



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

1  
2-  
Rey

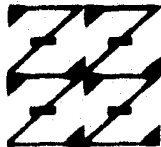
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

"ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO PRODUCIDO  
POR LA INTERACCIÓN VANADIO-CAFEINA APLICADOS  
EN DIFERENTES CICLOS DE DIVISIÓN CELULAR,  
EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS"



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  
CATIA AGUILAR MORALES

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: M. en IBSh. ELIA ROLDÁN REYES

MÉXICO, D.F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción (UIBR), de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" UNAM, bajo la dirección de la M. en IBSH. Ella Roldán Reyes.**

## **DEDICO ESTE TRABAJO A:**

A mi padre

**GUILLERMO AGUILAR M.**

Por haber sido mi guía y enseñarme las cosas que son importantes en la vida.

A mi madre

**AMPARO MORALES G.**

Por haberme dado la vida y apoyarme en los momentos difíciles.

A mis hermanos

Por su apoyo, cariño y comprensión.

**A E. Fernando**

Por su apoyo y cariño.

## **AGRADESCO A:**

La M. en IBSH. Elia Roldán Reyes  
Por su apoyo, consejos y orientación  
para la realización de esta tesis.

Al Dr. Mario A. Altamirano Lozano  
Por su apoyo y sus sugerencias

Francisco Chaves por ser parte de  
los donadores para la realización de  
esta investigación.

Juana Hernández A. Por apoyarme en  
los momentos más difíciles.

A los miembros del jurado:

Dr. Mario A. Altamirano Lozano  
M. en IBSH. Elia Roldán Reyes  
QUIM. Teresa Mendoza Mata  
Dra. Patricia Rosas Saucedo  
M. En C. Luis Sánchez Sánchez

Por sus comentarios y sugerencias  
en la revisión de este trabajo.

A todos mis amigos que de alguna forma  
contribuyeron a la realización de esta  
investigación.

---

## CONTENIDO

---

	Pag.
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
1. PAPEL DE LOS METALES EN EL ORGANISMO	2
2. EXPOSICIÓN A METALES	2
3. VANADIO	3
3.1 CINÉTICA DEL VANADIO	6
3.2 EFECTOS MUTAGÉNICOS DEL VANADIO	7
4. CAFEINA	9
4.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	10
4.2 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	11
4.2.1 ABSORCIÓN	11
4.2.2 DISTRIBUCIÓN	11
4.3 METABOLISMO Y ELIMINACIÓN	13
4.4 TOXICIDAD	13
5. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN	15
5.1 FOTORREACTIVACIÓN	17
5.2 REPARACIÓN POR ESCISIÓN	17
5.3 REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN O POSREPLICATIVO	18
5.4 REPARACIÓN DEL ADN EN MAMÍFEROS	19
5.5 REPARACIÓN SOS	20
6. LINFOCITOS HUMANOS COMO SISTEMA DE PRUEBA	21

7. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH's)	22
7.1 ANTECEDENTES	22
7.2 SÍNTESIS DEL ADN Y FORMACIÓN DE ICH's	23
7.3 ICH's COMO INDICADOR DE DAÑO EN EL ADN	23
7.3.1 DESVENTAJAS DE LA UTILIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ICH's	24
8. CINÉTICA DE LA DIVISIÓN CELULAR	24
II. JUSTIFICACIÓN	29
III. HIPÓTESIS	30
IV. OBJETIVOS	31
V. MATERIAL Y MÉTODO	32
1. COMPUESTOS QUÍMICOS	32
2. CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS	32
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	33
4. TINCIÓN DIFERENCIAL DE CROMÁTIDAS HERMANAS	36
5. EVALUACIONES	36
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
VI. RESULTADOS	37
VII. DISCUSIÓN	43
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. REFERENCIAS	51

---

## RESUMEN

---

El vanadio ( $V_2O_5$ ) se encuentra en el medio por el uso de combustibles de tipo fósil como el petróleo y de elementos como el carbón que son utilizados para la obtención de energía. La información relacionada a la genotoxicidad y al potencial carcinogénico del  $V_2O_5$  es limitada. En relación a sus efectos reproductivos, se ha reportado que en animales de laboratorio este metal en forma de metavanadato se acumula en la placenta y es excretado en la leche. Por otro lado, es de gran interés la posibilidad de que este metal sea utilizado en el tratamiento de diabetes tipo I (insulina-dependiente), ya que las sales de vanadio mimetizan *in vitro* muchas acciones de la insulina en varios tipos celulares. El vanadio y sus diferentes sales tienen efectos genotóxicos reportados en diferentes sistemas de prueba por ejemplo: incrementa las frecuencias de aberraciones cromosómicas, micronúcleos (en linfocitos humanos), e intercambio de cromátidas hermanas (en células de ovario de hámster Chino). En este estudio se evaluaron los efectos genotóxicos y citotóxicos del vanadio, combinado con un agente como la cafeína que es capaz de potencializar los efectos mutagénicos y letales de compuestos genotóxicos. Se utilizó como sistema biológico de prueba los linfocitos humanos en cultivo, cosechados a las 72 horas. Para obtener la tinción diferencial del intercambio de cromátidas hermanas (ICH's), 24 horas después de iniciados los cultivos se les adicionó bromodesoxiuridina (BrdU), se realizaron tres tratamientos de  $V_2O_5$  aplicados en los diferentes tiempos de división celular (0, 24 y 48 horas de haber iniciado los cultivos) utilizando concentraciones de 2, 4 y 6  $\mu\text{g/ml}$ , en combinación con cafeína (20  $\mu\text{g/ml}$ ). La cafeína se adicionó a las cero (siembra), 24 y 48 horas de haber iniciado los cultivos por



tratamiento. Se cuantificó la frecuencia de ICH's, el índice mitótico (IM) y la tasa de proliferación linfocítica (TPL). Todas las evaluaciones se realizaron por duplicado y a doble ciego en un microscopio óptico.

Los resultados que se obtuvieron al aplicar el  $V_2O_5$  en la concentración de 6  $\mu\text{g/ml}$  más cafeína a las cero horas, mostraron una disminución significativa en el índice mitótico (IM) y la tasa de proliferación linfocítica (TPL), se incrementó. El mismo tratamiento pero con cafeína a las 24 horas también modificó la TPL y con cafeína a las 48 horas se observó una disminución en el IM. Cuando el  $V_2O_5$  se adicionó a las 24 horas con cafeína a las 24 y 48 horas, se observó un aumento en la TPL. Sin embargo, cuando el  $V_2O_5$  se aplicó a las 48 horas en combinación con cafeína a las 24 horas se vio un aumento en la frecuencia de ICH's en la concentración más alta de  $V_2O_5$  y al agregar la cafeína a las 48 horas de haber iniciado los cultivos en el mismo tratamiento este aumento se vio más marcado en las concentraciones de 4 y 6  $\mu\text{g/ml}$  de vanadio, con respecto al índice mitótico éste disminuyó en las 3 concentraciones de vanadio utilizadas. En este tratamiento aumentó la TPL, lo cual quiere decir que el vanadio alarga el tiempo generacional. Con todos estos resultados se concluyó que la citotoxicidad del vanadio no se modifica por acción de la cafeína; probablemente el vanadio inhibe la fase de G<sub>1</sub> del ciclo celular, el efecto genotóxico del vanadio se observó cuando la cafeína fue aplicada simultáneamente en el segundo ciclo de división, la cafeína inhibió los mecanismos de reparación de escisión y posreplicativo en este modelo experimental, en donde el mecanismo de escisión juega un papel muy importante en la persistencia de las lesiones del ADN.

## I. INTRODUCCIÓN

En el planeta se han identificado cerca de seis millones de compuestos químicos tanto naturales como sintéticos, de los cuales entre 70,000 y 80,000 son de uso cotidiano, anexándose normalmente entre 500 y 1000 compuestos diferentes por año. Dentro de los agentes químicos considerados como peligrosos tanto por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), como por la Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), están los metales ya que con el tiempo se ha demostrado su toxicidad y los efectos adversos que ejercen sobre los organismos (Ortiz-Monasterio et al., 1987).

Los metales pesados se definen como elementos cuya densidad es superior a  $5 \text{ g/cm}^3$  (Lenthinger, 1982). Dentro de los 109 elementos químicos, 80 son clasificados como metales, con lo cual estos vienen a formar la mayor parte de la química inorgánica. Desde el punto de vista práctico, los metales son identificados con base en las propiedades físicas que presentan en estado sólido, como son la reflexión, conductividad eléctrica y térmica, sus propiedades mecánicas, magnéticas y su estructura cristalina (Friberg y Nordberg, 1990).

Los metales son compuestos con un amplio rango de oxidación, como los inorgánicos (algunas sales), los complejos metálicos o coordinados y los compuestos de tipo organometálico o combinados con otros metales. Cuando se disuelven en agua muchos metales son capaces de dissociarse en iones, elementos de tipo metálico, siendo el más común el catión, aunque en ocasiones puede incluir el oxanión (Friberg y Nordberg, 1990).

Una de las propiedades más sobresalientes de los elementos metálicos es que no son capaces de formar una amplia gama de compuestos inorgánicos, los cuales a pesar de su variabilidad, están clasificados en dos grandes grupos: los binarios y los multielementales. De estos, los primeros son los que presentan interés desde el punto de vista toxicológico y tecnológico ya que dentro de éstos se encuentran los óxidos y los

sulfitos, formas químicas en las cuales la mayoría de los metales aparecen en la naturaleza, ya sea en forma de minerales o como producto de los desechos industriales (Friberg y Nordberg, 1990).

## **1. PAPEL DE LOS METALES EN EL ORGANISMO**

Con el avance científico y tecnológico entre otros aspectos, la contaminación ambiental se incrementa paulatinamente. Por ello, el ser humano se expone constantemente a una gran cantidad de agentes contaminantes entre los que se encuentran los metales. Debido a que cada vez es mayor el contacto con estos agentes, en los últimos años ha aumentado el interés de estudiar los efectos a corto y largo plazo que tienen los metales (especialmente los considerados como peligrosos (IARC, 1982)), sobre los humanos y los animales (Fishbein *et al.*, 1987)

Muchos de los metales tienen funciones biológicas importantes, formando en la mayoría de los casos complejos con otras moléculas, por ejemplo, las metaloporfirinas (clorofila y hemo). La capacidad de la molécula de clorofila para absorber la luz se relaciona con la estructura tipo polietileno del anillo de la porfirina. El magnesio asociado al átomo de nitrógeno de los cuatro anillos pirrólicos da rigidez a la estructura molecular de la clorofila e incrementa la tasa de conversión del estado latente-excitado, lo cual resulta de la absorción de fotones en la molécula para ser posteriormente transferidos a la cadena respiratoria (redox) (Lenhinger, 1982).

De igual manera, podemos mencionar el caso de las proteínas férricas no hémicas como las ferredoxinas, las moléculas biológicas que contienen cobalto o cobalaminas como la vitamina B y a muchas enzimas activadas por estos elementos (por ejemplo el Mg) o las llamadas metaloenzimas, de las que hay 50 diferentes (20 con zinc, 15 con cobre, etc.) (Lenhinger, 1982).

## **2. EXPOSICIÓN A METALES**

Cuando se realiza la evaluación del efecto adverso de los metales sobre el organismo, lo primero que se debe tomar en cuenta es el mecanismo por el cual los

metales y sus compuestos son incorporados al cuerpo y su blanco de acción como es el caso del mercurio (Elinder et al., 1988).

Las características fisicoquímicas de los metales presentes en los medios de exposición (aire, agua o alimentos) son fundamentales para poder conocer su potencial de absorción y de retención dentro del organismo. En la mayoría de los casos, la ruta de entrada más común de los metales es por inhalación, debido a que los metales en gran parte se encuentran en la atmósfera como aerosoles y en algunos casos como vapores (Aito, 1988).

En la industria, la exposición a los metales en forma de vapor se limita a unos cuantos ejemplos, como en el caso del mercurio o del níquel. La parte correspondiente a los aerosoles tanto en ambientes laborales como cotidianos es la más frecuente, ya que existen muchas fuentes naturales que junto con las actividades humanas se encargan de formar y lanzar al ambiente estos aerosoles. En las plantas industriales donde se quema carbón y se libera Pb, Cd, Zn, As, V, Ni y el uso de gasolinas con plomo, cuyo consumo provoca que los automotores emitan grandes cantidades de aerosoles con plomo a la atmósfera, todo esto provoca que estos metales se acumulen y se vuelvan contaminantes, tal es el caso del vanadio.

### **3. VANADIO**

El vanadio pertenece al grupo V de los metales de transición, dentro de los cuales se incluyen el niobio y el tántalo (Phillips et al., 1983), aparece en la naturaleza en forma combinada en los estados de oxidación -1, 0 +2, +3, +4 y +5, se encuentra además en forma de isótopo  $V^{50}$  y  $V^{51}$  (Baroch, 1983; Phillips et al., 1983).

Aunque el vanadio no es un contaminante común en el ambiente se puede encontrar en grandes cantidades representando de 100-200 partes por millón (ppm), con una abundancia del 0.02% en la corteza terrestre; (160 ppm en la corteza continental y 250 ppm en el océano) en el suelo existe una concentración que va de 5-140 mg/kg, en la atmósfera se encuentra de 30-400 ng/m<sup>3</sup>, en el agua de áreas urbanas se puede

encontrar aproximadamente 0.5 µg/l, en el agua de mar la concentración aproximada es de 2 µg/l, en el agua potable hay 0.2-100 µg/l; en algunos alimentos de 1-100 µg/kg y en los fluidos corporales normalmente contiene cerca de 100-200 µg (Byerrum, 1991). Sin embargo, algunos organismos pueden acumular grandes cantidades de este metal, como son los tunicados y las acidia en las cuales existen concentraciones de más de 2 g/kg (peso húmedo) (TABLA 1) (Rehder, 1991).

Tabla 1. DISTRIBUCIÓN DEL VANADIO

FUENTE	CONCENTRACIÓN
Océano (Pacífico)	16.0 µg/l
Agua dulce	1.3 µg/l
Agua potable	0.0 - 0.6 ppb
Carbón-contaminantes de sedimentos de origen marino	más de 100 mg/kg
Roca basáltica e ígnea	150 mg/kg
Petróleos, aceite crudo	más de 1g/kg
Acidia	más de 2g/kg (peso húmedo)
Otros vertebrados	0.4 mg/kg
Tejido (humano)	0.1 - 1 µM
Invertebrados	0.5 - 2.5 mg/kg
Amanita muscaria	más de 1g/kg (peso seco)
Algas pardas	2 mg/kg (peso seco)
Otras plantas	0.1 - 5 mg/kg (peso seco)

Rehder, 1991.

El vanadio se puede encontrar en el medio por efecto del uso de combustibles de tipo fósil, como el petróleo y de elementos como el carbón que son utilizados para la obtención de energía, dando como resultado su acumulación y produciéndose así un gran impacto en la salud humana (Sabbioni et al., 1983). La forma más común del vanadio en la extracción, comercialización y como desecho, es la pentavalente (como pentóxido de vanadio), ésta es la más tóxica para los mamíferos (Hansen y Stern, 1984).

No existen datos de alteraciones producidas por deficiencias de este metal en el hombre. El vanadio ha mostrado ser esencial en la nutrición de algunos organismos como los pollos y las ratas (Hopkins y Mohr, 1974; Siemon et al., 1982), observándose

que la eliminación de este metal de la dieta produce alteraciones metabólicas importantes (Sabbioni et al., 1983). Sin embargo, en algunos alimentos de consumo cotidiano tales como perejil se encuentra en altas concentraciones (700 a 1800 µg/kg de peso seco), harina de trigo (40 µg/kg peso seco), setas (2000 µg/kg peso seco), etcétera (tabla 2).

**Tabla 2. CONCENTRACIÓN DE VANADIO EN  
DIFERENTES ALIMENTOS.**

ALIMENTOS	CONCENTRACIÓN (µg/kg (peso seco))
Cereales	43.0
Fresas	31.41
Lechuga	21.0
Aceites	0.2 - 4.0
Grasas	0.2 - 4.0
Arroz blanco	12.3 - 21.0
Rábano	52
Perejil	790.0 - 1800 (peso seco)
Eneldo	40.0 - 431.0
Langosta	5.0 - 43.0
Bacalao	28.0
Crema de cacahuete	44.0
Harina de trigo	40.0 (peso seco)
Trigo	3.6
Hígado (Res o Cerdo)	8.5
Féculas	33.00
Riñón (Res o Cerdo)	8.5
Setas	2000.0 (peso seco)
Pollo y pescado	1.7 - 36.0
Papas	1.0 - 6.0
Leche de polvo	40.0 (p/seco)
Leche	0.2 - 3.6
Huevos	0.2 - 3.6
Cerveza	3.2 - 11.0
Vino	3.2 - 11.0
Carne de res y cerdo	0.2 - 4.0

Modificado de: Soremark, 1967; Myron et al., 1977;  
Byrne y Kosta, 1978; Roldán, 1992; French y Jones, 1993.

Los efectos del vanadio y de sus compuestos, se han estudiado en varias especies y es importante señalar que en la mayoría de los reportes que se tienen han utilizado pentóxido de vanadio. Este compuesto se ha administrado por inhalación, por vía intragástrica ó intraperitoneal (Roschin, 1967, Roschin, 1968, WHO, 1988; Roldán, 1990; Allamirano et al., 1993).

La toxicidad del vanadio en animales de experimentación depende principalmente de la especie y la vía de administración. En general, la toxicidad es menor cuando el metal es administrado por la vía oral y moderada cuando es por vía parental (WHO, 1988). La toxicidad de este elemento también varía considerablemente con la naturaleza del compuesto, el vanadio es tóxico ya sea como catión o como anión y se sabe que la toxicidad se incrementa directamente proporcional a su valencia, de tal forma que el  $V^{5+}$  es el más tóxico (WHO, 1988; Galli et al., 1991). Entre los óxidos de vanadio, el pentóxido de vanadio es el más soluble y es más tóxico que el trióxido o el dióxido de vanadio (WHO, 1988).

El principal mecanismo de acción del vanadio es el bloqueo de numerosos procesos metabólicos celulares por inhibición de enzimas como las ATPasas, fosfatasa, quinasas y muchas otras (Jones y Basinger, 1983; Sabbioni et al., 1983), actuando en sitios citoplásmicos de la membrana plásmática (Léonard y Gerber, 1994), hecho que indica que el vanadio posee un amplio espectro de acción en el cuerpo y que su acción tóxica no es análoga a la mostrada por otros metales (Roschin, 1968). El vanadio también tiene influencia en las reacciones de oxidación-reducción en el metabolismo de lípidos y formación eritrocítica (Léonard y Gerber, 1994).

### 3.1 Cinética del vanadio

Desde el punto de vista metabólico, el tamaño de la partícula y la solubilidad determinan la absorción por respiración o inhalación. Se estima que aproximadamente el 25% de los compuestos de vanadio solubles al ser inhalados son absorbidos. En el caso del vanadio probablemente la absorción por el tracto gastrointestinal es alta (> 90 % en 4 días) y es eliminado principalmente por heces y la orina (10%) (French y Jones, 1993). Pero una pequeña fracción de los óxidos pueden ser retenidos por un tiempo largo (Rhoads y Sanders, 1983). Poco después de la absorción, se observa una distribución uniforme y equitativa en tejidos blancos, sin embargo, los sitios de almacenamiento a largo plazo son el hueso, el músculo y la médula ósea. El vanadio absorbido es transportado en el suero unido a la transferrina (Alessio et al., 1988).

El vanadio pentavalente es rápidamente reducido a su forma tetravalente en el interior de las células en los sistemas, tanto, *in vitro* como *in vivo*, (Johnson et al., 1974; Sakurai et al., 1980., Galli et al., 1991; Léonard y Gerber, 1994). La reducción del vanadato se lleva a cabo por el glutatión y en menor grado por otros agentes como el ácido ascórbico. El equilibrio entre ambos está en relación al potencial de óxido-reducción intracelular que a su vez se determina por el potencial de óxido-reducción del glutatión y del ácido ascórbico (Sakurai et al., 1980, Nechay et al., 1986; Rehder, 1991; Sakurai, 1994). Un hecho que ilustra lo anterior es que el pentóxido de vanadio por vía oral presenta una dosis letal media (LD<sub>50</sub>) en ratón de 23 mg/Kg y en otras sales de vanadio como el trióxido y el tricloruro la LD<sub>50</sub> es de 130 mg/Kg (National Research Council, 1974).

### 3.2 Efectos mutagénicos del vanadio

En el hombre, se conoce poco sobre las interacciones del vanadio con el ácido desoxirribonucleico (ADN), así como su posible acción carcinogénica y su efecto sobre el proceso reproductivo (WHO, 1988), aunque se ha reportado que en animales de laboratorio este metal en forma de metavanadato se acumula en la placenta y es excretado en la leche (Hansen y Stern, 1984; Graedel et al., 1986; WHO, 1988).

Por otro lado, la posibilidad de que este metal se utilice en el tratamiento de diabetes tipo I insulina-dependiente es de gran interés, ya que las sales de vanadio imitan *in vitro* muchas acciones de la insulina en varios tipos celulares (Shechter, 1990; Posner et al., 1990), efecto que puede ocurrir vía la activación de los receptores celulares de insulina por fosforilación de la fosfotirosina o una inhibición de las enzimas correspondientes a las fosfatasa (Léonard y Gerber, 1994).

*In vitro* el vanadio 5<sup>+</sup> ha mostrado tener efectos estimulatorios e inhibitorios de la síntesis del ADN, dependiendo de la concentración presente en el medio de cultivo (WHO, 1988), mientras que en cultivos de linfocitos humanos, no incrementa la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (Sun, 1987; Roldán y Altamirano, 1990).



Zhong *et al.* (1994), determinaron la citotóxicidad del pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ), utilizando células de ovario de hámster Chino V79, mediante la cinética del ciclo celular usando citocalacina-B para inducir células binucleadas; donde se observó que se incrementaba el número de células mononucleadas, con una disminución significativa de binucleadas, muestran que el  $V_2O_5$  inhibe la mitosis a bajas concentraciones. Giri *et al.* (1979), reportan una disminución del índice mitótico en células de médula ósea de ratas de 21 días. Otros estudios, reportan que en la línea D7 de levaduras el metavanadato de amonio ( $V^5$ ), induce conversión de gene mitótico y mutaciones puntuales reversas (Galli *et al.*, 1991).

Estudios realizados por Migliore *et al.* (1993), en linfocitos humanos *in vitro*, con diferentes compuestos de vanadio como el metavanadato de sodio ( $NaVO_3$ ), el metavanadato de amonio ( $NH_4VO_3$ ), el sulfato de vanadil ( $SVO_5$ ) y el ortovanadato de sodio ( $Na_3VO_4$ ), confirman que estos no son clastogénicos, ya que no encontraron un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas tanto estructurales como numéricas, aunque, en el intercambio de cromátidas hermanas (ICH's) y en la asociación de satélites y micronúcleos, hubo un incremento (tabla 3). Así mismo, el vanadato puede también producir rompimiento en la cadena de ADN en leucocitos humanos *in vitro* (Birboim, 1988).

Por otro lado, algunos compuestos de vanadio ( $V_2O_3$ ,  $VO_2$  o  $NH_4VO_3$ ) producen alteraciones morfológicas tales como deformación celular o pérdida de la definición nucleolar. En cultivos de células de ovario de hámster Chino (CHO), estos compuestos han mostrado ser citotóxicos (Léonard y Gerber, 1994). También éstos compuestos inducen aumento de aberraciones cromosómicas estructurales con y sin adición de la fracción S9, de forma dosis-dependiente. En el mismo sistema de prueba (tabla 3), se propone que el incremento en la frecuencia de ICH's es pequeño e independiente de la concentración (Owusu-Yaw *et al.*, 1990). Sin embargo, no se observaron efectos mutagénicos en la presencia o ausencia de la fracción microsomal S9 en células V79 (Galli *et al.*, 1991). En electroforesis en gel de una sola célula o "ensayo cometa" el  $V_2O_5$ , en linfocitos humanos *in vitro*, indica que éste metal puede inducir daño al ADN y el daño producido por éste metal es rápidamente reparado por las células (Rojas *et al.*, 1996).

TABLA 3. EFECTOS GENOTÓXICOS DEL VANADIO Y SUS DIFERENTES  
 COMPUESTOS EN DOS SISTEMAS DE PRUEBA

COMPUESTO	SISTEMA DE PRUEBA	EFEECTO	REFERENCIA
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	LINFOCITOS HUMANOS	NO INDUCE ICH's INCREMENTA LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS (A.C.) NUMÉRICAS	Roldán y Aitamirano 1990
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	LINFOCITOS HUMANOS	INCREMENTA A.C. ESTRUCTURALES	Roldán et al., 1995
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> NaVO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub> V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> SVO <sub>3</sub>	LINFOCITOS HUMANOS	INCREMENTA LOS ICH's Y LOS MICRONÚCLEOS	Migliore et al., 1993
Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub> SVO <sub>3</sub>	LINFOCITOS HUMANOS	INCREMENTA LOS MICRONÚCLEOS	Migliore et al., 1995
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	OVARIO DE HÁMSTER CHINO (CHO)	INCREMENTA LOS MICRONÚCLEOS Y LOS ICH's	Zhong et al., 1994
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> SVO <sub>3</sub>	CHO	INCREMENTA LOS ICH's Y A.C.	Owusu-Yaw et al., 1990
Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub> NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> SVO <sub>3</sub>	CHO	INCREMENTA A.C. NUMÉRICAS E INDUCE MICRONÚCLEOS	Ciranni et al., 1995

#### 4. CAFEINA

La cafeína es una metilxantina que se encuentra en forma natural como componente principal del café, té, refrescos (en especial los de cola), chocolates, analgésicos y otros fármacos. (Pollar et al., 1987) y su consumo es amplio entre un gran número de personas. Se le conoce como 3,7-Dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6 diona; 1,3,7-trimetilxantina; 1,3,7-trimetil-2,6-dioxo purina; Guaranina; Metil-teobromina (Merck, 1989). Además sirve como fungicida, herbicida e insecticida, para las plantas que lo producen (Shin et al., 1990).

El contenido de cafeína varía según el producto del que se trate. En café expreso encontramos desde 170 mg/tasa de 180 ml, en el filtrado 110 mg/tasa, en el instantáneo 75 mg/tasa y en el descafeinado 1 mg/tasa. El té de bolsa 50 mg/tasa y en el instantáneo 30 mg/tasa. En chocolates tenemos 40 mg/barra de 40 g. Los refrescos de cola dietéticos o regulares contienen 45 mg/180 ml. Estos valores permiten establecer el cálculo total de consumo de cafeína al sumar la ingesta de café, té, refresco de cola y chocolate (Beaulac-Baillargeon y Desrosiers, 1987).

Se ha mostrado que la cafeína se incrementa en el organismo por el efecto del tabaco (Parsons, 1978; May et al., 1982; Joeres et al., 1988), por lo que dejar el cigarro disminuye su concentración significativamente (Murphy et al., 1988) y el patrón del metabolismo de la cafeína se normaliza (Brown et al., 1988).

En mujeres sanas la cafeína se elimina en un 25 %, teniendo una vida media de 6.85 h en la fase luteal del ciclo menstrual, mientras que en la fase folicular es de 5.54 h (Balogh et al., 1987). El uso de anticonceptivos pueden duplicar el tiempo de vida media de la cafeína (Patwardhan et al., 1980; Meyer et al., 1991), también se prolonga durante el primer trimestre de embarazo (Aldridge et al., 1981; Brazier et al., 1983). En ratas no se han observado variaciones al ingerir cafeína durante la gestación (Nakazawa et al., 1985).

La cafeína es usada para el tratamiento de la somnolencia, fatiga, migraña y dolores de cabeza; ésta se ingiere en forma de tabletas o cápsulas de liberación prolongada debiendo transcurrir treinta minutos para que su acción empiece (Pálmer et al., 1993).

#### **4.1 Propiedades físicas y químicas**

Se presenta como agujas incoloras brillantes o prismas hexagonales, inodoras y de sabor amargo; su punto de fusión es de 238 °C. Sublima a 178 °C. La densidad como  $d_4^{18}$  es de 1.23. Su constante de basicidad ( $K_b$ ), a 19 °C es  $0.7 \times 10^{-14}$ , su constante de acidez ( $K_a$ ), a 25 °C es menor de  $1.0 \times 10^{-14}$  el pKa es de 0.8. El pH de una solución de cafeína al 1 % es de 6.9.

Un gramo de cafeina se disuelve en: 46 ml de agua a 25 °C, 5.5 ml de agua a 80 °C, 1.5 ml de agua hirviendo, 66 ml de alcohol, 22 ml de alcohol a 60 °C, 50 ml de acetona, 5.5 ml de cloroformo, 530 ml de éter, 100 ml de benceno y 22 ml de benceno hirviendo. Muy soluble en pirrol, tetrahidrofurano; soluble en acetato de etilo; ligeramente en éter de petróleo. La solubilidad se incrementa en el agua con la presencia de ácidos orgánicos, benzoatos alcalinos, cinnamatos, citratos o salicilatos. La cafeina es eflorescente al aire (Merck, 1989).

## **4.2 Propiedades farmacológicas**

### **4.2.1 Absorción**

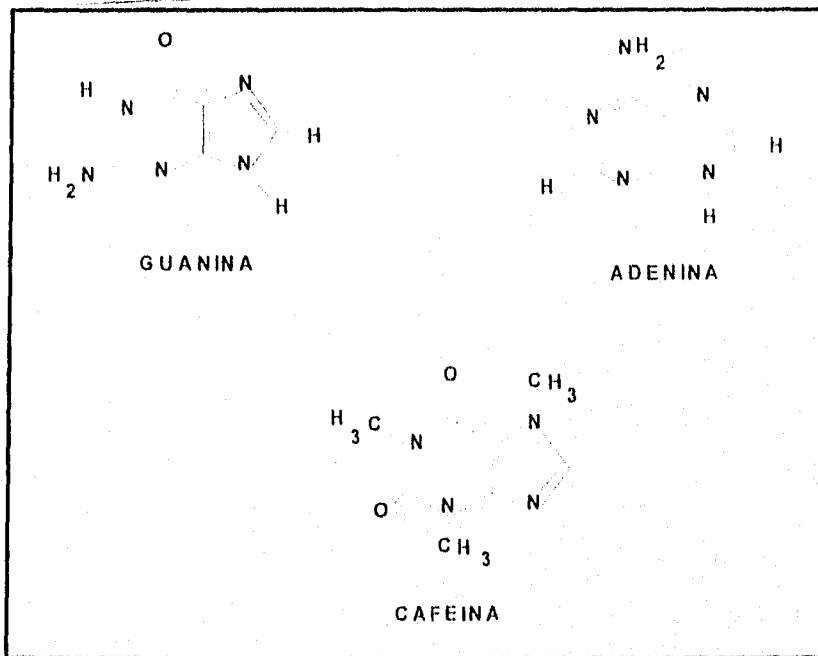
La cafeina, en cualquier forma farmacéutica se absorbe bien y en periodos cortos de tiempo, de manera que puede ser administrada por cualquier vía sin que se presenten mayores problemas; aunque preferentemente se utiliza la vía oral, ya que su absorción está influenciada por el pH del tracto gastrointestinal y dada sus características de base débil, se absorbe más rápidamente que por administración rectal, donde el pH del medio tiende a la neutralidad y la absorción disminuye (Guyton, 1976). La eficacia de la absorción por piel ha sido demostrada *in vitro* (Carver et al., 1989), en animales y en infantes tratados por apnea neonatal. Las concentraciones de cafeina en plasma son entre 11 y 20 mg/l obtenida 48 h después de una dosis alta, dividida en 4 aplicaciones abdominales a intervalos de 12 h (Morisot et al., 1990).

### **4.2.2 Distribución**

Se distribuye ampliamente en el organismo y se une en un 60 % a proteínas plasmáticas. El volumen de distribución (Vd) es igual a 0.5 l/kg. Se encuentran concentraciones terapéuticas en sangre una hora después de la administración oral. La cafeina puede encontrarse en líquido cefalorraquídeo, saliva e incluso, pasa a través de la leche materna aunque en dosis muy pequeñas (Guyton, 1976). La cafeina también puede ser detectada en la sangre del cordón umbilical (Van, 1979).

La cafeina tiene efecto inhibitorio sobre la agregación de plaquetas, por un mecanismo todavía desconocido. Se ha sugerido que se une al ADN con una alta afinidad

por las regiones dañadas y así interfiere en las uniones específicas de las enzimas reparadoras (Kihlman, 1977). Sin embargo, ninguna de estas proteínas, que han sido purificadas de procariontes son inhibidas por la cafeína (Selby y Sancar, 1990). Además la cafeína se asocia al ADN por intercambio entre las bases adyacentes y se sugiere que esta asociación, inhibe la reparación del ADN (Tornaletti et al., 1989). La cafeína posee una estructura química similar a las purinas que constituyen la molécula del ADN (figura 1) de ahí su potencial para interferir con la división y el metabolismo celular (Alder, 1970). Además se sabe que potencializa los efectos mutagénicos y letales de agentes genotóxicos (Osterga et al., 1965; Cleaver, 1969; Selby y Sancar, 1990).



**FIGURA 1. ESTRUCTURA DE LA CAFEINA Y DE LAS PURINAS CONSTITUTIVAS DE LA MOLÉCULA DE ADN (Lenhinger, 1982; Roldán, 1992)**

#### 4.3 Metabolismo y eliminación

La cafeína se metaboliza en el hígado por dimetilación y oxidación parcial. El tiempo de vida media es de 6.85 h. El fármaco se elimina casi totalmente en el hígado y se desecha principalmente por orina (Litter, 1986), la vía metabólica muestra múltiples y separadas dimetilaciones por oxidación del C-8 y formación de uracilo en humanos y roedores. Estas transformaciones ocurren en microsomas del hígado excepto la oxidación del C-8 en la 1-metilxantina a ácido 1-metilúrico, el cual es mediado por la oxidación de xantinas (Bergmann y Dikstein, 1956; Grant et al., 1986). Posee acción diurética inhibiendo la resorción tubular de sodio y cloruro, estimula la eliminación de potasio. Aumenta el número de glomerulos en acción; eleva la presión de filtración, dilatando más las arteriolas aferentes que las eferentes. Incrementa el flujo total del riñón (Guyton, 1976). La eliminación se retrasa en pacientes que presentan padecimientos hepáticos y renales.

#### 4.4 Toxicidad

La cafeína produce dependencia psíquica y en casos extremos, física, la abstinencia produce irritabilidad y somnolencia, se le atribuyen acciones teratológicas en concentraciones de 75 y 150 mg/Kg en ratas, ya que induce aberraciones cromosómicas debido a la inhibición de procesos de reparación del ADN (Hamed et al., 1994). A dosis de 600 mg /día en animales de laboratorio induce aborto o nacimiento prematuro. La dosis letal media para humanos es: (LD<sub>50</sub>) igual a 100 mg/Kg y para ratas es LD<sub>50</sub> igual a 200 mg/Kg (Guyton, 1976).

La característica más importante de la cafeína es su influencia en ciertos efectos biológicos inducidos por mutágenos como las radiaciones o los agentes alquilantes. La cafeína amplifica el daño cromosómico producido por estos agentes, tanto en células animales como en células vegetales debido a que evita que las células dañadas puedan reparar las lesiones producidas, por lo que la cafeína favorece la formación de estas aberraciones a partir de lesiones residuales inducidas principalmente por agentes S-dependientes (González-Fernández et al., 1985). Potencializa los efectos mutagénicos y

letales de agentes genotóxicos. Se sabe que esto se debe al menos en algunos organismos, a la inhibición de la reparación del ADN (Selby y Sancar, 1990).

Es bien conocido que la cafeína eleva las concentraciones de adenosin monofosfato cíclico (AMPc), por la inhibición de la fosfodiesterasa (Beavo et al., 1970). Si la cafeína actúa por este mecanismo, entonces los agentes como el N<sub>6</sub>-O-2'-dibutiryladenosine 3',5'-cíclico monofosfato (dbcAMP), y el 3-isobutil-1-metilxantina (IMBX), que pueden elevar el nivel celular de AMPc, debe tener un efecto de realce similar al de la cafeína. Por ejemplo, el tratamiento post-UV de las células XP1.19 con estos agentes (cafeína+UV), no realzan, pero reduce la inducción de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH's) por UV (Tohda y Oikawa, 1988). Además, la cafeína ha sido reportada como un potente inhibidor de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (Purnell y Whish, 1980).

En otros sistemas de prueba como son, las células permeabilizadas y la *Escherichia coli*, la cafeína (10 a 100 mM) inhibe los mecanismos de reparación de fotorreactivación y escisión de nucleótidos (Wilkin, 1969). También se ha demostrado que la cafeína (10 mM), inhibe el proceso de reparación por escisión de nucleótidos en células HeLa (Selby y Sancar, 1990).

En linfocitos humanos la cafeína (0.1, 0.5 y 1.0 mM), en combinación con mitomicina C, inhibe la reparación posreplicativa (Okoyama y Kitao, 1981). Se ha establecido que amplifica la inducción mutagénica por parte de N-metil-N-nitrosourea y la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en *Salmonella typhimurium* en una concentración de 1.0 mM, esto se efectúa durante la replicación del ADN (Balansky, 1992). En células de hámster Chino, se ha reportado que la cafeína convierte lesiones de doble cadena del ADN ocasionados por mutágenos, en aberraciones cromosómicas y fragmentaciones, durante la replicación (Roberts y Kotsaki-Kovatsi, 1986). Los efectos mutagénicos, co-mutagénicos, anti-mutagénicos mostrados por la cafeína han despertado un gran interés, debido al amplio uso de ésta.

## 5. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN

La reparación celular del daño causado a una macromolécula solo se sabe que existe para el ADN. En ningún otro caso la integridad de una sola molécula es tan vital para la supervivencia de la célula. Un gen bacteriano tiene un 50 % de probabilidades de no ser alterado, incluso después de haberse duplicado más de 100 millones de veces, no es sorprendente encontrar que la célula posea mecanismos para preservar la integridad del ADN y eliminar lesiones introducidas en el mismo. La estructura dúplex complementaria del ADN asegura que la información perdida de una cadena pueda ser recuperada de la otra. Solamente la pérdida completa de un par de bases, la escisión transversal del dúplex, o falla en la corrección de pruebas en un error de replicación son irreversibles (Kornberg, 1978).

El daño causado al ADN puede ser en forma de cortes en la cadena, o modificaciones o pérdidas de bases debidas a agentes químicos o físicos del ambiente, tales como iones hidrógeno, drogas alquilantes, luz ultravioleta, rayos-X y también el desgaste debido a los acontecimientos metabólicos. La depurinación espontánea, atribuible a  $H^+$ , ocurre con una frecuencia significativa. El principal daño causado al ADN por la luz ultravioleta es una dimerización de las pirimidinas. Residuos adyacentes de timina se juntan formando un anillo de ciclobutano y ya no pueden formar enlaces de hidrógeno con las adeninas de la cadena opuesta. En consecuencia la hélice en esta región está distorsionada. A menos que el dímero de timina sea eliminado, no puede tener lugar la replicación ni la transcripción, o éstas se ven alteradas (Kornberg, 1978).

En la actualidad, se considera que existen cuatro tipos principales de mecanismos de reparación del ADN; **fotorreactivación** que en presencia de luz repara daños *in situ*; **reparación por escisión**, que se efectúa antes de la replicación del ADN y requiere de varias reacciones enzimáticas; por **recombinación**, que repara daños que persisten aún después de la replicación del ADN y **reparación SOS**, el cual se activa cuando los anteriores ya se han saturado. Como su nombre lo indica es el último recurso de la célula para sobrevivir (tabla 4).



Tabla 4. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN

ESCISIÓN	POSREPLICATIVA	FOTORREACTIVACIÓN	SOS
<p>*Las áreas dañadas de ADN son escindidas y son resintetizadas nuevas secuencias en los huecos.</p> <p>*Múltiples funciones enzimáticas, involucradas en la reparación, incluyendo el reconocimiento de los sitios dañados, remoción de las bases por la nucleasa, remplazamiento de la base polimerada y unión de los extremos de ADN, por la ligasa.</p> <p>*Involucrada en la reparación del ADN humano.</p> <p>*Repara un gran rango de lesiones del ADN incluyendo, bases alteradas, grandes lesiones, uniones cruzadas.</p>	<p>* Sólo ocurre durante la replicación del ADN.</p> <p>*Involucra enzimas resintetizadas.</p> <p>* Involucrada en la actividad de reparación en humanos.</p> <p>* La reparación involucra lesiones con resultados en replicación de gaps, tales como bases alteradas o grandes lesiones de una sola hebra.</p> <p>* Puede involucrar eventos de recombinación.</p>	<p>* Específico para el daño inducido por la luz U.V. (dimerización de las pirimidinas).</p> <p>*Acción enzimática en presencia de luz visible que rompe los dímeros o monómeros.</p> <p>* No se ha demostrado en células humanas.</p> <p>* Hay poca o nula reparación del daño inducido por agentes químicos</p>	<p>* Parece ser confinado a organismos procariotas, tales como las bacterias.</p> <p>* Este sistema de reparación no se presenta normalmente, pero es inducido por el ADN dañado, que no puede ser reparado por los procesos de escisión normal o posreplicativo.</p> <p>* Estudios recientes han establecido una reparación parecida al SOS en algunas células de mamífero.</p>

Brusick, 1987

### 5.1 Fotorreactivación

Albert Kelner descubrió en 1949 que la sobrevivencia de bacterias irradiadas con luz ultravioleta se veía aumentada cuando eran expuestas subsecuentemente a una fuente intensa de luz azul. Este proceso es llevado a cabo por la ADN-fotoliasa, una enzima cromófora; es decir es capaz de captar la energía proveniente de la luz (longitud de onda entre los 300 y 500 nm) y transfieren la energía de sus electrones excitados hacia los dímeros de timina, lo que hace que esta alteración en el ADN (Sancar et al., 1987), se rompa y eliminen los dímeros de pirimidina (timinas), producidas por la luz ultravioleta (U.V) de onda corta, por rompimiento de enlaces covalentes entre el anillo ciclobutano con la absorción de un fotón, correspondiente a la región azul del espectro visible (Paterson y Genthner, 1984; Myles y Sancar, 1989). Las enzimas mejor estudiadas son las de *Escherichia coli*, *Saccharomyces sp.* y *Streptomyces sp.*, este tipo de reparación está presente en casi todos los organismos y al parecer juega un papel muy importante en las plantas (Lewin, 1985).

### 5.2 Reparación por escisión

Es el principal mecanismo de reparación en la oscuridad utilizado para eliminar el segmento defectuoso de la cadena de ADN reemplazándolo por otro en el que las bases estén apareadas correctamente (Kornberg, 1978). Este proceso se efectúa con la participación de glucosidasas de ADN y de tres tipos de enzimas diferentes: la endonucleasa, la ADN polimerasa I y la polinucleótido ligasa. Es universal en el mundo biológico, todos los organismos de vida libre incluyendo los micoplasmas dependen de ésta (Paterson et al., 1991). Aunque, las bacterias mutantes son deficientes en esta reparación (Sancar, 1994), la cual reúne la información en el dúplex para remover una base o el nucleótido dañado y reemplaza éste con una base normal usando la cadena complementaria como un molde.

En la reparación por escisión de bases la remoción de las lesiones ocurren de dos formas: 1) la base dañada es liberada por ADN glucosidasa y el azúcar AP (sitio apurínico) es escindido por AP endonucleasa. La reparación por escisión de bases fue un sustrato limitado porque la ADN glicosidasa que inicia el proceso de reparación, está en

contacto con las lesiones durante la catálisis. En la reparación de nucleótidos, un sistema de enzimas hidrolizan dos enlaces fosfodiéster, uno de cada lado de la lesión para generar un oligonucleótido (Sancar 1994). Tanto la fotorreactivación como la reparación por escisión, son mecanismos de reparación prereplicativos, actúan antes de la fase S (Kihlman, 1977).

### **5.3 Reparación por recombinación ó posreplicativa**

Fue descubierta por Rupp y Howard-Flanders (1968). Debido a que al momento de la síntesis de nuevas moléculas de ADN, los dímeros de timina no tienen nucleótidos complementarios, quedan huecos opuestos a cada dímero (Buhl y Reagan, 1975), los cuales son reparados por recombinación. La presencia de los dímeros de pirimidinas reducen la velocidad de replicación del ADN (Hewitt y Meyn, 1975) y son causa de la recombinación que se presenta durante y/o después de la replicación de éste (Lin y Howard-Flanders, 1976).

La molécula de ADN se abre y empiezan a separarse las 2 cadenas. Al llegar al sitio específico se corta una de las bandas por acción exonucleotídica de las mismas enzimas, dejando así un extremo 3'-OH libre; trasladándose hasta donde se encuentra la copia de ADN, uniéndose entonces con la secuencia homóloga por la acción de la ligasa del ADN. (Howard-Flanders, 1981; Stahl, 1987; Sancar y Sancar, 1988; Myles y Sancar, 1989; West, 1992). Hay cierto tipo de lesiones que inhiben o bloquean la duplicación de ADN, (como la presencia de dímeros de pirimidina que reducen la velocidad de replicación) y cuando la polimerasa del ADN encuentra este tipo de anomalías en la hebra que sirve de molde, deja de insertar nucleótidos y continúa con su labor más adelante, quedando un hueco justo enfrente de donde se localiza el daño, reparándose por recombinación.

Estos dos últimos mecanismos de reparación comparten propiedades similares en sus procesos, la reparación por escisión opera principalmente para la replicación del ADN, mientras que la reparación posreplicativa permite seguir la replicación cerca de las lesiones que pueden ser de otra manera letales. Estos 2 tipos de reparación se cree que son también inducibles así como constitutivos (es la producción del nivel enzimático)

(Samson y Schwartz, 1980). Ambos procesos están libres de error (reemplazamiento de bases exactas) y propensos a error, que es la reparación no exitosa (tabla 5).

Los factores que determinan si la vía es libre de error o propenso a error son la especie, el tipo celular, el mutágeno químico y la especificidad de la lesión inducida al ADN (Cerutti, 1978).

**Tabla 5. DEFINICIONES DE LAS PROPIEDADES DE LOS PROCESOS DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN Y POSREPLICATIVO**

PROPIEDAD	DESCRIPCIÓN
CONSTITUTIVA	La concentración de enzimas de reparación son fijados por un cierto nivel de producción; aumentar la incidencia de lesiones del ADN no conduce a una mayor actividad enzimática
INDUCIBLE	Las concentraciones de enzimas reparadas responden al número de lesiones del ADN, por ejemplo, el pretratamiento crónico de células con bajos niveles de agentes alquilantes amplifica la reparación de lesiones con un mayor nivel de "DESAFÍO" del mismo agente.
LIBRE DE ERROR	El proceso de reparación del ADN consiste de un seguro reemplazamiento de bases, resultando en un cambio no neto en el ADN una vez que el proceso de reparación está completo.
PROPENSO A ERROR	El proceso de reparación no es exitosa y las secuencias del ADN aberrantes son producidas por las polimerasas de reparación; nuevas mutaciones pueden resultar como consecuencia.

Brusick, 1987.

#### 5.4 Reparación del ADN en mamíferos

Se ha observado que en células de mamíferos las radiaciones aumentan la frecuencia de recombinación, lo cual pudiera ser la consecuencia de fenómenos de reparación por que se presentaran en el momento de la replicación del ADN o después de la misma (Radman y Herrera, 1970).

Mediante técnicas autorradiográficas, se ha mostrado (Rommelaere et al., 1973) que en células de criceto (hámster Chino) la frecuencia de recombinación aumenta después de la irradiación con luz UV. También se ha observado un incremento en la recombinación cuando se daña el ADN con agentes químicos como el N-acetilaminofluoreno (D'Ambrosio y Setlow, 1976), dimetilnitrosamina y metilmetanosulfonato (Craddock et al., 1976).

### 5.5 Reparación SOS

Es un sistema inducible y mutagénico (Caillet-Fauquet, 1976; Radman, 1975). En *E. coli* se requiere de síntesis de proteínas y de la presencia de los genes *rec* y *lex*. En este sistema se observa que la supervivencia del fago Lambda irradiado es mayor cuando el hospedero (*E. coli*) ha sido también irradiado. La hipótesis propone que al irradiar al hospedero se induce un sistema de reparación en las bacterias, que tienen ahora mayor capacidad para reparar el ADN dañado del fago, pero con un incremento en la frecuencia de mutación debido a la acción de una "polimerasa infiel" (Radman, 1975).

La señal que induce a los genes reprimidos para que el sistema SOS opere, es probablemente un bloqueo temporal de la replicación del ADN de la presencia de lesiones en el mismo. El hecho de que la mutagénesis aumente como resultado de este proceso, puede ser consecuencia secundaria de las condiciones fisiológicas de ensayo-error bajo las cuales opera el sistema SOS. Devoret et al (1975), reportan que en condiciones de máxima homología entre el fago Lambda infectante y las bacterias lisogénicas infectadas, eliminan aparentemente la posibilidad de que la reparación SOS sea el resultado de un incremento en la recombinación.

Es notable la similitud existente entre la reparación por el sistema SOS y la transformación oncogénica en cultivo de células de mamíferos. Para que la "transformación" se presente en ambos casos se requiere una respuesta celular activa al agente inductor. Además, Ames et al. (1973), demostraron que la mayoría de los carcinógenos son mutágenos potentes.

## 6. LINFOCITOS HUMANOS COMO SISTEMA DE PRUEBA

Las lesiones inducidas en el ADN de los linfocitos por agentes mutagénicos, pueden estar sujetas en algunos de los casos a la reparación, a pesar de la baja actividad lo que conduce a que las lesiones no reparadas o mal reparadas formen mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas importantes (Perry y Thomson, 1984).

Los linfocitos cultivados tienen propiedades que sirven para estudiar las funciones especiales de las células como la diferenciación celular y funciones generales como lo son la transferencia de energía, el flujo de información genética del ADN a través de ARN a proteínas y la formación de organelos celulares (Lerner y Dixon, 1973). Los linfocitos representan del 25 al 33 % de las células blancas o leucocitos (Ham, 1975, Fawcett, 1987).

En la sangre de las personas sanas, las concentraciones de linfocitos varían mucho con la edad, encontrándose por ejemplo en un adulto de 21 años el número de estas células es de  $2500/\text{mm}^3$ , mientras que en los recién nacidos la cantidad es más del doble ( $5500/\text{mm}^3$ ) (Natarajan y Obe, 1982).

En el hombre, el 80 % de los linfocitos periféricos son pequeños, el 5 % son medianos y un 15 % de estos pertenecen a las células grandes llamadas linfoides (Natarajan y Obe, 1982). En adultos el 70 % de los linfocitos son de tipo T, mientras el 30 % restante corresponden al tipo de los linfocitos B, estas proporciones varían con la edad (Smith et al., 1974; Steel et al., 1975).

Desde el punto de vista mutagénico el linfocito ofrece una serie de ventajas que lo hacen muy interesante, como el hecho de presentar una vida media de 2 a 4 años, lo que permite que acumule lesiones en su ADN, además de encontrarse en un estado definido del ciclo celular ( $G_0$ ) y mediante la adición de agentes mitogénicos como la fitohemaglutinina (PHA), la síntesis del ADN comienza después de las 24 horas a partir del momento de la estimulación, encontrando el máximo de actividad a las 72 horas (Ling y Kay 1975).

Se han estandarizado metodologías para el cultivo de sangre completa en humanos que permite determinar la sensibilidad de los linfocitos de sangre periférica al daño citogénético. Los cultivos obtenidos con dichos métodos dan resultados reproducibles con índices mitóticos altos y frecuencias basales estables de intercambios entre cromátidas hermanas (ICH's) (Kligerman et al., 1984).

## **7. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH's)**

Los intercambios de cromátidas hermanas (ICH's) se le define como el intercambio de segmentos de ADN que involucran un rompimiento simétrico en el mismo locus entre cromátidas hermanas que no resultan de una alteración morfológica de un cromosoma completo y durante el cual cada una de las cadenas del segmento de ADN intercambiado se une a la cadena similar de la cromátida hermana (Nakanishi y Schneider, 1979). Pueden visualizarse fácilmente en los cromosomas en metafase. Lo anterior ha sido aplicado para el estudio de la estructura de los cromosomas, daño cromosómico, inestabilidad y deficiencia en la reparación de algunos síndromes.

### **7.1 Antecedentes**

En 1957, Taylor utilizó métodos autoradiográficos, para describir por primera vez los intercambios en las cromátidas hermanas, en los cromosomas de *Bellaviana romana*. Observó que después de un ciclo de replicación en presencia de un medio, sin presencia de un precursor radioactivo, algunos cromosomas en metafase presentaban intercambios recíprocos a lo largo de las cromátidas hermanas lo cual sugirió que la mayoría de estos intercambios (si no todos), fueron inducidos por la radioactividad necesaria para su detección. Taylor sugirió la distribución del ADN marcado en divisiones subsecuentes, en ausencia de precursores no radioactivos y demostró que sólo el filamento del ADN original es conservado durante la duplicación en cada división celular; apoyando así la replicación semiconservativa del ADN. No obstante el método autoradiográfico presenta una resolución limitada y no permite analizar de manera detallada el número y posición de los ICH's.

## 7.2 Síntesis del ADN y formación de ICH's

Se ha demostrado que para dar origen a un intercambio de doble hebra (ICH's), es necesario que la célula pase por la etapa de síntesis y que el sitio para la formación de ICH's esta confinado a la horquilla de replicación (Kato, 1980). Así mismo, Schwartzman *et al* (1979), determinaron que la inducción de los ICH's aumentaba durante la replicación del ADN debido a la presencia de lesiones no reparadas. Estas evidencias indican que, la etapa en que se producen los intercambios en las cromátidas hermanas es durante la síntesis del ADN. Lo cual es de esperarse ya que es el momento en que las zonas homologas de las cadenas nacientes del ADN se encuentran más unidas, permitiendo que se lleve a cabo dicho intercambio de manera simétrica y equivalente a nivel molecular, esto significa un menor costo de energía en la célula, que si ocurriera después de la síntesis, ya que implicaría un sistema de reconocimiento y de asociación de las moléculas del ADN ya duplicados. Sin embargo, Anderson (1981), sugirió que en la etapa G<sub>2</sub> es en la que se forman los ICH's, por una síntesis semiconservativa residual, no obstante consideró que estos resultados se deben verificar en otros sistemas y con varios agentes mutagénicos.

## 7.3 ICH's como indicador de daño en el ADN

Los ICH's son el reflejo del daño al ADN, inducido por agentes químicos mutagénicos, cancerígenos, ultrasonido, luz UV, radiación ionizante y temperatura entre otros (Kato, 1980). Su análisis ofrece la posibilidad de ensayos rápidos, sensibles y cuantitativos, para descubrir daño genético (Taylor *et al.*, 1957; Guerrero, 1979), se puede detectar con dosis tan bajas, (de 10 a 100 veces menores que las utilizadas para producir aberraciones cromosómicas), que no "alteran" la morfología del cromosoma.

En un reporte del programa GENO-TOX, sobre intercambio de cromátidas hermanas se hacen las siguientes consideraciones sobre el uso del análisis de ICH's (Latt *et al.*, 1981).



- a) Es excelente para detectar compuestos que producen aductos al ADN, como es el caso de los agentes alquilantes metilmetano sulfonato (MMS) y mitomicina C (MMC).
- b) Es extremadamente sensible para descubrir mutágenos químicos a concentraciones de 10 a 100 veces menores, que las necesarias para causar ordinariamente aberraciones cromosómicas.
- c) Es posible detectar mutágenos químicos de acción directa e indirecta.
- d) Es un método relativamente rápido.
- e) En los sistemas de prueba de mamíferos es posible usar los estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que permiten el análisis de múltiples tejidos, inclusive células germinales.
- f) Es factible aplicar estas pruebas en organismos diversos incluyendo las plantas los cuales pueden utilizarse como monitores ambientales de agentes genotóxicos.
- g) Estos ensayos se pueden emplear en poblaciones humanas.
- h) El resultado positivo de inducción de ICH's generalmente indica que el compuesto es genotóxico y carcinógeno (Lalf et al., 1981).

### 7.3.1 Desventajas de la utilización de la prueba de ICH's

- a) Es relativamente insensible a compuestos capaces de inducir rupturas dobles en el ADN.
- b) El desconocimiento del significado biológico.
- c) El efecto sinérgico o aditivo que puede tener la BrdU en relación al mutágeno.

## 8. CINÉTICA DE LA DIVISIÓN CELULAR (C.D.C.)

El hecho de que la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas se base en la incorporación de un análogo de la timidina como es la bromodesoxitimidina durante dos ciclos de división (figura. 2), da la posibilidad de estudiar la cinética de proliferación celular, ya que sigue una substitución asimétrica del ADN, según el patrón de tinción se puede determinar, el número de veces que se ha dividido una célula. Las células que se han dividido una sola vez, muestran una tinción homogénea en ambas cromátidas, ya que

presentan una sustitución monofilar en sus cromátidas, lo cual conduce a una tinción oscura (figura 3), mientras que las que se han dividido dos veces presentan una sustitución bifilar, ya que la incorporación de ADN es mayor que en una monofilar, en la bifilar la tinción de una cromátida hermana es clara, mientras que la otra es oscura (figura 4) (Spelt et al., 1984), en las cuales se presenta una tinción diferencial y las células que ya pasaron por tres o más ciclos muestran una tinción heterogénea observándose cromosomas con ambas cromátidas pálidas, con porciones de cromátidas oscuras y lo que resta pálido (figura 5).

El análisis de la frecuencia de células en metafase, las cuales se han replicado por I, II, III o más ciclos, provee información sobre los efectos citostáticos o citotóxicos de los agentes químicos (Ivett y Tice, 1982).

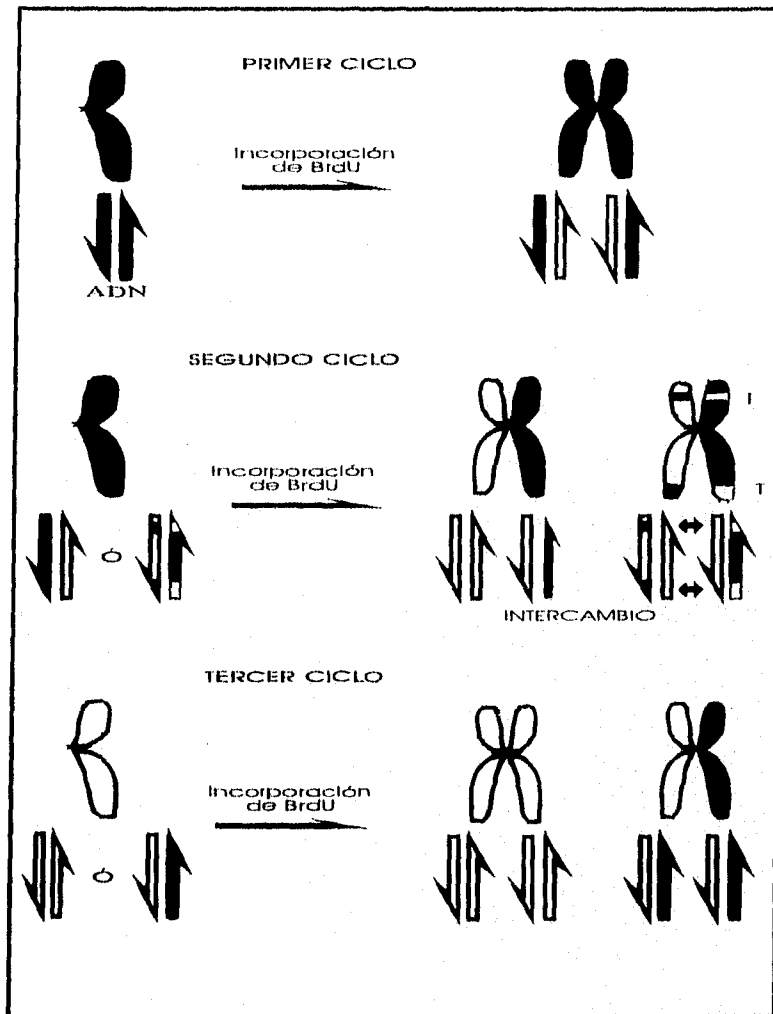


FIGURA 2. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS EN PRESENCIA DE DOS CICLOS DE BrdU, LAS FLECHAS INDICAN LAS CADENAS DE ADN, LA CROMÁTIDA NEGRA INDICA UNA INCORPORACIÓN UNIFILAR Y LA BLANCA REPRESENTA LA SUBSTITUCIÓN BIFILAR POR LA BrdU. LAS FLECHAS PEQUEÑAS INDICAN LOS INTERCAMBIOS: TERMINAL (T) O INTERSTICIAL (I). EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO* CON TINCIÓN DIFERENCIAL.

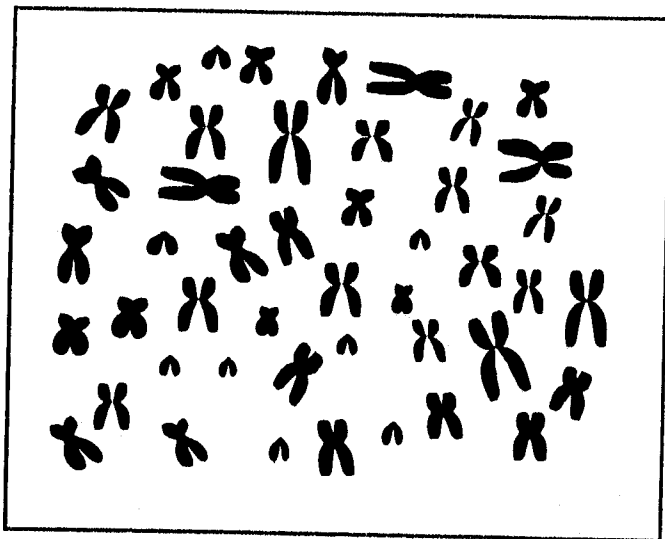


FIGURA 3. CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS EN METAFASE DE PRIMER CICLO

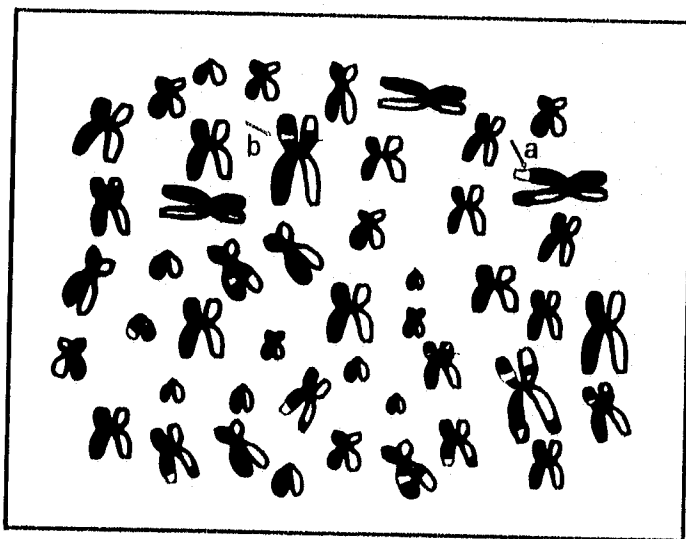


FIGURA 4. CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS EN METAFASE DE SEGUNDO CICLO: a = INTERCAMBIO TERMINAL Y b = INTERCAMBIO INSTERICIAL

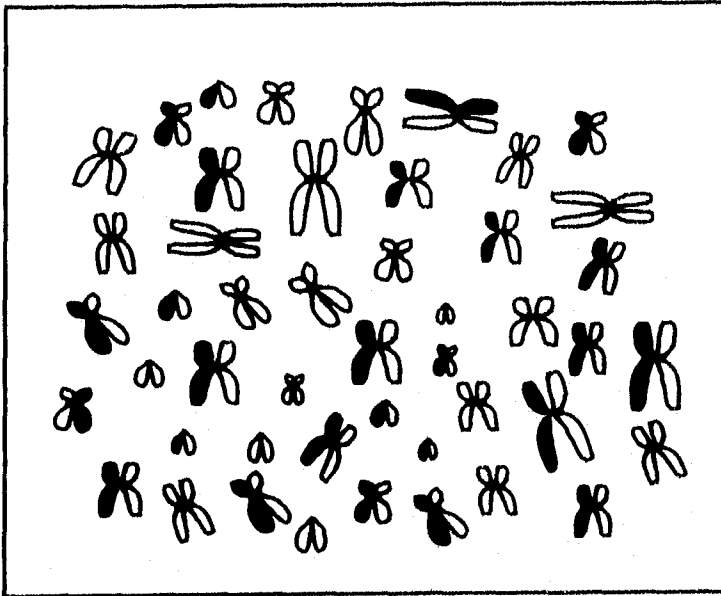


FIGURA 5. CROMOSOMAS DE LINFOCIOS HUMANOS EN METAFASE DE TERCER CICLO

## II. JUSTIFICACIÓN

En estudios previos realizados en el Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva se mostró que el pentóxido de vanadio no modifica la frecuencia basal de ICH's en cromosomas de linfocitos humanos. De tal forma que se considero la posibilidad de que el pentóxido de vanadio produzca lesiones que, al ser reparadas no se puedan expresar como ICH's. En trabajos previos efectuados en el mismo Laboratorio se encontró que la combinación de vanadio (aplicado a las 24 horas de cultivo) en las concentraciones de 4 y 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  más cafeína (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a las 24 y 48 horas de iniciados los cultivos), modifica las frecuencias básicas de ICH's. Por lo que en el presente trabajo se pretendió elucidar el ciclo de división en el cual se induce el daño por parte del vanadio, realizando tratamientos con diferentes tiempos de aplicación del pentóxido de vanadio y de la cafeína.

### III. HIPÓTESIS

Se sabe que en linfocitos humanos *in vitro*, el pentóxido de vanadio aplicado a las 24 horas de iniciados los cultivos en combinación con cafeína agregada a las 24 y 48 horas inducen un aumento diferencial de Intercambio de Cromátidas Hermanas, que no se observa únicamente con el metal. Por lo tanto si a cultivos de linfocitos humanos se les trata con vanadio más cafeína en diferentes ciclos de división entonces se evidenciará el efecto genotóxico por parte del vanadio y el tiempo específico en que éste es inducido.

#### IV. OBJETIVOS

##### **General:**

Estudiar el efecto genotóxico producido por la interacción vanadio cafeina aplicados en diferentes ciclos de división celular en cultivo de linfocitos humanos

##### **Específicos:**

Evaluar el efecto genotóxico del vanadio en combinación con la cafeina mediante el análisis del intercambio de cromátidas hermanas (ICH's), en diferentes ciclos de división celular en linfocitos humanos en cultivo.

Evaluar el efecto citotóxico del vanadio en combinación con la cafeina por medio del Índice mitótico y la tasa de proliferación linfocítica (TPL), en diferentes ciclos de división celular en linfocitos humanos en cultivo.

Establecer el tiempo de cultivo en el cual se induce el efecto genotóxico.

Establecer el papel que juega la cafeina en la expresión del daño al ADN, inducido por el pentóxido de vanadio



## V. MATERIAL Y MÉTODO

### 1. COMPUESTOS QUÍMICOS:

Se utilizó pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) (Aldrich Chem. Co. USA), disuelto en agua destilada y esterilizado por filtración, con filtro Millipore con poro de  $0.22 \mu m$ . La cafeína (Sigma, USA) también fue disuelta en agua destilada y esterilizada siguiendo el mismo procedimiento.

### 2. CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS

A partir de donadores clínicamente sanos del sexo masculino, se extrajeron por punción venosa 5 ml de sangre periférica, con una jeringa heparinizada. Posteriormente 0.5 ml de esta sangre se cultivó en 4.75 ml de medio RPMI-1640 suplementado con glutamina y  $NaHCO_3$  activado con 0.25 ml de fitohemaglutinina (PHA-M) (Sigma-USA) y se incubó durante 72 horas a  $37^\circ C$  en la oscuridad.

A las 24 horas de iniciados los cultivos y ya que las células empezaron a dividirse, a cada frasco se le adicionó 0.1 ml de una solución de 5-bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma, USA) con una concentración final de  $5 \mu g/ml$ . A las 71 horas a cada cultivo se le adicionó 0.1 ml de una solución de Colchicina ( $4 \mu g/ml$ ) (Merck) y se les dejó hasta completar las 72 horas.

Una vez transcurrido este tiempo los cultivos se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 10 minutos y el paquete celular se sometió a un choque hipotónico con una solución de cloruro de potasio (KCl 0.075 M) por 20 minutos a  $37^\circ C$ . Posteriormente se realizó otra centrifugación y las células se fijaron en una solución de metanol-ácido acético (3:1), con tres cambios de la mezcla fijadora 20, 15 y 10 minutos respectivamente.

Del último cambio de la solución fijadora se realizaron preparaciones por goleo en porta objetos desengrasados, las cuales se dejaron secar al aire.

### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

a) Para estudiar el efecto del pentóxido de vanadio a las cero horas de iniciados los cultivos, se adicionaron las tres diferentes concentraciones (2, 4 y 6  $\mu\text{g/ml}$ ), durante la siembra. La cafeína (20  $\mu\text{g/ml}$ ), se adicionó a las 0, 24 y 48 horas respectivamente (figura 6).

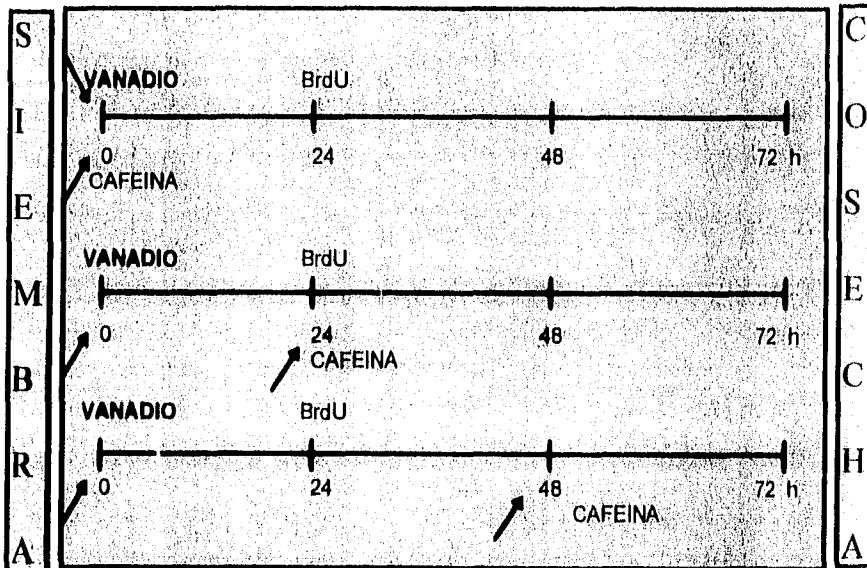


FIGURA 6. TRATAMIENTOS DE VANADIO APLICADOS A LAS CERO HORAS EN COMBINACIÓN CON CAFEINA EN LOS 3 DIFERENTES TIEMPOS DE DIVISIÓN

b) Para poder evaluar el efecto del pentóxido de vanadio sobre el primer ciclo de división, se adicionó a las 24 horas las tres diferentes concentraciones (2, 4 y 6 µg/ml). La cafeína se adicionó a las 0, 24 y 48 horas respectivamente (figura 7).

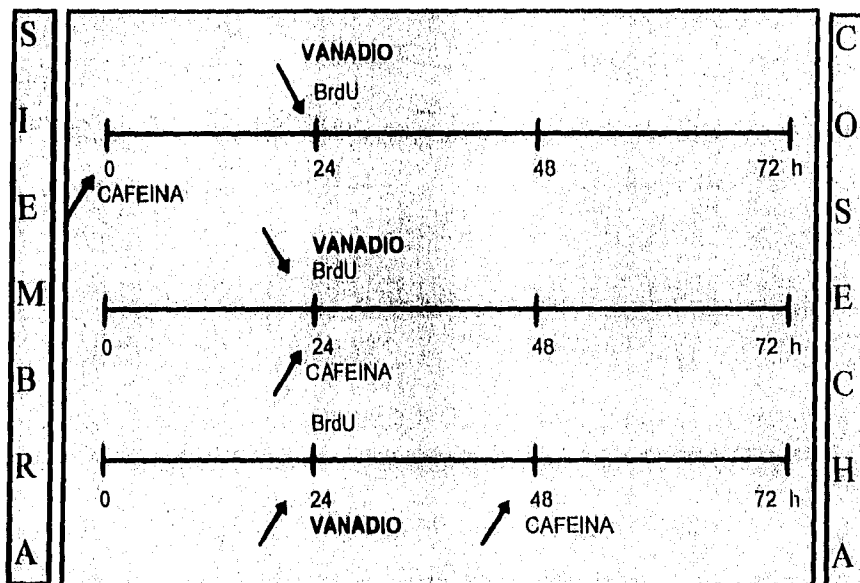


FIGURA 7. TRATAMIENTOS DE VANADIO APLICADOS A LAS 24 HORAS EN COMBINACIÓN CON CAFEINA EN LOS 3 DIFERENTES TIEMPOS DE DIVISIÓN

c) Para cuantificar el efecto del pentóxido de vanadio sobre el segundo ciclo de replicación, éste se agregó a las 48 horas de iniciados los cultivos, con las mismas concentraciones. La cafeína (20 µg/ml), se adicionó a las 0, 24 y 48 horas (figura 8).

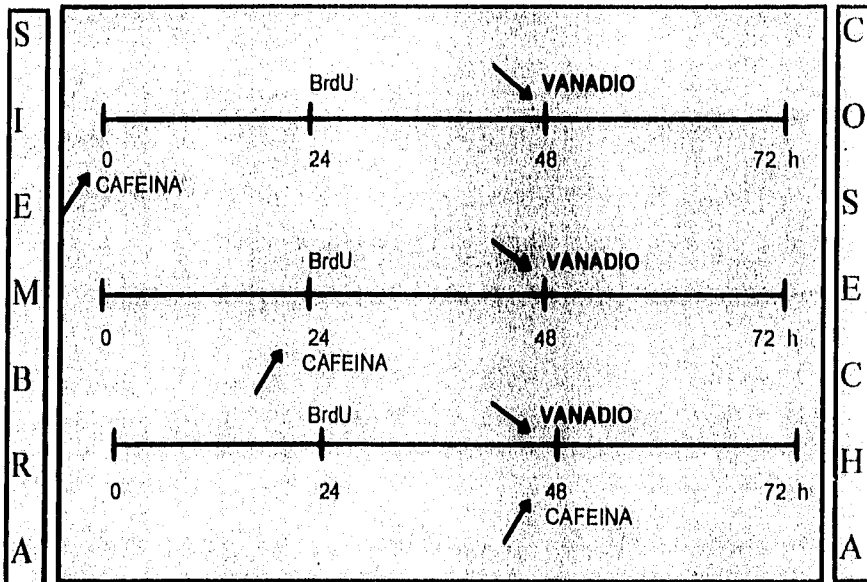


FIGURA 8. TRATAMIENTOS DE VANADIO APLICADOS A LAS 48 HORAS EN COMBINACIÓN CON CAFEINA EN LOS 3 DIFERENTES TIEMPOS DE DIVISIÓN

En todos los casos, se contó con un testigo absoluto (-) y otro de cafeína en los diferentes tiempos de división (+) (0, 24 y 48 h).

La BrdU, se aplicó en todos los protocolos, siempre a las 24 horas de iniciados los cultivos.

#### 4. TINCIÓN DIFERENCIAL DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH's)

Las laminillas se irradiaron con luz ultravioleta por 20 minutos en solución acuosa (agua destilada). Transcurrido este tiempo, se incubaron por 20 minutos en una solución doble salina de citratos 0.03M de citrato de sodio (2XSSC), a 60 °C. Finalmente las preparaciones se lavaron y tiñeron con una solución de Giemsa (Sigma) (1:30) en agua corriente durante 10 minutos después se lavaron al chorro del agua y se dejaron secar al aire.

#### 5. EVALUACIONES

Para evaluar la cinética del ciclo celular, por concentración se observaron al azar 100 células en metafase y se cuantificaron las células en primera, segunda, tercera o divisiones sucesivas. Para el análisis del IM se observaron 1000 células, tomando en cuenta el porcentaje de células en metafase.

El tiempo medio de división linfocítica (TPL) se obtuvo al aplicar la siguiente fórmula propuesta por Ivett y Tice (1982):

$$TPL = \frac{\text{TIEMPO DE BrdU EN EL MEDIO}}{I(I) + 2(II) + 3(III)} \times 100$$

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

Para cuantificar los ICH's se observaron 40 células en metafases, bien extendidas y de segundo ciclo, considerando a los intercambios terminales como uno y a los intersticiales como dos. Todas las evaluaciones se realizaron por duplicado, por concentración y a doble ciego en un microscopio óptico (Nikon)<sup>®</sup>.

#### 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El Índice Mitótico se analizó mediante la prueba de "Z" para proporciones, al Tiempo de Proliferación Linfocítica se le aplicó la "t" de Student y a la frecuencia de ICH's por metafase se evaluó mediante el análisis de varianza multifactorial (ANDEVA).

## VI. RESULTADOS

En la tabla 6 se presentan los resultados del ensayo donde el  $V_2O_5$  fue aplicado a las cero horas de cultivo simultáneamente con la cafeína, mostrando que el IM disminuyó significativamente en la concentración de 6  $\mu\text{g/ml}$  de  $V_2O_5$  con respecto al testigo (2.05 vs 3.63  $p < 0.05$ ). La TPL se modificó significativamente en el testigo de cafeína y en las concentraciones de 2 y 4  $\mu\text{g/ml}$  de  $V_2O_5$ , en relación al testigo absoluto (26.10  $\pm$  0.42, 2  $\mu\text{g}$ : 26.40  $\pm$  0.56, 4  $\mu\text{g}$ : 28.54  $\pm$  0.33 vs 24.71  $\pm$  0.47,  $p < 0.05$  y 0.005). Así mismo, cuando la cafeína fue aplicada en el primer ciclo de división (24 horas), se obtuvieron los mismos resultados a las mismas concentraciones ( $p < 0.005$  y 0.05). El IM disminuyó significativamente en relación al testigo absoluto (2.05 vs 3.63,  $p < 0.05$ ), en la concentración de 6  $\mu\text{g/ml}$  de  $V_2O_5$ , en el tratamiento mencionado, pero con cafeína adicionada en el segundo ciclo de división (48 h). Con respecto a la frecuencia de ICH's en estos mismos tratamientos, no presentaron modificaciones.

En la tabla 7, se presentan los resultados obtenidos del segundo tratamiento donde el  $V_2O_5$  fue aplicado a las 24 horas de cultivo. El IM no se modificó en este tratamiento en combinación con cafeína a las cero horas, mientras que en la TPL hubo un incremento estadísticamente significativo con respecto al testigo absoluto (25.94  $\pm$  0.48 vs 24.20  $\pm$  0.18,  $p < 0.005$ ). En la concentración de 6  $\mu\text{g/ml}$  de vanadio con cafeína aplicada a las 24 horas se observó una disminución significativa en todas las concentraciones de vanadio a las 48 horas de cafeína (2  $\mu\text{g}$ : 22.42  $\pm$  0.60, 4  $\mu\text{g}$ : 22.32  $\pm$  0.73, 6  $\mu\text{g}$ : 22.9  $\pm$  0.02 vs 24.20  $\pm$  0.18 respectivamente,  $p < 0.05$ ). En relación a la frecuencia de ICH's, no se encontraron diferencias significativas.

TABLA 6. ÍNDICE MITÓTICO, TASA DE PROLIFERACIÓN LINFOCÍTICA E INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS, EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO. TRATADOS CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> APLICADO A LAS 0 h, EN COMBINACIÓN CON CAFEÍNA A LAS 0, 24 Y 48 h.

CONCENTRACIÓN DE VANADIO (µg/ml)	TIEMPO DE TRATAMIENTO DE CAFEÍNA (20 µg/ml)	IM (%)	TPL (X ± e.e) (h)	ICH's/ CEL (X ± e.e)
0 h	0 h			
-	-	3.63	24.71 ± 0.47	3.17 ± 0.09
-	+	3.10	26.10 ± 0.42 b	3.92 ± 0.23
2	+	2.70	26.40 ± 0.56 b	3.77 ± 0.26
4	+	3.30	28.54 ± 0.33 c	3.00 ± 0.23
6	+	2.05 a	24.70 ± 0.42	2.87 ± 0.26
	24 h			
-	-	3.63	24.71 ± 0.47	3.17 ± 0.09
-	+	3.35	22.85 ± 0.21 c	3.89 ± 0.13
2	+	3.15	23.07 ± 0.38 b	3.49 ± 0.35
4	+	2.65	23.06 ± 0.37 b	3.57 ± 0.31
6	+	2.70	24.24 ± 0.42	3.39 ± 0.25
	48 h			
-	-	3.63	24.71 ± 0.47	3.17 ± 0.09
-	+	2.90	23.60 ± 0.48	3.11 ± 0.34
2	+	2.60	25.06 ± 0.37	2.64 ± 0.34
4	+	3.30	25.53 ± 0.47	3.64 ± 0.34
6	+	2.05 a	25.65 ± 0.50	3.97 ± 0.44

a p<0.05 prueba "Z" para proporciones vs testigo absoluto (-); b p<0.05 prueba "t" de Student vs testigo absoluto (-); c p<0.005 prueba "t" de Student vs Testigo absoluto (-)

TABLA 7. ÍNDICE MITÓTICO, TASA DE PROLIFERACIÓN LINFOCÍTICA E INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS, EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO, TRATADOS CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> APLICADO A LAS 24 h. EN COMBINACIÓN CON CAFEÍNA A LAS 0, 24 Y 48 h.

CONCENTRACIÓN DE VANADIO (µg/ml)	TIEMPO DE TRATAMIENTO DE CAFEÍNA (20 µg/ml)	IM (%)	TPL (X ± e.e) (h)	ICH's/ CEL (X ± e.e)
24 h	0 h			
-	-	3.28	24.20 ± 0.18	3.17 ± 0.09
-	+	3.15	23.64 ± 0.33	3.15 ± 0.28
2	+	3.60	23.88 ± 0.17	2.67 ± 0.32
4	+	3.65	24.63 ± 0.20	2.80 ± 0.37
6	+	2.20	23.76 ± 0.34	3.00 ± 0.34
	24 h			
-	-	3.28	24.20 ± 0.18	3.17 ± 0.09
-	+	3.15	23.52 ± 0.47	2.57 ± 0.24
2	+	3.60	24.36 ± 0.08	1.96 ± 0.24
4	+	3.65	24.87 ± 0.66	2.29 ± 0.20
6	+	2.20	25.94 ± 0.48 a	2.39 ± 0.32
	48 h			
-	-	3.63	24.20 ± 0.18	3.17 ± 0.09
-	+	2.90	23.60 ± 0.48	3.06 ± 0.35
2	+	3.05	22.42 ± 0.60	3.86 ± 0.42
4	+	2.70	22.32 ± 0.73	3.40 ± 0.28
6	+	2.65	22.00 ± 0.02 b	3.06 ± 0.32

a p<0.005 prueba "t" de Student vs testigo absoluto (-); b p<0.0005 prueba "t" de Student vs testigo absoluto (-)



En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos del tratamiento con el  $V_2O_5$  aplicado a las 48 horas en combinación con la cafeína a las 0, 24 y 48 horas de iniciados los cultivos respectivamente. La TPL mostró un incremento significativo en la concentración de  $6 \mu\text{g/ml}$  de  $V_2O_5$  comparado con el testigo absoluto ( $25.50 \pm 0.28$  vs  $24.20 \pm 0.18$ ,  $p < 0.005$ ), al adicionar la cafeína a las cero horas de haber iniciado los cultivos. Al analizar el IM, se encontró una disminución estadísticamente significativa en relación al testigo absoluto en las concentraciones de  $4$  y  $6 \mu\text{g/ml}$  de  $V_2O_5$  ( $4\mu\text{g}$ :  $1.80$ ,  $6\mu\text{g}$ :  $1.50$  vs  $3.26$ ,  $p < 0.05$ ), en la combinación de cafeína aplicada en el primer ciclo de división ( $24$  h). En cuanto a la TPL se vio un aumento significativo comparado con el testigo ( $2\mu\text{g}$ :  $26.37 \pm 0.52$ ,  $6\mu\text{g}$ :  $28.07 \pm 0.38$  vs  $24.20 \pm 0.18$   $p < 0.005$  y  $0.0005$ ), en la concentración más alta de vanadio combinado con el mismo tratamiento de cafeína. Con respecto a la inducción de ICH's en este tratamiento, no se observaron modificaciones significativas a las cero horas de cafeína. Sin embargo, al aplicar la cafeína en el primer ciclo ( $24$  h), hubo un aumento en la frecuencia de ICH's en la concentración de  $6 \mu\text{g/ml}$  de  $V_2O_5$ , en comparación con el testigo absoluto ( $4.49 \pm 0.29$  vs  $3.17 \pm 0.09$ ,  $p < 0.005$ ), los testigos de cafeína de los tres tiempos ( $0$ ,  $24$  y  $48$  h) ( $4.49 \pm 0.29$  vs  $2.80 \pm 0.25$ ,  $2.76 \pm 0.33$ ,  $2.86 \pm 0.38$ ,  $p < 0.005$  y  $0.05$  respectivamente) y con la primera concentración de vanadio combinado con cafeína aplicada a las cero horas ( $4.49 \pm 0.29$  vs  $2.94 \pm 0.24$   $p < 0.05$ ).

En cuanto a la aplicación simultánea de vanadio y cafeína a las 48 horas (tabla 8), los resultados muestran que el IM disminuyó significativamente en las concentraciones de  $4$  y  $6 \mu\text{g/ml}$  en relación al testigo absoluto ( $4 \mu\text{g}$ :  $2.0$ ,  $6 \mu\text{g}$ :  $1.80$  vs  $3.26$ ,  $p < 0.05$ ). La TPL se incrementó significativamente con respecto al testigo absoluto en las tres concentraciones de vanadio ( $2 \mu\text{g}$ :  $26.60 \pm 0.57$ ,  $4 \mu\text{g}$ :  $27.76 \pm 0.51$ ,  $6 \mu\text{g}$ :  $29.26 \pm 0.36$  vs  $24.20 \pm 0.18$ ,  $p < 0.005$  y  $0.0005$ ). Así mismo, en la frecuencia de ICH's también se ve un aumento significativo en la concentración de  $4 \mu\text{g/ml}$  de vanadio comparando con el testigo absoluto ( $4.70 \pm 0.44$  vs  $3.17 \pm 0.09$ ,  $p < 0.0005$ ), los testigos de cafeína en los tres tiempos ( $0$ ,  $24$  y  $48$  h) ( $4.70 \pm 0.44$  vs  $2.80 \pm 0.25$ ,  $2.76 \pm 0.33$ ,  $2.86 \pm 0.38$ ,  $p < 0.005$ ) y todas las concentraciones de vanadio en combinación con cafeína a las cero horas ( $4.70 \pm 0.44$  vs  $2\mu\text{g}$ :  $2.94 \pm 0.24$ ,  $4 \mu\text{g}$ :  $3.23 \pm 0.28$ ,  $6 \mu\text{g}$ :  $3.20 \pm 0.23$ ,  $p < 0.005$

TABLA 8. ÍNDICE MITÓTICO, TASA DE PROLIFERACIÓN LINFOCÍTICA E INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS, EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO, TRATADOS CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> APLICADO A LAS 48 h, EN COMBINACIÓN CON CAFEINA A LAS 0, 24 Y 48 h.

CONCENTRACIÓN DE VANADIO (µg/ml)	TIEMPO DE TRATAMIENTO DE CAFEINA (20 µg/ml)	IM (%)	TPL (X ± e.e) (h)	ICH's/ CEL (X ± e.e)
48 h	0 h	3.26	24.20 ± 0.18	3.17 ± 0.09
-	-	3.10	23.64 ± 0.33	2.80 ± 0.25
-	+	2.40	24.00 ± 0.56	2.94 ± 0.24
2	+	2.30	24.00 ± 0.56	3.23 ± 0.28
4	+	2.25	25.50 ± 0.28 b	3.20 ± 0.23
6	+			
	24 h			
-	-	3.26	24.20 ± 0.18	3.17 ± 0.09
-	+	3.15	23.52 ± 0.47	2.76 ± 0.33
2	+	2.20	26.37 ± 0.52 b	3.03 ± 0.31
4	+	1.80 a	25.53 ± 0.66	3.86 ± 0.28
6	+	1.50 a	28.07 ± 0.38 d	4.49 ± 0.29 d e
	48 h			
-	-	3.26	24.20 ± 0.18	3.17 ± 0.09
-	+	2.90	23.60 ± 0.48	2.86 ± 0.38
2	+	2.30	26.60 ± 0.57 b	3.67 ± 0.37
4	+	2.00 a	27.76 ± 0.51 c	4.70 ± 0.44 d e f
6	+	1.80 a	29.26 ± 0.36 c	5.22 ± 0.44 e f

a p<0.05 prueba "Z" para proporciones vs testigo absoluto (-); b p<0.005 prueba "t" de Student vs testigo absoluto (-)

c p<0.0005 prueba "t" de Student vs testigo absoluto (-)

d p<0.005 para ANDEVA seguida de Tukey; e p<0.05 para ANDEVA seguida de Tukey; f p<0.0005 para ANDEVA seguida de Tukey

y 0.05). En la concentración de 6  $\mu\text{g/ml}$  los ICH's aumentaron significativamente comparado con el testigo absoluto ( $5.22 \pm 0.44$  vs  $3.17 \pm 0.09$   $p < 0.0005$ ), los testigos de cafeina de los tres tiempos ( $5.22 \pm 0.44$  vs  $2.80 \pm 0.25$ ,  $2.76 \pm 0.33$ ,  $2.86 \pm 0.38$ ,  $p < 0.005$ ,  $0.0005$ ), todas las concentraciones de vanadio en combinación con cafeina a las cero horas ( $5.22 \pm 0.44$  vs 2  $\mu\text{g}$ :  $2.94 \pm 0.24$ , 4  $\mu\text{g}$ :  $3.23 \pm 0.28$ , 6  $\mu\text{g}$ :  $3.20 \pm 0.23$ ,  $p < 0.005$  y 0.05) y la concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$  de vanadio en combinación con cafeina aplicado en el primer ciclo de división (24 h) ( $5.22 \pm 0.44$  vs  $3.86 \pm 0.28$ ,  $p < 0.005$ ). Estos datos indican que cuando el vanadio y la cafeina son aplicados simultáneamente a las 48 horas a medida que aumenta la concentración de vanadio el porcentaje de células en metafase disminuye.

## VII. DISCUSIÓN

### 1. CITOTOXICIDAD

Los cambios que provoca un compuesto sobre el proceso de división celular, son un criterio importante para la identificación del daño en los sistemas genéticos (Sharma y Talukder, 1987). La toxicidad celular producida por un medicamento o compuesto, es uno de los índices que generalmente se evalúa para detectar los efectos de los agentes químicos. Los parámetros más utilizados para este fin son el índice mitótico y la tasa de proliferación linfocítica, este último aporta también información sobre la duración del ciclo celular (Rojas et al., 1993).

La mayoría de los metales son capaces de afectar la división celular y producir alteraciones en las fibras del huso mitótico, lo que conduce a la formación de diplocromosomas, poliploidías y a una disminución del IM (Sharma y Talukder, 1987). Aunque, algunas de estas respuestas pueden ser atribuidas a la afinidad de los metales por los enlaces disulfuro y por consecuencia a las proteínas del huso (Cherian, 1985).

La citotoxicidad del  $V_2O_5$  (4 y 6  $\mu\text{g/ml}$ ), se observó al aplicarlo a las 48 horas en combinación con cafeína a las 24 y 48 horas en donde hay una disminución significativa en el IM. Se sabe que la toxicidad *in vitro* del vanadio y sus compuestos, depende de la valencia, lo que se relaciona con su solubilidad y su densidad, siendo la forma pentavalente la más tóxica para los mamíferos (Galli et al., 1991). Sharma et al (1987), establecen que en división celular algunos metales, inducen disturbios en el huso mitótico, arresto en metafases y disminuyen el IM, lo cual coincide con nuestros resultados. Además Zhong et al (1994), reportan la citotoxicidad del  $V_2O_5$  en células de ovario de hámster Chino V79, por la cinética del ciclo celular usando citocalacina-B para inducir células binucleadas. El vanadio en concentraciones relativamente altas, es citotóxico y modifica varias funciones celulares involucradas en la mitosis (Léonar y Gerber, 1994).

Los datos obtenidos en el presente estudio indican que el vanadio en las tres diferentes concentraciones en combinación con cafeína es citotóxico y alarga la TPL, lo cual coincide con otros trabajos realizados con  $V_2O_5$  en cultivos de linfocitos humanos, en

donde disminuye el índice mitótico y el tiempo generacional (TPL) se prolonga (Roldán y Allamirano, 1990; Allamirano et al., 1993; Zhong, 1994). El efecto del vanadio sobre la TPL posiblemente se deba a que éste metal afecta la fase de G<sub>1</sub> del ciclo celular, ya que ésta es la responsable del tiempo generacional y de su estimulación o inhibición depende que un ciclo se retarde o se acelere, esto se puede lograr con algún nutriente u hormona. El vanadio es un elemento relativamente tóxico ya que unos pocos µg/g en la dieta pueden ejercer un efecto farmacológico *in vivo*, especialmente si el estado nutricional del organismo no es el óptimo. Sin embargo, la acumulación gradual tanto en los organismos como en el ambiente, aumenta su potencial toxicológico (Waters, 1977; Phillips et al., 1983). Si bien se sabe que el vanadio es un micronutriente esencial en pollos y ratas, el cual podría estar actuando sobre la fase de G<sub>1</sub> con base en lo que se mencionó previamente y posiblemente por tal motivo registramos TPLs más largas, es decir los cultivos presentaron un tiempo generacional mayor.

Como se mencionó, los resultados anteriores se pueden deber al efecto citotóxico o simplemente al bloqueo de la proliferación celular por parte del vanadio, ya que, éste es un potente inhibidor de la progresión mitótica y es capaz de afectar la segregación de todos los cromosomas (Pfarr et al., 1990; McIntosh y Pfarr, 1991; Léonard y Gerber, 1994). También afecta los procesos normales de síntesis del ADN (Sabbioni et al., 1991), interfiriendo al mismo tiempo con otras moléculas involucradas en el metabolismo celular, como el motor que impulsa el movimiento cromosómico (Migliore et al., 1993). Como otros metales pesados, esto puede impedir la reunión de los microtúbulos del huso por uniones específicas de grupos sulfhidrilos (Ramel y Magnusson, 1979; Onfelt, 1986). Lo cual puede alterar algunas actividades enzimáticas (Nechey, 1984; Sabbioni et al., 1991), que regulan la presencia de Ca<sup>2+</sup> intracelular, este parece estar asociado positivamente con el movimiento cromosómico (Izant, 1983; Nechey, 1986).

La exposición del vanadio en el metabolismo y algunas acciones farmacológicas, en concentraciones bajas como 10<sup>-7</sup>-10<sup>-8</sup> M, inhiben actividades enzimáticas como Na/K/ATPasa, asociadas con el transporte de la membrana (Cantley et al., 1977). Por otro lado, el vanadato (10-100 µM) inhibe el movimiento anafásico de los cromosomas y la prolongación del huso en células lisadas PTK 1, pero aparentemente en la polimerización no actúa (Cantley et al., 1977).

Los resultados de este trabajo, se suman a los observados en otros sistemas de prueba, por ejemplo en células de médula ósea de ratas de 21 días tratadas con  $V_2O_5$  en donde el índice mitótico se ve disminuido (Giri *et al.*, 1979). El potencial citotóxico por parte del  $V_2O_5$  se observa también en células de médula ósea en ratón, en las cuales no modifica la TPL (Altamirano *et al.*, 1993); mientras *in vitro* en la línea de células V79 de hámster Chino, refleja una tendencia a disminuir el índice de replicación pese a que los resultados no son significativamente diferentes (Zhong *et al.*, 1994). Sin embargo, cuando se evalúan diferentes sales de vanadio, en cultivo de linfocitos humanos se observó una disminución en el índice de replicación, para el  $NH_4VO_3$ , para el  $NaVO_3$ ,  $Na_3VO_4$  y  $SVO_5$ , aunque éstas no son significativas existe una tendencia a disminuir conforme aumenta la dosis. Todos estos reportes aportan información acerca de la citotoxicidad del vanadio, independientemente del sistema de prueba.

## 2. GENOTOXICIDAD

El intercambio de cromátidas hermanas (ICH's), las aberraciones cromosómicas (A.C) o micronúcleos, son considerados parámetros adecuados para identificar la exposición a bajos niveles de agentes químicos con acción genotóxica (Al-Sabti *et al.*, 1992; Barale *et al.*, 1993; Berces *et al.*, 1993; Lakhansky *et al.*, 1993). El desarrollo de técnicas basadas en la incorporación de 5-bromodesoxiuridina (BrdU), para la tinción de cromátidas hermanas (Latt, 1973; Perry y Wolff, 1974), ha permitido una determinación exacta de éstas.

La prueba de ICH's se considera una de las técnicas más sensibles para detectar la exposición a agentes mutagénicos (Knuutila *et al.*, 1978; Morimoto *et al.*, 1985). Painter propuso en 1980, que los ICH's son reflejo de errores en la síntesis, involucran rompimiento y reunión del ADN hacia los loci homólogos de las cromátidas, como resultado de una mala replicación del templado de ADN, dañado probablemente por recombinación o pérdida de la velocidad de replicación de la horquilla. Siendo intercambios de dos filamentos entre dos moléculas de ADN que posiblemente ocurran por alguna de las 3 siguientes vías: 1) Un intercambio entre cromátidas que han sido rotas independientemente en sitios homólogos; 2) Un sistema de reparación que opera durante la replicación del ADN y 3) un error en la replicación del ADN. Sin embargo, el

mecanismo molecular responsable para el intercambio todavía no se conoce (Knuttila, 1979; Iannuzzi et al., 1991; Morales et al., 1994).

En otros estudios, se ha reportado que la frecuencia basal de ICH's en linfocitos de sangre periférica varía entre individuos y dentro de los factores que la afectan son la exposición a agentes terapéuticos o genotóxicos ambientales, defectos genéticos como el caso del Síndrome de Bloom (Palitti et al., 1983), así como la edad, el sexo y el estilo de vida (fumadores, alcoholismo, consumo de anticonceptivos) (Hupkin y Evans, 1980; Husgafvel-Pursiainen et al., 1980; Alvarez et al., 1980; Bent et al., 1982).

Estudios previos, muestran que el pentóxido de vanadio por sí solo no induce intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos (Roldán y Altamirano, 1990), sin embargo, al combinarlo con la cafeína que es un inhibidor de los mecanismos de reparación posreplicativa y de escisión, los cuales son de fundamental importancia para la protección del material genético contra los cambios estructurales debido a agentes físicos y químicos (Arlett y Lhemann, 1978), se puede observar el efecto genotóxico por parte del  $V_2O_5$ , ya que, la dosis de cafeína empleada en este trabajo es baja (20  $\mu\text{g/ml}$  de cultivo, lo cual equivale a  $1.0298 \times 10^{-4}$  mM), en comparación con lo reportado por otros autores para la inducción de ICH's y de aberraciones cromosómicas en el mismo sistema de prueba (Weinstein et al., 1975).

Algunos trabajos que apoyan que la cafeína es un amplificador de daño son: 1) la cafeína (1 mM) ha sido utilizada para inhibir la reparación cromosómica producida por la mitomicina C, en linfocitos humanos (Okoyama y Kitao, 1981), 2) también se ha utilizado para amplificar el efecto de la luz U.V. en células de Xeroderma pigmentosum a una concentración de 0.1 mM donde esta concentración no afecta a las células normales (Tohda y Oikawa, 1988). Además se ha empleado a la cafeína (0.5-1.0 mM) en combinación con el selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) (0.0029-0.058 mM), como moduladores de químicos mutagénicos y carcinogénicos (sabiendo que los posibles efectos del selenio y la cafeína en mutagénesis en procariontes se aplican antes, durante o después de la exposición de un mutágeno), inducido por la N-metil-N-nitrosourea (MNU), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), en *Salmonella typhimurium*, donde la cafeína sola con MNNG produce una amplificación significativa de la mutagenicidad, lo cual se atribuye a la inhibición de algún mecanismo específico de la reparación del ADN (IARC, 1991). Lo

que confirma la capacidad de la cafeína para influenciar procesos involucrados en la fijación y expresión del daño inducido al ADN por MNU o MNNG (Samson *et al.*, 1988; Balansky, 1992).

Por otro lado, la cafeína ejerce varios efectos en células de mamíferos tratadas con mutágenos tanto físicos como químicos y los resultados observados sugieren que estos inhiben la reparación del ADN (Timson, 1977), por lo que ésta se ha empleado para realizar o potencializar el efecto inductor de la frecuencia de ICH's. Con base a estos antecedentes, se puede decir que los resultados obtenidos se deben realmente a la acción del vanadio sobre la molécula de ADN al inducir lesiones, que al no ser reparadas se manifiestan como ICH's. El incremento en la frecuencia de ICH's observado en los tratamientos con vanadio aplicado a las 48 horas de cultivo en combinación con cafeína a las 24 y 48 horas hace suponer que la presencia de la cafeína en un ciclo de división celular antes de la cosecha pudo influir sobre los mecanismos de reparación y provocar que las lesiones inducidas por el vanadio no fueran reparadas y sean traducidas en intercambios, esto es apoyado por Anderson (1981), el cual menciona que los ICH's aumentan durante la replicación del ADN en presencia de lesiones no reparadas. Además la cafeína en células somáticas induce un bloqueo en el límite de S/G<sub>2</sub>, mediante la inhibición del mecanismo de reparación posreplicativo, durante el segundo ciclo de exposición, esto nos habla de que los linfocitos humanos son más sensibles al efecto que esta ejerce como un amplificador de daño (Walters *et al.*, 1974).

Aunque el V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> no produce ICH's en linfocitos humanos (Roldán y Altamirano, 1990), trabajos realizados por Migliore *et al.* (1993), encontraron que diferentes compuestos de vanadio como son, el metavanadato de amonio (NH<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), el metavanadato de sodio (NaVO<sub>3</sub>), el ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) y el sulfato de vanadil (SVO<sub>5</sub>), incrementan la frecuencia de ICH's significativamente, en linfocitos humanos. Por otro lado, Owusu-Yaw *et al.* (1990); con los mismos compuestos pero, en células de ovario de hámster Chino, también muestran un aumento en la frecuencia de ICH's en las concentraciones más altas.

Siguiendo con los parámetros que proporcionan información acerca del efecto genotóxico se han realizado otros estudios, con diferentes sales de vanadio (SVO<sub>5</sub>, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>) en células de médula ósea de ratón, donde se observó un aumento de



micronúcleos los cuales pueden ser explicados por pérdida de cromosomas, esto también se puede deber a la inducción de células haploides y particularmente por metafases hiperploides (Ciranni et al., 1995). Además en células de ovario de hámster Chino y en células humanas MOLT4, el vanadato ( $V^{5+}$ ), es capaz de producir enlaces cruzados (crosslinks). También induce rompimientos al ADN de cadena sencilla en leucocitos humanos (Birboim, 1988).

El hecho de que no se observen ICH's en éstos tratamientos se puede deber a que el tiempo de aplicación del vanadio al inicio de los cultivos, en el cual las células se encuentran en un periodo de adaptación y al aplicarlo a las 24 horas las células empiezan a dividirse, sin poder observar el efecto del vanadio al aplicar la cafeína en los diferentes tiempos (ya que inhibe los mecanismos de reparación).

Por otro lado, en trabajos previos se utilizó el  $V_2O_5$  en combinado con cafeína ambos aplicados a las 24 horas observando un incremento en la frecuencia de ICH's en la concentración de 6  $\mu\text{g/ml}$  de vanadio y a las 48 horas de cafeína también la incrementa en las concentraciones de 4 y 6  $\mu\text{g/ml}$  de vanadio (Roldán, 1992), lo cual no concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo en relación con los tiempos de tratamiento del vanadio ya que en esta investigación se utilizaron los tiempos de 0 y 48 horas a diferencia de los antecedentes donde únicamente se utilizó en tratamiento de las 24 horas, cabe señalar que los tiempos de aplicación de la cafeína sí fueron los mismos que ya se habían utilizado (0, 24 y 48). Esto puede deberse a que los donadores utilizado en este proyecto no fueron los mismos que los que se emplearon en trabajos anteriores y hay que tomar en cuenta las características individuales de cada uno de los sujetos de donde se obtuvo la muestra de sangre. Probablemente los individuos utilizados en ésta investigación presentan diferencias en la cinéticas de reparación y en los niveles basales de ésta, (Rojas et al., 1996).

En el tratamiento donde se aplicó el pentóxido vanadio a las 48 horas en combinación con la cafeína a las 24 horas de haberse iniciado los cultivos se observó un incremento en la frecuencia de ICH's como ya se mencionó, estos resultados tal vez se deban a que la cafeína al ser aplicada en el primer ciclo de división produzca una inhibición de las enzimas implicadas en la reparación que no alcancen a normalizarse

para el siguiente ciclo, al momento de ser agregado el vanadio. Sin embargo, cuando el vanadio y la cafeína son aplicados a las 48 horas, se logra visualizar mejor el efecto con el incremento en la frecuencia de ICH's en las concentraciones de 4 y 6  $\mu\text{g/ml}$ , lo cual podría deberse a la permanencia de la combinación en el medio.

La amplificación del daño por parte de la cafeína depende del tiempo en el que esta es aplicada, ya que tiene una vida media de aproximadamente 6 horas y al ser adicionada actúa inmediatamente sobre los mecanismos de reparación. Los resultados anteriores sugieren la posibilidad de que la cafeína este inhibiendo los mecanismos de reparación, por tanto el daño producido por el vanadio se expresa en forma de ICH's, ya que, se sabe que la cafeína se une al ADN con una alta afinidad por las regiones dañadas y así interfiere con las uniones específicas de las enzimas reparadoras (Kihlman, 1977). Probablemente de esta forma este inhibiendo la reparación por escisión y posreplicativa (IARC, 1991), no permitiendo que el daño inducido por parte del vanadio se diluya, cuando sólo se dejan los cultivos durante un ciclo de división y antes de que sea completado se detienen a las células en metafases. Este hecho contribuye a lo ya propuesto por Rojas et al (1996), donde reportan que el daño producido por parte del vanadio es rápidamente reparado por la célula y conforme transcurre el tiempo este daño se va diluyendo. De tal forma que la persistencia de los ICH's (Tice y Schuartzman, 1982), no es posible debido a que la mayor parte del daño al ADN se repara cuando las células se dividen.

## VIII. CONCLUSIONES

- \* La citotoxicidad del vanadio no se vio modificada por acción de la cafeína
- \* Con base en los resultados obtenidos a partir de la Tasa de Proliferación Linfocítica (TPL), se propone que el vanadio inhibe la fase de  $G_1$  del ciclo celular.
- \* El efecto genotóxico se observó desde la concentración de 4  $\mu\text{g/ml}$  cuando la combinación de vanadio-cafeína (48 h), estuvo presente en el medio de cultivo y en contacto con las células por un ciclo de división, ya que el daño producido por el  $\text{V}_2\text{O}_5$  es rápidamente reparado por éstas.
- \* Los resultados de ICH's obtenidos cuando la cafeína fue aplicada un ciclo de división antes (24 h), que el pentóxido de vanadio ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ), indican que posiblemente los mecanismos de reparación de escisión y posreplicativo son inhibidos.
- \* De la misma forma y con base al incremento de ICH's obtenidos del tratamiento simultáneo de pentóxido de vanadio y cafeína durante el segundo ciclo de división (48 h), se sugiere la posibilidad de que la cafeína inhiba principalmente el mecanismo de reparación de escisión ya que el posreplicativo requiere de otra fase S (síntesis) para poder actuar. Lo que significa que el mecanismo de reparación de escisión juega un papel muy importante en la persistencia de las lesiones del ADN.

## IX. REFERENCIAS

- Aito A. (1988) Biological monitoring. En: Biological monitoring of toxic metal. Clarkson, T. W., Friberg, L., Nordberg, G. y Sayer, P. R., G. eds., Plenum Press, N.Y.
- Alder, Y. D. (1970) The problem of caffeine mutagenicity. En: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man. Cap 24. Vogel, F., Rohrborn, G. eds, New York: Springer-Verlag.
- Aldridge, A., Bailey, J. y Neims, A.H (1981) The disposition of caffeine during and after pregnancy. *Semin Perinatol*; 5:310-314
- Alessio, L., Maroni, M., y Dell'Orto, A. (1988) Biological Monitoring of Vanadium. En: Biological monitoring of toxic metal. Clarkson, T. W., Friberg, L., Nord-Berg, G. F. y Sager, P.R. (Eds). Plenum Press, N.Y.
- Al-Sabli, K., D.C. Lloyd, A. A. Edwards and P. Stegnar (1992) A survey of lymphocyte chromosomal damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogens. *Mutat. Res.*, 280:215-223
- Altamirano, L. M., Alvarez, B. L. y Roldán, R. E. (1993) Cytogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Med. Sci. Res.*, 21: 711-713
- Alvarez, M. R., Cimino Jr, L. E., Cory, M. J. y Gordon, R. E. (1980) Ethanol induction of sister-chromatid exchanges in human cells *in vitro*. *Cytogenet. Cell Genet.* 27: 66-69
- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. y Lee, F. D. (1973) Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 70:2281-2285
- Anderson, H. C. (1981) Introduction of sister chromatid exchanges by streptonigrin, and antibiotic and antineoplastic agent. *Hereditas* 95: 141-148
- Arlett, C. F. y Lehmann, A.R. (1978) Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage, *Ann. Rev. Genet.*, 12: 95
- Balansky, R. (1992) Effects of sodium selenite and caffeine on mutagenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and aflatoxin B<sub>1</sub> in *S. typhimurium*. *Mut. Res.* 269:307-317
- Balogh, A., Irmisch, E., Klinger, G., Splinter, F-K., y Hoffmann, A. (1987) Untersuchungen zur limination von caffein und metamizol im menstruations zyclus der fertilen frau. *Zent bl. Gynäkol*; 109:1135-1142
- Barale, R., I. Barral, I. Sbrana, L. Migliore, A. Marrazzini, V. Scarcelli, E. Bacci, A. Di Sibio, A. Tessa, L. Cocchi, V. Lubrano, C. Vassale and J. He. (1993) Monitoring human

- exposure to urban air pollutants, Environ. Health Perspect. Suppl., 101: (Suppl,3), 89-95
- Baroch, E. F. (1983) Vanadium and vanadium alloys. En: Encyclopedia of chemical Technology. vol.23 Ed. Wiley and Sons.
- Beaulac-Baillargeon, L. Ph. D. y Desrosiers, C. B. Sc. (1987) Caffeine-cigarette interaction on fetal growth. Am. J. obstet. Gynecol. 157 5: 1236-1240
- Beavo, J. A., Rogers, L.N., Crofford, B.O., Hardman, G.J., Sutherland, W.E. y Newman, V. E. (1970) Effect of xanthine derivatives on lipolysis and adenosine 3', 5' monophosphate phosphodiesterase activity. Mol. Pharmacol. 6:597-603
- Bent, H; Hans, C. W. y Niebuhr, E. (1982) Normal Sister-chromatid exchanges in oral contraceptive users. Mut. Res. 103: 161 - 164
- Bérces, J., M. Ótos, S. Szirmal, C. Crane-Uruena y G. J. Koteles (1993) Using the micronucleus assay to detect genotoxic effects of metal ions, Environ. Health Perspect. Suppl., 101 (Suppl. 3), 11-13
- Bergmann, F. y Dikstein, S. (1956) Studies on uric acid and related compounds. III Observation on the specificity of mammalian xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 223: 765 - 780
- Birboim, H. C. (1988) A superoxide anion induced DNA strand-break metabolic pathway in human leukocytes: effect of vanadate, J. Nutr., 112:2279-2285
- Brazier, J. L., Ritter, J., Berland, M., Khenfer, D. y Faucon, G. (1983) Pharmacokinetics of caffeine during and after pregnancy. Dev Pharmacol Ther; 6:315-322
- Brusick, D. (1987) Principles of genetic toxicology. 2a. ed. Plenum Press. New York.
- Brown, C.R., Jacob, P., Wilson, M. y Benowitz, N. L. (1988) Changes in rate and pattern of caffeine metabolism after cigarette abstinence. Clin Pharmacol Ther; 43:488-491
- Buhl, S.N. y Reagan, J.D. (1975) Effects of caffeine on postreplication repair in xeroderma pigmentosum cells. En: Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawalt y R. B. Setlow, Eds.). Plenum Press, Nueva York, Part B, pp.627-630
- Byerrum, R. U. (1991) Vanadium, in: E Merian (De.), Metals and their compounds in the environment, occurrence, analysis and biological relevance, VCH, Weinheim, pp. 1289-1297
- Byrne, A.R. y Kosta, L. (1978) Vanadium in foods and in human body fluid and tissue. Sci. Total Environm. 10:17-30
- Carver, M.P., Williams, P.L. y Riviere, J.E. (1989) The isolated perfused porcine skin flap III. Percutaneous absorption pharmacokinetics of organophosphates, esters, benzoic acid, and caffeine. Toxicol Appl Pharmacol 97:324-337

- Caillet-Fauquet, P. (1976) Etude biochimique, chez E. coli d'un mécanisme de réparation inductible et mutagène. Tesis. Université Libre de Bruxelles, Bélgica.
- Cantley, L.C. Jr., Josephson, L., Yanagasawa, M., Lechene, C. y Guidotti, G. (1977) Vanadate is a potent (Na, K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle, J. Biol. Chem., 252:7421-7423
- Cerutti, P.A. (1978) Repairable damage in DNA. In Proceedings of ICN-UCLA Symposia on Molecular and cellular Biology, DNA Repair Mechanisms, (P. C. Harawalt, E.C. riedberg, and C. F. Fox, eds.), Academic Press, New York, pp. 1-14
- Cherian, G. (1985) Metallothionein and metal toxicity. CRC. Press. Boca Raton. FL.
- Ciranni, R., M. Antonetti, L. Migliore (1995) Vanadium salts induce cytogenetic effects in *in vivo* treated mice. *Mutat Res.* 343:53-60.
- Cleaver, J.E. (1969) Repair replication of mammalian cell DNA synthesis on dark repair. *Radiat. Res.* 37:334-348
- Craddock, V.M., Henderson, A.R. y Ansley, C.M. (1976) Repair replication of DNA in the intact animal following treatment with dimethylsitosamine and with methyl anesulfonate studied by fractionation of nuclei in a zonal centrifuge. *Biochim. Biophys. Acta* 447:53-64
- D'Ambrosio, S.M. y Setlow, R.B. (1976) Enhancement of postreplication repair in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:2396-2400
- Devoret, R. Blanco, M, George, J. y Radman, M. (1975) Recovery of phage from ultraviolet damage. En: Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawalt y R.B. Setlow, ds.). Plenum Press, Nueva York, Part A, pp. 155-171
- Drahovsky, D., Lackojand, I. y Wacker, A. (1976) Enzymatic DNA methylation during repair synthesis in non-proliferating human peripheral lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 447:139-143
- Elinder, C.G., Gerhardsson, L. y Oberdoerster, G. (1988) Biological monitoring of toxic metals-overviw. En: Biological monitoring of toxic metals. Clarkson, T.W., Friberg, Norderber, G.F. y Sanger, P.R. Plenum Press. N.Y.
- Fawcett, W. D (1987) Tratado de histología. 11ª ed. Interamericana, México. pp 129-131
- Fishbein L. A., Furt y M. A. Mehlman (1987) Genotoxic and carcinogenic metals: environmental and occupational occurrence and exposure. Princenton Scientific Publishing Co. Inc. U.S.A. pp: 399
- French, R.J. y Jone, J.H. (1993) Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary consideration. *Lif. Sci.* 52:339-346

- 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 de, Elsevier Science Publishers B.V.
- Galli, A., Velloso, R., Fiorio, R., Della Croce, C., Del Carratore, R., Morichetti, E., Gironini, L., Rosellini, D. y Bronzetti, G. (1991) Genotoxicity of vanadium compounds in yeast and cultured mammalian cells. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 11:175-183
- 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.*, 2:391-394
- González-Fernández, P., Hernández, P. y López-Sáez, J.F. (1985) Effect of caffeine and adenine on G<sub>2</sub> repair: Mitotic delayed and chromosoma damage. *Mutat. Res.* 149:275-281.
- Graedel, T. E., Hawkins, D. T. y Claxton, L.D. (1986) Atmospheric compounds. Academic Press. N.Y.
- Grant, D.M., Tang, B.R., Campbell, M. E., Kalow, W. (1986) Effect of allopurinol on caffeine disposition in man. *Br J Clin Pharmac.* 21:454-458
- Guerrero, R.R. (1979) Bioassay procedure for the detection of mutagenic, metabolites in human urine with use of sister chromatid exchange analysis. *J. Natl.* 62:805-809.
- Guyton, A.C. (1976) Textbook of medical physiology. 15th ed. W. B. Saunders Co. Philadelphia.
- Ham, W. A (1975) Tratado de histología. 7ª ed. Interamericana, México. Pp 245-250
- Hamed, M. R., Saad, F. S. Y Younan, G. M. (1994) Influence of caffeine on susceptibility to acetylsalicylic acid teratogenicity in rats. *Med. Sci. Res.* 22:557-560
- Hansen, K. y Stern, R.M. (1984) A survey of metal-induced mutagenicity *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol. Environ. Chem.* 9:87-91
- Hewitt, R.R. y Meyn, R.E. (1975) Concerning pyrimidine as "blocks" to DNA replication in bacteria and mammalian cells. En: Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawalt y R.B. Setlow, Eds.). Plenum Press, N.Y, Part B, pp. 635-638
- Hopkins, L.L. y Mohr, H.E. (1974) Vanadium as and essential nutrient. *Fed. Proc.* 33: 1173-1175
- Howard- Flanders, P. (1981) Inducible repair of DNA. *Scientific American.* 245:56-64
- Hupkin, J. M. y Evans, H.J. (1980) Cigarette smoke-induced DNA damage and lung cancer risks. *Nature (London).* 283:338-390

- Husgafvel-Pursiainen, J., Maki-Paakkanen, H. N. y Sorsa, M. (1980) Smoking and sister chromatid exchange. *Hereditas*. 92:247-250
- Iannuzzi, L., G.P. Di Meo, A. Perucatti, L. F. y I. Gustavsson (1991) Sister chromatid exchange in chromosome of cattle from three different breeds under similar conditions, *Hereditas*, 114:201-205
- IARC (1982) Monographs, suplement 4. Evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans, chemicals industrial. Processes and industries associated with cancer in humans international agency for research on cancer. Lyon, France.
- IARC (1991) Coffe, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal, IARC Monographs, Vol 51, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Ivett, J.L. y Tice, R. (1982) Average generation time: A new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. *Environ. Mutagen.* 4:358
- Izant, J.G. (1983) The role of calcium during mitosis. *Chromosoma*. 88:1-10
- Joeres, R., Klinker, H., Heusler, H., Epping, J., Zilly, W. y Richter, E. (1988) Influence of smoking on caffeine elimination in healthy volunteers and in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Hepatology*, 8:575-579
- Johnson, J. L., Cohen, H. J. y Rajagopalan, K. V. (1974) Studies of vanadium toxicity in the rat black of correlation with molybdenum utilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56:940-946
- Jones, M.M. y Basinger, M.A. (1983) Chelate antidotes for sodium vanadate and vanadyl sulphate intoxication in mice. *J. Toxicol. Environm. Healt.* 12:749-756
- Kato, H. (1980) Evidence that the replication poin is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet Cytogenet.* 2, 69-77
- Kelner, A. (1949) Effect of visible ligh on the recovery of *Stroptomyces griceus* conidia from ultraviolet irradiation injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 35:73-79
- Kihlman, B.A. (1977) Caffeine and Chromosomes (Elsevier, New York). Kligerman, A. D., Bryant, M. F., Erexson, G.L. y Rabinowitz, J.R. (1984) Development of rodent peripheral blood lymphocyte culture systems to detect cytogenetic damage *in vivo*. En: Sister Chromatid Exchanges (Tice, R.R. Hollaender, A. eds) Plenum Press, N.Y. pp. 569-584
- Kligerman, A.D., G. L. Erexson y J.L. Wilmer (1984) Induction of sister-chromatid exchange (SCE) and cell-cycle inhibition in mouse peripheral blood B lymphocytes exposed to mutagenic carcinogens *in vivo*, *Mut. Res.*, 157:181-187
- Knuttila, S., E. Helminen, P. Vuopio y A. de la Chapelle (1978) Sister chromatid interchanges in human bone marrow cell. I. Control subjects and patients with eukaemia. *Ereditas*, 88:189-196



- Knuutila, S. (1979) Human bone marrow cells in the study of cytogenetic abnormalities. Dissertation, University of Helsinki, pp. 18-19
- Kornberg, A. (1978) Síntesis del ADN. De. H. Blume, Madrid.
- Latt, S.A. (1973) Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 70:3395-3399
- Latt, S.A., S. Allen., S.E. Bloom., A. Carrano., E. Falke., D. Kran., E. Schneider., R. SchreeK., R. Tice., B. Whitfield & S. Wolff. (1981) Sister-Chromatid Exchanges: A report of the gene-tox. program. Mutat. Res. 87:17-62
- Lakhanisky, T., D. Bazzoni, P. Jadot, I. Joiris, C. Laurent, M. Ottogali, A. Pays, C. Planard, los y C. Vleminckx (1993) Cytogenetic monitoring of a village population potentially exposed to a low level of environment pollutants. Phase 1: SCE analysis. Mut. Res., 319:317-323
- Léonard, A. y Gerber, G. B. (1994) Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Vanadium Compounds. Mutation Research. 317:81-88
- Lenhinger, A. (1982) Bioquímica, Omega, Barcelona, España.
- Lerner, R. A. y Dixon F.J. (1973) The human lymphocyte as an experimental animal. Sci.m, 228:82-91
- Lewin, B. (1985) Genes. ed. Wiley USA. pp 370-385
- Ling, N.R y Kay, J.E. (1975) Lymphocyte stimulation. 2ª. ed. North Holland Publ. Co. Amsterdam. pp:346
- Lin, P. F. y Howard-Flanders, P. (1976) Genetic exchanges caused by ultraviolet photoproducts in phage Lamda DNA molecules: The role of DNA replication. Mol. en. Genet. 146:107-115
- Litter M. (1986) Farmacología experimental y clínica 7a ed. Ed. El Ateneo Argentina pp 400
- May, D.C., Jarboe, C.H., van Bakel, A.B. y Williams, W.M. (1982) Effects of cimetidine on caffeine disposition in smokers and nonsmokers. Clin Pharmac Ther; 31:656-661
- McIntosh, J.R. y Pfarr, C.M. (1991) Mitotic motors. J Cell Biol. 115:577-585
- Merck, S. (1989) The Merck index, Merck & Co. Inc., Ninth Edition, Rahway N.J. USA.
- Meyer, F.P., Canzler, E., Giers, H. y Walther, H. (1991) Zeitverlauf der hemmung der coffeinellmination unter demeinfluß desoralen depotkontrazeptivum deposiston. Zeit bl Gynäkol; 113:297-302
- Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. y Lo Jocono, F. (1993) Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by

fluorescence in situ hybridization with a centromeric Probe. Mutation Research, 319:205-213

- Migliore, L., Scarpato, R. y Falco, P. (1995) The use of fluorescence in situ hybridization with a  $\beta$ -satellite DNA probe for the detection of acrocentric chromosomes in vanadium-induced micronuclei. Cytogenet Cell Genet. 62:215-219
- Morales, R. P., Mendiola, C. M. T., Vallarino, K. T. y Rodríguez, R. R. (1994) Comparason of sister chromatid exchange induction in murine germinal and somatic cells by gamma radiation exposure in vivo. Environmental and Molecular Mutagenesis. 24:89-95
- Morimoto, K., M. Sato-Mizuno y A. Koizumi (1985) Sister-chromatid exchanges and cell-cyclekinetics in human lymphocytes cultures exposed to alkylating mutagen: apparent deformity in dose-response relationships, Mut. res., 152:187-196
- Morisot, C., Simoens, C. y Trublin, F. (1990) Efficacité de la cafeine transcutanée dans le traitement des apnées du prématuré. Arch Fr Pediatr; 47: 221-224
- Murphy, T.L., McIvor, G., Yap, A., Cooksley, W.G.E., Halliday, J.W. y Powell, L.W. (1988) The effect of smokign on cafeine elimination: amplication for its use as a semiquantitative tes of liver funtion. Clin Exp Pharm Phhhys; 15:9-13
- Myles, G.M. y Sancar, A. (1989) DNA repair, Chemical Research in: Toxicology 2:197-226
- Myron, D.R., Givand, S.H. y Nielsen, F.H. (1977) Vanadium content of select food as determined by flameless atomic absorpion spectroscopy. J. Agric. Food Chem. 28:79-82
- Nakanisshi, Y. y Schneider, E. L. (1979) *In vivo* sister-chromatid exchange: A sensitive measure of DNA damage; Mutat. Res. 60:329-337
- Nakazawa, K., Tanaka, H. y Arima, M. (1985) The effect of cafeine ingestion on pharmacokinetics of cafeine and its metabolites after a single administration in pregnant rats. Pharmacobio Dyn; 8:151-160
- Natarajan, A. T. y Obe, G. (1982) Mutagenic testing with cultured mammalian cells. Citogenetic assays. En: Mutagenicity: A New Horizons in Genetic Toxicology. Acad. Press. N.Y. pp 171-204.
- National Research Council (1974) Committee on Biological effects of Atmospheric Polluants, Vanadium, US Academy of Sciences, Washington, DC. pp 117
- Nechay, B. R. (1984) Mechanisms of action of vanadium. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24:501-524
- Nechay, B.R., Nanning, L.B. y Nechay, S.E. (1986) Vanadyl (VI) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxil, and amino ligand; calculations of cellular vanadium species distribution. Arch. Biochem. Biophys. 251:128-138

- Okoyama, R. y Kitao Y. (1981) Inhibition of chromosome repair by caffeine or isonicotinic acid hydrazide on chromosome damage induced by mitomycin C in human lymphocytes. *Mut. Res.* 81:75-80
- Önfeldt, A. (1986) Mechanistic aspects on chemical induction of spindle disturbances and abnormal chromosome numbers. *Mut. Res.* 168:249-300
- Ortiz-Monasterio P. F., Cortinas de Nava C. y Maffey Garcia L. (1987) Manejo de los Desechos Industriales Peligrosos en México. Universo veintiuno, México. pp 37-45.
- Osterga, W., Duisberg, E. y Sturmman, M. (1965) The mutagenic activity of caffeine in man. *Mutat. Res.* 2:293-296
- Owusu- Yaw, J., Cohen, M.D., Fernando, S.Y. y Wei C.I. (1990) An Assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicol. Lett.*, 50:327-336
- Palitti, F., Tanzarella, C. Degrassi, F., De Galvía, R., Fiore, M. y Natarajan, A. N. (1983) Formation of chromatid-type aberrations in G2 stage of the cell cycle. *Mutat. Res.* 110:343-50
- Palmer, D., John, M.D., PHD, Jores, N.W. y MS. (1993) Guía para el uso de medicamentos. ed. Interamericana, McGraw Hill, México, 166-167
- Painter, R. B. (1980) A replication model of sister chromatid exchange. *Mutat. Res.* 70:337-341
- Parsons, W.D. y Neims, A.H. (1978) Effect of smoking on caffeine clearance. *Clin Pharmac Ther.* 24:40-45
- Paterson, S.N. y Genter, N.E. (1984) Environmentally induced DNA lesions and their biological consequences. En: Repairable lesions in microorganismos. Hurlis, A. y Nasim, A. eds. Acad. Press, Inc. Orlando Florida. 1-56
- Paterson, S.N., Schramm, N., Hu, P.C., Bott, K.F. y Hutchison, C.A. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 6027
- Patwardhan, R. V., Desmond, P.V., Johnson, R.F. y Schenker, S. (1980) Impaired elimination of caffeine by oral contraceptive steroid. *J Lab Clin Med*; 95:603-608
- Perry, P.E. y Thomson, E. J. (1984). The methodology of sister chromatid exchanges En: Handbook of mutagenicity test procedures. B. J., Kilbey, M., Legator, W., Nichols y C., Ramel. eds. Elsevier Sci. Pub. New York.
- Perry, P. E. Y Wolff, S. (1974) New giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature (London)*. 251:156-158
- Pfarr, C.M., Coue, M., Ggrissom, P.M., Hays, T.S., Porter, M.E., McIntosh, J. R. (1990) Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature* 345:263-265

- Phillips, T.D., Nochay, B.R. y Herdelbaugh, N.D. (1983) Vanadium chemistry and the kidney. *Fed. Proc.* 42:2969-2973
- Pollard, Y., Jabbour, H. y Mehrabani, P. A. (1987) Effects of caffeine administered during subsequent funtion in the adult rat: prolonged effects on a second generation. *J. Toxicol. Environm. Health* 22:1-15
- Posner, B.I., Shaver, A. y Fantus, I.G. (1990) Insulin mimetic agents: Vanadium and peroxovanadium compounds, in: C. J. Bailey and P.R. Flatt (Eds.), *New Antidiabetic drugs*, Smith Gordon, London. Pp. 107-118
- Purnell, M. R. y Whish, D.J.W. (1980) Novel inhibitors of poly(ADP-ribosa) synthetasa. *Biochem. J.*, 185:775-777
- Radman, M. (1975) SOS repair hypothesis: Phenomenology of an inducible DNA repair with es accompanied by mutagenesis. En: Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawallh y R.B. Sellow, Eds.). Plenum Press, New York, Part A, pp. 355-367
- Radman, M. y Herrera, M. (1970) Enhanced efficiency of excision repair of non eplicated UV-damage E. coli DNA. *Mutation Res.* 9:553-560
- Ramel, C. y Magnusson, J. (1979) Chemical production of nondisjunction in *Drosophila*. *Healt Perspect* 31:59-66
- Rehder, D. (1991) The Bioinorganic Chemistry of Vanadium. *Angew. Chem. Int. De. Engl.* 30:148-167
- Rhoads, K. y Sanders, C. L. (1983) Lung clearance, transtocation and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, caball, lead, selenium, vanadium and lterbium oxides following deposition in rat lung. *Environ. Res.*, 36:359-378
- Roberts, J.J. y Kottsaki-kovatsi, V.P. (1986) Potentiation of sulphur inustard or asplatin-induced toxicity by caffeine in Chinese hamster cells correlates with formation of DNA double-strand breaks during replication on a damaged template. *Mut. Res.* 165: 207-220
- Rojas, E., Montero, R., Herrera, A.L., Sordo, M., Gonseball, E.M., Rodriguez, R. y Ostrosky, W.P. (1993) Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs.* 4: 637-640
- Rojas, E., Valverde, M. Herrera, L.A., Allamirano, L.M. y Ostrosky-Wegman, P. (1996) genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mut. Res.* 359:77-84
- Roldán, R.E. y Allamirano, L.M.A. (1990) Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchange, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Res.* 245:61-65

- Roldán, R. E. (1992) Efectos mutagenico y teratogenico del pentóxido de vanadio. Tesis de Maestría. FES- Zaragoza. UNAM.
- Roldán, R.E., Hernández, S.E. y Altamirano, L.M. (1995) Genotoxicity of vanadium tetroxide (V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) in human lymphocyte cultures. Environm. Molec. Mutagen. Suplemento. pp. 25:45
- Rommelaere, J. Y Errera, M. (1973) Unscheduled DNA synthesis and repair replication in UV-irradiated Chinese-hamster cells. Aech. Int. Physiol. Biochim. 81:200-202
- Roschin, I.V. (1967) Toxicology of Vanadium Compound Used in Modern Industry. Water Res. 32:26-32
- Roschin, I.V. (1968) Vanadium and its compounds. Moscow Medicine Publishing House.
- Rupp, W. D. y Howard- Flanders, P. (1968) Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. J. Mol. Biol. 31:291-304
- Sabbioni, E., Clereci, L. y Barzzelli, A. (1983) Different effects of vanadium ions on some DNA-metabolising enzymes. J. Toxicol. Environm. Health. 12:737-748
- Sabbioni, E., Pozzi, G. Pintar, A., Casella, L. y Garattini, S. (1991) Cellular retention. Cytotoxicity y morphological transformation by vanadium (IV) y vanadium (V) in BALB/3T3 cell lines. Carcinogenesis, 12:47-52
- Sakurai, H., Shimomura, S., Fukuzawa, K. e Ishizu, K. (1980) Detection of oxovanadium (IV) and characterization of its ligand environment in subcellular fractions of the liver of rats treated with pentavalent vanadium (V). Biochem. Biophys. Res. Commun. 96:293-298
- Sakurai, H. (1994) Vanadium distribution in rats and ADN cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effect. Environ. Health perspect. 102:35-36
- Samson, L., y Schwartz, J. L. (1980) Evidence for an adaptative DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. Nature 287:861-863
- Samson, L., Thomale y Rajewsky, M. (1988) Alternative pathway for the in vivo repair of O<sup>6</sup>-alkyl guanine and O<sup>4</sup>-alkylthymidine in *Escherichia coli* - the adaptive response and nucleotide excision repair. EMBO J. 7:2261-2267
- Sancar, G; Jorns, B; Payne, S; Fluke G; Rupert, CS; Sancar, A (1987) Action mechanism of the *Escherichia coli* ADN Photolyase. J. Biol. Chem. 262: 492-498
- Sancar, A. y Sancar, G. (1988) DNA repair enzymes. Anual Reviv of Biochemistry. 57:29-67
- Sancar, A. (1994) Mechanisms of DNA excision repair. Science 266:1954-1956

- Schvartzman, J. B., R. Postigo, y C. Gutierrez (1979) Analysis of visible light-induced sister chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine substituted chromosomes. *Chromosoma*, 74:317-328
- Sharma, A. R. y Talukder, G. S. (1987) Effects of metals on chromosomes of higher organisms. *Environ. Mutag.* 9:191-226
- Sharma, R. P., S. J. S. Flora., D.B. Drown y S.G. Oberg (1987) Persistence of vanadium compounds in lungs after intratracheal instillation in rats. *Toxicol Ind. Health.* 3:321-329
- Shechter, Y. (1990) Insulin mimetic effects the vanadate. Possible implications for future treatment of diabetes, *Diabetes.* 39:1-15
- Selby, P. Ch. y Sancar, A. (1990) Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 3522-3525
- Shin, Ch.G., Strayer, J.M., Wani, M.A. y Snapka, R.M. (1990) Rapid evaluation of topoisomerase inhibitors: caffeine inhibition of topoisomerase *in vivo*. *Teretogen. Carcinogen. Mutagen.* 10:41-52
- Siemon, H., Schneider, H. y Fuhmann, G. F. (1982) Vanadium increased selective K<sup>+</sup> permeability in human erythrocytes. *Toxicology* 22:272-278
- Smith, M. A., Evans, J. y Steel, C. M. (1974) Age related variation in proportion of circulating T cells. *Lancet* 2:292-294
- Soremark, R. (1967) Vanadium in some biological specimens. *J. Nutr.* 92:183-190
- Spell, G., Hochsattel, R. Y Vogel, W. (1984) The contribution of DNA single-strand breaks to the formation of chromosome aberrations and SCEs. En: Sister Chromatid Exchanges. Tice, R.R., Hollaender, A. Eds. Plenum Press. N.Y.
- Stahl, F. W. (1987) Genetic recombination. *Scientific American.* 256: 52-63
- Steel, C. M., Evans, J. y Smith, M. A. (1975) Age-related changes in T and B cells. *Lancet* 1:914-915
- Sun, M. (1987) Toxicity of vanadio and its Environmental Health Standar. University of Medical Sciences, China.
- Taylor, J. H., Woods, P. S. y Hughes, W. L. (1957) The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 43:122-128
- Tice, R. y Schvartzman, J.B. (1982) Sister-chromatid exchange: A measure of DNA damage persistence. In Sister-chromatid exchange, A.A. Sandberg, ed. Alan R. Liss, New York, pp. 35-45

- Timson, J. (1977) Caffeine, *Mut. Res.* 47:1-52
- Tohda, H. y Oikawa, A. (1988) Characterization of the enhancing effect of caffeine on sister-chromatid exchanges induced by ultraviolet radiation in excision-proficient xeroderma pigmentosum lymphoblastoid cells. *Mut. Res.* 201:1-8
- Tornaletti, S., Russo, P., Parodi, S. y Pedrini A.M. (1989) Studies on DNA binding of caffeine and derivatives. Evidence of intercalation by DNA Unwinding experiments, *Biochim. et. Biophys. Acta* 1007:112-115
- Van Thoff, W. (1979) Caffeine in pregnancy. *Lancet*; 1:1020
- Walters, R.A., Gurley, L.R., Tobey, R.A. (1974) Effects of caffeine on radiation-induced phenomena associated with cell-cycle traverse of mammalian cells. *Biophys J.* 14:99-118
- Waters, M.D. (1977) Toxicology of vanadium. En: Advances in modern toxicology. Goyer, R. A.; Mehlman, M.A., vol.2, Toxicology of trace elements. eds. Washington, DC: Hemisphere. pp.147-189
- Weinstein, D., Maver, I., Katz, M.S. y Kazmer, S. (1975) The effect of methylxanthines on chromosomes of human lymphocytes in culture, *Mut. Res.* 31:57-61
- Weinstock, M.G. (1987) General recombination in *Escherichia coli*. En: Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C.; Ingram, J.L.; Lowik, B.; Magasanik, B.; Schaether, M. y Umbarger, H.E. Eds, Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C. 2: 1034-11043
- West, C.S. (1992) Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Annual Review of Biochemistry* 61:603-640
- Witkin, E. M. (1969) Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. *Ann. rev. Genetics* 3:525-552
- WHO. (1988) (World Health Organization) Vanadium. Environmental Health Criteria. 81, Geneva.
- Zhong, B.Z., Gu, Z.W., Wallace, R. S., Whong, W.Z. y Ong, T. (1994) Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese Hamster V79 cells. *Mutat. Res.* 321:35-45