efectos tóxicos. Según Noctor y Foyer (1998) esta acción de la VC se debe a su habilidad para donar electrones en múltiples reacciones enzimáticas y no enzimáticas; por ejemplo, según Guaiquil *et al* (2001), la forma oxidada de la VC, el ácido deshidroascórbico, es usado intracelularmente para desactivar a las moléculas oxidantes. Así, gracias a esta virtud química, la VC adquiere propiedades detoxificadoras que le permiten “barrer” directamente con los iones superóxido, hidroxilo y con el oxígeno molecular y transformar al H_2O_2 en agua.

En contraste con estos resultados están los obtenidos por Fenech *et al* (1999) en donde la VC, a altas concentraciones, optimizó la citotoxicidad de H_2O_2 en linfocitos humanos en plasma. De la misma manera, la suplementación mediante VC tampoco tuvo un efecto protector frente al poder tóxico del H_2O_2 . Por otro lado, Lusetko *et al* (2002) muestra como las altas concentraciones intracelulares de ácido ascórbico reducen las mutaciones causadas por el estrés oxidativo en células humanas *in vitro*. Los efectos de las investigaciones arriba citadas, son reportados en otro estudio realizado en células CHO, donde se establece una relación temporal entre la aplicación del tratamiento con ácido ascórbico y sus actividades prooxidantes y antioxidantes (Bijur *et al*, 1997). Sin embargo, estos investigadores usaron diferentes métodos, concentraciones y tratamientos para evaluar a la VC y el H_2O_2 .

Existen varios estudios que revelan el efecto protector de la VC ante los daños provocados por diversos agentes: por ciclofosfamida (CPA) en embriones de ratón (Vogel *et al*, 1989), por radiación (El-Nahas *et al*, 1993) y por daño oxidativo en fumadores y no fumadores cuando es administrada *in vivo* (Dulhie *et al*, 1996).

También se sugiere que las células cancerosas son más sensibles a la citotoxicidad de la VC (Kaegi, 1998) por vía intravenosa (Padayatty *et al*, 2000).

Esta acción protectora parece tener una relación dosis-efecto en el estudio ya que el tratamiento VC 100 $\mu\text{g/mL}$ + H_2O_2 fue el único de los tratamientos simultáneos que manifestó una diferencia significativa con el grupo control. Talvez, al tratarse de la concentración menor, su capacidad para competir con H_2O_2 y otros radicales libres de oxígeno no sea suficiente para reducirlos significativamente. Asimismo, la diferencia significativa de los tratamientos VC 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$ con respecto del control, hace pensar en un efecto levemente genotóxico relacionado con la concentración (relación dosis-efecto). Sin embargo, este efecto, (no presente en el tratamiento 100 $\mu\text{g/mL}$), es opacado por la acción protectora de estos mismos tratamientos simultáneos con H_2O_2 . Es posible que la presencia del H_2O_2 permita a la VC activar su habilidad de donador de electrones en pro de la estabilización electroquímica del nuevo compuesto (H_2O_2), relegando a un segundo plano su potencial actividad genotóxica dosis-dependiente.

La manifestación del daño a nivel genético se expresó de una manera reiterada en rupturas cromatídicas. Este tipo de rupturas es producto de un daño provocado en la fase G2 del ciclo celular (IAEA, 1986). Por lo tanto se deduce que el H_2O_2 actuó en esta fase del ciclo celular generando este tipo de AC. Muy probablemente su acción se produjo sobre el final del primer ciclo de división celular de los linfocitos. Aunque la duración del ciclo celular puede variar ampliamente entre células en el ciclo biológico de un organismo y entre tipos celulares diferentes del mismo organismo (Cummins *et al*, 1998), también se podría hipotetizar que el tratamiento con VC ejecutado aproximadamente sobre el comienzo de la fase G1 (hora 24 del cultivo) permitió minimizar los daños genéticos en esta fase al neutralizar la acción del H_2O_2 lo cual se percibe en las escasas rupturas de tipo cromosómico. Sin embargo, es también posible que la actividad genotóxica de las moléculas restantes de H_2O_2 o de su subproducto, el ion superóxido, presentes durante la fase G1 obligara a la célula a ejecutar una orden de muerte celular en su punto de chequeo G1/S con el fin de evitar la generación de células hijas en mal estado. Esta hipótesis puede estar relacionada con el detrimento en la proliferación celular observada en los ensayos de citotoxicidad del H_2O_2 antes mencionados.

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una dimensión más amplia del rol de la VC, y de las vitaminas en general, en la modulación del daño oxidativo generado por los radicales libres de oxígeno. Es posible que su papel modulador le permita hacer parte de nuevas terapias alternativas para los desordenes relacionados con el estrés oxidativo.

Bajo la luz de la significancia de los datos del presente estudio y su comparación con otras investigaciones relacionadas, se puede decir que muchos factores influyen en la actividad de la VC: condiciones experimentales, el agente inductor de daño genético, el tipo de tratamiento, el tipo de célula utilizado y la susceptibilidad individual y adquirida de cada individuo. Por lo tanto, son necesarios más estudios para determinar de una manera más clara los efectos de la VC.

6. CONCLUSIONES

Las concentraciones de VC menores a 400 $\mu\text{g/mL}$ no muestran un efecto citotóxico. A concentraciones más altas, los cultivos sufren cambios de pH nocivos para las células.

Las concentraciones de H_2O_2 entre 0.625 – 50 μM son moderadamente citotóxicas, mientras que la concentración de 500 μM resulto ser sumamente citotóxica.

La VC tiene un efecto modulador sobre la acción de los radicales libres generados por el H_2O_2 , reduciendo significativamente el número de AC.

La concentración de vitamina C que presentó el mejor efecto modulador positivo ante los daños inducidos fue la de 100 $\mu\text{g/mL}$

La simultaneidad de los tratamientos de VC + H_2O_2 , permitió a la VC ejercer su efecto modulador de manera rápida y eficaz.

7. RECOMENDACIONES

Son necesarios más estudios que permitan valorar de un modo integral la VC y sus efectos, tales como: estudios *in vivo*, que permitan integrar la influencia del metabolismo en la biotransformación de la VC. Monitoreo en poblaciones humanas suplementadas con VC. Estudios moleculares para relacionar susceptibilidad y conveniencia de la ingesta de VC y estudios de eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN.

Se recomienda también la evaluación de la VC en conjunto con compuestos quimioterapéuticos y ante otras fuentes potenciales de daño genético a nivel ocupacional.

Se sugiere la investigación de potenciales soluciones, en este caso la VC, ante problemáticas o procesos patológicos como el daño oxidativo, por medio de investigaciones interdisciplinarias que involucren la evaluación de múltiples biomarcadores, a fin de obtener un conocimiento más amplio de los efectos.

BIBLIOGRAFIA

AMARA-MOKRANE YA *et al.* Protective effects of α -hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. En: Mutagénesis. Vol. 11 (1996) p. 161-167. Citado por: CECCHI, Andréa Oliveira y TAKAHASHI, Catarina Satie.. Comparative Study of the Effects of Vitamin C and Bleomycin on Smokers' and Non-Smokers' Lymphocytes in Clastogenicity Assays. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis. Vol.19 (1999); p. 43-51.

AU, WW. Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetics techniques. En: Occupational medicine. Philadelphia. Vol. 6, No 4 (October-december 1991); p. 597-611

AULLETA and ASBHY, 1988. Citado por: TOBAR TOSSE, Dora. Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico In vitro del extracto de alcaloides del lirio pequeño (*Eucharis amazonica* Planchon & Linden) en cultivo de linfocitos humanos. Popayán, 2004, 63p. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

BASU, T; TEMPLE, N and GARG, M. Antioxidants in human health and disease. CABI Publishing. New York, 1999. p 15-20

BIJUR, GN; ARIZA, ME; HITCHCOCK, CL and WILLIAMS, MV Antimutagenic and promutagenic activity of ascorbic acid during oxidative stress. En: Environ Mol Mutagen. Vol. 30, No. 3 (January 1997); p. 339-45.

BISSETT D, *et al.* Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. En: Photodermatol Photoimmunol Photomed. Vol. 7 (1990); p. 56-62

CARDOSO SMITH Marilia de Arruda; KORMAN Maria, MELARAGNO Maria y NETO Joao. Investigation of the effect of hydrogen peroxide on the chromosome of young and elderly individuals. En: Mechanisms of Ageing and Development. Vol. 56 (1990); p. 107-115.

CARVAJAL, Silvio y HOYOS, Luz Stella. Manual de citogenética: Linfocitos humanos. Grupo de investigación en Toxicología genética y citogenética. Universidad del Cauca (2002) 56p.

CECCHI, Andréa Oliveira and TAKAHASHI Catarina Satie. Comparative Study of the Effects of Vitamin C and Bleomycin on Smokers' and Non-Smokers' Lymphocytes in Clastogenicity Assays. En: Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis. Vol.19 (1999); p.43-51

COZZI, R; RICORDY, R; AGLITTI, T; OATTA, V; PERTICONE, P and DE SALVIA, R. Ascorbic acid and β -carotene as modulators of oxidative damage. En: Carcinogénesis. Vol.18 (1997); p. 223-228.

CROTT, J and FENECH, M. Effect of vitamin C supplementation on chromosome damage, apoptosis and necrosis *ex vivo*. En: Carcinogénesis. Vol.20 No. 6 (1999); p. 1035–1041

CUMNINGS, Michael y KLUG, William. Conceptos de Genética. 5 ed. España: Prentice-Hall, 1998; p. 31,32, 626-629.

DULHIE, SJ; MA, A; ROSS, MA and COLLINS, AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human. En: Cancer Res. Vol. 56 (1996); p. 1291-1295. Citado por: CECCHI, Andréa Oliveira y TAKAHASHI Catarina Satie. Comparative Study of the Effects of Vitamin C and Bleomycin on Smokers' and Non-Smokers' Lymphocytes in Clastogenicity Assays. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis. Vol.19 (1999); p. 43-51

EI-NAHAS, SM; MATTAR, FE and MOHAMED, A. Radioprotective effect of vitamins C and E. En: Mutat Res. Vol. 301, (1993); p 143-147. Citado por: CECCHI, Andréa Oliveira y TAKAHASHI Catarina Satie. Comparative Study of the Effects of Vitamin C and Bleomycin on Smokers' and Non-Smokers' Lymphocytes in Clastogenicity Assays. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis. Vol.19 (1999); p. 43-51

ESPINOSA-LARA, A; MALDONADO RODRÍGUEZ R. y ESPINOSA-LARA, M. Mecanismos de reparación de daños a la molécula del ácido desoxirribonucleico. En: Rev. Lat.-Amer microbio. Vol. 35 (1993); p. 117-136.

EVANS, H. J. Chromosomal mutations in human populations. Cytogenet cell genet, Vol. 33 (1982); p. 48-56. Citado por: CARVAJAL, Silvio y HOYOS, Luz Stella. Manual de citogenética: Linfocitos humanos. Grupo de investigación en Toxicología genética y citogenética. Universidad del Cauca (2002) 56p

FENECH, M; CROTT, J; TURNER, J and BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. En: Mutagenesis, Vol. 14, No. 6 (1999); p. 605-612.

_____ and GREENROD, W. The principal phenolic and alcoholic components of wine protect human lymphocytes against hydrogen peroxide- and ionizing radiation-induced DNA damage in vitro. En: Mutagénesis. Vol. 18, No. 2 (2003); p. 119-126.

GUAQUIL, V; VERA J and GOLDE, D. Mechanism of Vitamin C Inhibition of Cell Death Induced by Oxidative Stress in Glutathione-depleted HL-60 Cells. En: J. Biol. Chem. Vol. 276, No. 44 (November 2001); p. 40955-40961

GUERRA, Elejalde. Oxidación, entre la vida y la enfermedad. En: An Med Interna. Vol. 18 (2001); p. 1-4.

HALLIWELL and GUTTERIDGE, 1989. Citados por: KONAT, G W. H₂O₂-induced higher order chromatin degradation: A novel mechanism of oxidative genotoxicity. En: J. Biosci. Vol. 28 (2003); p. 57-60

HENLE and LINN, 1997. Citados por: KONAT, G W. H₂O₂-induced higher order chromatin degradation: A novel mechanism of oxidative genotoxicity. En: J. Biosci. Vol. 28 (2003); p. 57-60

HORVATH and BLAIR. Lab 7: Mechanism of DNA damage in vivo nucleic acids. Biochemistry Lab website [online] 2005. Biology courses web server. University of Utah. http://courses.biology.utah.edu/horvath/biol.3525/7_h2o2invivo/7_h2o2invivo.html

HSU, T. C. J Hered. Vol. 43 (1952). Citado por: CARVAJAL, Silvio y HOYOS, Luz Stella. Manual de citogenética: Linfocitos humanos. Grupo de investigación en Toxicología genética y citogenética. Universidad del Cauca (2002) 56p

HYSLOP P A; ZHANG Z; PEARSON D and PHEBUS L A. Measurement of striatal H₂O₂ by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H₂O₂ in vitro. En: Brain Res. Vol. 671 (1995); p. 181–186

International Atomic Energy Agency (IAEA). Biological Dosimetry: Chromosomal aberrations analysis for dose assessment. Vienna, 1986. Technical reports series N° 260

JACKSON, J and BENDER, R. Cytotoxic thresholds of vincristine in a murine and a human leukemia cell line *in vitro*. Cancer Research (39) p43-46 1979. Citado por: TOBAR TOSSE, Dora. Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico *In vitro* del extracto de alcaloides del lirio pequeño (*Eucharis amazonica Planchon & Linden*) en cultivo de linfocitos humanos. Popayán, 2004, 63p. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

- KAEGI, E. Unconventional therapies for cancer: Vitamins A, C and E. En: CMAJ. Vol. 158 (1998); p. 1483-8
- KONAT, G W. H₂O₂-induced higher order chromatin degradation: A novel mechanism of oxidative genotoxicity. En: J. Biosci. Vol. 28 (2003); p. 57–60
- LARRAMENDY, M; MELLO-FILHO, A.C.; LEME MARTINS, E.A. and MENEZHINI, R. Iron- mediated induction of sister-chromatid exchanges by hydrogen peroxide and superoxide anion. En: Mutation Research. Vol. 178 (1987); p. 57-63.
- LEUNG, PY; MIYASHITA, K; YOUNG, M and TSAO, C. Cytotoxic effect of ascorbate and its derivatives on cultured malignant and nonmalignant cell lines. En: Anticancer Res. Vol. 13, No. 2 (March 1993); p. 475-80.
- LUTSENKO, Eugen; CARCAMO, Juan and GOLDE, David. Vitamin C Prevents DNA Mutation Induced by Oxidative Stress. En: The Journal of Biological Chemistry. Vol. 277, No. 19 (May 2002); p. 16895–16899.
- MEDINA, MA, GARCIA DE VEAS, R and SCHWEIGERER, L. Ascorbic acid is cytotoxic for pediatric tumor cells cultured in vitro. En: Biochem Mol Biol Int. Vol. 34, No. 5 (November 1994); p 871-4.
- MOOREHEAD, P.S; NOWELL, P.C; MELLMAN, W.J; BATTIPS, D.M and HUNGERFORD, D.A. chromosome preparations of leukocytes cultures from human peripheral blood. Experimental cell research. Vol. 20 (1960); p613-616. Citado por: CARVAJAL, Silvio y HOYOS, Luz Stella. Manual de citogenética: Linfocitos humanos. Grupo de investigación en Toxicología genética y citogenética. Universidad del Cauca (2002) 56p
- NOCTOR and FOYER, 1998. Citado por: BLOKINA, O; VIROLAINEN, E y FAGERSTEDT, K. Antioxidants, oxidative damage y oxygen deprivation stress: a review. En: Annals of botany. Vol. 91(2003); p.179-194.
- NOWELL, P.C. Cancer Res. Vol. 20 (1960). Citado por: CARVAJAL, Silvio y HOYOS, Luz Stella. Manual de citogenética: Linfocitos humanos. Grupo de investigación en Toxicología genética y citogenética. Universidad del Cauca (2002) 56p
- PADAYATTY, Sebastian and LEVINE, Mark. Reevaluation of Ascorbate in Cancer Treatment: Emerging Evidence, Open Minds and Serendipity. En: Journal of the American College of Nutrition. Vol. 19, No. 4 (2000); p. 423-425.
- PHILLIPS et al, 1984. Citado por: LARRAMENDY, M; MELLO-FILHO, A.C.; LEME MARTINS, E.A. and MENEZHINI, R. Iron- mediated induction of sister-chromatid

exchanges by hydrogen peroxide and superoxide anion. En: Mutation Research. Vol. 178 (1987); p. 57-63

PRATT and RUDDON, 1979. Citado por: CARVAJAL, Silvio y HOYOS, Luz Stella. Manual de citogenética: Linfocitos humanos. Grupo de investigación en Toxicología genética y citogenética. Universidad del Cauca (2002) 56p

PRYOR, WA. Free radical and lipid peroxidation. En: Frei B editor. Natural antioxidant in human health and disease. Nueva York: Academic Press. 1994; p. 1-24. Citado por: GUERRA, Elejalde. Oxidación, entre la vida y la enfermedad. En: An Med Interna. Vol. 18 (2001); p. 1-4

ROJAS, E *et al.* Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. Anti cancer drugs. Vol. 4 (1993); p. 637-340

SERRANO DEL CASTILLO, D; JURADO CHACÓN, M; SÁNCHEZ CAMPOS, M y LÓPEZ FRIAS, R. Vitaminas A, C y E en la prevención del cáncer. En: Nutrición Clínica. Vol. II (1991); p. 34-44

SIES, H; STAHL, W.A. and SUNDQUIST, A.R. Antioxidant functions of vitamins: vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. En: Ann N Y Acad Sci. Vol. 669 (1992); p. 7-20.

TEEBOR, G; BOORSTEIN, R and CADETS, J. The reparability of oxidative free radical mediated damage to DNA: a review. En: Int. J. Radiation Biol. Vol. 54, No. 2 (1988); p. 131-150

TOBAR TOSSE, Dora. Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico *In vitro* del extracto de alcaloides del lirio pequeño (*Eucharis amazonica Planchon & Linden*) en cultivo de linfocitos humanos. Popayán, 2004, 63p. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

VEIGA, E; AGUILAR, JA; CLAVO, B y LLANES, L. Radicales libres, formación daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. En: Análisis Clínicos. Vol. 22 (1997); p. 201-216. Citado por: GUERRA, Elejalde. Oxidación, entre la vida y la enfermedad. En: An Med Interna. Vol. 18 (2001); p. 1-4

VOGEL, R and SPIELMANN, H. Beneficial effects of ascorbic acid on preimplantation mouse embryos after exposure to cyclophosphamide in vivo. En: Teratog Carcinog Mutagen. Vol. 9, No. 1 (January 1989); p. 51-9

WUNDERLICH, K; KNORR, M; DARTSCH, PC; STEUHL, HP and THIEL, HJ. Ascorbic acid. Cytotoxic effect on cultivated bovine lens epithelium cells. En: Ophthalmologie. Vol. 89, No. 4 (August 1992); p. 313-8

YU, Zhe; CHEN, J; Ford, B; BRACKLEY, M and GLICKMAN, B. Human DNA Repair Systems: An Overview. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 33 (1999); p. 3–20.

ZORRILLA A y FERNÁNDEZ A. Diabetes mellitus y estrés oxidativo. En: Bioquímica. Vol.24, No.3 (1999); p. 75-9. Citado por: ZORRILLA, Adonis. El envejecimiento y el estrés oxidativo. En: Rev Cubana Invest Biomed. Vol. 21, No. 3 (2002); p. 178-85.

_____. El envejecimiento y el estrés oxidativo. En: Rev Cubana Invest Biomed. Vol. 21, No. 3 (2002); p. 178-85.

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

COOGLE, J.E. Biological effects of radiation. Second edition. International publications series. New York, 1983

EPA U.S. Environmental Protection Agency [online] Last updated on Wednesday, September 17th, 2003. Available in: <http://www.epa.gov/>

GILMAN,A.G.; T.W. RALL; NIES, A.S. AND P. TAYLOR Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th ed. New York, NY. Pergamon Press, 1990. 1247p

INSITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNIAS Y CERTIFICACION. Compendio: Tesis y otros trabajos de grado. Bogotá : ICONTEC, 2004. 113p

PERRY. Manual del Ingeniero químico. 6 ed. Tomo 1. McGraw-Hill. México, 1992.

TOXNET-U.S. National Library of Medicine: <http://toxnet.nlm.nih.gov/index.html>

ANEXO A

REGISTRO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EVALUACION DEL EFECTO MODULADOR DE LA VC

Registrador: _____ Experimento N° _____ Fecha cosecha: _____
 Fecha registro: _____ Tratamiento: _____ Código placa _____ Microscopio: _____

N° Cell	N° Cr	Aberraciones cromosómicas			Coord.	N° Cell	N° Cr	Aberraciones cromosómicas			Coord.
		chtb	chrb	Otras				chtb	chrb	Otras	
1	46					50	46				
2	46					51	46				
3	46					52	46				
4	46					53	46				
5	46					54	46				
6	46					55	46				
7	46					56	46				
8	46					57	46				
9	46					58	46				
10	46					59	46				
11	46					60	46				
12	46					61	46				
13	46					62	46				
14	46					63	46				
15	46					64	46				
16	46					65	46				
17	46					66	46				
18	46					67	46				
19	46					68	46				
20	46					69	46				
21	46					70	46				
22	46					71	46				
23	46					72	46				
24	46					73	46				
25	46					74	46				
26	46					75	46				
27	46					76	46				
28	46					77	46				
29	46					78	46				
30	46					79	46				
31	46					80	46				
32	46					81	46				
33	46					82	46				
34	46					83	46				
35	46					84	46				
36	46					85	46				
37	46					86	46				
38	46					87	46				
39	46					88	46				
40	46					89	46				

41	46					90	46				
42	46					91	46				
43	46					92	46				
44	46					93	46				
45	46					94	46				
46	46					95	46				
47	46					96	46				
48	46					97	46				
49	46					98	46				
50	46					100	46				

Total AC