



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales ZARAGOZA

"Efecto del Pentóxido de Vanadio sobre la  
Frecuencia de Intercambio de Cromátidas  
Hermanas (ICH's) en la Médula Osea  
de Ratón"

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
ALVAREZ BARRERA LUCILA

Director de Tesis:  
M. en C. MARIO ALTAMIRANO LOZANO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

	Pág.
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
LOS METALES COMO CONTAMINANTES .....	6
EL VANADIO .....	13
CONTAMINACION POR VANADIO .....	17
TOXICIDAD DEL VANADIO .....	19
SISTEMA DE PRUEBA UTILIZADOS	
PARA DETECTAR DAÑO .....	23
INTERCAMBIO DE CROMATIDAS	
HERMANAS (ICH's) .....	25
SISTEMAS DE PRUEBA <u>in vivo</u> .....	27
MEDULA OSEA COMO SISTEMA DE	
PRUEBA .....	28
ICH's <u>in vivo</u> .....	29
JUSTIFICACION .....	32
HIPOTESIS .....	33
OBJETIVOS .....	34
MATERIAL Y METODO .....	35
RESULTADOS .....	42
DISCUSION .....	50
CONCLUSIONES .....	60
REFERENCIAS .....	62

## RESUMEN

Los metales y sus compuestos constituyen una gran fuente de contaminantes químicos, particularmente en regiones altamente industrializadas. La exposición del hombre a estos compuestos provoca en algunas ocasiones enfermedades, las cuales pueden manifestarse de diferentes formas.

La combustión de aceites y derivados del petróleo como fuentes de energía ha emitido una gran cantidad de estos elementos en el ambiente, dentro de los cuales se encuentra el vanadio, metal que ha demostrado una alta actividad toxicológica. El vanadio se acumula en el organismo y afecta diversos órganos, siendo la forma pentavalente la más tóxica para el hombre.

En el presente trabajo se analizan los efectos causados por el Pentóxido de Vanadio sobre las células de la médula ósea de ratón. Para esto se aplicaron intraperitonealmente tres diferentes dosis 5.75  $\mu\text{g}$ , 11.5  $\mu\text{g}$  y 23.0  $\mu\text{g}$  de peso del ratón (1/4, 1/2 y la  $\text{LD}_{50}$ , respectivamente), a ratones macho de la cepa CD-1 de aproximadamente 30-45 días de edad, encontrándose que: los ratones tratados no presentaron diferencias significativas en cuanto al número y distribución de ICH's, ni en la tasa de proliferación celular. El índice mitótico fue el único que presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$  con Prueba de Diferencia de Proporciones 2), un incremento en el grupo tratado con 1/2  $\text{LD}_{50}$  y una disminución en el grupo tratado con la  $\text{LD}_{50}$ .

## INTRODUCCION

La industria y el proceso tecnológico han originado un ambiente muy contaminado, lo cual ha motivado una gran preocupación por el daño que esto pueda causar a la salud del hombre (Brooks, et al., 1984).

Conforme a la naturaleza del agente contaminante se suele distinguir entre contaminación biológica, contaminación física y contaminación química (Tabla 1).

Tabla 1. TIPOS DE CONTAMINACION

Tipo	Ejemplos
BIOLOGICA	Virus Bacterias Protozoarios Otros parásitos Hongos Vegetales
FISICA	Calor Ruido Radiaciones
QUIMICA	Hidrocarburos Metales Plaguicidas.

Tomada de Albert 1988.

El origen de la acumulación de estas sustancias en el ambiente generalmente se debe a las actividades del hombre, aunque existe además la contaminación química de origen natural, ejemplos de ésta son la contaminación de granos por micotoxinas y

## INTRODUCCION

La industria y el proceso tecnológico han originado un ambiente muy contaminado, lo cual ha motivado una gran preocupación por el daño que esto pueda causar a la salud del hombre (Brooks, et al., 1984).

Conforme a la naturaleza del agente contaminante se suele distinguir entre contaminación biológica, contaminación física y contaminación química (Tabla 1).

Tabla 1.	TIPOS DE CONTAMINACION
Tipo	Ejemplos
BIOLOGICA	Virus Bacterias Protozoarios Otros parásitos Hongos Vegetales
FISICA	Calor Ruido Radiaciones
QUIMICA	Hidrocarburos Metales Plaguicidas.

Tomada de Albert 1988.

El origen de la acumulación de estas sustancias en el ambiente generalmente se debe a las actividades del hombre, aunque existe además la contaminación química de origen natural, ejemplos de ésta son la contaminación de granos por micotoxinas y

la contaminación de la atmósfera por las erupciones volcánicas (Albert, 1988).

A diferencia de la contaminación química natural, la contaminación química de origen antropogénico se debe principalmente a la entrada al ambiente de sustancias sintéticas (xenobióticas) (Albert, 1988).

Las sustancias sintetizadas por el hombre han aumentando de una manera casi exponencial. Así mientras que en 1960 se habían descrito poco más de un millón de sustancias químicas, en 1985 se conocían ya seis millones (IRPTC, 1985), siendo de uso cotidiano 70,000, de las cuales aproximadamente 1,500 son principios activos de plagicidas, 4,000 son fármacos y 10,000 se emplean en la elaboración de cosméticos (Albert, 1988).

En el caso del ser humano, la exposición a estos agentes es diaria, ya sea de manera cotidiana o laboral, lo cual origina que los agentes químicos estén en contacto casi permanentemente con el organismo (Sorsa et al., 1982).

Los daños producidos por estos agentes pueden ser a diferentes niveles, pudiendo afectar de manera individual o en conjunto a distintos órganos; por ejemplo, los pulmones pueden sufrir quemaduras si se inhalan altas concentraciones de sustancias como ácido o bases. La inhalación de amoníaco, óxidos de nitrógeno, dióxido de azufre y cloro, ocasionan quemaduras que pueden conducir a la aparición de un edema pulmonar (Ortiz-Monasterio et al., 1987).

Muchos agentes químicos industriales pueden interferir con la habilidad de la hemoglobina para fijar y liberar oxígeno, entre ellos el monóxido de carbono que se fija a la hemoglobina y modifica el transporte de oxígeno, privando a los tejidos de este elemento; lo mismo ocurre con el benceno, cloruro de vinilo y el plomo, metal que además daña la membrana de los glóbulos rojos (Ortiz-Monasterio et al., 1987).

La inflamación del hígado puede ser ocasionada por la exposición a agentes químicos como el tetracloruro de carbono, tetracloroetano y otros derivados halogenados; metales como antimonio, berilio, cadmio, manganeso y selenio, el fenol, naftaleno o nitrobenceno pueden causar hepatitis o fibrosis hepática, conocida como cirrosis (Ortiz-Monasterio et al., 1987).

Además de los efectos tóxicos, los agentes químicos son capaces de producir daño a nivel más profundo, esto es, muchos de ellos pueden producir alteraciones en el material genético, alterar el proceso reproductivo o producir cáncer (Tabla 2) (Ortiz-Monasterio et al., 1987; Nielsen, 1988).

Dentro de los efectos de mayor repercusión en la población se encuentran los de tipo reproductivo como la impotencia, la esterilidad, las pérdidas fetales, la muerte perinatal, los defectos congénitos y la muerte infantil. Entre los compuestos que dañan al sistema reproductor se pueden mencionar al cloruro de vinilo (mutación en células germinales), DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis-(para clorofenil)-etano), PCB (policlorobifenilos),



cloropreno y epíclorhidrina (infertilidad en el varón), benceno, plomo (infertilidad en la mujer) (Ortiz-Moasterio et al., 1987).

Cuando el compuesto es capaz de alterar el desarrollo normal de un nuevo organismo se dice que este compuesto es teratogénico. Una sustancia provoca un efecto de este tipo cuando es absorbida por la madre gestante y actúa preferencialmente sobre el embrión en estados específicos de su desarrollo, induciendo anomalías que pueden o no originar su muerte (Moutschen, 1985; Ortiz-Monasterio et al., 1987).

Tabla 2. Efectos causados por algunos de los contaminantes ambientales (Ortiz-Monasterio et al., 1987).

EMBRIOTOXICIDAD	ANOMALIAS DEL DESARROLLO	DAÑO HEPATICO
Benceno	PCB	Metales pesados
PCB	Arsénico	Berilio
Plomo	Cadmio	Bismuto
Arsénico	Plomo	Benceno
Mercurio	Mercurio	
AFECCIONES EN:		
SISTEMA NERVIOSO	APARATO RESPIRATORIO	SISTEMA CARDIO-VASCULAR
Metales pesados	Asbestos	
Acetatos	Amoniaco	Disulfuro de c.
Alcoholes	Oxido de nitrógeno	Plomo
Monóxido de carbono	Cloro	
Plaguicidas	Bromo	
EFECTO:		
TERATOGENICO	CARCINOGENICO	MUTAGENICO EN CELULAS GERMINALES.
Aldrín	Arsénico	
Plaguicidas	Asbestos	
DMSO	Benceno	Cloruro de vinilo
Dioxinas	Cromo	
Hexaclorofeno	Radiaciones	CANCER EN LA DESCENDENCIA
	Niquel	
	Isopropilo	Hidrocarburos
		Plomo

Sin embargo, cuando una sustancia es capaz de afectar un tejido y producir una respuesta neoplásica en éste, se dice que es un agente carcinogénico, esto es, que es capaz de producir cancer (Ashby, 1982).

Por otro lado, uno de los blancos importantes es el material genético. Las alteraciones en la información del ácido desoxirribonucleico (ADN) son el resultado de pequeños cambios en su estructura, por lo que la secuencia de bases que se transmite a la descendencia es diferente a la del progenitor, lo cual conduce a que el organismo que lo presenta tenga respuestas diferentes a las normales (mutaciones), causando daño a diferentes niveles (Sorsa et al., 1982; Tice, 1986).

Tales daños pueden alterar las funciones metabólicas, producir esterilidad e incrementar las enfermedades genéticas, efectos que van a ser expresados en las siguientes generaciones traducirse en mutaciones capaces de provocar cambios que favorezcan el desarrollo de cáncer y problemas de envejecimiento prematuro (Figura 1.) (Moutschen, 1985; Tice, 1986; Forni y Bertazzi, 1987; Ortiz-Monasterio et al., 1987).

En 1985 Moutschen propuso una clasificación general de las sustancias mutagénicas presentes en el ambiente de acuerdo a su origen (Tabla 3), destacando los metales.

#### LOS METALES COMO CONTAMINANTES.

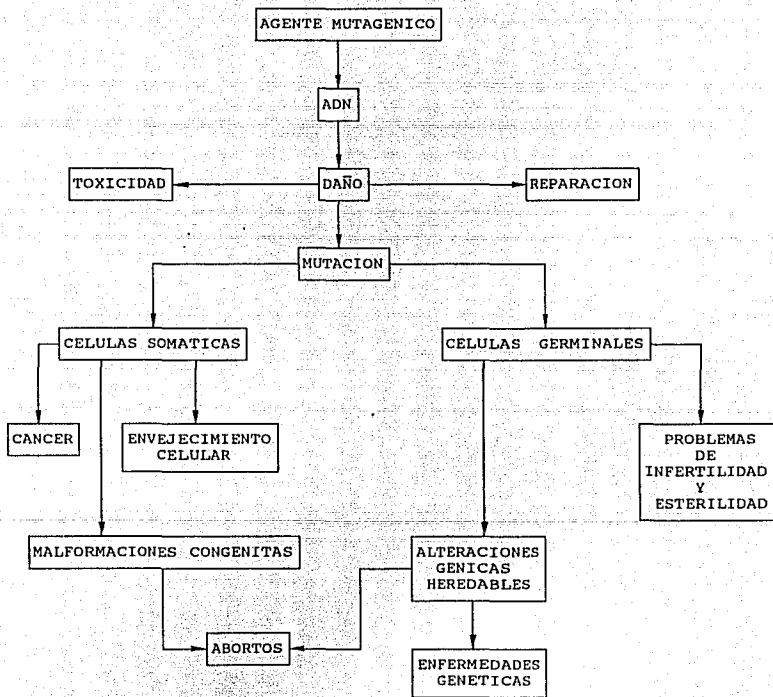
Dentro de los elementos considerados como muy peligrosos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos de

Norteamérica, por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) los metales ocupan un lugar importante, ya que ha sido ampliamente demostrada su toxicidad y los efectos adversos sobre los organismos (Smith, 1973; Rosas et al, 1980; Nemcsók y Boross, 1982; Falahi-Ardakani, 1984; Ortiz-Monasterio et al., 1987; Friberg y Nordberg, 1990).

En la naturaleza existe un gran número de metales. De los 109 elementos identificados cerca de 80 son considerados metales. Algunas de sus características son definidas con base en sus propiedades físicas, tales como el brillo, la ductibilidad, la conductividad, su estructura cristalina característica en estado sólido y por su poder para formar una amplia gama de compuestos en diferente estado de oxidación, incluyendo compuestos inorgánicos, complejos con metales y compuestos coordinados de metales y organometálicos (Vouk, 1990).

Los elementos metálicos se encuentran en todos los organismos vivos, donde desempeñan una gran variedad de funciones, como elementos estructurales, estabilizadores de la estructura biológica, componentes de los mecanismos de control (nervios, musculos), o funcionan como compuestos o activadores enzimáticos de sistemas redox (Clarkson, 1990; Friberg y Nordberg, 1990). Sin embargo, a pesar de que algunos metales pueden jugar un papel esencial en la evolución de los sistemas vivientes, la mayoría, en ciertas concentraciones, pueden ser tóxicos (Weiss, 1983).

Figura 1. Posibles efectos en el hombre del daño producido en el ADN por agentes mutagénicos.



(Modificado de Altamirano, 1989)

Tabla 3.- Clasificación de las sustancias mutagénicas de acuerdo a su origen.

---

Grupo 1: Sustancias mutagénicas sintetizadas por el hombre y usadas directamente en condiciones específicas.

- A. Fármacos
- B. Pesticidas
- C. Aditivos
- D. Contaminantes Biológicos.

Grupo 2: Sustancias mutagénicas usadas en la industria o subproductos de la industria, que se encuentran en el ambiente.

- A. Agentes Alquilantes Industriales.
- B. Solventes Orgánicos y compuestos organo-metalicos.
- C. Contaminantes del agua
- D. Contaminantes del aire
- E. Metales Pesados.

Grupo 3: Sustancias mutagénicas naturales

- A. Alcaloides
  - B. Productos del Metabolismo Microbiano.
- 

Moutschen, 1985.

Los metales producen una gran diversidad de efectos en el hombre, por ejemplo sobre la piel, las membranas pulmonares o el tracto gastrointestinal, además de ser productores de alergias o tener efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos (Clarkson, 1990).

Se ha visto que ciertos compuestos metálicos pueden provocar depósitos de colesterol en los vasos sanguíneos pequeños, por ejemplo, el plomo forma placas que estrechan los vasos, dificultan la circulación sanguínea y favorecen la incidencia de ataques cardíacos (Ortiz-Monasterio et al., 1987).

El modo de acción de los metales a nivel celular es diverso.

Se sabe que son capaces de afectar el sistema de membranas, al cambiar la permeabilidad de la célula o de la membrana mitocondrial, con lo cual pueden ocasionar una variación del metabolismo, o en algunas ocasiones puede disminuir la estabilidad de las membranas de los lisosomas, lo cual originaría disturbios celulares a través de la liberación de hidrolasas ácidas (Sharma y Talukder, 1987).

A nivel molecular, los metales pueden interactuar con las proteínas originando su desnaturalización, precipitación y efectos alostéricos, afectando con esto la síntesis de las mismas (Sabbioni et al, 1983). Alternativamente, los metales pueden ligarse a los ácidos nucleicos y formar fuertes asociaciones no covalentes, interactuar con el huso acromático y causar disturbios en la segregación normal de los cromosomas (Sorsa et al., 1982), alterando la conformación de las nucleoproteínas. En cualquiera de estos casos, las actividades pueden afectar la división celular, la estructura y la conducta del aparato genético (Sabbioni et al, 1983).

Entre los metales que han mostrado tener efectos carcinogénicos se encuentran el berilio (Be) (Sharma y Talukder, 1987) y compuestos de cobalto (Co), plomo (Pb), manganeso (Mn) y fierro (Fe) (Rossman, et al., 1984).

El cadmio (Cd) induce tumores testiculares en ratas y causa un incremento en la mortalidad por cáncer de pulmón (Popenoe y Schmaeler, 1979), afectando también la capacidad de división

celular (Deknudt y Deminatti, 1978).

Además de su potencial toxicológico los metales, como por ejemplo el cromo (Cr), plomo (Pb), níquel (Ni), zinc (Zn), cadmio (Cd) y mercurio (Hg), son capaces de inducir mutaciones, aberraciones cromosómicas y alterar el proceso reproductivo (ECETOC, 1983; Villanueva et al., 1988).

Los antecedentes de los efectos mutagénicos de los metales sobre la población humana son numerosos, en Japón, por ejemplo, se detectó un incremento de las alteraciones cromosómicas en personas que consumían grandes cantidades de pescado. El análisis del pescado mostró concentraciones de mercurio de 1mg/kg de peso, metal considerado altamente peligroso para la salud humana. Los compuestos organomercuriales aparecen en el medio por causa de los pesticidas, la combustión de gases, etc. Tienden a acumularse, al igual que la mayoría de los metales, en los organismos vivos. Se sabe que de los 317 pesticidas conocidos, sólo 12 de ellos presentan mercurio dentro de sus componentes, sin embargo, estos 12 son de los más empleados en la agricultura (Harada, 1975).

Para algunos metales, como el cromo, selenio y arsénico el potencial genotóxico depende del estado de oxidación del ión metálico, cromo (III) inorgánico es inactivo en sistemas de ensayo usando células intactas, mientras Cr (VI) es positivo en todos estos ensayos. En ensayos de aberraciones cromosómicas, los compuestos de arsénico trivalentes son más activos que los

compuestos pentavalentes; los compuestos de Se (IV) son más potentes que los de selenio (VI) (Hansen y Stern, 1984).

De los metales el cobre es único del que se cuenta con información suficiente sobre su efecto mutagénico. El cobre se une con el fosfato de los nucleótidos de los ácidos nucleicos, lo cual produce una infidelidad en la síntesis del ADN (Sideris et al., 1981). Por su lado el sulfato de cobre induce desintegración de la cromatina y disminuye el índice mitótico (Sing y Sharma, 1981).

Los trabajos realizados con cromo muestran que este metal no es muy tóxico como tal. Sin embargo, la administración de algunos de sus derivados a ratas induce alta frecuencia de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, además de producir bloqueo de la espermatogénesis y esterilidad temporal (Lower et al., 1978; Popence y Schmaeler, 1979; Garza y Leal, 1981; Jorma et al., 1981).

Algunos de los metales que han mostrado actividad clastogénica son el sodio y el potasio, los cuales en concentraciones altas afectan el nivel osmótico de las células (Sharma y Talukder, 1987).

Los resultados de las pruebas realizadas con metales a nivel mutagénico son variados. La mayoría de los metales actúan de manera diferente y su acción depende del organismo empleado, (Tabla 4) (Hansen y Stern, 1984) lo que dificulta su clasificación toxicológica.



Dentro de los elementos metálicos encontramos a los elementos de transición (aproximadamente 56), los cuales poseen una química extremadamente compleja, algunos de ellos son de gran interés por sus efectos toxicológicos, entre ellos están: Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Mo, Os, Ir y Pt (Vouk, 1990).

Muchos de los metales antes mencionados son considerados metales pesados. Se suele llamar metal pesado a aquel cuya densidad es superior a  $5 \text{ g/cm}^3$ , mientras que los ligeros presentan una densidad inferior a éstos (Smith 1973; Duffus, 1983).

Uno de los metales pesados que ha mostrado tener efectos toxicológicos es el Vanadio (V) (Phillips et al., 1983; Alessio et al., 1988).

#### EL VANADIO.

En los últimos años la concentración de vanadio en el ambiente se ha incrementado debido a la gran utilización de combustibles fósiles como el petróleo (aceites crudos y no desulfurizados) y el carbón, los cuales contienen diferentes proporciones de vanadio (Tabla 5) (Baroch, 1983; Carson et al., 1987).

El vanadio es miembro del grupo VB de la tabla periódica y primer elemento de la serie de transición, se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, pero en bajas concentraciones. La litósfera contiene cerca del 0.07% en peso de vanadio (Baroch, 1983), y se encuentra en concentraciones variadas en suelo, agua, plantas y tejidos animales (Phillips et al., 1983).

Tabla 4.- Respuesta a diferentes pruebas o ensayos realizados con algunos metales (Hansen y Stern, 1984).

Ensayo	M E T A L								
	As	Cr	Fe	Pb	Mn	Hg	Ni	Se	V
Daño al ADN en procariotes	*	*	*	-	*	*	*	*	*
Reparación del ADN en procariotes	*	*	o	o	o	o	o	o	o
Mutación en <i>S. typhimurium</i>	-	*	*	-	-	-	-	*	-
Mutación en <i>E. coli</i>	*	*	o	o	o	-	-	*	-
Daño al ADN en células de mamífero	*	*	o	*	*	*	*	*	o
Reparación del ADN de células de mamífero	*	*	o	o	o	o	o	*	o
A. C. en células de mamífero <i>in vitro</i>	*	*	-	*	*	*	*	*	-
Mutación en células de mamífero	*	*	*	*	*	*	*	o	o
Ensayos <i>in vivo</i> con mamíferos	*	*	o	*	o	*	-	*	o
Ensayos con plantas superiores	*	*	*	*	*	*	*	o	o

\* = respuesta positiva - = respuesta negativa o = no ha sido probado

Tabla 5: Promedio del contenido de vanadio en aceites y carbón.

Aceites (industriales)	Contenido V (ppm)	
	rango	promedio
U.S.A. doméstico		
Nuevo México, Colorado, Lousiana (Schroeder, 1963)	(0.1 - 0.5),	X= 0.35
California, Wyoming, Montana	(50 - 75),	X= 60.00
Venezuela (Oeste)	(100 - 1,400),	X= 356.00
Venezuela (Oriente)	(14 - 510),	X= 128.00
Carbón	Contenido V (ppm)	
Variedad Bituminous U.S.A.		
Oriente		30.00
Interior		34.00
Oeste		15.00
Variedad Antracita		125.00

Stokinger, 1981.

Se sabe que el vanadio es un elemento ultratraza esencial en animales superiores, necesario en concentraciones que van desde 50 ng - 1000 ng (Nielsen, 1988), y que además tiene interacción con otros elementos importantes (Hill, 1988).

Aunque en el hombre no se ha podido demostrar su función, el vanadio es necesario para el crecimiento de ratas y pollos (Sabbioni *et al.*, 1983), su deficiencia causa reducción en el crecimiento, deterioro de la reproducción y disturbios en el metabolismo de lípidos (Siemon, *et al.*, 1982); además tiene un papel importante en el metabolismo del hueso (Canalis, 1985).

En la naturaleza, el vanadio generalmente se encuentra en

estado trivalente (Stokinger, 1981), unido a otros minerales, como los de uranio, cobre, plomo y zinc. Además es un constituyente de las magnetitas titaníferas, las cuales se encuentran en grandes yacimientos de la ex-URSS, Sudáfrica, Finlandia, China, Australia y en el este de los EU. En México se encuentra en forma de vanadita  $Pb_5(VO_4)_3Cl$  y descloizita  $4(Cu,Pb,Zn)VO_2O_5$  (Baroch, 1983).

El vanadio generalmente se obtiene como un subproducto de la extracción de los minerales con los que se encuentra asociado como la carnotita  $K(VO_2)_2(VO_4)$  (Stokinger, 1981), en depósitos de roca de fosfato y unido a titanio formando sales con el NaCl (Carson et al., 1987).

El vanadio es un metal de color gris (cuando esta puro); que tiene marcada resistencia a la corrosión y oxidación por ácidos y agua de mar (Stokinger, 1981), por lo cual se utiliza principalmente en la producción de aceros de alta resistencia, mediante la formación de aleaciones con otros metales como el Cu, Cr, Co, Ti, y C, utilizándose en la industria de la construcción y en la aeronáutica (Brawning, 1969; Alessio et al., 1988). Es también importante como  $\beta$ -estabilizador de las aleaciones de titanio, las cuales contienen aproximadamente un 4% de vanadio (Stokinger, 1981; Baroch, 1983).

Los compuestos de vanadio como el  $VO_3$ ,  $VO_4$  y  $VOCl_3$  son usados como catalizadores para reacciones especiales (polimerización de olefinas y reacciones a altas temperaturas)

(Stokinger, 1981), como catalizadores en la industria química (el  $V_2O_5$  se utiliza como catalizador en la industria farmacéutica) (Alessio et al., 1988) y en la producción de aparatos electrónicos y cerámicas (Phillips et al., 1983).

Los compuestos de vanadio son utilizados también como mordentes en la tinción e impresión en telas de algodón, para fijar anilina negra en la seda y en pinturas de secado rápido (Carson et al., 1987). El  $VO_2$  se usa como colorante en cerámicas y vidrio (Stokinger, 1981; Alessio et al., 1988).

#### CONTAMINACION POR VANADIO.

Debido a su amplio uso en la industria, la extracción del vanadio de minas y de combustibles fósiles, incluyendo aceites, carbón, alquitrán y otros minerales, es una fuente importante de comercio en varios países (Stokinger, 1981).

Durante la primera mitad de los años 80, la producción global del vanadio (como pentóxido de vanadio) fue de cerca de 34 a 45 millones de kg, siendo China, Finlandia, Sudafrica, EU y la ex-URSS los mayores productores (Stokinger, 1981).

La concentración de vanadio en el aire urbano varía en un amplio rango (de 0.25 a 300  $ng/m^3$ ). Las grandes ciudades pueden tener un promedio anual de 20-100  $ng/m^3$ , con una elevación en la concentración durante los meses de invierno. Cerca de la industria metalúrgica se encuentran concentraciones de 1  $ug/m^3$  (WHO, 1988) (Tabla 6), sin embargo, su acumulación año con año aumenta.

Tabla 6. Presencia de vanadio en algunos organismos y elementos del ambiente.

Fuente	Rango de concentración
Suelo	3.0-310 ppb
Ríos y lagos	2.0-300 ppb
Agua de mar	0.2-300 ppb
Agua potable	0.0-006 ppb
Plantas	trazas
Aire no urbano	0.0005--0.024 µg/m <sup>3</sup>
Aire urbano	0.25--300 ng/m <sup>3</sup>

Tomado de Phillips et al., 1983.

Grupos especializados en salud laboral han establecido los niveles máximos de concentración de vanadio en el ambiente, que no sean peligrosos para la salud de los individuos que se encuentran en contacto con el elemento (Tabla 7).

Tabla 7. Concentraciones máximas permisibles de vanadio en ambientes laborales (Stokinger, 1981).

	ACGIH(1954)	OSHA(1972)	japoneses(1968)
Vanadio (ferro)	1.0 mg/m <sup>3</sup>	1.0 mg/m <sup>3</sup>	1.0 mg/m <sup>3</sup>
V205 (polvo)	0.5 mg/m <sup>3</sup>	0.5 mg/m <sup>3</sup>	0.5-0.1 mg/m <sup>3</sup>
V205 (gases)	0.1 mg/m <sup>3</sup>	0.1 mg/m <sup>3</sup>	0.5-0.1 mg/m <sup>3</sup>
(1972)	0.05 mg/m <sup>3</sup>		

ACGIH= Committee of the American Conference of Governmental Industrial Hygienists, adaptada en 1954 para V (ferro).

OSHA= Occupational Safety and Health Administration.

Además de la exposición ambiental, otra vía de entrada del vanadio al organismo humano es a través de los alimentos que se consumen en la dieta, especialmente cereales, leche, algunos vegetales y aceites de cocina habiéndose calculado que diariamente se llegan a consumir hasta cerca de 2 mg de vanadio (Carl-Gustaf et al., 1988) (Tabla 8).

Tabla 8. Concentración de vanadio en algunos alimentos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

	Estudio 1	Estudio 2	Estudio 3
Fecula	---	33.00	---
Arroz blanco	---	21.00	12.30
Cereal	---	93.00	---
Fresa	---	31.41 (p.seco)	---
Rabano	---	52.00	---
Lechuga	---	21.00	---
Perejil	---	790.00	1800.00 (p.seco)
Eneldo	40.00	431.00	---
Carne de hígado	24.10	---	---
Bacalao	28.00	---	---
Langosta	43.00	5.00	---
Crema de cacahuete	---	44.00	---
Leche en polvo	---	25.00	---
Cerveza	---	11.00	8.40

Tomado de: Environmental Health Criteria 81. Vanadium. World Health Organization, G $\acute{e}$ nova, 1988.

#### TOXICIDAD DEL VANADIO.

Se han detectado altas concentraciones de vanadio en diferentes  $\acute{o}$ rganos y tejidos tales como: ri $\acute{o}$ nes (Phillips et al., 1983), hueso, pulm $\acute{o}$ n e hígado (Oberg et al., 1987) (Tabla

9), debido a que este metal puede ser absorbido y transportado por el plasma sanguíneo (Alessio et al., 1988).

Tabla 9. Concentraciones de vanadio en algunos órganos y tejidos humanos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso seco).

Tejido	Estudio		
	Damsgaard (1972)	Lievens (1977)	Byrne & Kosta (1978)
Riñón	N-D	---	3.03
Higado	12.00	13.00	6.00
Cerebro	---	---	0.725
Tiroides	---	---	3.10
Corazón	---	---	1.10
Grasa del corazón	---	---	0.375
Grasa subcutánea	---	---	0.715
Músculo	7.0	N-D	0.553
Bazo	3.0	4.00	---
Páncreas	N-D	14.00	---
Pulmón	N-D	13.00	30.00

N-D No detectado

Tomado de: Environmental Health Criteria 81. Vanadium. World Health Organization Genova, 1988.

En 1977, Josephson y Cantley analizaron el aspecto bioquímico de la toxicidad del vanadio y encontraron que éste interviene en la regulación del transporte activo in vivo, ya que su presencia en el estado de oxidación +5 (vanadato) es altamente específico como inhibidor de las ATPasas para Na, K y Ca en varios sistemas de membranas (Siemon et al., 1982).

En 1978, Sabbioni encontró que los compuestos de vanadio



inhiber las enzimas transferasa y la fosfatasa alcalina intestinal del ternero al formar complejos estables con ellas. Posteriormente, en 1983 comprobó que el ión vanadato inhibe competitivamente a la enzima desoxinucleotidil-transferasa del timo del carnero y la actividad catalítica de la ADN polimerasa de los mamíferos, sugiriendo que el vanadio puede interactuar con las enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos (Sabbioni et al., 1983).

El vanadato tiene importantes efectos biológicos y puede jugar un papel importante en el metabolismo del hueso y en el proceso de crecimiento, en pequeñas dosis inhibe la reabsorción del hueso y estimula su formación. El vanadato de sodio estimula la síntesis del ADN y de la colágena, in vitro, aunque en altas concentraciones tiene efectos inhibitorios irreversibles (Canalis, 1985).

La forma más estable del vanadio (+5) en el ambiente es el pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ), la cual ha mostrado ser la forma más tóxica (Sprague et al., 1978; Carson et al., 1987).

En estudios in vivo, en poblaciones ocupacionalmente expuestas a vanadio, se encontró que en los trabajadores de la industria del acero expuestos a pentóxido de vanadio, la concentración de este compuesto en la orina fue aparentemente elevada; y en la observación clínica de uno de los trabajadores, que además era fumador, se encontró una coloración verde en la lengua, lo que permitió concluir que es posible detectar la

exposición a diferentes concentraciones de vanadio empleando un análisis de orina (Kawai et al., 1989).

La toxicidad del vanadio a nivel ocupacional ésta asociada con afecciones respiratorias agudas y crónicas. Algunos de los síntomas clínicos que presentan las personas expuestas son: faringitis, bronquitis y dolor gastrointestinal. El vanadio ha mostrado también producir otros efectos fisiológicos tales como: disturbio del sistema nervioso central y cambios cardiovasculares. Sin embargo, debido a que el vanadio se acumula en una gran extensión del tejido renal y es eliminado principalmente en la orina, los riñones representan el mayor órgano de acción tóxica y farmacológica (Phillips et al., 1983).

Desde el punto de vista mutagénico, la información que existe del vanadio es limitada, siendo en la mayoría de los casos poco concluyente (Hansen y Stern, 1984; Graedel et al., 1986; Carson et al., 1987; WHO, 1988).

Estudios realizados con pentóxido de vanadio han mostrado que su presencia inhibe la síntesis in vitro del ADN de ratón, y que esta respuesta depende directamente de su concentración en el medio (Sun, 1987).

En estudios in vitro de linfocitos humanos tratados con pentóxido de vanadio no se incremento la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) ni de intercambios de cromátidas Hermanas (ICH's); sin embargo, aumentó la frecuencia de células poliploides, se alteró la cinética de división celular y el

índice mitótico fue significativamente reducido, además aumentó la frecuencia de asociación de cromosomas (Roldán y Altamirano, 1990).

En plantas el vanadio y sus compuestos han mostrado tener efectos clastogénicos (Sharma y Talukder, 1987). En cebolla (*Allium cepa*) indujo pincosis, alteró el huso mitótico (Singh, 1979) y afectó también la formación de la placa celular (Navas *et al.*, 1985).

Cuando se administró por vía oral a ratas disminuyó el índice mitótico (Giri *et al.*, 1979), y en pruebas de micronúcleos, el pentóxido de vanadio administrado a dos ratones por vía intraperitoneal (dosis de 6.4, 2.13 ó 0.17 mg/kg de peso del ratón) durante 5 días consecutivos indujo un incremento significativo en la frecuencia de éstos. Lo mismo se observó cuando se aplicó por inyección subcutánea o por inhalación (Smith, 1983).

#### SISTEMAS DE PRUEBA UTILIZADOS PARA DETECTAR DAÑO.

Para poder establecer la relación entre el nivel de exposición a contaminantes y el riesgo que éstos representan para la salud del hombre se utilizan animales y plantas como modelos biológicos de prueba. La naturaleza de los efectos puede ser determinada como la proporción de daño causado por una dosis determinada en un periodo de tiempo dado. La ruta de exposición, el vehículo del tóxico, la edad, el sexo y las condiciones del modelo, el tiempo de exposición y el método empleado para

determinar las alteraciones son muy importantes (William, 1982).

Los sistemas de prueba (animales o vegetales) utilizados para detectar los efectos mutagénicos de los agentes de tipo físico, químico o biológico son numerosos, y con base en su potencial y del tipo de daño que sean capaces de detectar han sido agrupados en cuatro categorías (Moutschen, 1985):

Grupo I: pruebas diseñadas para detectar lesiones a nivel molecular (reacción de los compuestos con las moléculas de ADN).

Grupo II: sistemas de prueba diseñadas para detectar mutaciones a nivel celular, utilizando organismos inferiores y algunos organismos superiores como Tradescantia, hamster y ratón.

Grupo III: pruebas diseñadas para estimar el daño causado a nivel cromosómico (efecto clastogénico y mutagénico), ya sea in vivo o in vitro, utilizando plantas ó animales.

Grupo IV: Finalmente, algunos investigadores prefieren observar los efectos en la progenie de los organismos tratados, usando pruebas mutagénicas a nivel de organismos completos, en plantas como la cebada y el maíz o animales como la Drosophila y el ratón.

Dentro de las pruebas del grupo III se encuentran todos los análisis que involucran el estudio de las aberraciones cromosómicas que son visibles microscópicamente (Moutschen, 1985).

Los efectos en la división celular y la inducción de anomalías cromosómicas forman un criterio importante para la

identificación del daño en los sistemas genéticos inducidos por agentes mutagénicos (Sharma y Talukder, 1987), pudiéndose analizar dentro de éstas a las alteraciones cromosómicas ya sea de tipo numérico, estructural o ambas (Brinkley y Walter, 1975).

Las aberraciones estructurales de los cromosomas resultan del rompimiento y rearreglo de los cromosomas completos en forma anormal (Carrano y Natarajan, 1988), lo cual provee de evidencias inequívocas del daño genético (Tice, 1986).

Por su lado, las alteraciones numéricas son debidas principalmente a una disfunción del huso, aunque la fusión y fisión centromérica también pueden alterar el número cromosómico en ciertos casos. Dentro de las alteraciones numéricas se encuentran las aneuploidias y las euploidias.

Otro método citogenético para identificar daño a nivel cromosómico es el intercambio de cromátidas hermanas (Latt y Schereck, 1980; Wolff, 1982; Andersson, 1985).

#### INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH's).

El intercambio de cromátidas hermanas fue descrito por primera vez por Taylor en 1958, quien encontró que, si se permitía la replicación de los cromosomas en presencia de timidina tritiada y después, en ausencia del isótopo, las autorradiografiaba, sólo una cromátida de cada cromosoma estaba marcada, lo cual era el resultado de una replicación semiconservativa del ADN (Perry y Thomson, 1984).

Aunque inicialmente se utilizaron métodos autorradiográficos para detectar los ICH's, éstos presentaron una resolución limitada, debido a la marca radioactiva, por lo que no se podían analizar con detalle. Posteriormente, en 1974, Latt, y Perry y Wolff implementaron una técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas sin el uso de isótopos radioactivos, la cual ha aportado valiosos datos acerca del efecto de los agentes mutagénicos sobre el ADN, ya que esta técnica es altamente sensible, pudiendose detectar lesiones en el ADN aún con concentraciones del mutágeno de 10 a 100 veces menores que las empleadas para producir aberraciones cromosómicas (Latt, 1974; Latt et al., 1981; Wolff, 1982) lograndose aplicar en una gran cantidad de sistemas biológicos de prueba incluyendo al humano (Morimoto y Wolff, 1980; Schneider et al., 1984; Wakswik et al., 1984).

Actualmente, en la técnica de intercambio de cromátidas hermanas se emplea la incorporación de 5-bromodesoxiuridina (BrdU; un análogo de base) al ADN durante dos ciclos de replicación consecutivos (Figura 2) y su posterior revelado mediante el empleo de un colorante fluorocromado (Hoechst-33258) en combinación con luz ultravioleta y colorantes como el Giemsa, de modo que las células cuyo ADN hayan incorporado BrdU por un ciclo de duplicación (ADN monofilamente sustituido) tiñen de manera homogénea (Figura 2a), mientras que las células que ya han pasado por dos ciclos de replicación, y cuyos cromosomas muestran

una cromátida con ADN monofilamente sustituido con BrdU y una cromátida con su ADN bifilarmente sustituido, teñiran de una manera diferencial, obscura la primera y pálida la segunda Figura 2b) (Perry y Wolff, 1974) pudiendo observarse en este tipo de cromosomas los intercambios entre las cromátidas hermanas sin ningún problema (Figura 2d).

Los intercambios involucran la ruptura de las cadenas de ADN en ambos brazos del cromosoma y su posterior reunión, pero de manera ilegítima (Figura 2d), aunque el resultado final no altere la morfología ni la información contenida en los cromosomas (Perry y Evans, 1975; Painter, 1980; Perry y Thomson, 1984).

El poder emplear esta metodología tanto in vitro como in vivo y utilizarse para analizar células somáticas o germinales, ha permitido que su empleo se incremente en muchos laboratorios, principalmente para la detección de los efectos mutagénico y carcinogénico de los agentes químicos (Krishna et al., 1986).

#### SISTEMAS DE PRUEBA IN VIVO.

Los sistemas de prueba in vivo ofrecen la ventaja de que al exponer al animal completo a un mutágeno conocido o potencial, muchos de los factores fisiológicos del metabolismo de los mamíferos son automáticamente incorporados en la prueba, y el daño cromosómico puede ser estudiado en más de un tejido en el mismo animal (Bartsch et al., 1982). Además, si el sistema de prueba se realiza en mamíferos, los datos obtenidos son más

convenientes para la extrapolación de los resultados de este sistema al humano (Ehling, 1976).

Entre las evaluaciones que se pueden realizar en los ensayos de mamíferos in vivo empleando células somáticas se encuentran:

- 1) Aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas en médula ósea (ICH's)
  - 2) Ensayos vía hospedero
  - 3) Mutagenicidad microbiana por orina
  - 4) Ensayo de mancha en ratón
  - 5) Aberraciones cromosómicas e ICH's en linfocitos de ratón
  - 6) Ensayos en células de la granuloma de ratón
  - 7) Ensayos en células resistentes a la tóxina de la difteria
- mientras que en las células germinales se pueden estudiar:

- 1) Ensayos de mutación genética en células germinales primarias
- 2) Sistemas de ensayo de mutación cromosómica, incluyendo letales dominantes, traslocaciones heredables y ensayos citogenéticos.
- 3) La prueba síntesis no programada de ADN en espermatoцитos y el ensayo de ICH's.

(Oleson, 1990).

#### MEDULA OSEA COMO SISTEMA DE PRUEBA.

Uno de los ensayos mutagénicos in vivo más versátil empleando células somáticas es el de daño cromosómico en médula ósea de ratón.



La médula ósea es un componente importante del sistema inmune de los organismos superiores (Krishna et al., 1986) y está formada por los precursores de las células sanguíneas, macrófagos, células adiposas, células y fibras reticulares (Fawcett, 1987).

Las células madre, precursoras sanguíneas, están en constante división y diferenciación, y dan origen a eritrocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas (Fawcett, 1987).

Debido a que la médula ósea es un tejido en proliferación, es ampliamente utilizada para identificar compuestos que son capaces de inducir cambios estructurales en los cromosomas. El sistema de prueba de médula ósea in vivo permite el análisis a nivel cromosómico de aberraciones cromosómicas, ICH's y ensayo de micronúcleos. Además, este estudio puede realizarse en la mayoría de los mamíferos de laboratorio, como son, criceto ( $2n=22$ ), ratón ( $2n=40$ ) ó ratã ( $2n=42$ ) (Moutschen, 1985; WHO, 1985; Krishna et al., 1986).

#### ICH'S IN VIVO.

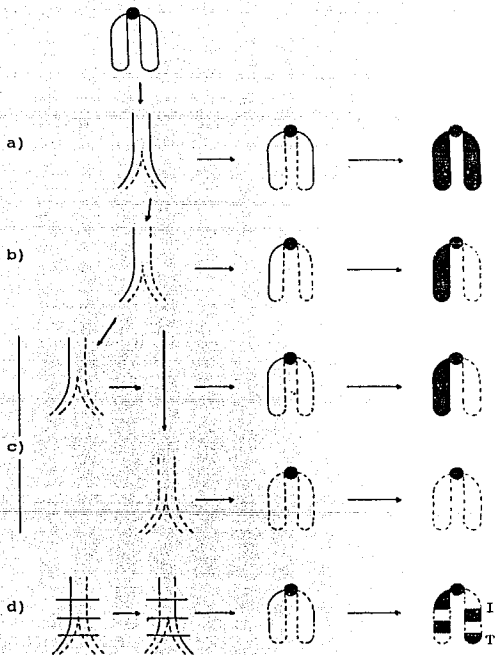
La BrdU puede ser introducida fácilmente in vitro. Sin embargo, in vivo, la administración de la BrdU en sistemas de mamíferos ha sido difícil, sobre todo por la rápida deshalogenación que sufre la BrdU en el hígado (Qin y Huang, 1984).

El primer sistema de tinción de cromátidas hermanas empleando la BrdU in vivo desarrollado en animales fue el de embriones de pollo por Bloom y Hsu en 1975, el cual requería de la aplicación repetida de BrdU para poder mantener la concentración lo suficientemente alta para que éste se incorporará en el ADN (Bloom y Hsu, 1975). Actualmente existe una gran variedad de nuevos métodos propuestos, orientados a retener la BrdU dentro del organismo el mayor tiempo posible. El primer procedimiento que mostró resultados efectivos fue la aplicación de inyecciones múltiples intraperitoneales de BrdU, encontrando que la infusión venosa continua (Allen et al., 1977), la implantación de tabletas de BrdU con agar y parafina (King et al., 1982; McFee et al., 1983) son métodos alternativos que mejoran los resultados obtenidos de primeros ensayos.

Más tarde se desarrolló un método en el cual la pérdida de BrdU se retardaba lo suficiente para ser mucho más efectiva la incorporación del análogo. La metodología involucra la adsorción del BrdU en carbón activado y su aplicación por vía intraperitoneal al animal. Este método fue inicialmente empleado por Kanda y Kato en, 1979 y por Morales et al., en 1984.

La aplicación de esta técnica in vivo ha sido realizada generalmente en pequeños roedores, tales como el ratón, la rata y el criceto, pudiendo estudiarse las espermatogonias, la médula ósea, el tejido fetal, los macrófagos de pulmón (Latt et al., 1981) y la glándula salival de ratón (Morales et al., 1984).

Figura 2. Incorporación de BrdU (-----) en los cromosomas de médula ósea de ratón durante 2 y 3 ciclos de replicación. a) primer ciclo, b) segundo ciclo, c) tercer ciclo y d) segundo ciclo que muestra un intercambio terminal (T) y uno intersticial (I).



## JUSTIFICACION

Debido al incremento de las enfermedades genéticas en el hombre causadas, en parte, por la contaminación ambiental, la cual es producida en mayor proporción por el mismo hombre, se hace necesario conocer los daños ocasionados por los agentes químicos a nivel cromosómico, ya que es aquí donde se encuentra almacenada la información genética que se heredará a futuras generaciones.

Entre los contaminantes ambientales que han mostrado tener efectos adversos en la salud del hombre se encuentran algunos metales, uno de ellos es el vanadio, el cual recientemente ha incrementado peligrosamente su presencia en el ambiente y cuyos efectos a nivel cromosómico no han sido lo suficientemente estudiados, por lo que en el presente trabajo se analizó el efecto de un compuesto de vanadio, pentóxido de vanadio, sobre los cromosomas de la médula ósea de ratón.

## HIPOTESIS

Debido a que el vanadio y sus compuestos han mostrado tener efectos toxicológicos y mutagénicos, los cuales se han observado como picnosis, inhibición de la placa celular o alteraciones en el huso, interactuando de manera directa con enzimas involucradas para la síntesis y acción del ADN y ARN, además de elevar la frecuencia de células poliploides y alterar la cinética de división celular en linfocitos humanos en cultivo, al aplicar pentóxido de vanadio por vía intraperitoneal en diferentes dosis (1/4, 1/2 y la LD<sub>50</sub>) a ratones macho de la cepa CD-1, éste compuesto será capaz de alterar el ciclo celular y la frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas de las células de la médula ósea.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el efecto mutagénico del pentóxido de vanadio sobre los cromosomas de la médula ósea de ratón.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Analizar el efecto del pentóxido de vanadio sobre el índice mitótico, la cinética del ciclo celular y la tasa de proliferación de las células de médula ósea de ratón.

Evaluar el efecto del pentóxido de vanadio sobre la frecuencia y distribución de los Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH's) en las células de médula ósea de ratón .

Establecer la posible relación dosis-efecto de este compuesto sobre la médula ósea de ratón.

## MATERIAL Y METODOS

### ANIMALES:

Se emplearon ratones macho de la cepa CD-1, de 30-45 días de edad y de 25 a 30 g de peso, los cuales se mantuvieron bajo condiciones estándar de bioterio y con libre acceso al agua y al alimento.

### COMPUESTO QUIMICO:

Se empleó pentóxido de vanadio (99.6 % de pureza; Aldrich Chemical Co., USA) el cual se disolvió en agua destilada para su aplicación.

### TRATAMIENTOS (Figura 3.a):

La administración del pentóxido vanadio en dosis de 1/4 de la LD<sub>50</sub> (5.75 µg/g de peso del ratón) , 1/2 de la LD<sub>50</sub> (11.5 µg/g del peso del ratón) y la LD<sub>50</sub> (dosis letal media) (23 µg/g de peso del ratón) se realizó por vía intraperitoneal, a grupos de cuatro ratones durante 24 horas, contando con un grupo testigo.

### TINCION DIFERENCIAL DE CROMATIDAS HERMANAS (Figura 3):

El tratamiento con bromodesoxiluridina (BrdU) y la tinción diferencial de las cromátidas hermanas se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Morales et al., en 1984, con algunas modificaciones.

Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal (ip) con una solución que contenía 1.5 mg de BrdU y 0.1 mililitro de agua destilada por cada gramo de peso del ratón, dosis que fue

## MATERIAL Y METODOS

### ANIMALES:

Se emplearon ratones macho de la cepa CD-1, de 30-45 días de edad y de 25 a 30 g de peso, los cuales se mantuvieron bajo condiciones estándar de bioterio y con libre acceso al agua y al alimento.

### COMPUESTO QUIMICO:

Se empleó pentóxido de vanadio (99.6 % de pureza; Aldrich Chemical Co., USA) el cual se disolvió en agua destilada para su aplicación.

### TRATAMIENTOS (Figura 3.a ):

La administración del pentóxido vanadio en dosis de 1/4 de la LD<sub>50</sub> (5.75 µg/g de peso del ratón) , 1/2 de la LD<sub>50</sub> (11.5 µg/g del peso del ratón) y la LD<sub>50</sub> (dosis letal media) (23 µg/g de peso del ratón) se realizó por vía intraperitoneal, a grupos de cuatro ratones durante 24 horas, contando con un grupo testigo.

### TINCION DIFERENCIAL DE CROMATIDAS HERMANAS (Figura 3):

El tratamiento con bromodesoxiuridina (BrdU) y la tinción diferencial de las cromátidas hermanas se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Morales et al., en 1984, con algunas modificaciones.

Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal (ip) con una solución que contenía 1.5 mg de BrdU y 0.1 mililitro de agua destilada por cada gramo de peso del ratón, dosis que fue



mezclada con 150 mg de carbón activado una hora después de la administración del pentóxido de vanadio. Transcurridas 21 horas y media después de la inyección de la BrdU, a los ratones se les aplicó 0.1 ml/10 gramos de peso, de una solución de colchicina al 0.1 % (Fisher Scientific Co., USA). Dos horas y media después los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a extraer la médula ósea del fémur del ratón.

Para realizar la extracción de la médula ósea, con unas tijeras de disección se desprendió el fémur y se limpió adecuadamente, se cortaron las epifisis del hueso y utilizando una jeringa se lavó el interior con 5 ml de solución salina hipotónica (cloruro de potasio al 0.075 M, precalentada a 37°C) para posteriormente recoger la médula ósea en un tubo de centrifuga. Finalmente, la médula se resuspendió vigorosamente utilizando un agitador vortex y se dejó reposar por 40 minutos a 37° C.

Transcurrido el tiempo, las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió y en agitación se le agregó 5.0 ml del fijador (metanol-ácido acético 3:1) dejándose reposar por 10 minutos. Este paso se realizó dos veces más agregando 5 y 3 ml de fijador respectivamente. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos y el botón fue resuspendido en 0.5 ml de fijador. A partir de esta suspensión las preparaciones se realizaron por goteo y se dejaron secar al aire.

Para realizar la tinción diferencial de cromátidas hermanas las preparaciones se tiñeron con una solución de Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co.) (0.05 µg/ml) durante 20 minutos a la oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, las preparaciones se sumergieron en una solución citrato-salina 2XSSC (NaCl 0.30 M + Citrato de Sodio 0.03 M) y se irradiaron por 20 minutos con luz ultravioleta y negra. Finalmente, las laminillas se colocaron en una solución citrato-salina 2XSSC por 20 minutos a 55° C en baño María y se tiñeron con una solución de Giemsa (1:10 en agua corriente) durante 5 min.

#### EVALUACION:

#### INDICE MITOTICO:

Para calcular el índice mitótico (IM) se revisaron 4000 células al azar por ratón y se utilizó la siguiente fórmula para calcularlo.

$$IM = \frac{\text{No. de células en metafase}}{\text{No. de células totales}} \times 100$$

Una vez obtenidos los datos de índice mitótico, éstos se analizaron mediante la prueba de diferencia de proporciones Z. (Spiegel, 1969; Márques, 1988).

$$Z = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{P_1 - P_2}}$$

$$\sqrt{P_1 - P_2} = \sqrt{pq \left( \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)^2}$$

$$q = 1 - p$$

$$p = \frac{N_1 P_1 + N_2 P_2}{N_1 + N_2}$$

donde:

$N_1$  = Total de células analizadas en el testigo

$N_2$  = Total de células analizadas en cada concentración.

$P_1$  = Índice mitótico del testigo (expresado en proporción)

$P_2$  = Índice mitótico de cada concentración (expresado en proporción).

$\sqrt{P_1 - P_2}$  = Desviación estándar de los índices mitóticos

$Z$  = Valor crítico

$p$  = probabilidad de encontrar células en mitosis

$q$  = probabilidad de encontrar células en interfase.

#### CINETICA DEL CICLO CELULAR:

Se observaron 100 células en metafase, por ratón, al azar,

y se cuantificaron, las células en primera (Foto 1), segunda (Foto 2), tercera o sucesivas divisiones (Foto 3). A partir de estos datos también se obtuvo la tasa de proliferación celular (TPC) siguiendo el método propuesto por Ivett y Tice en 1982.

$$\text{TPC} = \frac{24 \text{ horas}}{1(\text{I}) + 2(\text{II}) + 3(\text{III})} \times 100$$

donde I, II y III representan las proporciones de células en primera, segunda y tercera o subsecuentes divisiones.

Para comparar los porcentajes de células en primera, segunda y tercera división se aplicó, la prueba estadística Ji cuadrada ( $\chi^2$ ), al igual que a los datos de tasa de proliferación celular.

#### INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH's):

Se observó un mínimo de 40 metafases en segundo ciclo por ratón, y se cuantificó el número y tipo de ICH's (de acuerdo a Carrano y Natarajan, 1988) (Figura 4, Foto 2).

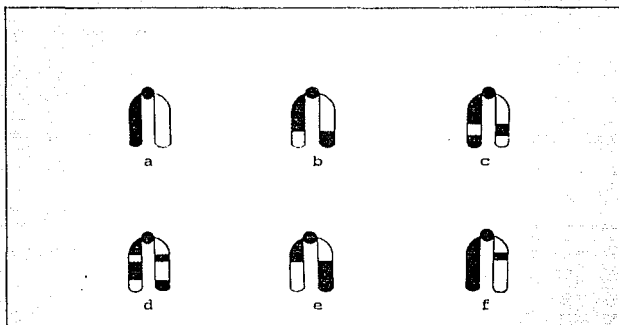
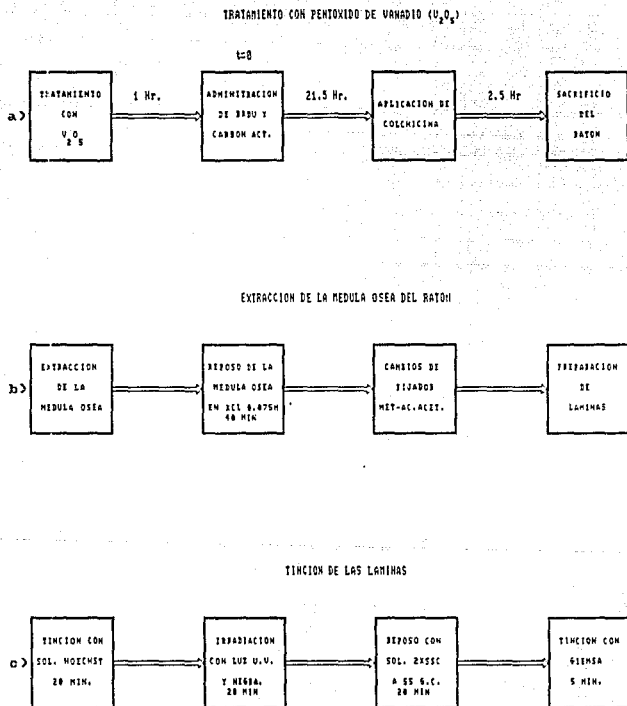


Figura 4. Cuantificación de los ICH's en metafases en segundo ciclo de replicación.

- a) Incorporación de BrdU por dos ciclos completos
- b) Un rompimiento, 1 ICH's
- c) Dos rompimientos, 2 ICH's
- d) Tres rompimientos, 3 ICH's
- e) Un rompimiento, 1 ICH's
- f) Posible artefacto de la tinción, No ICH.

A los datos de la frecuencia de ICH's se les aplicó la prueba estadística T de Student, para lo cual se calculó la media aritmética de ICH's por célula y su desviación estándar.

Fig. 3. DIAGRAMA DE FLUJO DEL METODO UTILIZADO.



## RESULTADOS.

### INDICE MITOTICO

Al comparar el índice mitótico del grupo testigo ( $2.47 \pm 0.27$ ) con el obtenido en los ratones tratados se encontró que la dosis de 11.5  $\mu\text{g}$  de pentóxido de vanadio/g de peso de ratón provocó un incremento ( $2.83 \pm 0.26$ ), mientras que en el caso del grupo tratado con 23  $\mu\text{g}$  de vanadio/g de ratón se observó una disminución ( $2.05 \pm 0.20$ ) (Tabla 1). En ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.05$  con la prueba Z).

### FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE ICH'S

Los resultados de la frecuencia y distribución de ICH's en los animales tratados i.p. con pentóxido de vanadio durante 24 horas (Tabla 2, figura 5 y foto 2) mostraron que el vanadio no alteró la frecuencia de ICH's en ninguna de las dosis aplicadas con respecto al grupo testigo ( $3.82 \pm 0.23$  para  $5.75 \mu\text{g/g}$ ,  $3.62 \pm 0.50$  para  $11.5 \mu\text{g/g}$  y  $4.31 \pm 0.32$  para  $23 \mu\text{g/g}$  en los ratones tratados vs.  $4.16 \pm 0.24$  del grupo testigo) (Tabla 2).

Al analizar la distribución de ICH's por célula de los grupos tratados se observaron ligeras variaciones (Figura 5) que no fueron estadísticamente diferentes a las del grupo testigo.

### CINETICA DE LA PROLIFERACION CELULAR (CPC)

Cuando se analizó el porcentaje de células que se

encontraban en primera (Foto 1), segunda (Foto 2) y tercera o subsecuentes divisiones (Foto 3) los resultados mostraron que en todos los casos, la proporción de células en primera división aumentó, mientras que las de segundo y tercer ciclo disminuyeron (Tabla 3), sin embargo, al realizar el análisis global del comportamiento de las divisiones en cada grupo se encontró que sólo los ratones tratados con 5.75 µg/g presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo.

La tasa de proliferación celular (TPC) en los grupos tratados con 5.75, 11.5 y 23 µg/g de pentóxido de vanadio fue de  $14.74 \pm 0.12$ ,  $14.40 \pm 0.38$  y  $14.06 \pm 0.47$  horas, respectivamente, estas no fueron significativamente diferentes a la tasa obtenida en el grupo testigo de  $13.41 \pm 0.19$  horas (tabla 3).



RESULTADOS.

Tabla 1: Efecto del pentóxido de vanadio sobre el índice mitótico (I.M.) de las células de la médula ósea de ratón.

Tratamiento V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (µg/g de ratón)	I.M. (%)
Testigo 0	2.47 ± 0.25
5.75 (1/4 LD <sub>50</sub> )	2.62 ± 0.33
11.5 (1/2 LD <sub>50</sub> )	2.83 ± 0.26 *
23.0 (LD <sub>50</sub> )	2.05 ± 0.20 *

\* P < 0.05 prueba de Z (diferencia de proporciones) vs testigo.

Tabla 2: Intercambio de cromátidas hermanas (ICH's) inducidos por el pentóxido de vanadio en los cromosomas de la médula ósea de ratón CD-1.

Tratamiento V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (µg/g de ratón)	X ICH's/cel. X ± E.E.
Testigo 0	4.16 ± 0.24
5.75 (1/4 LD <sub>50</sub> )	3.82 ± 0.23
11.5 (1/2 LD <sub>50</sub> )	3.62 ± 0.50
23.0 (LD <sub>50</sub> )	4.31 ± 0.32

FIG. 5 DISTRIBUCION DE ICH'S/CELULA EN RATONES TRATADOS CON VANADIO.

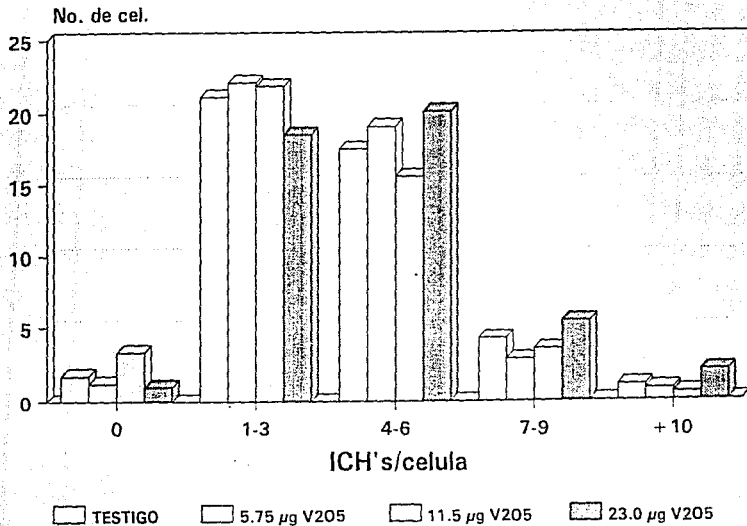


Tabla 3: Efecto del pentóxido de vanadio sobre la cinética del ciclo celular (C.P.C.) y el tiempo de proliferación celular (T.P.C.) de la médula ósea de ratón CD-1.

Tratamiento V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (µg/g de ratón)	C.P.C. (%)			T.P.C. (hrs)
	M1	M2	M3	
Testigo 0	29.00	63.00	8.00	13.41 ± 0.19
5.75 (1/4 LD <sub>50</sub> )	43.25	50.75	6.00 *	14.74 ± 0.12
11.5 (1/2 LD <sub>50</sub> )	38.75	55.50	5.75	14.40 ± 0.38
23.0 (LC <sub>50</sub> )	36.5	55.75	7.75	14.06 ± 0.47

\* P < 0.01 con X<sup>2</sup> vs testigo.

M1 = 1a. metafase

M2 = 2a. metafase

M3 = 3a. metafase

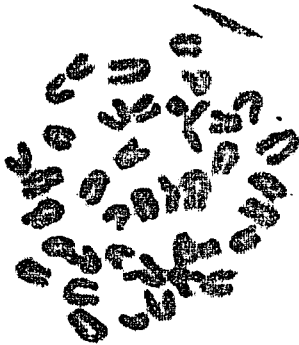


Foto 1



Foto 2

Foto 1: Fotomicrografía de una célula de médula ósea de ratón en primera metafase.

Foto 2: Fotomicrografía de una célula de médula ósea de ratón en segunda metafase (con ICH's).



Foto 1

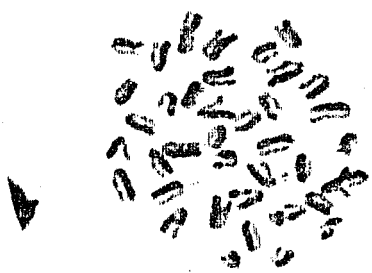


Foto 2

Foto 1: Fotomicrografía de una célula de médula ósea de ratón en primera metafase.

Foto 2: Fotomicrografía de una célula de médula ósea de ratón en segunda metafase (con ICH's).

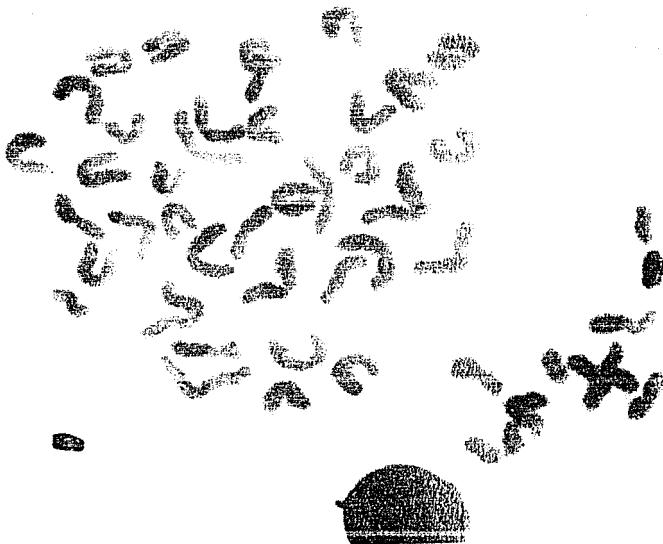


Foto 3: Fotomicrografia de una célula de médula ósea de ratón en tercera metafase.

## DISCUSION

### CITOTOXICIDAD

Uno de los 10 grupos de contaminantes más peligrosos para el ser humano son los metales, especialmente los pesados, ya que estos son capaces de afectar su salud pudiendo dañar al material genético produciendo efectos mutagénicos y clastogénicos (Nemcsok y Boross, 1982; Falahi-Ardakani, 1984; Smith, 1973; Rosas et al., 1980).

El vanadio es un metal pesado que ha originado un gran interés ya que las personas expuestas ocupacionalmente a este metal, en particular en su forma pentavalente (pentóxido de vanadio), presentan daños a nivel de sistema respiratorio, digestivo y nervioso, aunque su efecto a nivel genético aún no esta bien establecido (Crans y Shin, 1988; Crans et al., 1990; Holdway et al., 1983; Sabbioni et al., 1983).

Para evaluar la relación e interacción que tiene un agente químico con el material genético se cuenta con una amplia variedad de sistemas biológicos de prueba, desde procarióticos (bacterias) hasta eucarióticos (tanto plantas como animales), los cuales proporcionan parámetros de evaluación que permiten establecer el riesgo de exposición para el hombre (Hoffman y Morgan, 1984; Tice, 1986; Moutschen, 1985).

Los cambios que provoca un compuesto sobre el proceso de división celular, así como la inducción de anormalidades



cromosómicas son un importante criterio para la identificación de daño en los sistemas genéticos (Sharma y Talukder, 1987). Dentro de éstos, la evaluación de la toxicidad celular (citotoxicidad) producida por un agente químico es uno de los primeros índices de daño que deben de ser tomados en cuenta para su evaluación. Una de las técnicas más utilizadas es el estudio del índice mitótico (IM).

En los resultados obtenidos (tabla 1), al aplicar pentóxido de vanadio a ratones macho de la cepa CD-1, se encontraron variaciones en el IM en dos de los grupos tratados. En la dosis más baja no hubo diferencias significativas con respecto al grupo testigo, en la dosis intermedia (11.5 µg/g) el IM se incremento significativamente ( $P < 0.05$ ), mientras que la dosis más alta presentó una disminución estadísticamente significativa con respecto al testigo.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado previamente por diversos autores. Carpenter, en 1981, encontró que al tratar fibroblastos humanos con concentraciones menores de 40 µM de vanadato se estimulaba la incorporación de timidina dentro del ADN, evidencia de que se estaba incrementando la tasa de división de estas células *in vitro*, mientras que cantidades mayores de 40 µM fueron tóxicas para la célula, observando un bloqueo de la división y síntesis de ADN, lo que permitió concluir que el vanadato es capaz de estimular o inhibir el mismo sistema biológico, lo cual depende de la dosis

empleada.

Resultados similares fueron reportados por Sabbioni y Col. en 1983, quienes encontraron que el vanadio mostraba efectos opuestos sobre la función de la ADN-polimerasa de ternera in vitro, ya que a bajas concentraciones de vanadato ( $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M) aumentan la incorporación de nucleótidos dentro del ADN y concentraciones mayores de  $10^{-5}$  M inhibien la actividad enzimática de esta molécula.

Por otro lado, se sabe que los metales son capaces de afectar la división celular y producir alteraciones en las fibras del huso, lo que conduce a la formación de diplocromosomas, poliploidías y a una disminución del índice mitótico (Sharma y Talukder, 1987). Algunas de estas respuestas son atribuidas a la gran afinidad de los metales por los enlaces disulfuro y, por consecuencia, a las proteínas del huso. Por tales motivos esta otra posibilidad de acción del vanadio no puede ser descartada, sobre todo si se toma en cuenta que algunos estudios mostraron que el vanadio aplicado en células de Allium cepa (cebolla) fue capaz de alterar el huso mitótico, producir picnósis, pérdida de cromatina y favorecer la aparición de células binucleadas (Singh y Sharma, 1981; Navas et al., 1985).

Además, en 1990, Roldán y Altamirano encontraron un decremento en el índice mitótico en cultivos de linfocitos humanos tratados con 4 y 6  $\mu\text{g}$  de pentóxido de vanadio, mientras que en dosis menores (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) no encontraron diferencias

significativas.

La capacidad del vanadio de estimular e inhibir diversas enzimas, dentro de las cuales se encuentran algunas que participan de manera importante en la síntesis del ADN (Carpenter, 1981; Smith, 1983), permite sospechar que éste puede ser uno de los mecanismos de acción del vanadio sobre la división celular de la médula ósea del ratón.

Aunque la evaluación de la citotoxicidad de un químico es difícil, debido a la posible interacción con otras sustancias, a las diferencias en las concentraciones a las cuales se está expuesto, a las susceptibilidades individuales, etc. (Forni y Bertazzi, 1987) el vanadio, al igual que otros metales, en altas concentraciones es citotóxico. En nuestro caso, las células tratadas con la concentración más alta de pentóxido de vanadio mostraron alteraciones.

#### INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS

Además del daño celular causado por la exposición a un compuesto, éste puede interactuar de manera directa con el material genético y modificar la estructura cromosómica, ya sea causando alteraciones numéricas o estructurales.

Dentro de los indicadores de daño a nivel cromosómico se encuentran los intercambios de cromátidas hermanas (ICH's), los cuales son considerados como un parámetro altamente sensible para detectar alteraciones en el ADN (Cohen et al., 1982; Latt et al.,

1981; Montaldi et al., 1985; Morimoto et al., 1985; Mudry de Pargament et al., 1981).

Esta técnica fue introducida por Latt, en 1974, para la evaluación del efecto mutagénico de los agentes químicos. Los ICH's involucran la ruptura en puntos idénticos de ambas cromátidas con su posterior intercambio y reparación, sin pérdida de ADN ni cambios en la morfología del cromosoma, aunque se ha visto que existe una relación directa con el incremento de este evento y la clastogenicidad y mutagenicidad de muchos compuestos, lo que ha originado su amplio uso.

Los resultados obtenidos al aplicar tres diferentes dosis de pentóxido de vanadio a ratones macho no mostraron diferencia significativas en cuanto a la frecuencia y distribución de ICH's por célula, con respecto al testigo (Tabla 2 y Fig 5).

La inducción de ICH's por una gran cantidad de compuestos metálicos está ampliamente documentada (Gómez-Arroyo et al., 1989; Hansen y Stern, 1984; IARC, 1987; Ohno et al., 1982), sin embargo, los resultados encontrados al aplicar in vitro pentóxido de vanadio a linfocitos humanos fueron negativos (Roldán y Altamirano, 1990). Esto concuerda con los datos obtenidos en el presente trabajo, donde se empleó pentóxido de vanadio en un sistema in vivo.

La cinética de distribución del vanadio a través del organismo, implica que desde su entrada éste es transportado por el flujo sanguíneo unido a una enzima, y aunque se ha reportado

que en ratas después de 30 minutos de la administración de vanadio ya se puede localizar en hueso (WHO, 1988), tarda alrededor de 8 días en migrar hacia el interior de la fracción nuclear de las células (Stokinger, 1981), sitio en el cual se almacena el material genético. Por lo anterior se piensa que los resultados negativos obtenidos en este trabajo pueden deberse a que el tiempo de exposición del organismo al vanadio no fue el suficiente para que este compuesto llegara al núcleo de la célula, y se manifestara algún tipo de daño, ya sea como aberraciones cromosómicas o intercambio de cromátidas hermanas.

A pesar de ser uno de los grupos químicos más estudiados, el mecanismo de mutagénesis de los metales no está completamente entendido. Se ha visto que involucra, como paso inicial, el enlace covalente de un catión metálico a los sitios nucleofílicos del ADN, a las proteínas cromosómicas, a las ADN polimerasas ó a las sustancias precursoras de nucleótidos, interacción que puede afectar la fidelidad de la replicación del ADN e inducir aberraciones en la reparación, afectando la expresión genética (Montaldi et al, 1985).

Por otro lado trabajos realizados con otros compuestos metálicos dan respuestas poco claras de la de interacción del metal con el material genético. En 1975, Perry y Evans encontraron que la frecuencia de ICH's inducida por el tratamiento con compuestos metálicos fue más baja que la frecuencia de ICH's inducida por otros mutágenos. Esto puede

indicar que el efecto de los metales a nivel cromosómico es más complejo de lo que se suponía.

El análisis de la distribución de los ICH's ofrece un panorama diferente de la acción de los químicos sobre los cromosomas. En el caso del vanadio, las variaciones en las distribuciones de ICH's por célula muestra que este compuesto está generando cierto efecto sobre éste parámetro de evaluación (aunque no significativamente), por lo que no puede excluirse la posible acción mutagénica del pentóxido de vanadio sobre las células de la médula ósea de ratón, efectos que posiblemente pudieran manifestarse en tratamientos crónicos.

#### CINETICA DE CICLO CELULAR

Cuando se analiza el efecto de un agente químico se debe evaluar su acción sobre la proliferación celular, ya que, aunque el blanco principal de muchos clastógenos es el ADN, la evaluación del daño sobre la proliferación celular puede ser un reflejo importante del daño de las sustancias sobre esta molécula (Brewen y Stetka, 1982), aunque en algunos casos los dos eventos pueden ser independientes (Setlow, 1982).

Para la cuantificación de los ICH's se emplea la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas la cual se basa en la incorporación de 5-bromodesoxiuridina al ADN. Esta técnica permite evaluar también la cinética de proliferación celular. Para realizar el análisis de la cinética de proliferación celular

se cuantifica el número de células que se encuentran en primera, segunda y tercera división mitótica, las que se distinguen por su patrón de tinción (Fotos 1,2 y 3) (Gebhart et al., 1980; Watanabe et al., 1980; Cohen et al., 1982), permitiendonos determinar de esta manera cuantas veces se ha dividido la célula en un determinado tiempo, conociendo la duración del ciclo celular (Tasa de proliferación celular) de un determinado órgano o tejido.

Este parámetro también fue cuantificado en este trabajo (tabla 3), observándose que el promedio de la tasa de proliferación celular de los ratones tratados con pentóxido de vanadio no se alteró en ninguno de los grupos tratados al compararlos con el testigo.

Esto es contradictorio a los resultados obtenidos por Roldán y Altamirano (1990), quienes encontraron que el pentóxido de vanadio incrementaba la tasa de proliferación celular, (en consecuencia la célula empleaba más tiempo por división celular).

En nuestro caso, el tiempo del ciclo celular fue el mismo, pero al analizar el porcentaje de células que se encontraban en primera, segunda o tercera división (Tabla 3), se observó un ligero incremento del número de células en primera metafase en los tres grupos tratados, es decir, hubo una acumulación de células en este primer ciclo. Esto permite sospechar que las células, al finalizar la primera mitosis les costaba más trabajo continuar con la segunda división, evento que se reflejó en la

modificación del porcentaje de células que se encontraban en segundo y tercer ciclo.

El tipo de prueba realizada en este trabajo se baso en la administración aguda del compuesto (24 horas) (Latt et al., 1981), para posteriormente analizar los diferentes parámetros. Los datos aqui reportados muestran que el periodo de tiempo durante el cual el organismo estuvo expuesto al vanadio fue suficiente para alterar el indice mitótico, y aunque la duración del ciclo celular fue aparentemente el mismo, las células requerian más tiempo para pasar a una segunda o tercera división.

Para poder identificar y caracterizar el potencial tóxico de alguna substancia se deben tener claras las características de la relación estructura-actividad del compuesto, comparando la semejanza de la estructura química entre el agente a probar y compuestos ya conocidos. Por otro lado, se debe determinar el posible modo de acción del compuesto y tratar de establecer la relación dosis-efecto y los niveles máximos de no-efecto (ECETOC, 1983; EPA, 1988).

La acción de los metales a nivel molecular y celular en varios órganos y tejidos es muy amplia, sin embargo, la literatura muestra que aproximadamente 53 compuestos orgánicos e inorgánicos de metales que han sido evaluados, tanto in vivo como in vitro, son capaces de originar resultados positivos, en al menos uno de los sistemas de prueba utilizados. Estos resultados



permiten concluir que toda esta variedad de respuestas puede ser debida a diferencias en el mecanismo de acción de los metales, dentro de las cuales podemos mencionar al estado de oxidación que presenta el metal en el compuesto, su valencia, solubilidad, etc. (Hansen y Stern, 1984; Sharma y Talukder, 1987).

Existen compuestos metálicos como el  $CdCl_2$ ,  $HgCl_2$ ,  $NiCl_2$ ,  $CdCO_3$ ,  $HgCl$ , que han mostrado tener efectos mutagénicos (incremento en la frecuencia de ICH's) y carcinogénicos (Montaldi et al., 1985) entre otros, sin embargo, a pesar de que se conoce el poder toxicológico, algunos metales como el arsénico, cromo y níquel los cuales incrementan el riesgo de adquirir cáncer, los resultados acerca de su influencia en la frecuencia de ICH's son contradictorios (Tice, 1986), lo cual hace patente la complejidad del mecanismo de mutagenicidad de los metales (Perry y Evans, 1975).

Ya que no se contó con un parámetro que respondiera positivamente en todas las dosis empleadas ó que mostrara un patrón en la mayoría de los ensayos realizados, esto hizo difícil establecer una relación dosis-efecto.

## CONCLUSIONES

El análisis de los índices mitóticos obtenidos en los ratones tratados con 11.5  $\mu\text{g/g}$  y 23  $\mu\text{g/g}$  de pentóxido de vanadio nos están indicando que el vanadio a bajas concentraciones es capaz de estimular la entrada de las células a división, incrementándose así el índice mitótico, pero que al estar presente en altas concentraciones daña las células inhibiendo la división celular y es citotóxico.

Por otro lado, el tratamiento agudo (24 horas), empleando tres diferentes dosis de pentóxido de vanadio, aplicado a ratones macho de la cepa CD-1 no modificó la frecuencia y distribución del intercambio de cromátidas hermanas. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, las ligeras variaciones encontradas en la distribución de ICH's por célula, permite postular que el vanadio tiene cierto efecto sobre las células de la médula ósea de los ratones tratados.

Las concentraciones de vanadio aplicadas no modificaron la CPC de las células de la médula ósea de ratón, es decir el tiempo de duración del ciclo celular no presentó alteraciones significativas, sin embargo, se observaron algunas variaciones en el número de células que se encontraban en primera, segunda y tercera división, lo cual muestra que el vanadio puede modificar la división celular.

Aunque la variedad de efectos que mostró el pentóxido de

vanadio sobre las células de la médula ósea no permitió establecer una relación dosis-efecto, podemos decir que este compuesto es citotóxico y potencialmente mutagénico.

## REFERENCIAS

Albert L., 1988, Curso Básico de Toxicología Ambiental, Centro Panamericano de la Salud, Organización Panamericana de la Salud, O.M.S., Limusa, pág. 308.

Alessio L., Maroni M. y Dell'Orto A., 1988, Biological Monitoring of Vanadium en: Biological Monitoring of Toxic Metals, (ed) Clarkson W. T., Friberg L., Nordberg F. y Sager R., Plenum press.

Allen J. W., Sheler C. F., Mendez R. W. y Latt S. A., 1977, A Simplified Technique for in vivo Analysis of Sister-Chromatid Exchanges Using 5-bromodeoxyuridine Tablets, Cytogen. Cell. Genet., 18: 231-237.

Altamirano L. M., 1989, Contaminación Ambiental, Genética y enfermedad, Tópicos de Investigación y Posgrado, ENEP- Z. U.N.A.M., Vol. 1, No. 1.

Andersson H.C., 1985, Sister Chromatid Exchanges, en: Tradescantia paludosa Stain Technology, U.S.A., 60(4):193-199.

Ashby J., 1982, Screening Chemicals for Mutagenicity Practices and Pitfalls, en: Mutagenicity New Horizons in Genetic Toxicology, (ed) Heddle J. A., Academic Press Nueva York.

Baroch E. F., 1983, Vanadium and Vanadium Alloys, en: Encyclopedia of Chemical Technology, (ed) John Wiley & Sons., Vol. 23, pág. 673-687.

Bartsch H., Tomatis L. y Malaveille C., 1982, Qualitative and Quantitative Comparisons between Mutagenic and Carcinogenic Activities of Chemicals, en: Mutagenicity New Horizons in Genetic Toxicology, (ed) Heddle A. J., Academic Press, pág. 36-72.

Bloom S. E. y Hsu T. C., 1975, Differential Fluorescence of Sister Chromatids in Chiken Embryos Exposed to 5-bromodeoxyuridine, Chromosoma, 51: 261-267.

Brawning E. M. D., 1969, Toxicology and Risk Estimation with Mammals, Mutat. Res., 41:113-122.

Brewer J. G. y Stetka D. G., 1982, Cytogenic events in vivo, en: Mutagenicity New Horizons in Genetic Toxicology, cap. 13, Academic Press, Nueva York.

Brinkley B. R. y Walter N. H., 1975, Ultrastructure of Mammalian Chromosome Aberrations, International Review of Cytology, Vol. 42, Academic Press Inc., Nueva York, pág. 49-101.

Brooks A. L., Schimizu R. W., Bemson J. M. y Dautcher J. S., 1984, The Induction of Sister Chromatid Exchanges by Environmental Pollutants: Relationship of SCE to other Measures of Genetic Damage, en: Sister Chromatid Exchange, (eds) Tice R. y Hollaender A., Plenum Publishing Corporation.

Canalis E., 1985, Effect of Sodium Vanadate on Deoxyribonucleic Acid and Protein Syntheses in Culture Rat Calvariae, *Endocrinology*, Vol, 116, no. 3: 855-862.

Carl-Gustaf E., Gerhardsson L. y Oberdoerster G., 1988, Biological Monitoring of Toxic Metals-Overview en: Biological Monitoring of Toxic Metals, (ed) Clarkson W. T., Friberg L., Nordberg G. F. y Sager P. R., Plenum Press.

Carpenter G., 1981. Vanadate Epidermal Growth Factor and the Stimulation of DNA Synthesis. *Biochem. Res. Commun.*, 102:115-1121.

Carrano A. V. y Natarajan A. T., 1988, Considerations for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques, *Mutat. Res.*, 204:379-406.

Carson L. B., Ellis H. V. y McCann J. L., 1987, Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans, Including Feasibility and Need, Lewis Pub., Inc., pp. 276-282.

Clarkson T. W., 1990, Effects General Principles Underlying the Toxic Action of Metals, en: Handbook on the Toxicology of Metals, (ed) Friberg L., Nordberg F. G. y Vouk V. B., Vol. I, 2a ed., Elsevier.

Cohen M. M., Alice O. Martin, Carole Ober y Stacy J. Simpson, 1982, A Family Study of Spontaneous Sister Chromatid Exchange Frequency, *Am. J. Hum. Genet* 34: 294-306.

Crans C. y Shin K., 1988, Spontaneous and Reversible Interaction of Vanadium (V) oxyanions with Amine derivatives, *Inorganic Chemistry*, 27: 1797.

Crans C., Willging y Butler R., 1990, Vanadate Tetramer as the inhibiting specie in enzyme reactions in vitro and vivo., *Journal of the American Chemical Society* 112:427.

Deknudt G. H. y Deminatti M., 1978, Chromosome Studies in Human Lymphocytes after in vitro Exposure to Metal Salts *Toxicology*, 10:67-75.

Duffus J. H., 1983, *Toxicologia Ambiental*, Cap. 6, Ed. Omega, Barcelona España.

ECETOC (European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre), 1983, Identification and Assessment of the Effects of Chemicals on Reproduction and Development (Reproductive Toxicology), Monograph No. 5, Brussels, Belgium.

Ehling R. H., 1976, Mutagenicity Testing and Risk Estimation with Mammals, *Mutat. Res.*, 41:113-122.

EPA (Environmental Protection Agency), 1988, Guidelines for Reproduction Studies for Safety Evaluation of Drugs for Human Use, Washington DC.

Falahi-Ardakani A., 1984, Contamination of Environment with Heavy Metals Emitted from Automotives, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, pág. 152-161.

Fawcett D. W., 1987, *Tratado de Histología*, 11a edición, Interamericana Mc. Graw Hill, pág. 995.

Forni A. y Bertazzi P. A., 1987, Epidemiology Protection and Prevention Against Environmental Mutagens-Carcinogens, *Mutation Research*, 181: 287-297.

Friberg L. y Nordberg G. F., 1990, cap. I, en: Handbook on the Toxicology of Metals, (ed) Friberg L., Nordberg G. F. y Velimir B. V., 2a ed, Elsevier Science Publishers B. V.

Garza C. R. y Leal G. C., 1981, Plomo y Aberraciones Cromosómicas, *Salud Pública México*, Epoca V, Vol. XXXI, No. 4.

Gebhart E., Wildolph B. y Wopfner F., 1980, Chromosome Studies on Lymphocytes of Patients Under Cytostatic Therapy, *Hum. Genet.*, 56:157-167.

Giri A. K., Sanyal R., Sharma A. y Talukder G., 1979, Cytological and Cytochemical Changes Induced through Certain Heavy Metals on Mammalian Systems. *Natl. Acad. Sci. Lett.*, 21:391-394.

Graedel T. E., Hawkins D. T. y Claxton L. D., 1986, *Atmospheric Chemical Compounds, Sources, Occurrence, and Bioassay*, Academic. Press. Inc. Nueva York.

Gómez-Arroyo, S., Abarca-Hernández J. C., Cortés-Elava J. y Villalobos Pietrini R., 1989, Sister Chromatid Exchanges Induced by Cadmium in Vicia faba, *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 5:71-82.

Hansen K. y Stern M. R., 1984, A Survey of Metal-Induced Mutagenicity in vitro, Toxicological and Environmental Chemistry, Vol.9, pp:87-91.

Harada M., 1975, Minamata Disease: A medical Report en: Smith W. E., Smith A. Minamata. An Alskong-Sensorium Book., Hait-Reinhardt y Wiston (eds), Nueva York.

Hill C. H., 1988, Interactions Among Trace Elements, en: Current Topics in Nutrition and Disease, Vol. 18, Prasad A. S. (ed), Alan R. Liss. Inc., E. U.

Hoffman G. R. y Morgan R. W., 1984, Review: Putative Mutagens and Carcinogens in Food V. Cycads. Azoxycosides., Environm. Mutag., 6:103-116.

Holdway D. A., Spregue J. B. y Dick J. G., 1983, Bioconcentration of Vanadium in American Flagfish Over one Reproductive Cycle, Water Res., Vol. 17, 8:937-941.

IAFC, 1987, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Genetic and Related Effects. An Updating of selected IARC Monographs from Volumen 1 to 42. Supplement 6.

IRPTC, International Register of Potentially Toxic Chemicals, 1985, United Nations Environment Programme.

Ivett J.L. y Tice R. P., 1982, Average Generation Time: A New Method of Analysis and Quantitation of Cellular Proliferation Kinetics, Environ. Mutagen., 4:358 (resumen).

Jorma Maki-Packkanen, Marja Sorsa y Harri Vainio, 1981, Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange in Lead-Exposed Workers, Hereditas 94:269-275.

Karda N. y Kato H., 1979, A simple Technique for in vivo Observation of SEC in Mouse Ascites Tumor and Spermatogonial Cells, Exp. Cell. Res., 118: 431-434.

Kawai T, Kazunori S., Takao W., Harvo N. y Masayuki I., 1989. Urinary Vanadium as a Biological Indicator of Exposure to Vanadium. Int. Arc. Occup. Environ Health, 61:283-286.

King M. T., Wild D. Gocke E. y Eckhardt K., 1982, 5-Bromodeoxyuridine Tablets with Improved Depot Effect for Analysis in vivo of Sister-Chromatid Exchanges in Bone-marrow and Spermatogonial Cells, Mutation Res., 97: 117-129.

Krishna G., Nath J. y Ong T., 1986, Murine Bone Marrow

Culture for Cytogenetic Analysis, Mutation Research, 164:91-99.

Latt S. A., 1974, Sister Chromatid Exchanges, Indices of Human Chromosome Damage and Repair: Detection by Fluorescence and Induction by Mitomycin C., Proc. Nat. Acad. Sci., E.U., Vol. 71, 8:3162-3166.

Latt S. A. y Schereck R. R., 1980, Sister Chromatid Exchange Analysis, Am. J. Hum. Gent., 32:297-313.

Latt S. A., Allen J., Bloom E. S., Carrano A., Falke E., Kram D., Scheneider E., Schreck R., Tice R., Whitfield B. y Wolff S., 1981, Sister Chromatid Exchanges: A Report of the Genotox Program Mutation Research, Mutat. Res., 87:17-62.

Lower W. R., Rose P. S. y Drobney V. K., 1978, In situ Mutagenic and Other Effects Associated with Lead Smelting. Mutation Research, 54:83-93.

Marques M. J., 1988, Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico-Biológicas. Ed. U.N.A.M.

McFee A. F., Lowe K. W. y San Sebastian J. R., 1983, Improved Sister-Chromatid Differentiation Using Paraffin-coated Bromodeoxyuridine Tablets in Mice, Mutation Res., 119:83-88.

Montaldi A., Zentilin L., Venier P., Gola I., Bianchi V., Paglialonga S. y Levis A. G., 1985, Interaction of Nitrilotriacetic Acid With Heavy Metals in the Induction of Sister Chromatid Exchanges in Cured Mammalian Cells, Environmental Mutagenesis, 7:381-390.

Morales R. P., Vallarino K. T. y Rodriguez R. R., 1984, Detection of SCE in Rodent Cells Using the Activated Charcoal BromodeoxyUridine Sistem. en: Sister Chromatid Exchanges, (Eds) Tice R. R. y Hollaender A., Plenum Publishing Corporation.

Morimoto K., Mayumi Sato-Mizuno y Akira K., 1985, Sister-Chromatid Exchanges and Cell-cycle Kinetics in Human Lymphocyte Cultures Exposed to Alkylating Mutagens: Apparent Deformity in Dose-response Relationships, Mutation Research, 152: 187-196.

Morimoto K. y Wolff S., 1980, Increase of Sister Chromatid Exchanges and Pertutions of Cell Division Kinetics in Human Lymphocytes by Benzene Metabolites, Cancer Res., 40: 1189-1193.

Moutschen J., 1985, Introduction to Genetic Toxicology, John Wiley & Sons., N. Y.



Mudry de Pargament D. M., Mabel Labal de Vinuesa, Larripa I, Brioux de Salum S. y Colillas O., 1981, Utilidad del Método de Intercambio de Cromátidos Hermanas en la Detección de Posibles Agentes Mutagénicos, Medicina (Buenos Aires) 41: 173-176.

Navas P., Hidalgo A. y Herdurgo Garcia G., 1985, Cytokinesis in Onion Roots: Inhibition by Vanadate and Caffeine, Experientia, 42:437-439.

Nemcsok J. y Boross L., 1982, Comparative Studies on the Sensitivity of Different Fish Species to Metal Pollution, Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 33 (1): 23-27.

Nielsen H. F., 1988, Ultratrace Elements en: Current Topics in Nutrition and Disease, vol. 18. Essential and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease. Prasad A. S. (ed) Alan R., Liss Inc. U. S. A.

Oberg. G. S., Sharma R. P., Swaran J. S. y Drown D. B., 1987, Persistence of Vanadium Compounds in Lungs After Intratracheal Instillation in Rats.

Ohro Hisako, Fumio Hana Oka y Masa-atsu Yamada, 1982, Inducibility of Sister-Chromatid Exchanges by Heavy-Metal Ions, Mutation Research, 104: 141-145.

Oleson B. F., 1990, Overview of in vivo Mammalian Testing Systems. Mutation and the Environment Part B, pág. 171-184.

Ortiz-Monasterio P. F., Cortinas de Nava C. y Maffey Garcia L., 1987, Manejo de los Desechos Industriales Peligrosos en México, Universo Veintiuno, México.

Painter R. B, 1980, A replication Model for Sister-Chromatid Exchange, Mutat. Res., 70: 337-341.

Perry P. y Wolff S., 1974, New Giemsa Method for the differential staining of Sister Chromatid, Nature, 251: 156-158.

Perry P. y Evans H. J., 1975, Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange, Nature, Vol. 258.

Perry P. E. y Thomson E. J., 1984, The Methodology of Sister Chromatid Exchange, en: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, (Eds) Kilbey B. J., Legartor M. N. y Rantel C., 2a. ed., Elsevier Science Publisher B. V., cap. 24, pág. 495-529.

Phillips T. D., Nechay B. R. y Heidelbaugh N. D., 1983,

Vanadium: Chemistry and the Kidney, Fed. Proc., 42:2969-2973.

Popenoe E. A. y Schmaeler M. A., 1979, Interation of Human DNA polymerase b with Ions of Copper, Lead and Cadmium, Archives of Biochemistry and Biophysic, Vol. 196, 1: 109-120.

Qin S. y Huang C. C., 1984, A New Method for Sister-Chromatid Exchange Etudies in vivo, a Single Injection of BrdU in Melted Agar, Mutation Research, 141:189-193.

Roldán R. E. y Altamirano L. M. A., 1990, Chomosomal Aberrations in Human Lymphocyte Culture Exposed to Vanadium Pentoxide, Mutation Research, 245:61-65.

Rosas I., Báez A., Belmont R. y Gómez E., 1980, Eichhornia crassipes como un indicador de la presencia de cadmio, Revista de Geofísica, Instituto Panamericano de Geografía e Historia, no. 12 México.

Rossmán T. G., Molina M. y Meyer W. L., 1984, The Genetic Toxicology of Metal Compounds: I. Induction of Prophage in E. coli WP2s (B), Environ. Mutag., 6:59-69.

Sabbioni E., Brazzelli A. y Clerici L., 1983, Defferent Efec of Vanadium Ions Some-Metabolizing Enzimes, Jor. Toxicol. Environ. Health, 12:737-748.

Schneider E. L., Bickings C. K., y Sternberg H., 1984, Againg and Sister Chromatid Exchange. VII, Efect of Againg of Bakground SCE in vivo, Cytogenet. Cell. Genet, 33:249-253.

Setlow B. R., 1982, Dose Response Relations: The Effects of DNA Repair, en: Genetic Toxicology and Agricultural Perspective, (ed) Fleck R. A. y Hollaender A. Plenum Press, Nueva York.

Sharma A. y Talukder G., 1987, Effects of Metals on Chromosomes of Higher Organisms, Environ. Mutag., 9:191-226.

Sideris E. G., Petraki M. y Kalfas C., 1981, Cu<sup>2+</sup> as an Environmental Mutagenic Agent, Abstract paper presented at 10 th Meeting Mutat. Res., 85(4): 303, EMS, Atenas.

Siemon H., Scheleider H. y Fuhrmann G. F., 1982, Vanadium Increases Selective K<sup>+</sup> permeability in Human Erytrocites, Toxicology, 22:271-278.

Singh D. P., 1979, Effects of Certain Chemical Pollutans on Plant Chromosomes, Phd. Thesis Submitted to University of Calcuta.

Singh O. P. y Sharma A., 1981, Radiomimetic Effects of Some Metallic Salts, en: Perspective in Cytology and Genetic, (eds) Manna G. K y Sinh U., Delhi: Hindsia Publ., Vol. 3, pág. 489-492.

Smith H. W., 1973, Metal Contamination of Urban Woody Plants, Environmental Science and Tecnology, Vol 7, No. 7: 631-636.

Smith J. B., 1983, Vanadium Ions Stimulate DNA Synthesis in Swiss Mouse 3T3 Cells and 3T6 Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 80(20):6162-6166.

Sorsa M., Kari H. y Vainio H., 1982, Biological Monitoring of Exposure to Chemical Mutagens in the Occupational Environment. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 2:137-150.

Spiegel M. R., 1969, Teoría y Problemas de Estadística. Ed. Mc Graw Hill, Colombia.

Sprague J. B., Holdway D. A. y Stendahl D., 1978, Accute and Chronic Toxicity of Vanadium to Fish. Alberta O:I Sands Env. Res. Prog. Final Rept. Sub Project, pág 88.

Stokinger H. E., 1981, The metals en: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, (ed) Clayton, Vol. IIA, A Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons.

Sun Mianling, 1987, Toxicity of Vanadium and its Environmental Stard, Chengdu, West China University of Medical Sciences, pág. 20.

Tice R., 1986, An Overview of Ocupational Studies Direted at Assessing Genetic Damage.

Villanueva S., Botello A. V. y Páez O. F., 1988, Evaluación de Algunos Metales Pesados en Organismos del Rio Coatzacoalcos y de la Laguna del Ostión Veracruz, Méx., Contam. Ambient., 4: 19-31.

Vouk V., 1990, General Chemistry of Matsls en: Handbook on the Toxicology of Metals., (ed) Friberg L., Nordberg y Vouk V., Elsevier Science Publisher B. V.

Wakswik H., Boysen M. y Hoegtviat A. C., 1984, Increased Incidence of Chromosomal Aberrations in Peripheral Lymphocytes of Retired Nickel Workers. Carcinogenesis 5: 1525-1527.

Watanabe T., Akira E., Yasuo K., Shogo S., Takao W. y Masayuki I., 1980, Cytogenetics and Cytokinetics of Cultured

Lymphocytes from Benzene-exposed Workers, Int. Arch. Occup. Environ. Health, 46:31-41.

Weiss B., 1983, Behavioral Toxicology Science, American Psychologist, Vol. 38, No. 11, E.U.

WHO, World Health Organization, 1985, Guide to Short-Term Tests for Detecting Mutagenic and Carcinogenic Chemicals, Environmental Health Criteria, No. 51.

WHO, 1988, Environmental Health Criteria, No. 81, Vanadium, Geneva.

William U., 1982, Health Risks and Exposure in: Genetic Toxicology and Agricultural Perspective, (ed) Fleck R. y Hallaender A., Plenum Press, Nueva York.

Wolff S., 1982, Difficulties in Assessing the Human Health Effects of Mutagenic Carcinogens by Cytogenetic Analyses, Cytogenet. Cell. Genet., 33:7-13.