

## Efecto de la administración intragástrica y *ad libitum* del vino tinto (*Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Carménère* y *Cabernet Sauvignon/Nebbiolo*) y del alcohol en la cito/genotoxicidad evaluada en sangre periférica de ratones CD-1

The effect of intragastric and *ad libitum* administration of red wines (*Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Carménère* and *Cabernet Sauvignon/Nebbiolo*) and alcohol in the cyto/genotoxicity evaluated in the peripheral blood of CD-1 mice

Maria del Carmen García-Rodríguez\*<sup>o</sup>, Gabriela Guerrero-Palomo\*, Mario Altamirano-Lozano\*

### RESUMEN

Se evaluó la cito/genotoxicidad en sangre periférica de ratones CD-1 expuestos a las variedades de vino tinto *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Carménère* y *Cabernet Sauvignon/Nebbiolo*. Grupos de cinco organismos fueron tratados: a) con el vehículo, b) vino tinto o etanol (diluidos al 75% y 10%, respectivamente) *ad libitum*, y c) vino tinto sin diluir o etanol diluido al 13.5% (dos dosis diarias-0.25 ml, intragástricamente [i.g.]). La cito/genotoxicidad se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos (MN) y la relación entre eritrocitos policromáticos/normocromáticos (EPC/ENC) a las 0 h, 24 h, 48 h y 72 h. La administración i.g. de *Cabernet Sauvignon*, *Merlot* y etanol mostraron ligeros incrementos en los MN que resultaron significativos; sin embargo, la administración *ad libitum* de los vinos mostró una tendencia a reducirlos. Nuestros hallazgos sugieren que los MN podrían estar relacionados con la biodisponibilidad, farmacodinámica y farmacocinética del etanol y de los antioxidantes del vino tinto. No se observaron efectos citotóxicos.

### ABSTRACT

We evaluated the cyto/genotoxicity in peripheral blood of CD-1 mice exposed to different varieties of red wine *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Carménère* and *Cabernet Sauvignon/Nebbiolo*. Groups of five CD-1 mice were treated with: a) vehicle only; b) red wine or ethanol *ad libitum* (diluted 75% and 10%, respectively); c) undiluted red wine or ethanol diluted to 13.5% (two daily doses-0.25 ml via intragastric [i.g.]). The cyto/genotoxicity was evaluated by micronucleus (MN) assay, and by the relationship between polychromatic/monochromatic erythrocytes at 0 h, 24 h, 48 h and 72 h. Significant but slight increases of MN were observed only in the treatments i.g. of *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, and ethanol. However, the administration *ad libitum* of red wines tended to decrease the MN. Our findings suggest that the MN could be related with the bioavailability, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of ethanol and the antioxidants of red wine. No cytotoxic effects were observed.

Recibido: 18 de febrero de 2016

Aceptado: 15 de marzo de 2017

#### Palabras clave:

Vino tinto; genotoxicidad; micronúcleos; citotoxicidad; alcohol.

#### Keywords:

Red wine; genotoxicity; micronucleus; cytotoxicity; alcohol.

#### Como citar:

García-Rodríguez, M. C., Guerrero-Palomo, G., & Altamirano-Lozano, M. (2017). Efecto de la administración intragástrica y *ad libitum* del vino tinto (*Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Carménère* y *Cabernet Sauvignon/Nebbiolo*) y del alcohol en la cito/genotoxicidad evaluada en sangre periférica de ratones CD-1. *Acta Universitaria*, 27(3), 19-27. doi: 10.15174/au.2017.1221

### INTRODUCCIÓN

El vino es una bebida consumida por la humanidad desde hace más de 6000 años que cumple tanto funciones alimenticias como socio-religiosas (Soleas, Diamandis & Goldberg, 1997). Aunque al consumo de vino se le ha asociado con efectos perjudiciales, también han llamado la atención

\* Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Lab. 2 primer piso UMEZ, Campus II, Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), PO Box 9-020, Ciudad de México, C.P. 15000, México. Tel.: 55-56230772; Fax: 55-57736330. Correo electrónico: carmen.garcia@unam.mx

<sup>o</sup> Autor de correspondencia.

sus efectos benéficos en la salud a partir de la llamada “paradoja francesa”, definida como la protección o reducción de enfermedades cardiovasculares por el consumo regular y moderado de bebidas alcohólicas, especialmente vino tinto (Artero, Artero, Tarín & Cano, 2015; Biagi & Bertelli, 2015). Por consumo regular y moderado, según las “Guías Alimentarias”, se considera al día un vaso de 150 ml de vino o 10 g de alcohol para las mujeres, y el equivalente a dos vasos de vino (300 ml de vino o 20 g de alcohol) para los hombres. Aunque, estas recomendaciones pueden variar de acuerdo a la edad, estilo de vida, dieta, uso de drogas o suplementos, entre otros (Sancho & Mach, 2015; U.S. Department of Health and Human Services, 2011).

La ingesta de vino tinto, además de incrementar la capacidad antioxidante (Whitehead, Robinson, Allaway, Syms & Hale, 1995), reduce las lipoproteínas de baja densidad (LDL), modula las vías de señalización celular y reduce la agregación de plaquetas (Lindberg & Amsterdam, 2008; Pandey & Rizvi, 2009), lo que puede explicar la reducción en el riesgo de las enfermedades cardiovasculares. A partir de diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se han podido atribuir los efectos benéficos a la salud a sus compuestos polifenólicos, que pueden presentar propiedades anti-inflamatorias, anti-alérgicas, inmuno-moduladoras, anti-bacterianas, anti-virales, anti-fibróticas, hipotensivas, anti-coagulantes y anti-genotóxicas (Artero *et al.*, 2015; García-Rodríguez, Nicolás-Méndez, Montano-Rodríguez & Altamirano-Lozano, 2014; Shahidi & Ambigai-palan, 2015). Además de disminuir la incidencia de patologías neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson e incluso la inducción de algunos tipos de cáncer (Sancho & Mach, 2015; Sun, Wang, Simonyi & Sun, 2008). Los vinos tintos pueden contener hasta 3000 mg/L de compuestos polifenólicos, estos son una mezcla compleja de flavonoides (como las antocianinas y flavan-3-oles) y no flavonoides (como el resveratrol, cinamatos y ácido gálico). Los flavan-3-oles o flavanoles son los más abundantes en el vino tinto, ya que componen hasta el 50% del total de los constituyentes fenólicos. Las variedades *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Carménère* y *Pinot Noir* son las que presentan una mayor concentración. A pesar de que las propiedades benéficas del consumo del vino tinto están siendo ampliamente estudiadas, hay pocos estudios *in vivo* de evaluaciones genotóxicas y citotóxicas debido a la limitación de los estudios clínicos por su naturaleza observacional. Por ello, estudios en los que se emplean modelos experimentales como el ratón pueden ampliar

la información básica para establecer las dosis farmacológicas. El empleo de ensayos como el de micronúcleos (MN) en sangre periférica nos permiten evaluar la genotoxicidad y hacer su seguimiento durante todos los días del tratamiento (cinética de MN), ya que solo se requiere una o dos gotas de sangre de la vena caudal para hacer las evaluaciones. En estas mismas muestras se puede evaluar la citotoxicidad mediante la relación entre los eritrocitos policromáticos/normocromáticos (EPC/ENC) (Hayashi *et al.*, 2000). Por lo que, en el presente trabajo se evaluó la genotoxicidad y la citotoxicidad en sangre periférica de ratones CD-1 tratados por vía oral (*ad libitum* intragástricamente [i.g.]) con las variedades de vino tinto *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Carménère* y *Cabernet Sauvignon/Nebbiolo*, así como con alcohol diluido en los mismos porcentajes contenidos en promedio en los vinos tintos empleados en el estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se emplearon grupos de cinco ratones macho seleccionados al azar de la cepa CD-1, de 2 a 3 meses de edad (35 g – 40 g) obtenidos del bioterio Harlan de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA-Harlan®) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales fueron aclimatados durante dos semanas en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z), UNAM. Se les permitió el libre acceso tanto al agua como al alimento (NUTRI-CUBOS, para roedores pequeños Purina®-México). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (22 °C) y circulación de aire, así como de periodos de luz-oscuridad de 12 h – 12 h (7:00 h – 19:00 h luz). El Comité de Bioética de la FES-Z, UNAM, aprobó los protocolos experimentales utilizados en este estudio.

### Reactivos

Todos los reactivos químicos fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Naranja de Acridina (NA) [CAS No. 10127-02-3]; Bromuro de Etidio [CAS No. 1239-45-8]; Etanol [CAS No. 64-17-5]. Los vinos tintos empleados fueron de marcas comerciales. En la tabla 1 se describen las características y regiones de los vinos empleados en el estudio.

Tabla 1.

Descripción y consumo promedio diario por ratón de las variedades de vino tinto administradas *ad libitum* al 75% durante el estudio (cuatro días).

	Testigo	CS1	CS2	CS/N	Merlot	Carménère
<b>Año cosecha</b>	--	2006	2005	2005	2005	2007
<b>Etanol (%)</b>	--	12.4	14.5	13.0	14.5	13.9
<b>Región Vitícola</b>	--	Valle de Calafia, Baja California, México	Valle de Guadalupe, Baja California, México	Valle de Calafia, Baja California, México	Valle de Guadalupe, Baja California, México	Valle de Rapel, Santiago, Chile
<b>Consumo diario/ ratón (ml)</b>	1.7	1.4	1.5	1.5	1.5	1.6

Cabernet Sauvignon (CS1); Cabernet Sauvignon (CS2); Cabernet Sauvignon/Nebbiolo (CS/N).

Fuente: Elaboración propia.

## Diseño experimental

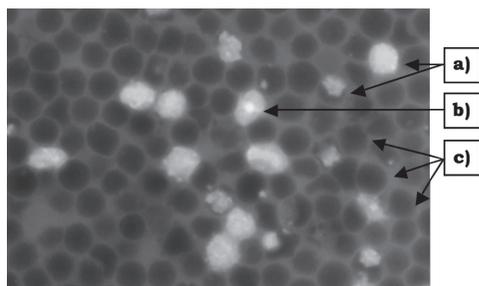
Se seleccionaron las variedades *Cabernet Sauvignon*, *Merlot* y *Carménère* por encontrarse dentro de las variedades de vino tinto más consistentes en cuanto a la cantidad de antioxidantes totales (Van Leeuw, Kevers, Pincemail, Defraigne & Dommès, 2014). De la variedad *Cabernet Sauvignon* se estudiaron dos cosechas, la primera (2006) correspondía al Valle de Calafia, Baja California, México (CS1) y la segunda (2005) correspondía al Valle de Guadalupe, Baja California, México (CS2). También se seleccionó un vino de la variedad *Merlot* del Valle de Guadalupe, Baja California, México, y una mezcla de las variedades *Cabernet Sauvignon/Nebbiolo* (CS/N) de la región del Valle de Calafia, Baja California, México. A excepción del vino tinto *Carménère*, todos corresponden a la misma región (Baja California Norte, México). El vino tinto *Carménère* (Valle del Rapel, Santiago de Chile) se seleccionó debido a que esa cosecha fue denominada como histórica debido a sus propiedades organolépticas. El vino tinto se administró por vía i.g. y *ad libitum*, por ser la vía oral la forma común de “exposición” de los humanos.

Para las administraciones *ad libitum*, se calculó la cantidad consumida de vino tinto y etanol diariamente (índice de consumo diario por ratón) empleando bebederos con control de volumen (graduados/ml). El vino tinto y el etanol se prepararon en “fresco” todos los días, y se administraron inmediatamente. El vino tinto administrado i.g. se empleó sin diluir, se “aplicaron” dos tratamientos de 0.25 ml dos veces al día durante tres días. En los grupos tratados con alcohol se empleó etanol diluido al 10% (*ad libitum*) y al 13.5% (i.g.), ya que estos porcentajes representan el contenido promedio de etanol de los vinos tintos empleados en ambas vías de administración. El grupo testigo fue tratado y mantenido bajo las mismas condiciones que los otros grupos, pero solo se le administró el vehículo. Los grupos fueron conformados de la siguiente manera: a) testigo; solo se administró el vehículo (agua potable), b) tratamientos

*ad libitum*; se les permitió el libre acceso al vino tinto o etanol (diluidos al 75% y 10% respectivamente) durante tres días, y c) tratamientos i.g.; se les administraron dos dosis diarias de 0.25 ml de vino tinto sin diluir o etanol al 13.5% durante tres días.

Se tomaron muestras de sangre periférica (5 µl) de la vena caudal a las 0 h, 24 h, 48 h y 72 h después de iniciados los tratamientos. Las muestras se colocaron directamente sobre laminillas pre-tratadas con NA preparadas de acuerdo con la técnica establecida por Hayashi, Morita, Kodama, Sofuni e Ishidat (1990). Las preparaciones se mantuvieron en la oscuridad a una temperatura aproximada de 4 °C hasta su análisis. Las evaluaciones se realizaron mediante la identificación de EPC, ENC y MN bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot-2) con una excitación azul (480 nm) y un filtro de barrera (515 nm – 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 (figura 1). El daño genotóxico fue cuantificado mediante el análisis de 2000 EPC por cada ratón, en los que se identificó la presencia o ausencia de MN. Mientras que el daño citotóxico se basó en el análisis de 1000 eritrocitos totales por ratón, en los que se estableció la relación EPC/ENC.

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo se establecieron con base en 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 MN a corto plazo en sangre periférica de ratón (Hayashi *et al.*, 2000; Mavournin, Blakey, Cimino, Salamone & Hedde, 1990).



**Figura 1.** Frotis de sangre periférica de ratón teñida con Naranja de Acridina donde se muestran ejemplos de: a) EPC teñidos de color naranja fluorescente (claros); b) MN teñido de amarillo fluorescente en EPC (punto blanco) y c) ENC que se observan como sombras sin teñir.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 2.**

Promedios de MN evaluados en los EPC de los grupos tratados con las diferentes variedades de vino tinto y con etanol *ad libitum* y por vía i.g.

Grupo	N	Hora	MN/EPC <sup>a</sup> media ± d.e. ( <i>ad libitum</i> )	MN/EPC <sup>a</sup> media ± d.e. (i.g.)
Testigo	5	0	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.5
		24	0.1 ± 0.2	1.0 ± 0.3
		48	0.2 ± 0.2	0.9 ± 0.4
		72	0.2 ± 0.3	1.0 ± 0.5
Etanol	5	0	0.7 ± 0.6	0.5 ± 0.3
		24	1.2 ± 0.3	1.5 ± 0.5
		48	1.5 ± 0.4	2.1 ± 0.6 <sup>a,b</sup>
CS1	5	0	0.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0
		24	0.8 ± 0.4	1.7 ± 0.8 <sup>c</sup>
		48	0.7 ± 0.2	1.4 ± 0.4 <sup>c</sup>
		72	0.4 ± 0.4	0.9 ± 0.5
CS2	5	0	0.7 ± 0.2	1.4 ± 0.2
		24	0.8 ± 0.4	1.7 ± 0.5
		48	0.5 ± 0.3	2.2 ± 0.3 <sup>a</sup>
		72	0.4 ± 0.2	1.8 ± 0.3
CS/N	5	0	0.6 ± 0.4	1.1 ± 0.4
		24	0.6 ± 0.4	1.7 ± 0.6
		48	0.4 ± 0.2	1.2 ± 0.5
		72	0.3 ± 0.2	1.2 ± 0.5
Merlot	5	0	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.4
		24	0.4 ± 0.5	1.0 ± 0.3
		48	0.4 ± 0.5	1.9 ± 0.4 <sup>d</sup>
		72	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.3
Carménère	5	0	0.2 ± 0.2	0.9 ± 0.4
		24	0.6 ± 0.6	1.0 ± 0.8
		48	1.0 ± 0.6	1.6 ± 0.8
		72	0.4 ± 0.4	0.9 ± 0.4

Los vinos tintos fueron diluidos al 75% cuando se administraron *ad libitum*. El etanol se diluyó al 10% (*ad libitum*) y al 13.5% (i.g.). CS1 (*Cabernet Sauvignon* 1); CS2 (*Cabernet Sauvignon* 2); CS/N (*Cabernet Sauvignon/Nebbiolo*). <sup>a</sup>*p* < vs. testigo 48 h; <sup>b</sup>*p* < vs. Etanol 0 h; <sup>c</sup>*p* < vs. CS1 0 h; <sup>d</sup>*p* < Merlot 0 h.

<sup>a</sup>1000 EPC por ratón; i.g.

Fuente: Elaboración propia.

## Análisis estadístico

Las frecuencias de MN y la relación de EPC/ENC se presentan como promedios (media ± desviación estándar [d.e.]) y se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey. Mientras que la Frecuencia Neta de la Inducción de MN (NIF-MN, por sus siglas en inglés) se analizó con una Chi-cuadrada. Se emplearon los programas SPSS/PC V18<sup>TM</sup> y Statistica/PC V6.0<sup>TM</sup> para hacer los análisis estadísticos. Se consideró una *p* < 0.05 como significativa.

## RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los consumos promedio diarios por ratón de las diferentes variedades de vino tinto. Se observa que no hay variaciones significativas entre los consumos del vino tinto y el agua (alrededor de 1.5 ml/día). Al evaluar la cinética de MN no hubo efectos significativos en los grupos que se les administró el vino tinto *ad libitum*, y aunque el tratamiento con etanol *ad libitum* incrementó los promedios de MN, estos no resultaron significativos al compararse con el grupo testigo ni contra su propia hora 0, que representa las evaluaciones de cuando aún no se iniciaban los tratamientos (tabla 2). Sin embargo, cuando se administraron los tratamientos por vía i.g. se incrementaron los promedios de MN en los grupos tratados con CS1, CS2 y Merlot. En general el mayor efecto se observó a las 48 h después de iniciados los tratamientos. El grupo tratado con etanol es el que muestra los mayores incrementos que resultaron significativos al compararlos con el grupo testigo y contra su propia hora 0 (tabla 2).

Debido a la variabilidad observada en los promedios de MN en la hora 0 en todos los grupos (tabla 2) y, considerando que a esta hora aún no se iniciaban los tratamientos, se realizó el cálculo del NIF-MN partiendo de la premisa de que la inducción de los MN en la hora 0 de cada grupo es su propio testigo. De ahí que se restó la frecuencia de MN observada en la hora 0 a las evaluadas en las siguientes horas (García-Rodríguez, López-Santiago & Altamirano-Lozano, 2001):

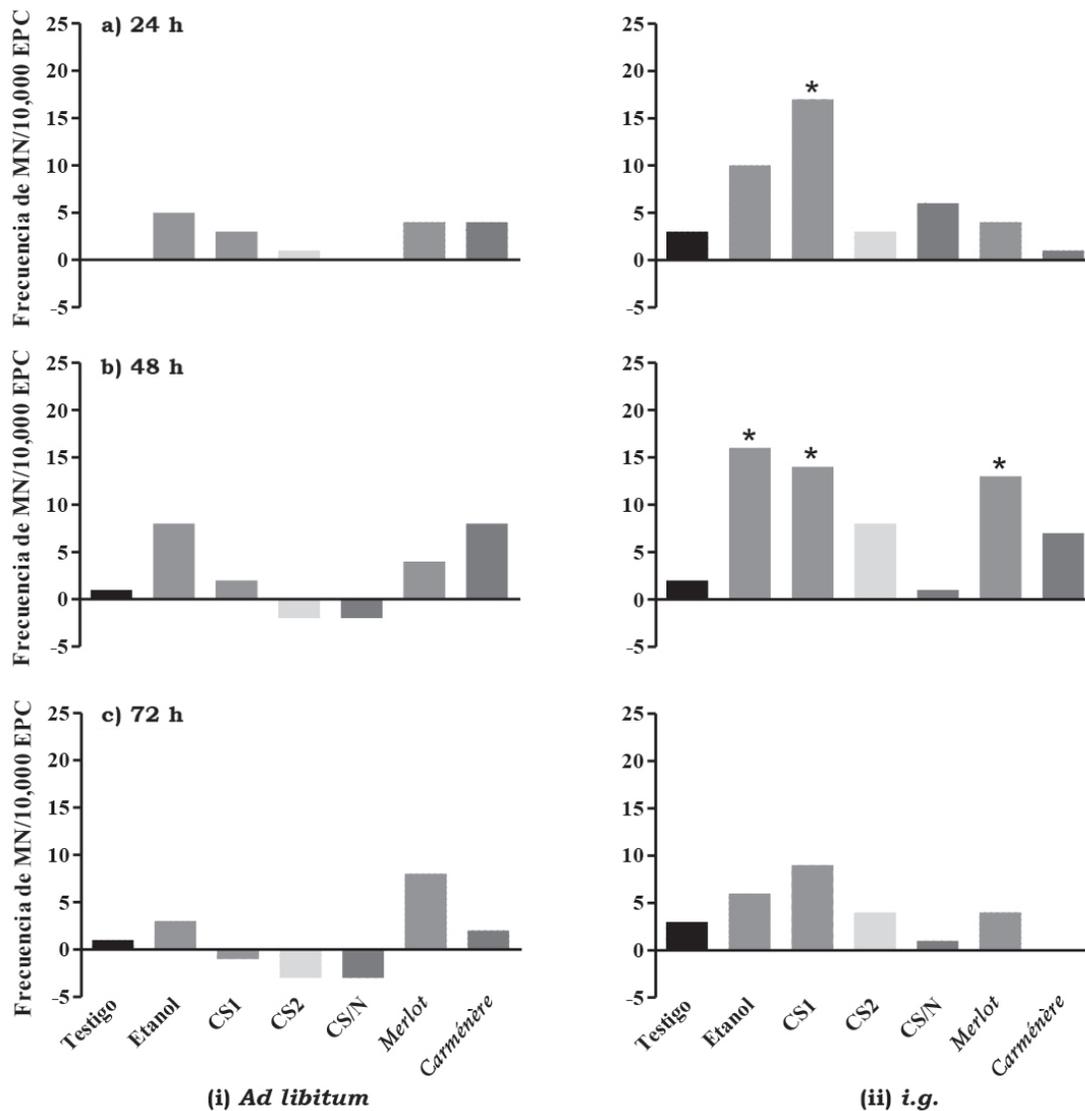
NIF-MN = Número de MN evaluados en el tiempo Xi - Número de MN evaluados en el tiempo 0.

Xi = evaluaciones después de la administración de los tratamientos.

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

En la figura 2 se muestra el análisis por tiempo y por grupo del NIF-MN calculado para 10 000 EPC, en donde se corrobora que los tratamientos *ad libitum* no presentan efectos significativos sobre las frecuencias de MN, de hecho, con este análisis, se observa una tendencia a disminuir los MN basales (CS2 y CS/N) a las 48 h y 72 h, siendo más claro en esta última. Cabe señalar que la diferencia significativa observada a las 48 h en el grupo tratado vía

i.g. con CS2 (tabla 2), una vez realizado el cálculo del NIF, no resulta significativo. Finalmente, en la tabla 3 se muestran los promedios de la relación de los EPC/ENC de los grupos tratados con las diferentes variedades de vino tinto y con etanol al ser administrados *ad libitum* y por vía i.g., en donde se observa que ninguno de los tratamientos modificó significativamente la relación entre los EPC con respecto a los ENC.



**Figura 2.** Representación del cálculo del NIF-MN en las 24 h, 48 h y 72 h después del inicio de los tratamientos con las diferentes variedades de vino tinto y con etanol administrados *ad libitum* (i) e intragastricamente (ii). Significancia: \* $p < 0.05$  vs. testigo. Los vinos tintos fueron diluidos al 75% cuando se administraron *ad libitum*, mientras que el etanol se diluyó al 10% (*ad libitum*) y al 13.5% (i.g.). CS1 (*Cabernet Sauvignon* 1); CS2 (*Cabernet Sauvignon* 2); CS/N (*Cabernet Sauvignon/Nebbiolo*).

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 3.**  
Promedios de EPC con relación a los ENC de los grupos tratados con las diferentes variedades de vino tinto y con etanol *ad libitum* y por vía i.g.

Grupo	N	Hora	EPC/1000 ENC media ± d.e ( <i>ad libitum</i> )	EPC/1000 ENC media ± d.e (i.g.)
Testigo	5	0	72.2 ± 3.1	72.0 ± 8.4
		24	75.8 ± 1.7	77.8 ± 3.8
		48	73.4 ± 3.7	77.2 ± 5.8
		72	73.6 ± 3.5	75.6 ± 3.8
Etanol	5	0	75.4 ± 2.7	78.8 ± 3.0
		24	75.2 ± 5.0	76.4 ± 2.7
		48	75.8 ± 2.5	74.6 ± 2.7
		72	74.6 ± 2.7	73.4 ± 3.3
CS1	5	0	74.2 ± 3.0	91.4 ± 12.7
		24	73.4 ± 2.1	88.0 ± 10.0
		48	73.4 ± 2.9	91.2 ± 13.6
		72	72.6 ± 3.2	82.4 ± 3.8
CS2	5	0	73.0 ± 2.5	73.8 ± 3.7
		24	72.8 ± 2.4	70.6 ± 3.8
		48	71.6 ± 4.6	68.0 ± 4.2
		72	72.8 ± 2.7	64.0 ± 2.8
CS/N	5	0	73.4 ± 3.2	80.6 ± 8.0
		24	73.2 ± 3.0	74.2 ± 6.8
		48	71.6 ± 3.6	68.0 ± 4.1
		72	73.8 ± 3.0	73.8 ± 3.7
Merlot	5	0	72.0 ± 2.9	82.0 ± 4.6
		24	70.8 ± 3.0	79.6 ± 3.8
		48	69.2 ± 1.9	77.4 ± 2.3
		72	71.8 ± 2.8	74.6 ± 2.1
Carménère	5	0	72.8 ± 3.3	74.0 ± 4.6
		24	71.8 ± 5.9	71.0 ± 4.9
		48	65.0 ± 3.4	60.4 ± 2.7
		72	74.4 ± 4.5	68.2 ± 4.8

Los vinos tintos fueron diluidos al 75% cuando se administraron *ad libitum*.

El etanol se diluyó al 10% (*ad libitum*) y al 13.5% (i.g.).

CS1 (*Cabernet Sauvignon* 1); CS2 (*Cabernet Sauvignon* 2); CS/N (*Cabernet Sauvignon/Nebbiolo*). i.g. (intragástrica).

Fuente: Elaboración propia.

## DISCUSIÓN

Si bien el consumo de bebidas alcohólicas ha sido ampliamente cuestionado por los profesionales de la salud, el consumo moderado de vino tinto ha mostrado efectos benéficos en la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Iriti & Varoni, 2014). Sin embargo, dentro de los resultados observados tanto en los estudios epidemiológicos como en los clínicos hay datos contradictorios, ya que si bien en algunos se reportan efectos fisiológicos en la modulación de algunas enfermedades, en otros no se han presentado efectos dañinos asociados al consumo del vino tinto (Biagi &

Bertelli, 2015; Xiang *et al.*, 2014). Esto puede ser debido a que el consumo de vino tinto en humanos es afectado por factores socioeconómicos y el estilo de vida (Yoo, Saliba, McDonald, Prenzler & Ryan, 2013). Aunado a que las concentraciones y componentes del vino también pueden variar dependiendo de la variedad de la vid, la región, el tipo de vino, el clima, la cosecha (temprana o tardía), los procedimientos de prensado de la uva, el tiempo/tipo de fermentación (mosto con la piel y las semillas), el proceso de envejecimiento, etc. (Stockham *et al.*, 2013; Van Leeuw *et al.*, 2014; Waterhouse, 2002). De ahí que las dosis farmacológicas han generado dudas sobre la extrapolación clínica por la limitación de los estudios clínicos dada su naturaleza observacional. De ahí que los estudios *in vivo* empleando animales de experimentación resultan un buen modelo para controlar estos factores o variables. El ensayo de MN *in vivo* (roedores) se utiliza como batería de prueba reglamentaria para predecir la carcinogenicidad de los agentes químicos mediante su capacidad para producir genotoxicidad evaluada mediante el daño clastógeno y aneuploidógeno (Tweats *et al.*, 2007). De manera simultánea a las evaluaciones de MN se debe establecer la relación entre EPC/ENC, ya que es un indicador de citotoxicidad principalmente presentada por una reducción de los EPC (muerte celular) (Hayashi *et al.*, 2000). En el presente trabajo se evaluó la cito/genotoxicidad en ratones tratados i.g. y *ad libitum* con las variedades de vino tinto *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Carménère* y *Cabernet Sauvignon/Nebbiolo*. Estas variedades se seleccionaron por ser las que presentan una cantidad de antioxidantes más consistente (Van Leeuw *et al.*, 2014). Los vinos correspondieron a la misma región (Baja California Norte, México), dado que no hay estudios de evaluaciones genotóxicas y citotóxicas de las variedades de vino tinto producidas en particular en nuestro país. Solo se consideró el vino tinto *Carménère* de otra región (Valle del Rapel, Santiago de Chile) con el propósito de comparar los resultados por ser una cosecha denominada como histórica debido a sus propiedades organolépticas.

A pesar del sabor del vino tinto, el consumo promedio diario por ratón (alrededor de 1.5 ml) no se afectó al compararse con el consumo promedio diario del grupo testigo. La dosis consumida diaria por ratón (tratamiento *ad libitum*) equivale a consumir aproximadamente dos botellas de vino tinto durante 24 h en humanos, a pesar de que esta cantidad representa seis veces la cantidad recomendada (regular y moderada), no se observaron efectos significativos en las frecuencias de MN y la relación de los EPC/ENC (tablas 2 y 3, figura 2), por el contrario se observó un tendencia

a disminuir las frecuencias basales (figura 2). El vino tinto se diluyó al 75% cuando fue administrado *ad libitum*, esto con base en un estudio previo donde se observó que la administración sin diluir de vino tinto (*Cabernet Sauvignon*) presentaba efectos fisiológicos debido a la falta de consumo de agua (García-Rodríguez, Mateos-Nava & Altamirano-Lozano, 2015), al diluir el vino tinto con agua potable se logra afectar lo menos posible el consumo de agua en los organismos (deshidratación) al ser esta la única fuente de líquidos a la que tuvieron acceso los ratones durante el estudio. En un estudio *ex vivo* realizado con muestras de sangre periférica obtenidas a las 1 h, 3 h, 8 h y 24 h de 4 personas que consumieron una sola dosis de 300 ml de vino tinto, se observó una disminución de MN en linfocitos expuestos a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) mediante la técnica del bloqueo-citocinesis, las reducciones resultaron tiempo-dependientes, siendo mayor la reducción en las muestras obtenidas después de la primer hora post-consumo (Fenech, Stockley & Aitken, 1997). Esto sugiere una protección del daño oxidante inducido por el  $H_2O_2$  mediada por los componentes antioxidantes del vino tinto. Se ha observado que en particular los compuestos fenólicos del vino tinto son capaces de proteger del daño al ADN inducido por agentes oxidantes *in vitro* (Greenrod & Fenech, 2003; Macedo *et al.*, 2013) e *in vivo* (García-Rodríguez, Carvente-Juárez & Altamirano-Lozano, 2013; García-Rodríguez *et al.*, 2014), por lo que la tendencia a la disminución de los MN basales observada en el presente estudio pudiera estar relacionada con estos componentes fenólicos del vino tinto, sin embargo es necesario ampliar este tipo de estudios probando específicamente los componentes antioxidantes del vino tinto para obtener datos concluyentes sobre su posible protección del daño genotóxico.

Cuando se administró a los ratones por vía i.g. un tercio de la dosis consumida *ad libitum* de los vinos tintos se observaron incrementos en los MN significativos particularmente con las variedades de *C1*, *Merlot* y con el etanol, siendo mayor incluso para este último. El hecho de que las dosis consumidas *ad libitum* no presentaran efectos a pesar de ser mayores que las administradas i.g., nos permite sugerir que las frecuencias de MN observados podrían estar relacionados con la biodisponibilidad, farmacodinámica y farmacocinética tanto del etanol como de los antioxidantes presentes en cada variedad de los vinos estudiados (Biagi & Bertelli, 2015; Choy, Black, Mandakas, Mirro & Black, 1995; Van Leeuw *et al.*, 2014). De igual manera es recomendable identificar y cuantificar las concentraciones de los antioxidantes que presentan en particular cada

una de las variedades de vino tinto, con la finalidad de realizar correlaciones tanto de su posible protección del daño genotóxico, como de su relación con los posibles beneficios en la salud humana.

Cabe señalar que, aunque los incrementos en los MN resultaron significativos, estos no representan un daño genotóxico claro, ya que con base en los lineamientos de la FDA y la OECD se considera un agente genotóxico aquel que induce más de 3 MN/1000 EPC (Heddle *et al.*, 1983; Topham, Albanese, Bootman Scott & Tweats, 1983).

La mayoría de los profesionales médicos están de acuerdo en no promocionar el consumo de vino tinto únicamente por razones de salud, ya que no se debe reemplazar un estilo de vida saludable por el consumo de vino. Sin embargo, los consumidores moderados de vino, sin complicaciones médicas, pueden considerar su consumo de vino como un hábito saludable. No obstante, más ensayos clínicos son necesarios para elucidar los mecanismos de la acción del alcohol y los componentes polifenólicos del vino tinto.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó en un modelo experimental *in vivo* que dosis incluso superiores a las recomendadas no inducen daño cito/genotóxico (por el contrario, se muestra una tendencia a reducirlo) siempre y cuando sean consumidas a lo largo del día (*ad libitum*) y no de manera aguda (i.g.). Nuestros hallazgos nos permiten sugerir también que los incrementos de MN observados por la administración i.g. del vino tinto podrían estar relacionados con la biodisponibilidad, farmacodinámica y farmacocinética del etanol y de los antioxidantes del vino tinto.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), mediante la DGAPA-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-IN219216 y PAPIIT-IN209309). También expresamos nuestro particular agradecimiento a Alejandro Gordillo Martínez y a Lourdes Hernández Cortés por su apoyo técnico.

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

## REFERENCIAS

- Artero, A., Artero, A., Tarin, J. J., & Cano, A. (2015). The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas*, 80(1), 3-13.
- Biagi, M., & Bertelli, A. A. (2015). Wine, alcohol and pills: What future for the French paradox? *Life Sciences*, 131(1), 19-22.
- Choy, W. N., Black, W., Mandakas, G., Mirro, E. J., & Black, H. E. (1995). A pharmacokinetic study of ethanol inhibition of micronuclei induction by urethane in mouse bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, 341(4), 255-263.
- Fenech, M., Stockley, C., & Aitken, C. (1997). Moderate wine consumption protects against hydrogen peroxide-induced DNA damage. *Mutagenesis*, 12(4), 289-296.
- García-Rodríguez, M. C., López-Santiago, V., & Altamirano-Lozano, M. (2001). Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research*, 496(1-2), 145-151.
- García-Rodríguez, M. C., Carvente-Juárez, M. M., & Altamirano-Lozano, M. A. (2013). 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. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (1), 1-9.
- García-Rodríguez, M. C., Nicolás-Méndez, T., Montano-Rodríguez, A. R., & Altamirano-Lozano, M. A. (2014). Antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), quercetin, and rutin on chromium trioxide-induced micronuclei in the polychromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 77(6), 324-336.
- García-Rodríguez, M. C., Mateos-Nava, R. A. & Altamirano-Lozano, M. A. (2015). 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]. *Nutrición Hospitalaria*, 32(4), 1645-1652.
- Greenrod, W., & Fenech, M. (2003). The principal phenolic and alcoholic components of wine protect human lymphocytes against hydrogen peroxide- and ionizing radiation-induced DNA damage *in vitro*. *Mutagenesis*, 18(2), 119-126.
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., & Ishidat, M. Jr. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, 245(4), 245-249.
- Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I., Blakey, D. H., Dertinge, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., & Sutuo, S. (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 234-252.
- Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavoumin, K., McGregor, J. T., Newell, G. W., & Salamone, M. F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 123(1), 61-118.
- Iriti, M., & Varoni, E. M. (2014). Cardioprotective effects of moderate red wine consumption: Polyphenols vs. ethanol. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(4), 193-202.
- Lindberg, M. L., & Amsterdam, E. A. (2008). Alcohol, wine, and cardiovascular health. *Clinical Cardiology*, 31(8), 347-351.
- Macedo, F. L., Rogero, M. M., Guimaraes, J. P., Granato, D., Lobato, L. P., & Castro, I. A. (2013). Effect of red wines with different *in vitro* antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. *Food Chemistry*, 137(1-4), 122-129.
- Mavoumin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F., & Heddle, J. A. (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 239(1), 29-80.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.
- Sancho, M., & Mach, N. (2015). Efecto de los polifenoles del vino sobre la prevención del cáncer. *Nutrición Hospitalaria*, 31(2), 535-551.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects-A review. *Journal of Functional Foods*, 18(1), 820-897.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11(5), 287-313.
- Stockham, K., Sheard, A., Paimin, R., Buddhadasa, S., Duong, S., Orbell, J. D., & Murdoch, T. (2013). 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. *Food Chemistry*, 140(3), 500-506.
- Sun, A. Y., Wang, Q., Simonyi, A., & Sun, G. Y. (2008). Botanical phenolics and brain health. *Neuromolecular Medicine*, 10(4), 259-274.
- Topham, J., Albanese, R., Bootman, J., Scott, D., & Tweats, D. (1983). *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, pp. 119-141.
- Tweats, D. J., Blakey, D., Heflich, R. H., Jacobs, A., Morita, T., Nohmi, T., O'Donovan, M. R., Sasaki, Y. F., Sofuni, T., & Tice, R. (2007). Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(1), 78-91.

- U.S. Department of Health and Human Services. (2011). U.S. Department of Agriculture. Dietary guidelines for Americans 2010. Washington: US Government Printing Office.
- Van Leeuw, R., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2014). Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of *Pinot Noir*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36(1-2), 40-50.
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 21-36.
- Whitehead, T. P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J., & Hale, A. (1995). Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clinical Chemistry*, 41(1), 32-35.
- Xiang, L., Xiao, L., Wang, Y., Li, H., Huang, Z., & He, X. (2014). Health benefits of wine: Don't expect resveratrol too much. *Food Chemistry*, 156(1), 258-263.
- Yoo, Y. J., Saliba, A. J., McDonald, J. B., Prenzler, P. D., & Ryan, D. (2013). A cross-cultural study of wine consumers with respect to health benefits of wine. *Food Quality and Preference*, 28(2), 531-538.