

1
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VALORACION DE LA GENOTOXICIDAD DEL PENTOXIDO DE VANADIO EN CELULAS DE LAS ALAS DE *Drosophila melanogaster*. COMPARACION DE TRES PROTOCOLOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

HECTOR MARTIN ABUNDIS MANZANO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

MEXICO, D. F.

1984

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron ^{el} pasante(s) Héctor Martín Abundis Manzano

con número de cuenta 8117693-7 con el Título: Valoración de la genotoxicidad del Pentóxido de Vanadio en células de las alas de Drosophila melanogaster. Comparación de tres protocolos.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
D. en C. Director de Tesis	Patricia	Ramos Morales	
D. en C.	Rosario	Rodríguez-Arnaiz	
D. en C.	Mario Agustín	Altamirano Lozano	
D. en C.	Ma. Genoveva	González Morán	
Suplente M. en C. Suplente	Ma. de la Luz	Madariaga Campos	

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO

DE GENÉTICA

" THEODOSIUS DOBZHANSKY "

DE LA FACULTAD DE CIENCIAS,

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DEDICATORIAS

**A la memoria de mi Padre:
Héctor Abundis Hernández
cuyo recuerdo siempre esta conmigo.**

**A mi Madre:
Eusebia Mansano Vda. de Abundis
de quien he aprendido el coraje por la vida,
el deseo de superación y a quien mucho le debo
lo que he logrado.**

**A mis hermanos: Carmen, Víctor Hugo y Rosario
por su apoyo y su unión en los momentos difíciles.**

**A Bruno y Brenda, con la esperanza
de un futuro mejor.**

**A Patricia, por su apoyo, su cariño y por
lo mucho que he aprendido de ella.**

AGRADECIMIENTOS

**A la Directora de tesis:
Doctora Patricia Ramos Morales
Por su orientación, apoyo y valiosos
consejos durante el desarrollo de este
trabajo.**

A los Miembros del Jurado:

**Dra. Rosario Rodríguez-Arnaiz
Dr. Mario A. Altamirano Lozano
Dra. Genoveva González Morán
M. en C. Ma. de la Luz Madariaga Campos**

**Por la revisión del manuscrito y sus valiosos comentarios y
sugerencias al mismo.**

**Al personal del laboratorio de Genética de la Facultad de
Ciencias, UNAM.**

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIA Y METODOS	25
Material biológico	25
Compuestos	26
Procedimiento experimental	26
Concentración letal 50	26
Tratamiento agudo	28
Tratamiento sub-crónico	28
Tratamiento crónico	30
Análisis de las alas	30
RESULTADOS	32
DISCUSION	39
CONCLUSIONES	49
SUGERENCIAS	49
REFERENCIAS	50

RESUMEN

El pentóxido de vanadio (V_2O_5), es uno de los compuestos del vanadio con mayor variedad de usos: como fertilizante, catalizador, aleador de metales, en alfarería y producción de lacas y esmaltes, fotografía, industria textil, la fundición y muchas más. Aunque algunos organismos, acuáticos y terrestres acumulan vanadio, en general se presenta en niveles bajos en los tejidos de animales, principalmente de mamíferos. Además de inhibir la actividad de numerosas enzimas que participan en el metabolismo de los organismos, también induce la actividad de gran número de ellas. A nivel celular estimula la proliferación de fibroblastos. Las pruebas de genotoxicidad con bacterias han producido resultados positivos y negativos en *E. coli* y *S. typhimurium*. En la cepa 614 de ratón induce micronúcleos. En cultivos de linfocitos, El V_2O_5 , no incrementa la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas.

En este trabajo se utilizó la prueba de mutación y recombinación somáticas en la estirpe celular de las alas de *Drosophila* para evaluar la genotoxicidad del pentóxido de vanadio.

Larvas transheterocigas *flr³/mwh* se trataron con 32, 63, 125, 250 y 500 ppm de V_2O_5 , en tres tiempos de exposición diferentes: 72 X 6 hr, 72 X 48 hr y 0 x 120 hr. Se comparó la frecuencia de manchas por ala de las series testigo y experimentales por el procedimiento de Frei y Würgler (1988). En la exposición aguda el V_2O_5 , incrementó la frecuencia de manchas chicas y totales a 32, 63 y 125 ppm ($P < 0.05$), en las dos concentraciones restantes, las frecuencias correspondientes fueron menores. En el tratamiento subcrónico sólo incrementó la frecuencia de manchas totales en 250 y 500 ppm y en el crónico, la alta citotoxicidad del V_2O_5 , no permitió evaluar el efecto mutagénico y/o recombinogénico, dando resultados negativos. El V_2O_5 , no indujo actividad recombinogénica.

Se recomienda evaluar nuevamente la genotoxicidad de este compuesto utilizando concentraciones menores en tratamientos agudos para confirmar la respuesta en concentraciones que no sean tóxicas para el sistema de prueba.

I. INTRODUCCION

En la industria, así como de las diversas actividades realizadas por el hombre, se producen una gran cantidad de desechos químicos que dada la cantidad y diversidad de ellos, por lo general no se procesan adecuadamente, los cuales al ser vertidos al ambiente representan un riesgo potencial para todas las formas de vida.

Los compuestos químicos generados son variados. Entre ellos se encuentran desde residuos orgánicos —los cuales son degradados e incorporados nuevamente como materia prima a los ciclos biológicos en un lapso de tiempo relativamente corto—, hasta compuestos inorgánicos diversos en cuanto a su composición y estructura; algunos de estos últimos se acumulan gradualmente hasta alcanzar niveles altos. Ciertos organismos tienen la capacidad de acumular en sus tejidos gran cantidad de éstos sin mostrar efecto alguno, sin embargo, para la mayoría la exposición llega a implicar riesgo considerable (Casarett y Doull, 1975).

Entre todos los compuestos químicos a los que se encuentra expuesto el hombre una gran cantidad de ellos son metales o bien compuestos derivados de ellos, éstos representan 80 de los 109 elementos que constituyen la tabla periódica de los elementos. Los metales pueden formar un número considerable de compuestos como algunas sales, complejos metálicos o coordinados y complejos organometálicos (Altamirano, 1992).

Entre los muchos metales que se vierten al medio se encuentra el vanadio, cuyas principales características se muestran en la tabla I. Sus números de oxidación son -1, 0, +2, +3, +4 y +5, los últimos tres son los más comunes y de éstos, el +4 es el más estable, frecuentemente forma polímeros (Clark, 1973). Es considerado el veintiún elemento más abundante sobre en la tierra, con una concentración promedio aproximada de 135 ppm; y el treinta y cuatro más abundante en el agua de mar, con 2 ppb (Biggs y Swinehart, 1976; Underwood^{1,2}, 1977). El pentóxido de vanadio (V₂O₅) es la forma comercial del vanadio utilizada comúnmente, se disuelve en ácidos y agua, y forma vanadatos con bases; por lo general, los compuestos orgánicos de vanadio son inestables.

TABLA I
CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DEL VANADIO

Peso molecular	50.942
Número atómico	23
Grupo de la tabla periódica	VB
Punto de fusión	1910 ± 10 °C
Punto de ebullición	3420 °C, a 1 atm. de presión
Isotopos naturales	⁵⁰ V, ⁵¹ V
Isotopos radiactivos	⁴⁶⁻⁴⁹ V, ⁵²⁻⁵⁴ V

El análisis de neutrón activado es el método más rápido y exacto que se utiliza para la detección de vanadio en aire y agua,

es usado para determinar su presencia en fluidos orgánicos como suero, sangre y otros materiales biológicos (Byrne y Kosta, 1978; Pashynich, 1967).

El vanadio metálico no se encuentra como tal en la naturaleza, pero se conocen cerca de 70 minerales que lo contienen; en la minería, la carnatita ($K_2O \cdot 2U_2O_3 \cdot V_2O_5 \cdot 3H_2O$) y vanadinita ($9PbO \cdot 3V_2O_5 \cdot PCl_2$) son los más importantes (Budavari et al., 1989). La producción de vanadio esta ligada con la de otros metales como son: hierro, uranio, titanio y aluminio (NAS, 1974). La extracción de vanadio de combustibles fósiles como petróleo —el mexicano y el venezolano pueden acumular de un 12 a un 15% de pentóxido de vanadio (Byerrum, 1991)—, carbón, alquitrán, betunes y asfaltitas es importante en muchos países.

Los países considerados como los mayores productores de vanadio (como pentóxido de vanadio, V_2O_5) en orden decreciente son Sudáfrica, la ex-Unión Soviética, Estados Unidos, Finlandia y China, el consumo anual estimado es de 2.9×10^4 toneladas métricas (Byerrum, 1991).

Aproximadamente del 75 al 85 % de la producción total del vanadio se utiliza en la industria metalúrgica, los países que más lo consumen son Japón y los Estados Unidos, aunque debido al constante avance tecnológico de los países en vías de desarrollo, su uso se ha incrementado. Es un aditivo en la aleación de varios tipos de acero y metales no ferrosos (Goldshtejn, 1967; Grin et al., 1971); el hidruro de vanadio es utilizado en los reactores

atómicos como un neutrón moderador, en la construcción de naves aéreas y en la tecnología espacial; en la industria química se le usa como catalizador. El pentóxido de vanadio y los metavanadatos son especialmente importantes en la producción de ácido sulfúrico y plásticos, la oxidación de compuestos orgánicos, separación del petróleo, purificación de gases, oxidación del etanol y producción de vidrio de diferentes tipos y colores. El pentóxido y otras sales de vanadio se utilizan para la elaboración de barnices y esmaltes para porcelana y alfarería en general, producción de lacas y pinturas; reveladores, sensibilizadores y agentes colorantes en fotografía y cinematografía; como mordiente en el tejido y coloreado del algodón —particularmente para la fijación de la anilina negra en la seda—; sales solubles derivadas de ácidos de arsénico y vanadio son usadas como fungicidas e insecticidas; los residuos de vanadio se utilizan en los talleres de fundición como auxiliares para mejorar la calidad de la superficie del metal y facilitar su limpieza; además puede usarse como un fertilizante traza en un rango de 0.1-1 mg/kg de suelo (Peterburgskij y Tormosova, 1969). El vanadio se utiliza también aunque en mucho menor cantidad en otra gran variedad de industrias.

En lo que respecta a la contaminación ambiental, las industrias que utilizan combustibles fósiles para producir energía y calor son las que descargan mayor cantidad de vanadio al ambiente. También la purificación de petróleo crudo y la destilación de combustibles derivados contribuye con pequeñas cantidades a la

atmósfera. En los alrededores de las grandes plantas productoras de aleaciones metálicas la emisión de vanadio puede ser alta; también, por la refinación de acero desechado y la transformación de titanio ferroso y hierro magnetita vanádico en acero, la quema de residuos de vanadio, los hornos de fundición de pentóxido de vanadio y los hornos eléctricos, donde el ferrovandio es fundido (NAS, 1974).

La concentración del metal en las rocas depende del pH de éstas en el siguiente orden: básicas > neutras > ácidas (Borisenko, 1953); las primeras contienen alrededor del 92 % (basalto, grava, anfíbolitas y eclogitas).

El vanadio se encuentra prácticamente en todas las plantas (Arnon y Wessel, 1953), la cantidad de éste es influida por la concentración en el suelo, la acidéz del mismo y las condiciones del cultivo; pese a esto los rangos de variación no son altos. Las concentraciones de vanadio en las raíces son similares a las del suelo, a diferencia de las concentraciones de las partes aéreas con las que no tienen relación. En el hongo *Amanita muscaria* se presenta la mayor acumulación de vanadio con 51,000 ppm en la forma de un compuesto conocido como amavadina (Biggs y Swinehart, 1976), alrededor de 100 veces más vanadio que en otros hongos (Bertrand, 1950).

Concentraciones tan altas como 80 mg/kg han sido encontradas en algunas algas consumidas por peces como *Pontedarius cordata*, los cuales se consideran posibles acumuladores del metal (Cowgill, 1973; Krauskopf, 1963); en musgos como *Hypnum cupressiforme*, se han

detectado concentraciones cercanas a 10 mg/kg en áreas rurales y, de 50-250 mg/kg cuando se encuentran en áreas urbanas (Tyler, 1970; Ruhlring, 1971). Muchas otras plantas tienen vanadio en diferentes concentraciones (Tabla II).

TABLA II
CONCENTRACION DE VANADIO EN DIFERENTES PLANTAS
 mg/Kg
 (Söremark, 1967)

<i>Astragalus confertiflorus</i>	144
<i>Astragalus prensii</i>	67
<i>Allium macropetallum</i>	133
<i>Oenothera caesipitosa</i>	38
<i>Castilleja angustifolia</i>	37
<i>Chysothammas viscidiflorus</i>	37
<i>Eriogonum inflatum</i>	15
<i>Lepidium montanus</i>	11
<i>Triticum aestivum</i>	5

Aparentemente el vanadio está presente en todos los animales, y es un elemento esencial para pollos y ratas; se ha calculado que el requerimiento mínimo para estos organismos es de 50 y 500 ng/g, respectivamente (Underwood¹, 1977; Davies, 1981; Mertz, 1974). Dietas conteniendo <30 o <100 ng/g producen retraso en el desarrollo esquelético, incremento de triglicéridos y variaciones en las concentraciones de colesterol en el plasma, además la deficiencia del metal reduce la fertilidad y la viabilidad. Las dietas co-

merciales para pollos contienen 1400-5400 ng V/g (Kubena y Phillips, 1983).

En los animales, principalmente en los mamíferos, el nivel de vanadio en los tejidos es bajo, lo que dificulta su detección (Tabla III). En mamíferos terrestres los niveles más altos se registran en tejidos del hígado, riñón, esqueleto, pulmón y en tracto digestivo, independientemente de la ruta de ingreso. No se ha descrito requerimiento alguno en otros mamíferos, sin embargo, los fibroblastos de seres humanos tienen un crecimiento clonal óptimo cuando se adicionan 0.25 ng/ml del metal, aparentemente el

TABLA III
CONCENTRACION DE VANADIO EN DIFERENTES
ESTRUCTURAS DE MAMIFEROS mg/Kg. (Myron et al., 1977)

Hueso (cerdo, oveja)	20-40
Médula osea (cerdo)	< 1
Hígado (res, cerdo, rata)	2-10
Riñón (rata, cerdo, perro, conejo)	9-34
Corazón (cerdo, rata, conejo)	1-9
M. Esquelético (res, cerdo, conejo, caballo)	< 1-14
Cerebro (rata, vaca)	< 1-3
Pulmón (conejo, res)	5-25
Grasa (cerdo)	< 1-2
Mantequilla, leche	< 1-3
Plasma en rata	2-5
Ratón completo	66

VO₃ (vanadato) actúa sinérgicamente con el factor de crecimiento epidermal en la estimulación de síntesis de ADN en el fibroblasto (Carpenter, 1981).

Mucho del vanadio que entra en el mar es depositado o absorbido en coloides, no reacciona químicamente con el agua y la mayor parte se deposita en forma de sal, sólo el 10 % del total se encuentra en forma soluble; las bajas concentraciones de éste indican que es removido continuamente pero no se conoce el mecanismo. En los organismos marinos, generalmente invertebrados, el vanadio puede acumularse en diferentes etapas de su vida, como en ciertas ascidias, por ejemplo *Phalludia mamillata*, con una concentración de 1900 mg/kg en el adulto o concentraciones que pueden llegar a cuatro millones de veces más que la del agua de mar. Las larvas de *Ascidia gemmata* (Michibata et al., 1992) y las holoturias o pepinos de mar (*Sticopus mobil*) presentan una concentración de 1200 mg/Kg; y moluscos como *Pleurobranchus plumula*, una concentración de 150 mg/Kg de peso (LaTouche et al., 1981). El vanadio también ha sido detectado en otros organismos acuáticos (Tabla IV).

Los niveles de vanadio en el ambiente se ven influidos por los cambios estacionales y las inversiones atmosféricas. En áreas rurales alejadas de las fuentes de emisión se encuentran concentraciones de alrededor de 1 ng/m³ de aire, pero si se queman combustibles fósiles se incrementa el nivel aproximadamente a 75 ng/m³. Las concentraciones en las áreas urbanas oscilan en un rango

TABLA IV
CONCENTRACION DE VANADIO EN DIFERENTES
ANIMALES ACUATICOS mg/Kg
(Blotcky et al., 1979)

Peces cartilaginosos	3-28
Peces óseos	125-2000
Trucha de agua dulce	0.4
Langosta	5-43
Crustáceos	455-1840
Moluscos	150-1900

de 0.25-300 ng/m³. Las grandes ciudades tienen un promedio anual en el aire de 20-100 ng/m³, que se incrementa en los meses de invierno. En los alrededores de las industrias metalúrgicas son comunes concentraciones de 1 µg/m³. Se asume que un promedio de 50 ng/m³ a 1 µg de vanadio puede entrar diariamente en el tracto respiratorio del hombre. Las concentraciones de vanadio en el agua potable oscilan en un rango de 0.2-100 µg/l con un promedio anual de 5 µg/l (Byerrum, 1991).

Mediante la dieta ingresan concentraciones que oscilan desde 0.1 µg/Kg hasta valores por arriba de 2 mg (Byrne y Kosta, 1978 y 1979; Myron et al., 1978; Tipton et al., 1969).

La exposición a altas concentraciones de vanadio en el aire ocurre generalmente en ambientes de trabajo. En la producción de pentóxido de vanadio, la concentración en el aire está en el rango de 0.5 a 5 mg/m³, también es similar en la producción de vanadio

metálico y en la catálisis de vanadio. Grandes concentraciones (50-100 mg/m³) se detectan al limpiar las calderas, pero pueden llegar a 500 mg/m³, el polvo contiene de 5-17 % de pentóxido de vanadio y de 3-10 % de otros (Kelm y Schaller, 1978).

El rango de absorción pulmonar no ha sido determinado, pero se estima que alrededor del 25 % de los compuestos de vanadio solubles pueden ser absorbidos. Las sales de vanadio son escasamente absorbidas por el tracto gastrointestinal en los seres humanos (por ejemplo, sólo del 0.1 al 1 % del muy soluble oxitartarovanadato) (Byrne y Kosta, 1978). Se ha encontrado experimentalmente que el vanadio se incorpora a través de la piel en pequeñas cantidades, posteriormente se transporta mediante el plasma; las concentraciones en los tejidos son generalmente bajas: hígado 4.5-19 µg/kg; riñón 3-7 µg/kg y pulmón 10-130 µg/kg (Byrne y Kosta, 1978). En la placenta se han registrado pequeñas cantidades de compuestos vanádicos, éstos pueden atravesarla y llegar al feto, también se encuentra en la leche materna y en la saliva, y llega al cerebro a través de la sangre (Thúrauf et al., 1978). Los niveles de vanadio en sangre difieren mucho entre sí, se reportan concentraciones que van de 0.016 a 0.4 mg/litro. No hay correlación aparente entre el contenido del metal y la edad y contenidos de colesterol, triglicéridos o lipoproteínas (Ordhzonikidze et al., 1977; Byrne y Kosta, 1978; Post et al., 1979; Versieck y Cornelis, 1980; Cornelis et al., 1981; Dick et al., 1982; Stroop et al., 1982).

Además del bajo nivel de absorción por el tracto gastroin-

testinal, la mayor parte del vanadio es eliminado por las heces, la otra ruta de excreción es a través de los riñones, las concentraciones en la orina están en el orden de 0.1 a 0.2 $\mu\text{g}/\text{l}$, pero se han reportado valores de 10 $\mu\text{g}/\text{l}/24$ horas (Byrne y Kosta, 1978). Aunque la correlación entre el vanadio ingerido y el excretado es pobre, el nivel de vanadio en la orina de trabajadores expuestos incrementa de 20 a 30 veces el valor estimado como normal (Cornelis et al., 1981). La Conferencia Gubernamental Americana de Higiene Industrial (ACGIH, 1992) recomienda que la cantidad de pentóxido de vanadio en cenizas y humos respirables no rebase los 0.05 mg/m^3 por un día normal de trabajo de ocho horas o bien una semana de 40 horas.

Evidencias obtenidas en animales de laboratorio y en pruebas *in vitro* indican que el vanadio produce deterioro en la reproducción y altera el metabolismo de los lípidos.

Desde 1965 se sabe que el vanadio inhibe la acción ATPasa Na^+-K^+ en fracciones microsomales de riñón, cerebro y corazón de algunas especies (Rifkin, 1965), más recientemente varios estudios muestran al vanadato (VO_3) como el más potente inhibidor de este sistema enzimático (Cantley et al., 1977; Nechay y Saunders, 1978; Quist y Hokin, 1978); además se ha sugerido que el VO_3 es un regulador potencial de la bomba de Na^+ (Cantley et al., 1978 y 1979; Cantley y Aisen, 1979). La observación de los efectos inhibitorios de la ATPasa Na^+-K^+ llevó al descubrimiento de enzimas sensibles al vanadio: ATP-fosfohidrolasa, ribonucleasa, adenil-

tatequinasa, fosfofructoquinasa y glucosa 6-fosfatasa, que son inhibidas por compuestos de vanadio (Cantley et al., 1977; Quist y Hokin, 1978).

En un estudio de la inhibición metálica de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, V_2O_5 disuelto en NaOH, produjo VO_3^- en solución y se descubrieron las propiedades inhibitorias de este ión (Beaugé y Glynn, 1977; Josephson y Cantley, 1977; Nechay y Saunders, 1978).

El VO_3^- tiene un sitio de alta y uno de baja afinidad para la ATPasa e interfiere con su actividad retrasando el cambio conformacional de la molécula enzimática, de la forma alostérica E2 (enzima 2) a la E1 (Enzima 1); el sitio de alta afinidad del VO_3^- corresponde al sitio de baja afinidad del ATP y viceversa, el ATP reduce la unión e inhibición del VO_3^- . El Mg^{2+} es requerido para la unión del VO_3^- a la enzima y la inhibición del cambio conformacional de E2 a E1 y facilita además la inhibición de la actividad de la enzima. El Na^+ promueve el cambio conformacional de E2 a E1, interfiriendo con la unión del VO_3^- , y se opone a la inhibición de la actividad enzimática, el Na^+ puede también actuar por desplazamiento del K^+ . Un efecto del K^+ es facilitar la inhibición y puede ser desplazado por Na^+ de sitios que activan la enzima. El K^+ no es requerido para la unión del VO_3^- . Los iones Ca^{+2} o Mn^{+2} pueden sustituir al Mg^{+2} en la activación de la unión del VO_3^- , aunque el Ca^{+2} es menos efectivo y el Mn^{+2} es más efectivo que el Mg^{+2} . Los cationes Ti^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH^+ y Li^+ pueden sustituirse por K^+ como activadores de la enzima y también pueden incrementar la actividad del VO_3^- .

(Glynn y Richards, 1982; Hansen, 1982; McDonald et al., 1982).

Generalmente, en un modelo en que el VO_3 puede unirse sólo a la forma conformacional E2, agentes que favorecen este estado, como el Mg^{+2} , K^+ , ouabaína y dimetil-sulfóxido, incrementan la unión del VO_3 ; y los que favorecen el estado E1 como el ATP, Na^+ y oligomicina, disminuyen la unión de VO_3 (Hansen, 1980; Robinson y Merseer, 1981). El VO_3 es capaz de promover la unión de ouabaína a la ATPasa Na^+-K^+ en ausencia de ATP (Hansen, 1979 y 1982).

Entre los agentes que interfieren con la inhibición de VO_3 se incluyen albúmina bovina, que actúa probablemente por quelación; aniones como el citrato y el EDTA, que pueden desplazar el VO_3 aniónico de la enzima (Nechay y Saunders, 1978; Wu y Phillips, 1979); agentes reductores como el glutatión, ascorbato, NADH, metileno azul, imipramina y cloropromacina, que convierten el VO_3 a la forma iónica de baja actividad VO^+ , ambos compuestos pueden unirse al VO_3 y reducirlo (Macara et al., 1980; Vyskocil et al., 1982).

En general, el vanadio es más tolerado por animales pequeños como la rata y el ratón, que por animales grandes incluyendo el conejo y el caballo. Su toxicidad es baja si se administra oralmente, moderada cuando se inhala y alta cuando se inyecta. Existen múltiples reportes acerca de la potente toxicidad del vanadio tanto en animales de laboratorio como la rata (Tabla V), el conejo (Tabla VI) y algunos otros mamíferos así como también en el hombre (Tabla VII).

En el campo de la medicina se han descrito recientemente numerosas funciones del vanadio, como son: formar parte de diversas vías enzimáticas en algunos organismos inferiores, como *Azotobacter vinelandii* en el que interviene en una ruta alternativa para la fijación del nitrógeno (Raina et al., 1993); o bien, en *Azotobacter chroococcum* en el que participa en la reducción de N₂ (Dilworth et al., 1993); o formando parte de la cloroperoxidasa en el hongo *Curvularia inaequalis*, la cual actúa en el metabolismo del mismo (Van-Schijndel et al., 1993); las amalgamas odontológicas elaboradas a base de vanadio desprenden partículas de metal que producen actividad antibactericida sobre numerosas colonias de bacterias como *Posphyromonas endodontalis*, *Posphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melanigenica*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces naeslundii* y *Actinomyces viscosus*, que generalmente se encuentran en la cavidad bucal de los seres humanos (Berry et al., 1992); su uso —aún experimental— como mimético de la insulina ha sido estudiado en ratas recién nacidas tratadas con estreptozotocina; la administración oral de orthovanadato de sodio nulifica las alteraciones de la diabetes relacionadas con la expresión de la fenilalanina hidroxilasa, también puede restaurar la expresión de genes que codifican para la enzimas glucoquinasa y piruvato quinasa tipo-L, implicadas en el metabolismo de la glucosa; disminuye la expresión del gene de la enzima fosfoenol-piruvato carboxiquinasa que se expresa en las células afectadas (Serradas et al., 1991; Green et al., 1992;

Brichard et al., 1993; Cam et al., 1993; Endo, 1993; Shechter y Shisheva, 1993); se le utiliza como antineoplásico en el trata

TABLA V
EFFECTOS TOXICOS DE ALGUNOS COMPUESTOS DE VANADIO
EN RATA
(Oberg et al., 1978)

COMPUESTO	CONCENTRACION	EFFECTOS TOXICOS
V	70 mg/m ³ /1 hora	LC ₅₀
	10 mg/m ³	- Ligero envenenamiento.
V ₂ O ₅	3-5 mg/m ³	- Inflamación del endotelio, congestión capilar, edema perivascular y pequeñas hemorragias.
	0.05-0.5 mg/kg/día/8 días	- Deterioro de las condiciones reflejas. - Disminución en el contenido cisteína en el pelo y de coenzima A.
V ₂ O ₃	10-70 mg/ Kg/ día /12	- Cambios en tejidos grasos, necrosis celular parcial del hígado, cambios grasos en miocardio e inchamiento perivascular.
VCl ₃		
VO ₂		
VO ₂ NH ₃		

miento de algunos tipos de cáncer (Cohen et al., 1993); activa la transcripción de genes como el de la actina, el C-Ha-ras y C-jun en células cultivadas C127 de ratón (Yin et al., 1992); estimula la ovulación *in vitro* al activar el ciclo folicular del fosfatidili-

nositol e inhiba la actividad de la fosfatasa alcalina en el ovario del pez dorado, *Carassius auratus* (Hsu y Goetz, 1992)

A pesar de los variados estudios sobre la inducción de mutagé-

TABLA VI
EFFECTO TOXICO DE VARIOS COMPUESTOS DE VANADIO EN
CONEJO
(Sörenmark, 1967)

COMPUESTO	CONCENTRACION	EFFECTO TOXICO
V ₂ O ₅	250 mg/m ³	- Conjuntivitis, traqueitis, edema pulmonar, bronconeumonía
	13 µg/ml/20 horas	- Reducción del 50 % de la viabilidad de los macrófagos.
	7 µg/ml/2 horas	- Reducción de la viabilidad de los macrófagos.
V ₂ O ₅ VCl ₃	10-70 mg/kg/día /12 meses	- Cambios en los tejidos grasos, necrosis calular parcial del hígado.
VO ₃	40.75 mg/m ³ / 2 horas/día/ 12 meses	- Descarga nasal, estornudo, disnea y reacciones asmáticas

nesis y carcinogénesis por compuestos de vanadio, los resultados aún son contradictorios.

El ion V⁵⁺ puede inhibir o incrementar la síntesis de ADN *in vitro* dependiendo de la concentración en el medio (Hori y Oka, 1980; Carpenter, 1981; Jackson y Linskens, 1982; Smith, 1983). Ratonos macho a los que se administró 14.6, 29.2 y 58.4 mgV₂O₅/Kg de peso, 21 horas después del tratamiento se les inyectó 1 µCi de

timidina tritiada y 3 horas después se les sacrificó, no mostraron diferencias significativas con respecto al lote testigo en la incorporación de timidina en bazo, hígado y sangre (Sun, 1987); linfocitos humanos tratados con cloruro de vanadil [5×10^{-5} M] no

TABLA VII
EFEECTO TOXICO DEL V_2O_5 EN EL HOMBRE

CONCENTRACION	EFEECTO TOXICO
1 mg/ m ³ / 8 horas	- Tos prologada.
0.16 mg/ m ³	- Hormigueo, comezón, sequedad de las membranas mucosas.
0.01-0.04 mg/ m ³ / 10 meses	- Irritación de membranas mucosas del tracto respiratorio.
0.9 a 5 mg/ m ³	- Tos, flemas, irritación de ojos, nariz y garganta.
15-150 mg/ m ³	- Rinitis atrófica, bronquitis crónica, esputo con sangre y broncoespasmos.
6 µg/ m ³	- Dermatitis eczematosa.

mostraron rompimientos de filamentos de ADN (Mc Leand et al., 1982); en células V79 de mamíferos el V_2O_5 puede provocar mutaciones y enlaces cruzados de ADN y proteínas (Cohen et al., 1992); el V_2O_5 experimentalmente en linfocitos humanos no ha mostrado incrementar las aberraciones cromosómicas estructurales, ni el intercambio de

cromátidas hermanas, sin embargo, el índice mitótico muestra decremento significativo, además de presentarse un aumento en la frecuencia de cromosomas con asociaciones satélite (Roldán y Altamirano, 1990).

En la prueba rec con *Bacillus subtilis* algunos compuestos de vanadio, VOCl_2 , V_2O_5 y NH_4VO_3 , fueron ligeramente positivos (Kanematsu et al., 1980); en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, no hubo inducción de mutaciones. El metavanadato de amonio fue mutagénico en las cepas TA1535 y TA100 de *S. typhimurium* (prueba de fluctuación) (Kanematsu y Kada, 1978; Kada et al., 1980; Kanematsu et al., 1980; Rongshan et al., 1982); induce mutaciones reversas en las cepas WP2, WPuvrA y Cm-981 de *E. coli*, pero no en las ND-160 y MR102 (Sun, 1987). También en *S. typhimurium*, se obtuvieron resultados negativos con V_2O_5 en las cepas TA11535, TA1537, TA98 y TA100. De esta manera, los ensayos con bacterias han proporcionado resultados contradictorios de los que aún no pueden obtenerse conclusiones claras.

La inyección de V_2O_5 [6.4, 2.13 y 0.17 mg/Kg] durante cinco días, a dos cepas de ratones (614 y albino Kunming) indujo micronúcleos en la cepa 614. En cultivos de linfocitos, el V_2O_5 no incrementa la frecuencia de cromátidas hermanas (Sun, 1987).

Hasta el momento, la toxicidad y los efectos fisiológicos de los compuestos de vanadio han sido objeto de la investigación experimental, sin embargo, es necesario evaluar también su potencial genotóxico. Para ello es necesario utilizar sistemas de prueba

que generen resultados en tiempos relativamente cortos y que al ser utilizados en conjunto con otros ya establecidos, aporten información acerca de determinado compuesto en el ambiente y su impacto sobre el genoma.

Drosophila melanogaster, conocida comúnmente como la mosca de la fruta, es un eucarionte, del que se han mapeado los cuatro pares de cromosomas que presenta; se le mantiene fácilmente en laboratorio y con un costo moderado; existe un número considerable de líneas mutantes y además, presenta paquetes enzimáticos dependientes de citocromo P-450 similares a la fracción S9 del hígado de mamíferos, los cuales tienen un papel fundamental en la bioactivación de los compuestos. Algunas otras características que lo hacen uno de los organismos más utilizados en la experimentación genética se muestran en la tabla VIII.

TABLA VIII
ALGUNAS CARACTERISTICAS DE *Drosophila melanogaster* QUE
LO HACEN UN ORGANISMO IDEAL PARA EXPERIMENTACION
GENETICA (Ramos et al., 1993)

- Ciclo de vida corto, diez días a 25°C y 60 % de humedad relativa.
- Fases del ciclo de vida fácilmente distinguibles entre sí..
- Gran número de descendencia en espacio reducido.
- Larvas con cromosomas gigantes (politénicos) en las glándulas secretoras.
- Dimorfismo sexual claramente definido

La prueba de mutación y recombinación somática (SMART), que involucra las células somáticas de alas de *Drosophila melanogaster* para evaluar diversos compuestos con respecto a su capacidad para producir alteraciones en el células somáticas de la mosca, puede discriminar entre compuestos mutagénicos, promutagénicos, recombinogénicos (Graf et al., 1984) y antimutagénicos (Orozco, 1993). Es capaz de detectar deleciones, mutaciones puntuales, recombinación y no disyunción (Frölich, 1989) (Fig. 1). Involucra los marcadores *mwh* (múltiples pelos en el ala) y *flr*³ (pelos en forma de flama), ambos recesivos y localizados en el cromosoma 3 de *Drosophila*, las larvas resultantes de esta cruce son de dos tipos: 1) portadoras del cromosoma balaceador TM3, *Ser* y, 2) transheterocigas para los dos marcadores, las segundas presentan fenotipo silvestre. El tipo de daño inducido por los compuestos a los que las larvas son expuestas se expresa como un fenotipo indicador en las células del ala; así un mosaico de células *mwh* se origina a partir de una deleción o una mutación puntual, o bien por recombinación entre los marcadores implicados; una mancha llamada gemela (con los fenotipos *mwh* y *flr*³) proviene de la recombinación entre el centrómero y el marcador *flr*³. El tamaño del clon puede ser influido por la edad a la cual fue tratada la larva, entre más joven el número de células que conforman el disco imagal será menor y si una de ellas es afectada pasará por más ciclos de divisiones mitóticas, (manchas grandes); o bien, porque el compuesto requiera ser bioactivado y sean sus metabolitos los causantes de la alteración (manchas de

menor tamaño), aunque cabe aclarar que esto no es una regla general en todos los casos (Graf et al., 1983).

El objetivo de este trabajo fue el valorar el efecto genotóxico del pentóxido de vanadio (V_2O_5) en la prueba de mutación y recombinación somática (ala), utilizando tres diferentes protocolos de exposición.

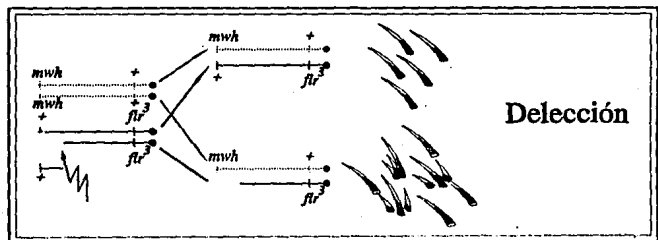
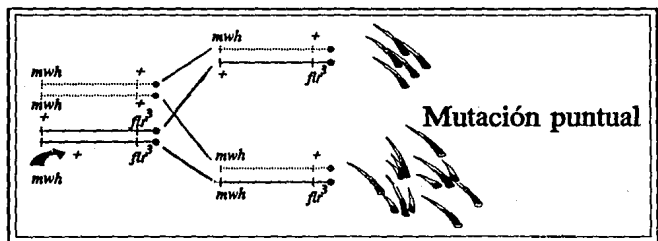
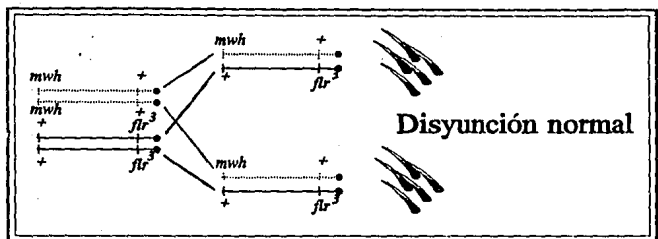


Fig. 1. Eventos genéticos detectados por la prueba SMART (ala)

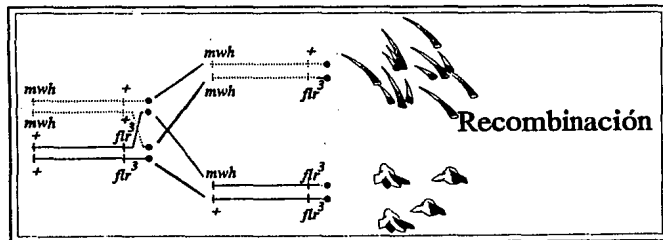
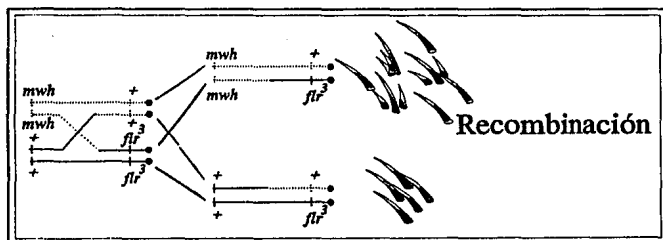
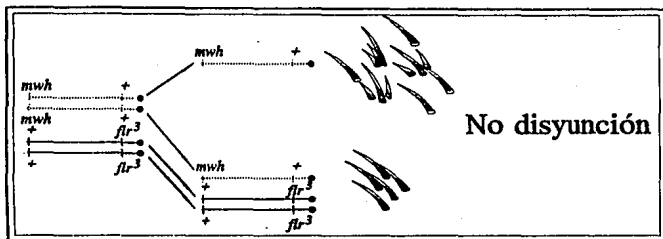


Fig. 1. Continuación.

II. MATERIAL Y METODOS

Material biológico:

Se utilizaron dos líneas de *Drosophila melanogaster*: *flr*³/*TM3*, *Ser* y *mwh*/*mwh* de las cuales se obtuvieron hembras vírgenes y machos, respectivamente.

El marcador *flr*³ (*flare*, 3-38.8) es recesivo y provoca que la expresión fenotípica de los tricomas de las alas sea similar a una flama, o bien, que únicamente se exprese como pequeños brotes amorfos quitinosos sobre la superficie del ala; en general, los tricomas tienen una longitud diferente a la del tipo silvestre, este marcador cuando se presenta en condición homóciga es letal para el organismo, por lo que para mantener la línea que lo presenta se utiliza el cromosoma balanceador *TM3*; el cual posee múltiples inversiones que impiden recobrar eventos de recombinación, la presencia del balanceador es indicada por el gene marcador dominante *Serrata* (*Ser*), el cual se manifiesta fenotípicamente por la aparición de muescas en el borde de las alas. *Ser*/*Ser* es letal, por lo que en esta cruce sólo se recobran heterocigotos *flr*³/*TM3*, *Ser* en cada generación (García-Bellido y Dapena, 1974; Graf et al., 1983).

El marcador *mwh* (*multiple wing hair*, 3-0.0) se manifiesta fenotípicamente por la producción de más de un tricoma por célula, en comparación con el tipo silvestre, el cual presenta sólo uno por cada célula del ala (Lindsley y Zimm, 1990).

Las larvas que se recobran de la cruce son de dos tipos y cada uno conforma el 50 % de la población total: trans-heterocigas para los dos marcadores recesivos, y portadoras del cromosoma balanceador TM3 y del cromosoma con el marcador *mwh*; no pueden distinguirse unas de otras en el estadio larvario por lo que ambas son tratadas, pero cuando son adultas las moscas trans-heterocigas presentan alas de tipo silvestre; en contraste, las portadoras del cromosoma balanceador se distinguen por las muescas características (*Serrata*) en los bordes de las alas.

Compuestos:

Pentóxido de vanadio (V_2O_5), Aldrich. El pentóxido de vanadio se disolvió en agua destilada y se dejó en agitación por un período de 24 horas, después de este lapso la mezcla era homogénea.

Procedimiento experimental:

Para seleccionar las concentraciones a probar se obtuvo la concentración letal que produce la muerte del 50 % de las moscas tratadas (LC_{50}). Grupos de 10 machos adultos de tipo silvestre (*Canton-S*) y 48 horas de edad, se colocaron en tubos homeopáticos que contenían papel filtro humedecido con la solución a probar. Cada ocho horas las moscas fueron transferidas a tubos con solución recién preparada. Después de 48 horas de exposición se cuantificó el número de moscas sobrevivientes. El procedimiento se repitió dos veces más para confirmar la respuesta. La LC_{50} para moscas adultas

se fijó en 8000 ppm (Fig. 2) y se eligieron tres concentraciones adicionales 4000, 3000 y 2000 ppm, sin embargo, al realizar los

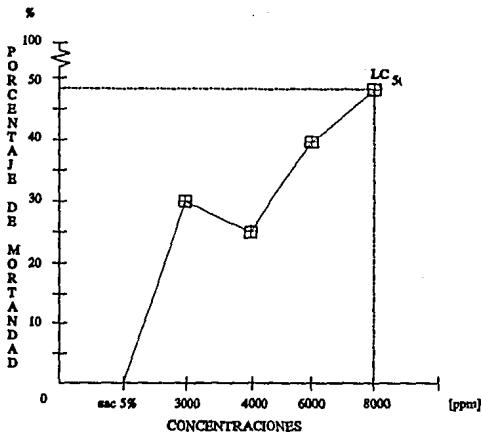


Fig. 2 Datos obtenidos al realizar la obtención de la LC₅₀

primeros tratamientos en SMART todos las larvas murieron debido a la toxicidad del pentóxido de vanadio. Dado esto las concentraciones se modificaron a 500, 1000, 1500 y 2000 ppm. Sólo a 500 ppm se recobraron organismos adultos, por lo cual finalmente se eligieron las concentraciones 32, 63, 125, 250 y 500 ppm, como testigo negativo siempre se utilizó agua destilada.

Se realizaron tres tipos de tratamientos (Fig. 3), para cada uno de ellos se realizó un experimento y su repetición, pero en algunos casos hubo de realizarse una segunda repetición, para alcanzar el número de organismos necesarios para el análisis estadístico.

Tratamiento agudo:

Tres días después de realizada la cruce se colectaron huevecillos sobre medio fresco durante 4 horas y se dejó que llegaran a la edad de 72 ± 2 horas de edad, las larvas se colectaron mediante el método de Nöthiger (1970) y se colocaron en tubos homeopáticos con gasa en un extremo para permitir el libre acceso de líquido, y un tapón de hule espuma en el otro, para evitar la salida de las larvas. Cada tubo se introdujo en un vaso de precipitado de 10 ml que contenía 0.1 gr de celulosa y 0.3 ml de la solución a probar. Después de 6 horas de tratamiento las larvas se lavaron con agua corriente para eliminar cualquier residuo del compuesto y finalmente se colocaron en frascos con medio nuevo para que completaran su desarrollo.

Tratamiento sub-crónico:

Se colectaron huevecillos con el mismo método que en el tratamiento agudo, se permitió el desarrollo de las larvas hasta la edad de 72 ± 2 horas, entonces se agregó a cada frasco 1.5 ml de la solución de prueba con la que se cubrió totalmente la superficie

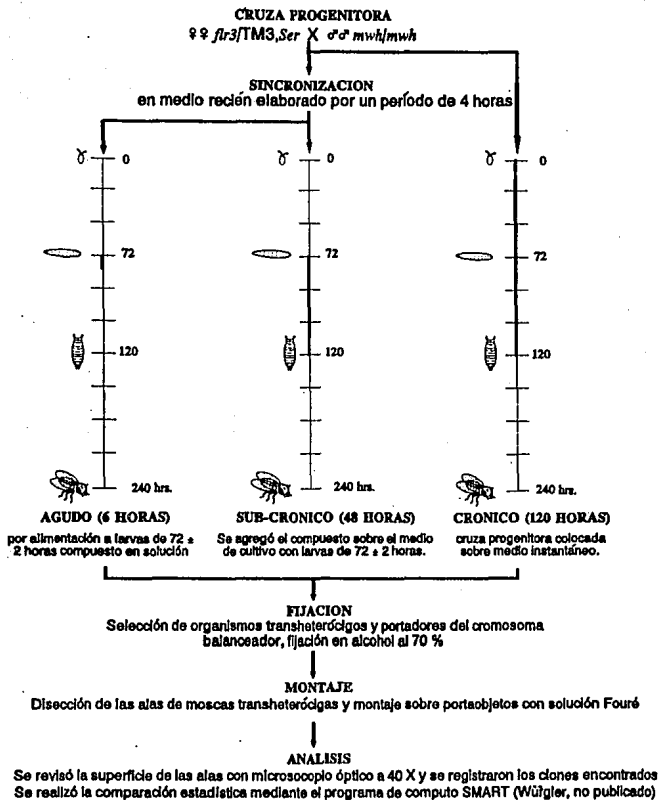


Fig. 3. Cronograma de los tres protocolos realizados

del medio de cultivo y se permitió que las larvas completaran su desarrollo.

Tratamiento crónico:

Tres días después de realizada la cruce, se procedió a colocar 10 parejas de adultos en tubos homeopáticos que contenían 1 gr de medio instantáneo Carolina (Carolina, 1994) y 5 ml del compuesto, durante un período de 48 horas; la progenie colectada de esta manera estuvo en contacto con el compuesto durante todo su desarrollo.

Análisis de las alas.

Una vez que los adultos emergieron se separó la progenie trans-heteróciga de la portadora del cromosoma balanceador y se fijaron en alcohol etílico al 70 %. Para elaborar las laminillas las moscas se enjuagaron con agua corriente y las alas se disectaron en solución Fauré con la ayuda de una pinza de relojero y una aguja de disección, las alas se colocaron en un portaobjetos en grupos de 40, de las cuales, las primeras 20 provenían de hembras y las restantes de machos. Se permitió que la solución secase por 48 horas para después colocar sobre ellas un cubreobjetos y una gota de solución Fauré y finalmente, se colocó sobre la laminilla una pesa para extender las alas y facilitar su observación al microscopio. Las laminillas se sellaron con barniz para hacerlas semipermanentes. Las alas fueron revisadas con un microscopio

óptico a 40X y las manchas encontradas se registraron con base en su localización en la ala y el número y tipo de células que los formaban: mwh, flr' o ambas (Fig. 4). Se examinaron un total de 120 alas por concentración, por protocolo.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de decisión múltiple de Frei y Würler (1988) y el programa de cómputo SMART (no publicado).

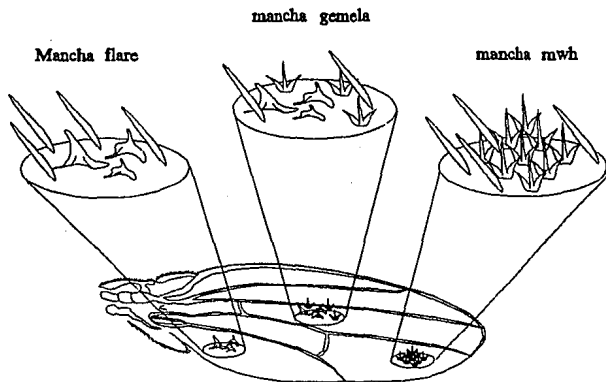


Fig. 4 Diferentes tipos de clones observados sobre la superficie de las alas.

III. RESULTADOS

El pentóxido de vanadio administrado en el tratamiento agudo (72 x 6 horas) (Tabla IX, Fig. 5), aumentó la frecuencia de aparición de clones de 1 a 2 células en todas concentraciones, excepto a 250 ppm, la frecuencia de manchas mayores de 2 células se incrementa con 32, 63 y 125 ppm, pero no significativamente. Para las tres primeras concentraciones, la frecuencia de manchas totales se incrementó significativamente ($P < 0.05$).

En el tratamiento sub-crónico (72 x 48 horas) (tabla X, fig 6), se obtuvo la mayor respuesta a 125 ppm, con incrementos significativos en las frecuencias de manchas simples chicas y grandes, y en la de manchas totales. De manera similar al tratamiento agudo, también en este protocolo se registró disminución en cuanto a la frecuencia de clones pequeños en la concentración de 250 ppm aumentando ligeramente en la de 500 ppm.

En el tratamiento crónico (0 x 120 horas) (Tabla XI, Fig 7), en ninguna de las diferentes concentraciones administradas se observó inducción de manchas mosaico por el pentóxido de vanadio de forma significativa.

Tabla IX. Frecuencia y número de manchas por ala obtenidos en el tratamiento agudo.

V ₂ O ₅ [ppm]	Número de alas analizadas	Manchas simples pequeñas (1-2 cel.) m=2		Manchas simples grandes (>2 cel.) m ₁ =5		Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Clones con manchas mwh	Promedio del número de ciclos de división celular	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁵	
		Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.			observado	Control corregido
Testigo*	120	0.11	13	0.03	4	0.02	2	0.16	19	18	2.17	0.6	
32	120	0.24	29 ⁺	0.04	5 ⁻	0.02	2 ⁱ	0.30	36 ⁺	36	1.86	1.2	0.6
63	120	0.26	31 ⁻	0.08	9 ⁱ	0.01	1 ⁱ	0.34	41 ⁺	41	2.02	1.4	0.8
125	120	0.32	39 ⁺	0.06	7 ⁱ	0.03	4 ⁱ	0.42	50 ⁺	50	2.02	1.7	1.1
250	120	0.17	20 ⁱ	0.03	4 ⁻	0.03	3 ⁱ	0.22	27 ⁱ	27	1.96	0.9	0.3
500	120	0.20	24 ⁺	0.01	1 ⁻	0.03	3 ⁱ	0.23	28 ⁱ	27	1.78	0.9	0.3

* Testigo negativo agua destilada.

+ = positivo; - = negativo; d⁺ = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.

Prueba estadística de una cola.

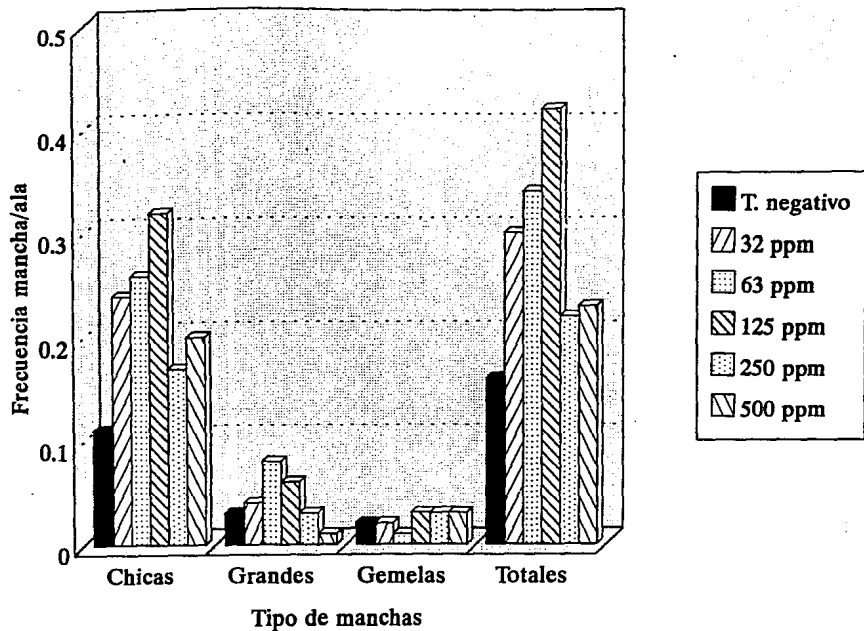


Fig. 5 Frecuencia de manchas/ala inducidas por V_2O_5 . (tratamiento agudo)

Tabla X. Frecuencia y número de manchas por ala obtenidos en el tratamiento sub-crónico.

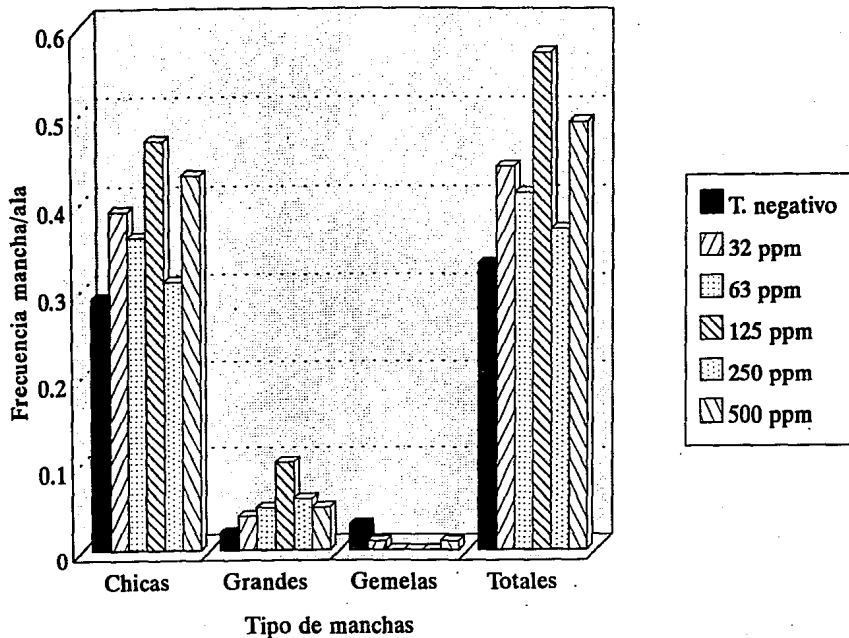
V ₂ O ₅ [ppm]	Número de alas analizadas	Manchas simples pequeñas (1-2 cel.) m=2		Manchas simples grandes (>2 cel.) m=5		Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Clones con manchas mwh	Promedio del número de ciclos de división celular	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁵	
		Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.			observado	Control corregido
Testigo *	120	0.29	35	0.02	2	0.03	3	0.33	40	40	1.65	1.4	
32	120	0.39	47 ⁻	0.04	5 ⁻	0.01	1 ⁻	0.44	53 ⁻	53	1.68	1.8	0.4
63	120	0.36	43 ⁻	0.05	6 ⁻	0.00	0	0.41	49 ⁻	49	1.47	1.7	0.3
125	120	0.47	57 ⁺	0.10	12 ⁺	0.00	0	0.57	69 ⁺	67	1.67	2.3	0.9
250	120	0.31	37 ⁻	0.06	7 ⁱ _i	0.00	0	0.37	44 ⁻	44	1.86	1.5	0.1
500	120	0.43	52 ⁺	0.05	6	0.01	1 ⁻	0.49	59 ⁺	58	1.60	2.0	0.6

* Testigo negativo agua destilada.

+ = positivo; - = negativo; d⁺ = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.

Prueba estadística de una cola.



36 Fig.6 Frecuencia de manchas/ala inducida por V_2O_5 . (Tratamiento subcrónico)

Tabla XI. Frecuencia y número de manchas por ala obtenidos en el tratamiento crónico.

V ₂ O ₅ [ppm]	Número de alas analizadas	Manchas simples pequeñas (1-2 cel.) m=2		Manchas simples grandes (>2 cel.) m ₁ =5		Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Clones con manchas mwh	Promedio del número de ciclos de división celular	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁵	
		Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.			observado	Control corregido
Testigo*	120	0.19	23	0.06	7	0.01	1	0.26	31	31	1.97	1.1	
32	120	0.29	35 ⁱ	0.04	5 ⁻	0.02	2 ⁱ	0.35	42 ⁱ	42	1.81	1.4	0.4
63	120	0.29	35 ⁱ	0.06	7 ⁻	0.00	0	0.25	42 ⁱ	40	1.65	1.4	0.3
125	120	0.22	27 ⁻	0.02	2 ⁻	0.01	1 ⁱ	0.25	30 ⁻	29	1.41	1.0	-0.1
250	120	0.23	28 ⁱ	0.05	6 ⁻	0.02	2 ⁱ	0.30	36 ⁻	35	1.97	1.2	0.1
500	120	0.17	21 ⁻	0.05	6 ⁻	0.02	2 ⁱ	0.24	29 ⁻	29	2.28	1.0	-0.1

* Testigo negativo agua destilada.

+ = positivo; - = negativo; d⁺ = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.

Prueba estadística de una cola.

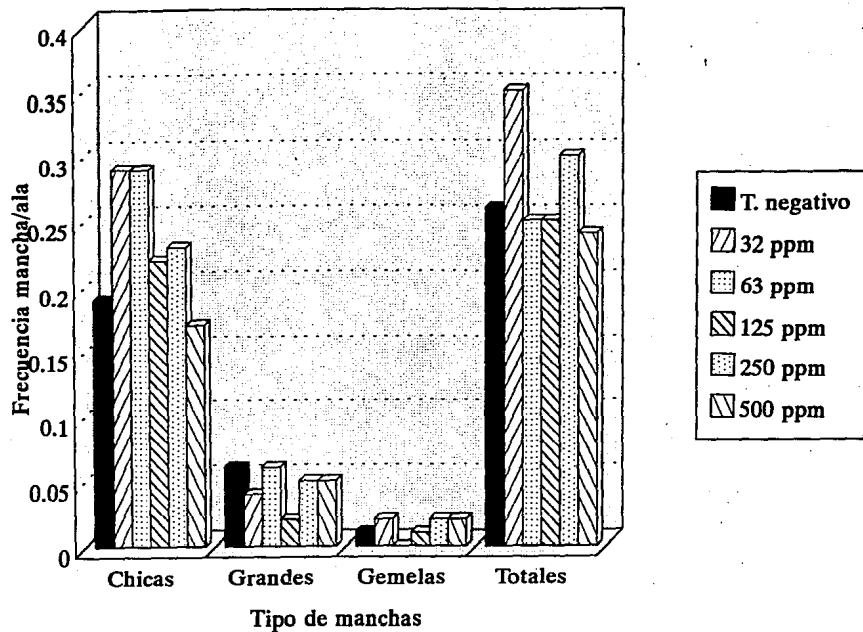


Fig.7 Frecuencia de manchas/ala inducida por V_2O_5 . (Tratamiento crónico)

IV. DISCUSION

Para determinar la genotoxicidad de un compuesto deben tomarse en cuenta diversos factores que inciden en la respuesta final. Por ejemplo, su composición química, su polaridad, el tamaño de la molécula, si ésta es muy grande, su entrada a la célula será limitada por el tamaño de los poros y/o el mecanismo de entrada; adicionalmente algunos xenobióticos tienen estructura química similar a los compuestos que ingresan de manera normal a la célula, compitiendo con ellos, lo que puede provocar el mal funcionamiento de diferentes rutas metabólicas y la posible muerte de la célula (Casarett y Doull, 1975).

Entre el gran número de biomoléculas implicadas en el metabolismo de las sustancias extrañas cuando ingresan a los organismos, están las enzimas dependientes del citocromo P-450, estas proteínas metabólicas derivan de una superfamilia de genes cuyos productos funcionan como mono-oxigenasas, además, intervienen en diversas reacciones bioquímicas como son el uso del oxígeno atmosférico, metabolismo endógeno (biosíntesis o catabolismo) de sustancias como los esteroides y los ácidos grasos y, biotransformación de diversos xenobióticos (incluyendo drogas y contaminantes ambientales). Si bien muchas enzimas dependientes de citocromo P-450 son parte del metabolismo normal, otras son activadas solamente en presencia de determinadas sustancias (Wiseman, 1993). En los seres humanos se han identificado más de treinta genes para

diversos tipos de citocromos P-450, y en la rata más de cuarenta, cada uno de ellos con actividad catalítica específica.

Cuando el xenobiótico que se analiza es un metal, muchas de las características intracelulares influyen en el tipo de acción, ya que, generalmente los metales reaccionan de múltiples maneras; por ejemplo, pueden formar iones de diferente valencia y reactividad que se unen a moléculas orgánicas e interfieren en su función (Rubinson, 1981).

En el caso específico del pentóxido de vanadio, cuando se encuentra en solución básica, uno de los iones que más frecuentemente se forma es el vanadato (VO_3^-), del cual se han descrito muchas características de su efecto sobre el metabolismo (Macara, 1980).

Por otro lado, la edad de los organismos expuestos modula la respuesta tóxica inducida por las mismas sustancias extrañas. En el caso concreto de los estadios larvarios de *Drosophila*, la sensibilidad a la toxicidad de los xenobióticos disminuye en el siguiente orden: 1º > 2º > 3º estadio (Fuchs et al., 1993). Así, la edad debe ser un factor de comparación ya que el daño generado en las distintas etapas del desarrollo puede ser diferente. Debido a estos rasgos distintivos, puede asumirse que durante las diferentes etapas del desarrollo de *Drosophila*, puede variar tanto la actividad enzimática como la sensibilidad.

SMART es una prueba versátil la cual permite modificar los diferentes parámetros que inciden en la respuesta final, como son

el tiempo y la ruta de exposición, la edad de la larva al momento del tratamiento, y otros más (Tabla XII), que al ser comparados contribuyen a determinar el mecanismo de acción, o bien, las posibles características del compuesto probado, además, dentro de la clasificación general de eventos detectados por las pruebas de corto tiempo (Tabla XIII) (Brusick, 1987), SMART engloba varios de los grupos que generalmente son detectados de manera individual por otros sistemas de prueba, por ejemplo, linfocitos *in vitro* o la prueba de Ames.

TABLA XII
CARACTERISTICAS DE LA PRUEBA DE MUTACION Y RE-
COMBINACION SOMATICA (SMART) CON *D. melanogaster*
(Graf et al., 1984)

- Utilizando una sola generación filial se obtienen resultados en comparación con otras pruebas como letales recesivos ligados al sexo o clastogenia, las cuales también utilizan *D. melanogaster*, pero requieren de más generaciones para sacar conclusiones.

- Las larvas pueden ser expuestas al compuesto probado desde el momento de la eclosión hasta poco antes de su entrada a pupación.

- Se analiza un número grande de células por ala (alrededor de 35,000).

- La ruta de exposición al compuesto es variada: inyección a larvas o adultos, alimentación, inhalación, por contacto, ducha vaginal, ésta se elige dependiendo de las características fisicoquímicas del compuesto.

TABLA XIII
CLASIFICACION DE LAS PRUEBAS DE CORTO TIEMPO
(Brusick, 1987)

Grupo	Características de los eventos detectados
<ul style="list-style-type: none"> • Mutación Génica • Aberraciones cromosómicas • Daño primario al ADN • Transformación morfológica 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en los nucleótidos intragénicos principalmente por adición, sustitución o delección. • Cambios estructurales y/o numéricos en el cariotipo normal. • grupos heterogéneos de interacciones de ADN, incluyendo aductos de ADN, rompimiento de hebras, estimulación de reparación de ADN, ICH. • Cambios morfológicos en blanco asociadas con tumorigénesis.

García Bellido y Merriam (1971), determinaron el número y el tamaño de los clones mutantes inducidos por radiación en larvas expuestas en diferentes estadios del desarrollo. Las sustancias con actividad genotóxica alteran la información de las células blanco en cuanto entran en contacto con ellas. En contraste, aquellas que son activadas mediante la participación del metabolismo (de acción indirecta), producirán clones con menor número de células afectadas, que el esperado según la edad de las larvas al momento del tratamiento.

Al estudiar el V_2O_5 mediante tres protocolos con diferentes tiempos de exposición, se tenía como objetivo seleccionar el más apropiado para determinar la actividad genotóxica del pentóxido de vanadio en las células somáticas de *Drosophila*.

La exposición aguda implica que los organismos son expuestos una sola vez a la sustancia problema, durante un lapso de tiempo corto, a concentraciones elevadas y la absorción es rápida; generalmente la tasa de acumulación no rebasa la de excreción y el compuesto puede ser, además, metabolizado; de manera general se producen efectos agudos, pero dadas las características de los compuestos probados, este tipo de exposiciones pueden dar la apariencia de respuestas de tipo crónico. En contraste la exposición de tipo crónico se realiza durante un lapso de tiempo más prolongado, el compuesto es liberado con cierta frecuencia o bien se encuentra presente durante toda la exposición; las concentraciones implicadas son, en general, menores que en la exposición aguda; además, si el rango de acumulación excede al de eliminación, la sustancia puede almacenarse en el organismo, o bien, si el compuesto resulta ser demasiado tóxico, se presentan alteraciones fisiológicas e inclusive la muerte (Casarett y Doull, 1975). De esta manera, es frecuente que en la exposición crónica la cantidad del compuesto que ingrese a un organismo sea mayor que la que éste recibiría en una aguda, lo cual puede repercutir en el metabolismo del individuo, principalmente debido a la toxicidad del compuesto involucrado.

En el protocolo agudo, las larvas fueron expuestas al V_2O_5 , durante un período corto y, en comparación con los otros dos tratamientos, es probable que la cantidad de compuesto ingerida por cada organismo haya sido menor. La frecuencia de manchas simples chicas y totales se incrementó de manera lineal hasta 125 ppm ($P < 0.05$), en las dos concentraciones superiores la respuesta obtenida no fue significativa, este efecto se atribuyó a la alta citotoxicidad del metal.

Cuando el tiempo de exposición aumentó, en el tratamiento subcrónico (48 horas), sólo se detectaron incrementos significativos en 125 y 500 ppm; y en 63 y 250 ppm la reducción en las frecuencias recobradas se asoció nuevamente con la citotoxicidad del V_2O_5 .

En lo que respecta al tratamiento crónico, la respuesta fue negativa para todo tipo de mancha, no obstante que en este protocolo la cantidad ingerida de V_2O_5 debe haber sido mayor que en los otros dos.

La intensidad de un tratamiento depende principalmente de factores como la ruta de administración, las concentraciones empleadas y la duración de la exposición. Debido a que en los tres protocolos la ruta de administración fue la misma (alimentación, contacto), no puede atribuirse a ésta la respuesta obtenida. Las concentraciones empleadas fueron las mismas, aunque en el protocolo subcrónico la concentración real fue menor debido a que se utilizó un tratamiento superficial y la distribución del compuesto no fue

uniforme en todo el medio de cultivo. Finalmente, la duración de la exposición podría ser la razón de la variación encontrada, aunque si el tiempo de exposición determinara la respuesta, la magnitud de la respuesta obtenida debería haber sido: crónico > subcrónico > agudo.

De lo anterior se desprende que la combinación entre la duración de la exposición, las concentraciones utilizadas y la gran toxicidad del V_2O_5 , provocaron la aparente inversión de la respuesta: agudo > subcrónico > crónico.

Cuando un compuesto es sumamente tóxico, como es el caso del V_2O_5 , existe el riesgo de que los resultados en ensayos *in vivo* e *in vitro* lleven a interpretaciones confusas, ya que, al aumentar las concentraciones, independientemente del tiempo de exposición, se encontrará una relación lineal en las más bajas, a medida que la concentración aumenta se alcanza el límite en el cual el efecto citotóxico es máximo y a partir de él, como una consecuencia de la inactivación o muerte celular, la respuesta disminuye. También, a medida que la concentración aumenta, los sistemas de desintoxicación, así como los de reparación responden con mayor intensidad al ser estimulados por la presencia del xenobiótico o del daño inducido, respectivamente; cuando se llega al límite en el cual todos los mecanismos de la célula son insuficientes para eliminar, degradar y/o reparar las alteraciones provocadas por la sustancia, la respuesta perderá uniformidad registrándose resultados alterados de los cuales no podrán obtenerse conclusiones claras.

En ninguno de los protocolos se incrementó la frecuencia de manchas gemelas, por lo que puede sugerirse que la recombinación no es inducida de manera importante por el pentóxido de vanadio.

Al comparar los resultados obtenidos por los tres protocolos, se observa que el pentóxido de vanadio, parece ser un agente mutagénico de acción indirecta en *Drosophila* ya que, la única frecuencia de inducción de clones que aumentó significativamente fue la de manchas chicas (1-2 células), en el tratamiento agudo. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que, debido a su alta toxicidad —la cual se hace evidente en los tratamientos subcrónico y crónico—, la aparente acción indirecta mostrada en el tratamiento agudo sea causada por la citotoxicidad del pentóxido de vanadio, lo cual provocaría la muerte de una parte de las células afectadas.

Cabe la posibilidad de que el V_2O_5 , no actúe directamente sobre el ADN, sino sobre las diferentes vías enzimáticas que actúan durante la metamorfosis del organismo. En el rango en que se aplicaron los tratamientos, las células indiferenciadas de los discos imagales de las alas sólo se dividen mitóticamente, sin embargo, es factible que algunos de los genes que portan información para la estructura final en el adulto, se empiecen a transcribir. Los ARNm o primeros transcritos se pliegan inmediatamente después de la transcripción y la maduración y, dado que no son requeridos en ese momento, se acumulan en estructuras conocidas como gránulos pericromatinianos, que son "almacenes" de ARNm los

cuales posteriormente serán traducidos cuando se dispare la diferenciación celular; estas moléculas portadoras de información para la formación de nuevas estructuras —aunque asociadas con proteínas—, están menos protegidas que el ADN que les dio origen y ofrecen por lo tanto muchos sitios susceptibles de interacción con otras moléculas. Si el pentóxido de vanadio o los iones en los cuales se disocia al ingresar a la célula, no actúan directamente sobre el ADN, es posible que por su alta reactividad interaccionen con las moléculas de ARNm acumuladas alterando su posterior traducción normal, o deteniéndola por completo; si esto ocurriera, a pesar de que la información de la célula es alterada, como el daño no es directo al ADN, no es heredable a la siguiente generación de células hijas y, en consecuencia, no se multiplicaría, lo cual explicaría el hecho de obtener manchas de 1-2 células principalmente, dando la apariencia de un agente de tipo indirecto.

Por su gran capacidad para competir con el fosfato en la función de las ATPasas-P, el vanadio es capaz de inducir la transcripción de algunos genes e inhibir la de otros en la misma célula, como ocurre en la glucólisis del hígado de ratas diabéticas; o bien de estimular la transcripción de genes en ratón o algunos otros organismos sin una especificidad aparente, lo cual permite considerar un posible mecanismo mediante el cual el metal actúa sobre los genes que regulan la expresión fenotípica de los tricomas. Dentro de las ATPasas que se ven inhibidas por compuestos de vanadio y que resultan de particular interés para este trabajo

son las Dineína-ATPasas, las cuales son enzimas de alto peso molecular que requieren de Ca^{2+} o Mg^{2+} para su funcionamiento y que están asociadas a microtúbulos, su función es la traducción de la energía química proveniente de la hidrólisis del ATP en trabajo mecánico tal como el movimiento de los cilios y los flagelos, intervienen también en el transporte exoplásmico, movimiento intracelular de vesículas y el movimiento de los cromosomas durante el proceso de división celular (Gibbons, 1982; Johnson y Porter, 1982). Al agregar diferentes concentraciones de compuestos de vanadio la formación del huso durante la mitosis y la meiosis se ve inhibido en diferentes grados, lo cual provoca una distribución anormal de los cromosomas causando posiblemente aneuploidías. Este tipo de daño a nivel del huso, es uno de los eventos detectados por SMART mediante la aparición de clones de células *mwh*. Dado esto se puede suponer que algunas de las manchas que se detectaron sobre la superficie de las alas se deben a eventos de no disyunción, provocados por la capacidad mitogénica del pentóxido de vanadio.

Este trabajo permitió detectar una posible actividad mutagénica del pentóxido de vanadio, en el tratamiento agudo y un alto grado de citotoxicidad en *Drosophila melanogaster*, sin embargo, es recomendable evaluar nuevamente la genotoxicidad de este compuesto utilizando concentraciones menores en tratamientos agudos con el fin de confirmar la inducción de manchas en concentraciones que no sean tóxicas para el sistema de células utilizado.

V. CONCLUSIONES

- 1) En las condiciones probadas el pentóxido de vanadio resultó altamente citotóxico para *Drosophila melanogaster*.
- 2) La duración de la exposición fue determinante de la intensidad real de los tratamientos: crónico > subcrónico > agudo.
- 3) Por la toxicidad del pentóxido de vanadio, solamente el tratamiento agudo detectó el daño inducido por éste.
- 4) El pentóxido de vanadio mostró ser un probable promutágeno, no recombinogénico.

VI. SUGERENCIAS

- 1) Se recomienda una nueva evaluación del potencial genotóxico del pentóxido de vanadio utilizando concentraciones menores.

VII. REFERENCIAS

ACGIH (1992) Threshold limited values and biological exposure indices for 1992-1993, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati, OH.

Altamirano, M.A. (1992) Efectos mutagénicos y alteraciones del ciclo reproductivo del ratón producidos por pentóxido de vanadio. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM, 84 pp.

Arnon, D.I. y G. Wessel (1953) Vanadium as an essential element for green plants. *Nature (Lond.)*, 172: 1039-1040.

Beaugé, L.A. y I.M. Glynn (1977) A modifier of (Na^+K^+) ATPase in commercial. *Nature* 268: 355-356.

Berry, C.W., T.J. Moore, J.A. Safar, C.A. Henry y M.J. Wagner (1992) Antibacterial activity of dental implant metals. *Implant. Dent.* 1(1): 59-65.

Bertrand, D. (1950) Survey of contemporary knowledge of biochemistry. II. The biogeochemistry of vanadium. *Bull. Am. Mus. Natl Hist.*, 94(7): 407-455.

Biggs, W.R. y J.H. Swinehart (1976) Vanadium in selected

biological systems. En: Metals ions in biological systems; biological actions of metal ions. ed. H. Sigel, 6: 141-96. New York: Dekker, 453 pp.

Blotcky, A.J., C. Falcone, V.A. Medina, E.P. Rack y D.W. Hobson (1979) Determination of trace-level vanadium in marine biological samples by chemical neutron activation analysis. Anal. Chem. 51: 178-182.

Borisenko, L.F. (1953) Vanadium. Moscow, Nedra Publishing House.

Brichard, S.M., B. Desbuquois y J. Girard (1993) Vanadate treatment of diabetic rats reverses the impaired expression of genes involved in hepatic glucose metabolism: effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes, and on glucose transporter GLUT2. Mol. Cell Endocrinol. 91(1-2): 91-7.

Brusick, D. (1987) Principles of Genetic toxicology. Plenum Press, New York.

Budavari, S., M.J. O'Neil, A. Smith y P.H. Heckelman (Eds.) (1989) The Merck Index, 11th ed. Merck & Co. Inc., Rahway, NJ.

Byerrum, R.U. (1991) Vanadium, en E. Merian (Ed.) Metals and

their compounds in the environment, occurrence, analysis and biological relevance. VCH, Weinheim: 1289-1297.

Byrne, A.R. y L. Kosta (1978) Vanadium in foods and in human body fluids and tissues. *Sci. Total Environ.* 10: 17-30.

Byrne, A.R. y L. Kosta (1979) On the vanadium and tin contents of diet and human blood. *Sci. Total Environ.* 13: 87-90.

Cam, M.C., R.A. Pederson, R.W. Brownsey y J.H. McNeill (1993) Long-term effectiveness of oral vanadyl sulphate in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 36(3): 218-224.

Cantley, L.C. Jr. y P. Aisen (1979) The fate of cytoplasmic vanadium. Implications on (Na,K)-ATPase inhibition. *J. Biol. Chem.* 254: 1781-784.

Cantley, L.C. Jr., L. Josephson, R. Warner, M. Yanagisawa, C. Lechene y G. Guidotti (1977) Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* 252: 7421-7423.

Cantley, L.C. Jr., L.G. Cantley y L. Josephson (1978) A characterization of vanadate interactions with the (Na,K)-ATPase. Mechanistic and regulatory implications. *J. Biol. Chem.* 253: 7361-

7368.

Cantley, L.C. Jr., L. Josephson, J. Gelles y L.G. Cantley (1979) The active site structure of the Na, K-ATPase. En: Na, K-ATPase Structure and Kinetics, eds. J. C. Skou y J.G. Norby, Academic. New York 549 pp.

Carolina (1994) Biology/Science materials. Catalog 64. 122 pp.

Carpenter, G. (1981) Vanadate, epidermal growth factor and the stimulation of DNA synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 1115-1121.

Casarett, L.J. y J. Doull (1975) Toxicology, the basic science of poisons. Mcmillan Publishing Co., Inc. pp 654.

Clark, R.J.H. (1973) Vanadium. En: Comprehensive inorganic chemistry. C. Bailar Jr (ed.). Pergamont 3: 491-551, New York, 1387 pp:

Cohen, M.D., C.B. Klein y M. Costa (1992) Forward mutations and DNA-protein crosslinks induced by ammonium metavanadate in cultured mammalian cells. Mutat. Res. 269(1): 141-148.

Cohen, M.D., E. Parsons, R.B. Schlesinger y J.T. Zelikoff (1993) Immunotoxicity of *in vivo* vanadium exposures: effects on interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E2 production by WEHI-3 macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.* 15(3): 437-446.

Cornelis, R., J. Versieck, L. Mees, J. Hoste y F. Barbier (1981) The ultratrace element vanadium in human serum. *Biol. Trace Element Res.* 3: 257-263.

Cowgill, U.M. (1973) The determination of all detectable elements in the aquatic plants of Linsley Pond and Cedar Lake (North Branford, Connecticut) by X-ray emission and optical emission spectroscopy. *Appl. Spectrosci.*, 21: 603-612.

Davies, N.T. (1981) An appraisal of the newer trace elements. *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* 294: 171-184.

Dick, D.A.T., G.J. Naylor y E.G. Dick (1982) Plasma vanadium concentration in manic-depressive illness. *Psychol. Med.* 12: 533-537.

Dilworth, M.J., M.E. Eldridge y R.R. Eady (1993) The molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*: effect of elevated temperature on N₂ reduction. *Biochem. J.* 289: 395-400.

Endo, M. (1993) Effects of vanadate on glucose metabolism of the streptozotocin-diabetic rat lens. *Nippon Ganka-Gakkai-Zasshi* 97(3): 333-339.

Frei, H. y F.E. Würzler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.* 230: 297-308.

Frölich, A. (1989) Genotoxizitätsprüfung mit *Drosophila melanogaster*: Neue testerstämme mit erhöhter metabolischer Kapazität, Thesis No. 8850. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.

Fuchs, S.Y., V.S. Spiegelman y G.A. Beltsky (1993) The effect of the Cytochrome P-450 system inducer on the development of *Drosophila melanogaster*. *J. Biochem. Toxicology*, Vol. 8, No. 2: 83-88.

García-Bellido A. y J.R. Merriam (1971) Clonal parameters of tergite development in *Drosophila melanogaster*. *Develop. Biol.* 26: 264-276.

García-Bellido, A. y J. Dapena (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*.

Mol. Gen. Genet. 128:117-130.

Gibbons, I.R. (1982) Dynein ATPases. Prog. Clin. Biol. Res. 80: 87-93.

Glynn, I.M. y D.E. Richards (1982) Occlusion of rubidium ions by the sodium-potassium pump: its implications for the mechanism of potassium transport. J. Physiol. 330: 17-43.

Goldshtejn, M.I. (1967) Vanadium containing steels. Moscow, Chernetinformacija.

Graf, U., Juon, H., Katz, A.J., Frei, H.J. and Würgler, F.E. (1983) A pilot study on a new *Drosophila* spot test. Mutation Res. 120: 233-239.

Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G. (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mutagen., 6: 153-188.

Green, A.K., I.L. McDowall, S.C. Richardson y M.J. Fisher (1992) The effect of vanadate upon the expression of phenylalanine hydroxylase in streptozotocin-diabetic rat liver. Biochim. Biophys. Acta 1180(1): 21-27.

Grin, A.V., Blum, A.A., Seletkov, A.L., Freidenzon, Yu.E. y Naimuchina, L.F. (1971) Low-alloyed welded steels containing vanadium for construction. In: Problems of Kachkanar, Sverdlovsk, Central Bureau of technical information, pp. 186-196.

Hansen, O. (1979) Facilitation of ouabain binding to (Na^+K^+) ATPase by vanadate at in vivo concentrations. *Biochim. Biophys. Acta* 568: 265-269.

Hansen, O. (1980) Vanadate interaction with Na, K-ATPase. An assay of serum vanadium based on the displacement of (^{51}V) vanadate from Na, K-ATPase. *Basic Res. Cardiol.* 75: 455-459.

Hansen, O. (1982) Studies on ouabain-complexed (Na^+K^+) -ATPase carried out with vanadate. *Biochim. Biophys.* 692: 187-195.

Hori, C. y T. Oka (1980) Vanadate enhances the stimulatory action of insulin on DNA synthesis in cultured mouse mammary glands. *Biochim. Biophys. Acta*, 610: 235-240.

Hsu, S.Y. y F.W. Goetz (1992) Oxoanions stimulate in vitro ovulation and signal transduction pathways in goldfish (*Carassius auratus*) follicles. *Am. J. Physiol.* 263 (5-1): E 943-949.

Jackson, J.L. y H.F. Linskens (1982) Metal ion induced

unscheduled DNA synthesis in Petunia Pollen. Mol. Gen. Genet. 187: 112.

Johnson, K.A. y M.E. Porter (1982) Transient state kinetic analysis of the dynein ATPase. Prog. Clin. Bio. Res. 80: 101-106.

Josephson, L. y L.C. Jr. Cantley (1977) Isolation of a potent (Na-K)ATPase inhibitor from striated muscle. Biochemistry 16: 4572-4578.

Kada, T. Hirano, K. y Shirasu, Y. (1980) Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with *Bacillus subtilis*. In: de Serres, F.J. & Hollander, A., ed. Chemical mutagens: principles and methods for their detection, New York, Plenum Press, pp. 149-173.

Kanematsu, K. y Kada, T. (1978) Mutagenicity of metal compounds. Mutation Res., 53(2): 207-208.

Kanematsu, N., Hara, M. y Kada, T. (1980) Rec-assay and mutagenicity studies on metal compounds. Mutation Res., 77: 109-116.

Kelm, W. y K.H. Schaller (1978) The quantitative determination of vanadium in blood samples of ecologically and occupationally

exposed persons with a specific and sensitive method. *Wiss. Umwelt.*

1:34-42.

Krauskopf, F.K. (1963) Factors governing the concentration of thirteen rare metals in seawater. Collected articles on the geochemistry of rock formation. En: *The geochemistry of lithogenesis*. Moscow, Foreign Languages Publishing House, pp. 294-338.

Kubena, L.F. y T.D. Phillips (1983) Toxicity of vanadium in female leghorn chickens. *Poult. Sci.* 62: 47-50.

LaTouche, Y.D., C.W. Bennett y M.C. Mix (1981) Determination of vanadium in a marine mollusc using a chelating ion exchange resin and neutron activation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 224-227.

Lindsley, L.D. y G.G. Zimm (1990) *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press Inc. U.S.A.

Macara, I.G. (1980) Vanadium -An element in search of a role. *Trends Biochem. Sci.* 5: 92-94.

Macara, I.G., K. Kustin y L.C. Cantley Jr. (1980) Glutathione reduces cytoplasmic vanadate. Mechanism and physiological implications. *Biochim. Biophys.* 629: 95-106.

McDonald, E., A. LeRoy y M. Linnoila (1982) Failure of lithium to counteract vanadate-induced inhibition of red blood cell membrana Na^+ , K^+ -ATPase. Lancet 2: 774.

Mc Leand, J.R., R.S. Mc Williams, J.G. Kaplan y H.C. Birnboim (1982) Rapid detection of DNA strand breaks in human peripheral blood cells and animal organs following treatment with physical and chemical agents, En: K.C. Bora, G.R. Douglas y E.R. Nestman (Eds.), Chemical mutagenesis, human population monitoring and genetic risk assessment, Elsevier, Amsterdam.

Hertz, W. (1974) The newer essential trace elements, chromium, tin, vanadium, nickel and silicon. Proc. Nutr. Soc. 33: 307-313

Michibata, H., J. Uchiyama, Y. Seki, T. Numakanai y T. Uyama (1992) Accumulation of Vanadium during embryogenesis in the vanadium-rich ascidian, *Ascidia gemmata*. Biological Trace Element Reserch, Vol. 34: 219-223.

Myron, D.R., Givand, S.H., Nielsen, F.H. (1977) Vanadium content of select food as determined by flameless atomic absorption spectroscopy. J. Agric. food Chem. 28: 79-82.

Myron, D.R., T.J. Zimmermann, T.R. Shuler, L.M. Klevay y D.E. Lee (1978) Intake of nickel and vanadium by humans a survey of

selected diets. Am. J. Clin. Nutr. 31: 525-531.

NAS (1974) Vanadium, Washington DC, National Academy of Sciences.

Nechay, B.R. y J.P. Saunders (1978) Inhibition by vanadium of sodium and potassium dependent adenosinetriphosphatase derived from animal and human tissues. J. Environ. Pathol. Toxicol. 2: 247-262.

Nöthiger, R. (1970) Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae. Dros. Inf. Serv. 45: 177.

Oberg, S.G., R.D.R. Parker y R.P. Sharma (1978) Distribution and elimination of an intratracheally administered vanadium compound in the rat. Toxicology 11: 315-323.

Ordhzonikidze, E.K., Roschin, A.V., Shalганova, I.V., Bogomazov, M. YA. & Kasimov, M.A. (1977) On distribution and elimination of vanadium from the organisms. Gig. Tr. prof. Zabol., 6: 29-34.

Orozco, S.P.G. (1993) Efecto protector de la vitamina E y de los β -carotenos en contra de la mutagenicidad de la mitomicina-C (MMC) en la prueba somática de ala de *Drosophila melanogaster*.

Tesis de Maestria, Facultad de Ciencias, UNAM, 109 pp.

Pazhynich, V.M. (1967) Experimental basis for the determination of maximum allowable concentration of vanadium pentoxide in atmospheric air. En: Rjazanov, V.A., ed. The biological effect and hygienic importance of atmospheric pollutants. Moscow, Medicine Publishing House. pp. 201-217.

Peterburgskij, A.V. & Tormasova, E.E. (1969) The effect of vanadium on certain physiological processes in the pea. Dok. Timiryazevsk. Akad., 149 pp.

Post, R.L., D.P. Hunt, M.O. Walderhaug, R.C. Perkins, J.H. y Park (1979) Vanadium compounds in relation to inhibition of sodium and potassium adenosine triphosphatase. En: Na, K-ATPase Structure and Kinetics, eds. J. C. Skou y J.G. Norby, Academic. New York 549 pp.

Quist, E.E. y L.E. Hokin (1978) The presence of two ($\text{Na}^+\text{+K}^+$)-ATPase inhibitors in equine muscle ATP: Vanadate and a dithioerythrinol-dependent inhibitor. Biochem. Biophys. 511: 202-212.

Raina, R., U.K. Bageshwar y H.K. Das (1993) The ORF encoding a putative ferredoxin-like protein downstream of the *vnfH* gene in *Azotobacter vinelandii* is involved in the vanadium-dependent

alternative pathway of nitrogen fixation. Mol. Gen Genet. 236(2-3): 459-462.

Ramos, R., H. Abundis, J.C. Gaytán, M.G. Tellez, P.G. Orozco, J. Maldonado, J. Hernández, E. González, P. Reyes, E.M. Galicia y J.A. Muñoz (1993) Manual de laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw-Hill, 1a. edición, México, D.F. 131 pp.

Rifkin, R.J. (1965) *In vitro* inhibition of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ and Mg^{2+} ATPases by mono- di-, and trivalent cations. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 120: 802-804.

Roldán, C.E. y M.A. Altamirano (1990) Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. Mutation Res. 245: 61-65.

Robinson, J.D. y R.W. Mercer (1981) Vanadate binding to the ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) ATPase. J. Bioenerg. Biomembr. 13: 205-218.

Rubinson, K.A. (1981) Concerning the form of biochemically active vanadium. Proc. R. Soc. London Ser. B 212: 65-84.

Ruhling, A. (1971) Pollution with heavy metals in the greater Stockholm area. En: Report No. 12 on ecological heavy metal

research. Lund, University of Lund, Department of Plant Ecology.

Serradas, P., D. Bailbe, O. Blondel y B. Portha (1991) Abnormal B-cell function in rats with non-insulin-dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin: effect of in vivo insulin, phlorizin, or vanadate treatments. *Pancreas* 6(1): 54-62.

Shechter, Y. y A. Shisheva (1993) Vanadium salts and the future treatment of diabetes. *Endeavour* 17(1): 27-31.

Smith, J.B. (1983) Vanadium ions stimulate DNA synthesis in Swiss mouse 3T3 and 3T6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 80(20): 6162-6166.

Söremark, R. (1967) Vanadium in some biological specimens. *J. Nutr.* 92: 183-190.

Stroop, S.D., G. Helinek y H.L. Greene (1982) More sensitive flameless atomic absorption analysis of vanadium in tissue and serum. *Clin. Chem.* 28: 79-82.

Sun, M. (ed) (1987) Toxicity of vanadium and its environmental health standard, Changdu West China University of Medical Sciences, Report.

Thürauf, J., K.H. Schaller, G. Syga y D. Weltle (1978) The vanadium concentration of human placenta. *Wiss. Umwelt* 2: 84-88.

Tipton, I.H., P.L. Stewart y J. Dickson (1969) Patterns of elemental excretion in long term balance studies. *Health Phys.* 16: 455-462.

Tyler, G. (1970) Pollution with heavy metals in the Norrkköping area. II. Molybdenum and vanadium. En: Report No. 12 on ecological heavy metal research. Lund, University of Lund, department of Plant Ecology.

Underwood⁽¹⁾, E.J. (1977) Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press, New York, 4th ed. 454 pp.

Underwood⁽²⁾, E.J. (1977) Vanadium. En: Trace elements in human and animal nutrition, 4th ed., New York, Academic Press, pp. 388-397.

Van-Schijndel, J.W., E.G. Vollenbroek y R. Wever (1993) The chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*; a novel vanadium enzyme. *Biochem. Biophys. Acta* 1161(2-3): 249-256.

Versieck, J. y R. Cornelis (1980) Normal levels of trace elements in human blood plasma or serum. *Anal. Chem.* 116: 217-254.

Vyskocil, F., J. Pilar, H. Zemková y J. Teisinger (1982) Reduction of vanadate to vanadyl by methylene-blue, imipramine, and chlorpromazine in absence of NADH. Lancet 1: 1078-1079.

Wiseman, A. (1993) Genetically-engineered mammalian cytochromes P-450 from yeasts, potential applications. Trends in Biotech. Vol. 11: 131-136.

Wu, P.H. y J.W. Phillips (1979) Effects of vanadate of brain ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) ATPase and p-nitrophenylphosphatase interactions with mono- and di-valent ions and with noradrenaline. Int. J. Biochem. 10: 629-635

Yin, X., A.J. Davison y S.S. Tsang (1992) Vanadate-induced gene expression in mouse C123 cells: roles of oxygen derived active species. Mol. Cell Biochem. 115 (1): 85-96.