



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Ciencias

Pentóxido de Vanadio y Cloruro de Manganeseo: Comparación de sus efectos genotóxicos en leucocitos. Modelo murino de exposición por inhalación.

T E S I S
Que para obtener el título de
B I Ó L O G A
P r e s e n t a:
Marcela Rojas Lemus



Directora de Tesis: Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

2006



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.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno Rojas Lemus Marcela 56450449 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 098201730
2. Datos del tutor Dr en C Teresa Imelda Fortoul van der Goes
3. Datos del sinodal 1 Dr Mario Agustín Altamirano Lozano
4. Datos del sinodal 2 Dra Laura Colín Barenque
5. Datos del sinodal 3 Dr. Luis Felipe Jiménez García
6. Datos del sinodal 4 M en C Martha Patricia Bizarro Nevares
7. Datos del trabajo escrito Pentóxido de Vanadio y Cloruro de Manganeso: comparación de sus efectos genotóxicos en leucocitos. Modelo murino de exposición por inhalación. 44 p 2006

Agradecimientos

¡Hay tanto y a tantos a quienes quiero agradecerles...!

A mi familia:

A mis papis abijones: ¡Gracias por confiar en mí! Los quiero mucho y les agradezco haberme dado la vida y todas las oportunidades que conlleva.

A mis hermanas (Carmen y Olga) y a mis sobrinos (Chris, Iñaki y Milla): Sólo puedo decirles que son mi felicidad y que este trabajo va dedicado a ustedes y a los abijones. ¡Los quiero!

A Adrián: Sin ti no lo hubiera logrado, no sólo por los apoyos técnicos que siempre me has brindado, si no por estar ahí siempre y por ser el papá de mi sobrina consentida. ¡Mil Gracias!

A Ángel: Te agradezco todo el apoyo y la paciencia que me has tenido durante todos estos años. ¡Te amo!

A mis queridos Maestros:

A Tere: No tengo palabras para agradecerte tantas cosas que me has enseñado: a confiar en mí, a creer que podía hacerlo sin importar cuantos problemas se presentaran en el camino, a trabajar en equipo y muchas, muchas cosas más en el tiempo que, afortunadamente para mí, he estado formando parte del laboratorio. ¡Gracias y te quiero mucho!

A Lau y Patito: Les agradezco tanto y tanto por todas sus enseñanzas, por tener siempre un minuto para resolver mis dudas y desde luego por todo el apoyo y el cariño que me han brindado durante mi estancia en el laboratorio. ¡Mil gracias!

Al Dr. Altamirano: Perdón por darle siempre tanta lata. Le agradezco la paciencia y el tiempo que dedicó para mí y para llevar a feliz término esta tesis. ¡Gracias!

A Rose: Gracias por estar siempre ahí, dándome valor y palabras de aliento en los tiempos difíciles. Agradezco mucho tus comentarios y el tiempo que le dedicaste a este trabajo. ¡Mil gracias!

A mis queridos amigos:

Gabito y Gabita: ¡Las quiero tanto chicas! Graaaacias por todo su apoyo, por estar ahí en todo momento (bueno, buenísimo o malo, malísimo). Personas como ustedes no se encuentran todos los días y yo tuve muy buena suerte...

A Shanik: Mi querida amiga de toda la vida... gracias por escucharme, consolarme, apoyarme... entre otras muchas cosas más que has hecho por mí. ¡Por fin terminamos, Shan!

A Sergio: Gracias por todo (¡incluyendo los ratos de sano esparcimiento!). Eres un gran amigo... ¡Te quiero mucho!

A José Luis y Michelita: No tengo cómo agradecerles todo su apoyo (¡tal vez sólo con un millón de cafés!) y su cariño. ¡Los quiero mucho!

A Mayrén: Por todo lo que hemos vivido y compartido, por enseñarme muchas cosas cosas de mí y por muchas cosas más... ¡Gracias amiga, te quiero y deseo que encuentres tu camino!

A Vianey: Por todos los momentos que pasamos juntas y por todo tu apoyo...¡Gracias!

A Anita, Fidencio: Aunque estaban lejos siempre estuvieron ahí. ¡Van ustedes un paso más adelante, chicos!

A los nuevos chicos del laboratorio: Paola, Paulina, Carlos y Rafael. ¡Siguen ustedes!

A mis sinodales:

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Dr. Mario Altamirano Lozano

Dra. Laura Colín Barenque

M. en C. Patricia Bizarro Nevares

Dr. Luis Felipe Jiménez

A todas las personas que aportaron su valiosa colaboración en la realización de esta tesis:

Biól. Armando Zepeda: por su valiosísimo apoyo técnico en la microscopía.

Biól. Francisco Pasos: Por su incomparable ayuda en las fotografías.

Por su importante apoyo en la parte técnica:

Técnica Académica Verónica Rodríguez Mata

Técnica Académica Judith Reyes Ruíz

Al personal del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM

Por su valiosa colaboración, así como en la asesoría Técnica para la realización de este trabajo:

Jefe de la Unidad de Bioterio: Dr. Enrique Pinzón Estrada

Y colaboradores:

Dr. Víctor Manuel Salgado Alfaro

Dr. Ismael Torres Saldaña.

Y a la **UNAM**, por ser mi segundo hogar durante tantos años y espero que lo siga siendo.

Este proyecto fue parcialmente apoyado por PAPIIT, UNAM IN200606

Índice

Tema	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Contaminación atmosférica	2
2.1.1. Contaminación atmosférica en la Cd. de México	2
2.1.2. Partículas suspendidas	4
2.1.3. Partículas suspendidas y sus efectos sobre la salud	5
2.1.4. Metales	6
2.1.5. Vanadio	7
2.1.5.1. Generalidades	7
2.1.5.2. Fuentes de emisión	7
2.1.5.3. Niveles de vanadio en el ambiente	8
2.1.5.4. Usos	8
2.1.5.5. Vías de exposición	8
a) Vía oral	8
b) Vía inhalada	9
2.1.5.6. Toxicocinética	9
2.1.5.7. Toxicodinámica	10
2.1.5.8. Efectos en la salud	10
2.1.5.9 Efectos genotóxicos	11
a) <i>in vitro</i>	11
b) <i>in vivo</i>	12
2.1.6. Manganeso	13
2.1.6.1. Generalidades	13
2.1.6.2. Fuentes de emisión	13
2.1.6.5. Niveles de manganeso en el ambiente	13
2.1.6.3. Usos	14
2.1.6.4. Vías de exposición	14
a) Vía oral	14
b) Vía inhalada	14
2.1.6.6. Toxicocinética	14
2.1.6.7. Toxicodinámica	15
2.1.6.8. Efectos en la salud	16
2.1.6.9. Efectos genotóxicos	16
a) <i>in vitro</i>	16
b) <i>in vivo</i>	16
2.2. Técnicas para la detección de genotoxicidad	17
2.2.1. Electroforesis Unicelular Alcalina (Ensayo Cometa)	18
3. Justificación	19

4. Hipótesis	20
5. Objetivo general	20
5.1. Objetivos particulares	20
6. Material y Método	21
6.1. Modelo experimental	21
6.2. Método de viabilidad por fluorocromos	22
6.3. Electroforesis Unicelular Alcalina	22
6.4. Análisis Estadístico	24
7. Resultados	24
7.1. Viabilidad celular por fluorocromos	24
7.2. Genotoxicidad inducida por pentóxido de vanadio o por cloruro de manganeso	24
8. Discusión	30
8.1. Viabilidad celular	30
8.2. Genotoxicidad inducida por pentóxido de vanadio o por cloruro de manganeso	30
8.2.1. Mecanismo común de genotoxicidad: Inducción de estrés oxidativo.	32
8.2.2. Radicales libres y daño al ADN.	33
9. Conclusiones	35
9.1 Perspectivas	35
10. Referencias	36

1. Resumen

La Ciudad de México es una de las más grandes y contaminadas del mundo. La mayor parte de la contaminación que se emite en esta ciudad es debida a las actividades humanas, particularmente por la quema de combustibles fósiles y sus derivados como la gasolina. Entre los contaminantes que se liberan a la atmósfera por esta fuente, podemos mencionar a metales como el vanadio y el manganeso.

Ambos son metales de transición que pueden existir en diversos estados de oxidación; en el caso del vanadio la pentavalente es la más tóxica y en el caso del manganeso la divalente es la que se encuentra en mayor proporción en los organismos.

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial genotóxico del pentóxido de vanadio o cloruro de manganeso en leucocitos de ratones expuestos a estos compuestos por vía inhalada, ya que esta es la vía por la que mejor se absorben estos metales (del 90 al 100% en ambos casos).

Para ello, se empleó un grupo de 18 ratones machos de la cepa CD1 a los que se les administró por nebulización pentóxido de vanadio 0.02 M o cloruro de manganeso 0.02 M una hora, dos veces a la semana por espacio de 4 semanas. Un segundo grupo de 4 ratones fueron los testigos que inhalaban agua desionizada en las mismas condiciones y por el mismo espacio de tiempo.

Se tomaron muestras de sangre entera una vez a la semana y se procesaron para la técnica de Electroforesis Unicelular Alcalina (Ensayo Cometa) pH >13 y para la de viabilidad celular por fluorocromos.

En todos los casos la viabilidad celular fue mayor al 85%, esto nos indica que los compuestos no mostraron actividad citotóxica. En este sentido, es necesaria un alto porcentaje de viabilidad para realizar el Ensayo Cometa, para evitar que los resultados observados en el Ensayo sean debidos a la muerte de la célula.

Las células analizadas se agruparon en cuatro categorías de daño: bajo, medio, alto y total. En cada muestra se cuantificaron para obtener las proporciones respectivas. De las células pertenecientes a las tres primeras categorías se midió la longitud de la migración del ADN.

Los resultados del Ensayo Cometa muestran un incremento en la proporción de células con daño (cometas) a lo largo de ambos tratamientos con respecto a los testigos. Por otro lado, el cloruro de manganeso produjo un aumento significativo en la longitud de las colas de los cometas de los leucocitos. Lo anterior indica que tanto el pentóxido de vanadio como el cloruro de manganeso producen rompimientos de cadena sencilla de ADN, lo que podría deberse a la generación de radicales libres que producen estos compuestos.

2. Introducción

2.1. Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica se define como la presencia de sustancias en el aire, en cantidades tales que pueden ser perjudiciales para la vida, afectar estructuras, materiales y ocasionar cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas. En este sentido, un contaminante atmosférico es cualquier sustancia (química o biológica) que al agregarse al aire puede modificar sus características naturales (Vallejo *et al* 2003). Este tipo de contaminación es reconocida como el mayor problema para la salud humana (Choi *et al* 2004).

Los contaminantes atmosféricos pueden ser emitidos por dos tipos de fuentes: naturales o antropogénicas. *Naturales*: en general, sólo una pequeña fracción de los contaminantes de la atmósfera es emitida por fuentes naturales, entre éstas se encuentran las volcánicas y las geológicas. *Antropogénicas*: Son las generadas por las actividades humanas. Estas fuentes se han clasificado en fijas y móviles. *Fijas*: Entre las principales fuentes fijas se cuentan minas, refinerías, centrales hidro, termo y nucleoelectricas, sitios en donde se desarrollan procesos industriales (p.e. fábricas de pintura y solventes), lugares de almacenamiento y distribución de gasolina, entre otras. *Móviles*: las principales fuentes móviles de contaminación atmosférica son los vehículos de combustión interna. Los contaminantes generados por éstos son diferentes de los que proceden de las fuentes fijas (Flores 2004).

Una manera de clasificar a los contaminantes atmosféricos es por la forma en que las sustancias se encuentran en la atmósfera: si se encuentran tal como fueron emitidas por las fuentes, se conocen como *contaminantes primarios*, mientras que las que resultan de la interacción de varios contaminantes, ya sea entre sí y/o con otras sustancias del medio se les llama *contaminantes secundarios* (Vallejo *et al* 2003, Flores 2004).

Dentro de los contaminantes primarios podemos contar a varias sustancias cuya presencia en el aire puede ser nociva para la salud humana. Los principales son: monóxido de carbono (CO), bióxido de carbono (CO₂), bióxido de nitrógeno (NO₂), bióxido de azufre (SO₂), partículas suspendidas (PS), hidrocarburos (HC), clorofluorocarbonos (CFC) y metales (Flores 2004).

Los contaminantes secundarios se forman por reacciones entre los contaminantes primarios que son catalizadas por la luz ultravioleta que proviene del sol. Entre los más importantes están: ácido sulfúrico, ácido nítrico y ozono troposférico (O₃) (Flores 2004).

2.1.1. Contaminación atmosférica en la Ciudad de México

La Zona Metropolitana de la Ciudad de México, ésta incluye parte del Estado de México, (comúnmente llamada Ciudad de México) está situada en una elevada cuenca hidrológica a 2240 msnm (Riveros-Rosas *et al* 1997, Vallejo *et al* 2003). La meseta ocupa casi 5000 km² y está confinada por tres lados (este, sur y oeste) por cordilleras montañosas, con un lado abierto hacia el norte y con un pequeño lado abierto hacia el suroeste. Las cordilleras montañosas a su alrededor varían en elevación (Rivero-Rosas

et al 1997) y la más alta es la Sierra del Ajusco (Vallejo *et al* 2003). El área metropolitana se encuentra del lado suroeste de la cuenca (Molina y Molina 2004) y abarca aproximadamente 2000 km² (Riveros-Rosas *et al* 1997).

La Ciudad de México es considerada una Megaciudad (definida en términos generales como un área metropolitana con población que excede los 10 millones de habitantes) y la contaminación ambiental ha sido, en décadas recientes, uno de los problemas más importantes de las megaciudades. Las emisiones y las altas concentraciones de contaminantes atmosféricos pueden tener efectos adversos muy importantes sobre la salud, incluido un incremento significativo sobre la mortalidad de su población (Katsouyanni 2003) aunado a la degradación de los ecosistemas (Molina y Molina 2004).

Esta Ciudad es una de las más grandes del mundo, con alrededor de 20 millones de habitantes (Molina y Molina 2004) que viven en un área de 2 000 km² (Rivero-Rosas *et al* 1997), con una densidad poblacional de 12 200 habitantes/km² (una de las más altas a escala mundial), con 3.5 millones de vehículos que consumen 40 millones de litros de gasolina al día (Molina y Molina 2004) y 35 mil industrias (Riveros-Rosas *et al* 1997, Molina y Molina 2004) situadas principalmente en la zona Norte de la ciudad (Rivero-Rosas *et al* 1997). Además presenta características topográficas y meteorológicas complejas que la vuelven altamente susceptible a presentar altos niveles de contaminación (Vallejo *et al* 2003) y entre ellas podemos contar: i) Las cadenas montañosas que junto con las frecuentes inversiones térmicas atrapan a los contaminantes dentro de la cuenca. ii) La altitud a la que se encuentra, determina que la concentración de oxígeno este disminuida (-23%) en relación con el nivel del mar, y esto a su vez, reduce la eficiencia de los motores de combustión interna y aumenta la concentración de monóxido de carbono y de hidrocarburos (Vallejo *et al* 2003, Molina y Molina 2004). iii) La gran elevación de la ciudad y la intensa luz del sol también contribuyen en los procesos fotoquímicos para la formación de contaminantes secundarios (p.e. ozono) (Molina y Molina 2004). iv) La dirección de los vientos predominantes, de noreste a sureste, hace que la mayor concentración de contaminantes se encuentre en la zona sur de la ciudad, en donde la Sierra del Ajusco obstaculiza su dispersión (Vallejo *et al* 2003).

Por otro lado, a grandes altitudes (como es el caso de la Ciudad de México) las personas son más susceptibles a enfermedades respiratorias que las personas que viven al nivel del mar. A mayor altitud, más aire debe ser inhalado para obtener oxígeno suficiente pero al mismo tiempo, se inhalan también mayores cantidades de contaminantes (Molina y Molina 2004). Los efectos en la salud más comúnmente reportados por exposición a la contaminación del aire son en vías respiratorias (p.e. bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía), y en el sistema cardiovascular (p.e. arritmias, infartos) (Rosales-Castillo *et al* 2001). Asimismo, en los últimos años se ha estudiado con mayor detalle a los grupos poblacionales que son más susceptibles a padecer los efectos de la contaminación: niños, ancianos, personas que sufren diabetes, enfermedades cardiovasculares, respiratorias o asma (Rosales-Castillo *et al* 2001, Molina y Molina 2004).

En la Ciudad de México se estima que el 52% del total de la energía producida se emplea en el transporte, que es la mayor fuente de contaminación ambiental (Molina y Molina 2004), 27% en las industrias y en plantas generadoras de energía y 15% en uso

doméstico. Del total de contaminantes emitidos a la atmósfera el 83% corresponde a fuentes móviles, el 12% a fuentes fijas y el 5 % a fuentes naturales (Riveros-Rosas *et al* 1997). El efecto combinado de las emisiones naturales y antropogénicas, y las características topográficas y meteorológicas de la Ciudad de México favorecen la persistencia de contaminantes (Vallejo *et al* 2003) y el resultado es la degradación significativa del ambiente y de la salud humana (Molina y Molina 2004).

En esta ciudad se monitorean continuamente las cantidades de dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno, monóxido de carbono, hidrocarburos y ozono. Adicionalmente, las partículas suspendidas totales y el plomo, sólo son monitoreados semanalmente. Sin embargo, además del plomo, otros elementos como el cromo, el cobre, el zinc, el manganeso y el vanadio no han sido cuantificados en esta ciudad (Riveros-Rosas *et al* 1997).

Las megaciudades a menudo presentan altas concentraciones de: dióxido de azufre (SO₂), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO₂), óxidos de nitrógeno (NO_x), monóxido de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles (COV's), hidrocarburos (HC), partículas suspendidas totales (PST) y ozono (O₃) (Molina y Molina 2004). Siendo estos dos últimos los contaminantes más importantes que se presentan en la Ciudad de México (Rosales-Castillo *et al* 2001).

2.1.2. Partículas suspendidas

Las partículas suspendidas (PS), son una compleja mezcla de diferentes componentes químicos (Fernandez *et al* 2003) y físicos (Katsouyanni 2003) con variación local y regional (Englert 2004). Se considera que el principal origen de las partículas suspendidas es la condensación de los productos de la combustión, tanto de fuentes fijas como móviles (Flores 2004). Por otro lado, las partículas también pueden proceder de reacciones químicas o fotoquímicas que se producen en la atmósfera (Vallejo *et al* 2003), de la fabricación de hierro y acero, la producción de cemento, la extracción de rocas y minerales, el almacenamiento y manejo de granos, de caminos sin asfaltar o de suelos erosionados (Vallejo *et al* 2003, Flores 2004).

Las partículas suspendidas totales, en términos generales, incluyen partículas de cualquier tamaño suspendidas en el aire. Sin embargo, partículas más grandes de 30-70 µm sólo permanecen suspendidas por cortos períodos de tiempo antes de depositarse (Englert 2004), por lo tanto, sólo pueden ser cuantificadas las que se encuentran en la atmósfera.

Las PS pueden ser caracterizadas por: su origen (antropogénico o geogénico); su fuente (productos de la combustión); sus propiedades químicas (su solubilidad) (Englert 2004); por su potencial de depósito en el aparato respiratorio (inhalables y no inhalables) (Flores 2004) o por ser partículas de formación primaria o secundaria. Por razones prácticas para su cuantificación, las PS son caracterizadas por el tamaño de la partícula (también llamado *diámetro aerodinámico*) (Englert 2004), considerándose como partículas inhalables a las que tienen un diámetro igual o menor a 10µm (Vallejo *et al* 2003, Englert 2004) y se clasifican en:

- Partículas burdas o gruesas: con un diámetro aerodinámico menor a $10\ \mu\text{m}$ (PM_{10}) y mayor a $2.5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) (Vallejo *et al* 2003, Englert 2004). Están compuestas principalmente por sílice, titanio, aluminio, sodio, hierro, cloruros (Vallejo *et al* 2003, Molina y Molina 2004) y manganeso (WHO 1999).
- Partículas finas: con un diámetro aerodinámico igual o menor a $2.5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) (Vallejo *et al* 2003, Englert 2004). Están compuestas por productos derivados de la combustión (Fernandez *et al* 2003), particularmente del diesel, e incluyen carbono, plomo, vanadio, dióxido de azufre y dióxido de nitrógeno (Vallejo *et al* 2003).
- Partículas ultrafinas: con un diámetro aerodinámico menor a $0.1\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{0.1}$) (Englert 2004, Vallejo *et al* 2003). Están compuestas por los productos de las quemas agrícolas y forestales, y por la combustión de gasolina y diesel. Sin embargo, permanecen aisladas en la atmósfera durante cortos períodos de tiempo debido a que tienden a unirse a partículas de mayor tamaño (Vallejo *et al* 2003).

Las partículas ultrafinas ($\text{PM}_{0.1}$) están comprendidas dentro de las partículas finas ($\text{PM}_{2.5}$) y éstas a su vez, dentro de las partículas gruesas (PM_{10}) y todas juntas representan las Partículas Suspensas Totales (PST) (Englert 2004, Molina y Molina 2004).

2.1.3. Partículas Suspensas y sus efectos sobre la salud

Las partículas suspensas son un tipo de contaminante atmosférico ubicuo, con una gran influencia en el bienestar humano y sus efectos en la salud conciernen a toda la población (Englert 2004). Estudios epidemiológicos realizados en diferentes países han reportado una asociación entre el incremento de las concentraciones de las PS y el aumento de mortalidad y morbilidad de sus poblaciones (Ghio *et al* 2002, Aust *et al* 2002, Marconi 2003).

Una vez dentro del árbol respiratorio son capaces de acumularse en diferentes sitios como: fosas nasales, laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos y sacos alveolares (Rosales-Castillo *et al* 2001). Se ha observado que conforme disminuye el tamaño de la partícula aumenta su toxicidad (Ghio *et al* 2002), esto se debe a que las partículas más pequeñas son capaces de penetrar más profundamente en las vías respiratorias (Choi *et al* 2004). Recientemente la Organización Mundial de la Salud (WHO) concluyó que hay suficiente evidencia para decir que las partículas suspensas $<2.5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) son más dañinas que las PM_{10} en términos de mortalidad y de enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Englert 2004, Molina y Molina 2004, Choi *et al* 2004). Las partículas suspensas en la Ciudad de México tienen una gran relevancia debido a que estudios epidemiológicos indican que se produce un incremento del 1% en la mortalidad por cada $10\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ de aumento en la concentración de PM_{10} (Molina y Molina 2004).

Está ampliamente aceptado que algunas de las PS son buenos receptores, contenedores y vehículos de componentes toxicológicamente relevantes (Vallejo *et al* 2003, Fernandez *et al* 2003). Un ejemplo de ello son las partículas generadas por la combustión de derivados del petróleo. Éstas usualmente consisten en un núcleo de carbón en el cual hay complejas mezclas de compuestos adheridos a ellas, como hidrocarburos poliaromáticos, toxinas, sulfatos, nitratos y metales de transición (p.e. vanadio, manganeso) (Sorensen *et al* 2005, Katsouyanni 2003). Se considera que éstos

últimos pueden jugar un papel muy importante en la inducción de efectos tóxicos (Marconi 2003) en los sistemas biológicos (Ghio *et al* 2002).

Las PS están asociadas con enfermedades pulmonares, incluido el cáncer. Se sabe que causan daño al ADN, a proteínas y a lípidos; estos efectos son atribuidos a los metales que transportan (Choi *et al* 2004).

2.1.4. Metales

Son la categoría mayor de contaminantes globalmente distribuidos. Es notable su tendencia a acumularse en algunos tejidos del cuerpo humano y su potencial tóxico a concentraciones relativamente bajas (Hu 2002). La exposición constante a ciertos metales se ha relacionado con inflamación de los tejidos, daño celular y cáncer, particularmente de pulmón y piel (Leonard *et al* 2004b). Cada metal tiene sus propios mecanismos de acción (Leonard *et al* 2004b), algunos pueden producir efectos adversos por sí mismos, mientras que otros interactúan con otros factores de manera sinérgica (Leonard *et al* 2004a). Actualmente se sabe que los metales pueden ser genotóxicos y carcinogénicos por medio de diferentes vías y que una de las más comunes es la inducción de estrés oxidativo (Leonard *et al* 2004a, Leonard *et al* 2004b).

El estrés oxidativo es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante de un organismo (Chihuaif *et al* 2002). En sentido estricto, un radical libre (RL), representa cualquier especie química de existencia independiente que posee uno o más electrones desapareados girando en sus orbitales atómicos externos. Esta configuración, electroquímica es muy inestable, le confiere la propiedad de ser una especie química altamente reactiva y de corta vida (Chihuaif *et al* 2002, Valko *et al* 2006). La mayoría de los radicales libres de interés biológico suelen ser extremadamente reactivos e inestables, tienen un período de vida muy corto (fracciones de microsegundo). Cuando un radical reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres, generándose así reacciones en cadena que dan lugar a efectos biológicos alejados del sistema que originó el primer radical (Martínez-Cayuela 1998).

Un amplio rango de xenobióticos pueden generar estrés oxidativo (Martínez-Cayuela 1998). Sin embargo, independientemente del origen, los radicales libres pueden interactuar con las biomoléculas que se encuentran en la célula como es el caso de los ácidos nucleicos (Cooke *et al* 2003), las proteínas, los lípidos insaturados y los carbohidratos (Martínez-Cayuela 1998), provocando con ello modificaciones y consecuencias potencialmente serias para el equilibrio celular (Cooke *et al* 2003).

Los efectos pro-oxidantes de los metales de transición han sido confirmados en repetidas ocasiones en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (HaMai *et al* 2001). El vanadio, al igual que el manganeso, presenta habilidad de catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno y de radicales libres (HaMai y Bondy 2004, Ali *et al* 1995).

2.1.5. Vanadio

2.1.5.1. Generalidades

El vanadio, metal de transición miembro del grupo VB de la tabla periódica (Mukherjee *et al* 2004) está ampliamente distribuido en la corteza terrestre y está presente en cantidades comparables al cobre, níquel y zinc (Kleinsasser *et al* 2003), constituyendo el elemento 21 en abundancia (Thompson 1999). Existe en estados de oxidación que van desde el -1 hasta el +5, siendo los más comunes +3, +4 y +5 (Barceloux 1999, Fortoul *et al* 2002, Ivancsits 2002). Forma parte de 70 minerales aproximadamente (SCF 2004), pero no se le encuentra como vanadio puro debido a que es muy propenso a reaccionar con otros elementos, particularmente con el oxígeno (Barceloux 1999).

2.1.5.2. Fuentes de emisión

La emisión mundial total de vanadio en la atmósfera se calcula entre 71 000 a 210 000 toneladas por año (Ress *et al* 2003). Las fuentes antropogénicas contribuyen con dos terceras partes del vanadio que es emitido a la atmósfera específicamente en forma de óxidos (Barceloux 1999, Fortoul *et al* 2002). Las fuentes naturales como polvos continentales, aerosoles marinos y en menor medida, emisiones volcánicas, contribuyen con el resto del vanadio en el ambiente (Barceloux 1999).

Entre las fuentes de vanadio se encuentran los desechos de las industrias metalúrgicas y altos niveles de este metal (arriba de 50%) pueden aparecer en los depósitos de petróleo particularmente de Iraq, Irán, Kuwait Venezuela y del Golfo de México (Barceloux 1999, Fortoul *et al* 2002).

La fuente más importante de contaminación ambiental por vanadio es la combustión de petróleo y carbón (Rodríguez-Mercado *et al* 2003), se estima que el 90% del vanadio que es emitido cada año a la atmósfera proviene principalmente de la combustión del petróleo (Dill *et al* 2004) y de sus derivados como la gasolina (Ávila-Costa *et al* 2004). La combustión de esos materiales es una fuente apreciable de óxidos de vanadio en el ambiente (Zhong *et al* 1994).

Este metal está ampliamente distribuido como contaminante ambiental (unido a las partículas suspendidas) en forma de óxidos resultado de la quema de combustibles fósiles (Cohen *et al* 1992, Ávila-Costa *et al* 2004, Ávila-Costa *et al* 2005), aunado a que muchos procesos metalúrgicos generan polvos que contienen óxidos de este metal (Dill *et al* 2004).

2.1.5.3. Niveles de vanadio en el ambiente

Para el personal ocupacionalmente expuesto, el límite de exposición permisible determinado por la Administración para la Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) es 0.5 mg/m^3 en el aire (Dill *et al* 2004). En el caso de las áreas urbanas, el nivel medio de vanadio en las ciudades con un alto consumo de combustibles fósiles es $0.62 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ comparado con $0.011 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ en las zonas rurales (Fortoul *et al* 2002).

Por otro lado, en la ciudad de México, Fortoul y colaboradores (2002) reportaron un aumento significativo en los niveles de vanadio por medio de un estudio realizado en pulmones de casos de autopsias de habitantes de las décadas 60's y 90's de esta ciudad.

2.1.5.4. Usos

Debido a su dureza y a su capacidad para formar aleaciones, el vanadio es frecuentemente utilizado como constituyente del acero que se emplea para fabricar herramientas, implantes ortopédicos (Ivancsits 2002) y maquinaria (Barceloux 1999). También su uso es común en la manufactura de semiconductores, reveladores fotográficos y agentes colorantes; para la producción de pigmentos amarillos y cerámicas. El vanadato, las sales y los óxidos de vanadio se emplean como catalizadores para la producción de ácido sulfúrico, en la purificación de gases y en la oxidación de etanol (Barceloux 1999).

El pentóxido de vanadio (V_2O_5) es el compuesto más empleado (Ivancsits 2002) y comercial, es también el material principal para la producción de otros compuestos de vanadio (Dill *et al* 2004). Por otro lado, es la forma más común en situaciones de exposición industrial (Dill *et al* 2004).

2.1.5.5. Vías de exposición

a) Vía oral

Para la población en general, los alimentos son la mayor fuente de exposición a vanadio (Barceloux 1999, Ivancsits 2002, Mukherjee *et al* 2004). Entre los alimentos ricos en vanadio se incluyen: pimienta negra, hongos, perejil (Mukherjee *et al* 2004) y espinacas (Barceloux 1999). En general, los alimentos de origen marino contienen mayores cantidades de vanadio comparados con los de origen terrestre (Barceloux 1999, Ivancsits 2002). Sin embargo, la absorción de compuestos de vanadio por el tracto gastrointestinal es pobre (Mukherjee *et al* 2004), sólo se absorbe < 1-2% del metal que es ingerido (Barceloux 1999).

b) Vía inhalada

El vanadio es mejor absorbido y ampliamente distribuido en el organismo cuando es inhalado (WHO 2001). Se considera que por esta vía se absorbe hasta el 90% de este metal (Leónard y Gerber 1994).

2.1.5.6. Toxicocinética

Los estados biológicamente relevantes del vanadio son los siguientes: vanadato V(V), el estado pentavalente usualmente como oxianión (p.e. HVO_4^{2-} o H_2VO_4^-), esta forma predomina en el espacio extracelular; y vanadilo V(IV), el estado tetravalente usualmente como oxición (p.e. VO^{2+}), más estable y que predomina intracelularmente (Stern *et al* 1993, Fortoul *et al* 2002, SCF 2004).

Los metales usualmente penetran en los organismos cuando éstos inhalan partículas suspendidas a las que se encuentran adheridos (Fortoul *et al* 2002). En el caso del vanadio, éste se une a las partículas suspendidas emitidas de las industrias metalúrgicas y por la quema de combustibles fósiles (Ress *et al* 2003). En este sentido, las partículas más pequeñas son capaces de penetrar profundamente en las vías respiratorias (Choi *et al* 2004), y una vez dentro del árbol respiratorio son capaces de acumularse en diferentes sitios como: fosas nasales, laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos y sacos alveolares, y de esta manera alcanzar el torrente sanguíneo (Rosales-Castillo *et al* 2001).

En el plasma, el vanadio(V) es rápidamente reducido a vanadio(IV) generalmente por antioxidantes del plasma y se transporta unido a proteínas (Evangelou 2002). Sin embargo, ambos estados de oxidación existen en el plasma debido a que el vanadilo (IV) sufre una oxidación espontánea a vanadato(V) *in vivo* (Mukherjee *et al* 2004).

El vanadilo(IV) es transportado principalmente por albúmina y transferrina y el vanadato(V) sólo por transferrina; de esta manera el vanadio es transportado a los órganos y tejidos (Mukherjee *et al* 2004, Gandara *et al* 2005). Aproximadamente el 90% del vanadio en el plasma se encuentra primordialmente como vanadilo unido a transferrina y albúmina (Barceloux 1999, Fortoul *et al* 2002, Ivancsits 2002).

Siguiendo el transporte en el plasma, la distribución del vanadio en el organismo es rápida ($t_{1/2}$ 1 hora) (Barceloux 1999) y se acumula principalmente en hueso, riñón, hígado, bazo, y en menor grado en pulmones y testículos (Evangelou 2002).

El vanadilo como catión libre tiene habilidad limitada para atravesar las membranas celulares, pero el vanadato(V) — que usualmente predomina en el espacio extracelular, a pH neutro se absorbe 5 veces más que el vanadilo (Mukherjee *et al* 2004)— entra a las células por medio de canales iónicos inespecíficos e intracelularmente es biorreducido a vanadilo (Stern *et al* 1993, Barceloux 1999, Evangelou 2002). Esta biorreducción puede ser llevada a cabo por: glutatión celular, catecolaminas, cisteína, NADH, NADHP y L-ácido ascórbico (Rodríguez-Mercado *et al* 2003), subsecuentemente se une a proteínas (Evangelou 2002). Su reducción es regulada por los mecanismos redox de la célula que controlan el equilibrio de los estados de oxidación del vanadio (Evangelou 2002).

Intracelularmente, el vanadio se encuentra en estado tetravalente y se une a las fracciones citosólicas y nucleares. Una pequeña porción (~ 1%) se puede encontrar en forma libre (Evangelou 2002), además de pequeñas cantidades de vanadio presentes en la célula pueden permanecer unidas a las moléculas de grasa y por lo tanto no estar disponibles para producir toxicidad inmediata (Mukherjee *et al* 2004).

La eliminación del vanadio del organismo es bifásica con una fase rápida (10-20 h) y una fase terminal larga (40-50 días) (Barceloux 1999, Ivancsits 2002). El vanadio que

no es absorbido es excretado por vía urinaria, que es la ruta de eliminación principal y sólo una pequeña cantidad (<10%) es excretado por heces (Barceloux 1999).

2.1.5.7. Toxicodinámica

El vanadio puede ser altamente tóxico para los humanos y algunos animales debido a que puede afectar importantes funciones celulares (Altamirano-Lozano *et al* 2004) como: el ciclo celular, vías de señalización y la sobrevivencia celular tanto *in vitro* como *in vivo* (SCF 2004). Este elemento puede interferir con una gran batería de sistemas enzimáticos que contienen fosfatos como: ATPasas, fosfatasas, cinasas (Zhong *et al* 1994, Mukherjee *et al* 2004), ribonucleasas (Mukherjee *et al* 2004), ADN-polimerasas, peroxidasas (Zhong *et al* 1994), ATP fosfohidrolasas, adenilato ciclasa, fosfatasa alcalina y proteínas propias de la síntesis de ADN (Altamirano-Lozano *et al* 2004). Por otro lado, varios genes son regulados por este elemento o por sus compuestos, se incluyen genes como: Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-8 (IL-8), Proteína Activadora 1 (AP-1), Ras, c-raf, Proteína Activadora de Genes Mitógenos (MAPK), p53, Factores Nucleares- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), entre otros (Mukherjee *et al* 2004).

El vanadato está ampliamente reconocido como un análogo estructural y electrónico del fosfato (VO_4^{3-} y PO_4^{3-}), presentando reacciones similares de protonación (Morinville *et al* 1998, Crans *et al* 2004). Esta similitud química del vanadio al fosfato ayuda a explicar el efecto de este metal sobre las reacciones de fosforilación del organismo (Fortoul *et al* 2002).

2.1.5.8. Efectos en la salud

El vanadio es un metal ampliamente distribuido en el ambiente y ejerce efectos tóxicos potentes sobre una gran variedad de sistemas biológicos (Ávila-Costa *et al* 2005). Los efectos tóxicos de los compuestos de vanadio están relacionados con el organismo expuesto, la dosis, la ruta, la duración de la exposición y la naturaleza del compuesto (Evangelou 2002). Los óxidos de vanadio pueden ser más tóxicos que las sales (Evangelou 2002), aunado a que la toxicidad de los compuestos de vanadio aumenta conforme a su valencia, siendo de esta manera, el estado pentavalente el más tóxico (Barceloux 1999, Evangelou 2002) para los mamíferos (Zhong *et al* 1994, Altamirano-Lozano *et al* 1999).

2.1.5.9. Efectos genotóxicos

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) enlista al pentóxido de vanadio como “un posible carcinógeno para humanos” (Grupo 2B) (SCF 2004). Pocos estudios se han realizado para evaluar la acción genotóxica del vanadio de diferentes compuestos y en varios estados de oxidación (Ivancsits 2002, Kleinsasser *et al* 2003), importante es mencionar que muchos de ellos son experimentos *in vitro* (Ivancsits 2002). La información relacionada a la genotoxicidad y al potencial carcinogénico del pentóxido de vanadio (V_2O_5) es limitada (Zhong *et al* 1994) y no es concluyente (Rodríguez-Mercado *et al* 2003). A continuación se citan algunos de los

trabajos realizados para evaluar el potencial genotóxico de los compuestos de vanadio tanto *in vitro* como *in vivo*.

a) *In vitro*

Owusu-Yaw y colaboradores (1990) en células de ovario de hamster chino (CHO-K1), administraron trióxido de vanadio (+3), sulfato de vanadilo y metavanadato de amonio a las siguientes concentraciones 0.1-1 µg/mL, 0.5-6 µg/mL y 0.5-4 µg/mL, respectivamente. Observaron que estos compuestos inducen un incremento significativo en la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH). Por otro lado, en presencia de la fracción hepática S9, la actividad genotóxica del metavanadato de amonio y del sulfato de vanadilo disminuye. En el mismo estudio, los tres compuestos inducen un incremento significativo de aberraciones cromosómicas estructurales, con prevalencia de rompimientos e intercambios después de 2h de tratamiento con 4, 8 y 16 µg/mL de metavanadato de amonio, 6, 12 y 24 µg/mL de sulfato de vanadilo, y 12 y 18 µg/mL de trióxido de vanadio, en ausencia y presencia de activación metabólica.

Roldán y Altamirano (1990) no observaron inducción de aberraciones cromosómicas estructurales ni ICH en linfocitos humanos sin activación metabólica tratados por 48 horas con 2, 4 y 6 µg/mL de pentóxido de vanadio. Sin embargo, sí encontraron a todas las dosis, un incremento significativo en la frecuencia de células poliploides.

En un estudio realizado por Migliore y colaboradores (1993) se investigó el potencial del ortovanadato (0.41- 13.12 µg/ml), del metavanadato (0.28-8.96 µg/ml), del metavanadato de amonio (0.29-9.36 µg/ml) y del sulfato de vanadilo (0.41-13.04 µg/ml) para producir aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas, micronúcleos e ICH en linfocitos humanos. Los tratamientos con los compuestos de vanadio no indujeron incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales, sin embargo sí observaron un incremento en la frecuencia de ICH y micronúcleos.

En otro estudio, Zhong y colaboradores (1994) no encontraron incremento significativo de ICH en células V79 de hámster chino después de 24 h de tratamiento con V₂O₅ (4 µg/ml).

En un estudio realizado por Rojas *et al.* (1996) para detectar daño al ADN empleando la electroforesis de células individuales (ensayo cometa), el pentóxido de vanadio indujo rompimientos de cadena sencilla de ADN y/o sitios álcali lábiles en linfocitos no estimulados a dosis de 0.54 µg/ml o más. Por otro lado, en linfocitos estimulados sólo a altas concentraciones (540 µg/ml) se observó un incremento significativo en el daño al ADN.

Ivancsits y colaboradores (2002) observaron que el ortovanadato incrementa significativamente la longitud de la cola de los cometas de linfocitos no estimulados y de fibroblastos humanos a dosis de 0.25- 0.5 µg/ml y 0.025 µg/ml, respectivamente.

Rodríguez-Mercado y colaboradores (2003) evaluaron la genotoxicidad del tetraóxido de vanadio (+4) a dosis 2- 16 µg/ml en células de sangre periférica sin activación metabólica. Concluyeron que conforme se incrementaba la dosis aumentaban también

las aberraciones cromosómicas y por otro lado, se inhibía el índice mitótico. Con el ensayo cometa, no hubo cambio en los parámetros evaluados después de 2 h de tratamiento, posiblemente por la limitada habilidad del V^{+4} para cruzar la membrana celular.

b) *In vivo*

Ciranni y colaboradores (1995) evaluaron la capacidad para inducir micronúcleos, aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales en células de médula ósea de ratones machos de la cepa CD-1 por administración intragástrica a 100, 70 y 50 mg/kg de peso del sulfato de vanadilo, del ortovanadato de sodio y del metavanadato de amonio, respectivamente. Se observó que todos los compuestos indujeron micronúcleos e hiperploidia, sin embargo sólo el sulfato de vanadilo indujo un incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales.

En otro estudio el Ensayo Cometa fue utilizado para evaluar la habilidad del pentóxido de vanadio en la generación de daño al ADN en un modelo *in vivo* en 6 órganos diferentes (hígado, riñón, pulmón, bazo, corazón y médula ósea) en ratones CD-1. El compuesto fue administrado por inyección intraperitoneal a las siguientes dosis: 5.75, 11.5 y 23 mg/kg de peso 24 h antes del sacrificio. Se observó un incremento significativo en la migración del ADN de las células de riñón, hígado, corazón y pulmón. Un daño menor se encontró en las células de bazo y no se encontró efecto significativo en las células de médula ósea (Altamirano-Lozano *et al* 1999). Con el mismo protocolo, se observó un incremento significativo en la migración del ADN de células testiculares a dosis de 5.75 mg/kg (Altamirano-Lozano *et al* 1996).

Larvas de *Drosophila melanogaster* fueron tratadas con sulfato de vanadilo (163-407 µg/ml) y se observó una inducción de mutaciones somáticas detectadas como sectores rojos aberrantes en los ojos de la mosca adulta (Barrera-Ferrer y Villalobos-Cabrera 1998).

2.1.6. Manganese

2.1.6.1. Generalidades

El manganeso (Mn) es un metal ubicuo en el ambiente y comprende aproximadamente el 0.1% de la corteza terrestre. El manganeso no ocurre en estado puro si no como componente de más de 100 minerales, principalmente en pirolusita, rodocrosita y rodonita (Barceloux 1999, WHO 2004). Puede existir en 11 estados de oxidación que van desde el -3 hasta el +7 y los más comunes son +2 (p.e. cloruro de manganeso: $MnCl_2$), +4 (p.e. dióxido de manganeso: MnO_2) y +7 (p.e. permanganato de potasio: $KMnO_4$) (WHO 2004).

2.1.6.2. Fuentes de emisión

El manganeso puede ser emitido a la atmósfera tanto por fuentes naturales como antropogénicas. Dentro de las principales fuentes naturales se encuentran: erosión de los suelos (WHO 1999, Vitarella *et al* 2000, Dorman *et al* 2001), aerosoles marinos y actividad volcánica (WHO 2004). Las mayores fuentes antropogénicas de este metal que se emite en forma de partículas suspendidas incluyen: minería y procesamiento de los minerales, producción de baterías, industrias metalúrgicas, hornos de coque, plantas generadoras de energía y quema de combustibles fósiles (Vitarella *et al* 2000, Dorman *et al* 2001, WHO 2004, Aschner *et al* 2005), dentro de éstas se considera que la quema de combustibles fósiles aporta el 20 % y las industrias el 80 % de este metal en el ambiente (Barceloux 1999).

Se ha estimado que el 80% del manganeso se encuentra en partículas suspendidas de diámetro $<5 \mu$ y el 50 % de ese metal se estima que está asociado con partículas de diámetro aerodinámico $<2 \mu$ (WHO 1999).

2.1.6.3. Niveles de manganeso en el ambiente

El manganeso en el ambiente tiende a estar en bajas concentraciones en lugares no poblados ($0.5-14 \text{ ng/m}^3$ en promedio), más alto en áreas rurales (40 ng/m^3 en promedio) y aún más alto en áreas urbanas ($65-166 \text{ ng/m}^3$ en promedio). Las concentraciones de manganeso en lugares cercanos a fundidoras pueden alcanzar $200-300 \text{ ng/m}^3$ y hasta 500 ng/m^3 en sitios cercanos a industrias de silicio y ferromanganeso (WHO 2004).

El manganeso está enlistado como un tóxico ambiental por la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (U.S. EPA). Esta agencia ha establecido la concentración límite de referencia para el manganeso en $0.05 \mu\text{g/Mn/m}^3$ (Aschner *et al* 2005).

2.1.6.4. Usos

Debido a sus propiedades físicas, el manganeso es principalmente empleado en la producción de acero y superaleaciones para proveer firmeza y dureza a los productos (Barceloux 1999, WHO 2004).

Sus compuestos tienen una gran diversidad de usos como: producción de baterías secas, fósforos, fuegos artificiales, porcelanizado, catalizadores, suplementos en alimento para ganado, fertilizantes, esmaltes, barnices, cerámicas, fungicida, desinfectantes, entre otros (WHO 2004, Barceloux 1999).

2.1.6.5. Vías de exposición

a) Vía Oral

Los alimentos son la fuente más importante para la población en general (Barceloux 1999, WHO 1999, SCF 2000), sin embargo la vía oral es considerada de bajo riesgo, debido a que este metal se absorbe pobremente por el tracto gastrointestinal (Brenneman *et al* 2000); se estima que sólo del 1 al 5% del manganeso que entra al organismo por esta vía es absorbido (WHO 1999, Aschner *et al* 2005).

Altas concentraciones de Mn se encuentran en: cacahuates, granos, legumbres, frutas, vegetales (Barceloux 1999, Dorman *et al* 2001), té y varias especias (Roth y Garrick 2003). Concentraciones menores se pueden encontrar en productos lácteos, carnes rojas, carne de aves, pescado y huevo (WHO 1999). Otra fuente muy importante son los suplementos alimenticios (Aschner *et al* 2005).

b) Vía inhalada

En contraste con la vía oral, la absorción por la vía inhalada de manganeso es más eficiente, aunado a que hay evidencia de que la inhalación es la ruta más común de exposición para los humanos (Brenneman *et al* 2000). Se considera que por esta vía el 100 % del manganeso es absorbido (WHO 1999).

2.1.6.6. Toxicocinética

El manganeso es un elemento esencial que está presente en todos los tejidos de los mamíferos (Dorman *et al* 2001). Altas concentraciones de manganeso se encuentran en hígado, páncreas, hipófisis (Barceloux 1999), hueso y riñón (Aschner *et al* 2005).

En muchas enzimas el manganeso se encuentra como Mn^{+3} , mientras que el resto está en el organismo en forma de cationes cuatrivalentes o divalentes (Aschner *et al* 2005) estos últimos predominan en los tejidos biológicos (Dorman *et al* 2001, SCF 2000). Se ha reportado que la ceruloplasmina humana puede oxidar al Mn^{+2} a Mn^{+3} *in vitro*. Esta vía se considera un posible mecanismo para la oxidación del Mn en la sangre (Aschner *et al* 2005).

Dentro del plasma, aproximadamente el 80% del Mn se une a la β -globulina y a la albúmina, y el manganeso trivalente se une a la proteína transportadora de hierro, transferrina (Aschner *et al* 2005) y transmanganina (Barceloux 1999). El Mn^{+3} puede competir efectivamente con el ion hierro por la unión a la transferrina en la circulación y de este modo el Mn^{+3} es transportado extracelularmente unido a la transferrina formando un complejo. Este complejo se une al receptor TfR que subsecuentemente lo internaliza dentro de vesículas endosomales. Dentro de éstas, se produce un proceso de acidificación, por el cual probablemente es liberado el Mn^{+3} del complejo transferrina-TfR. El manganeso trivalente libre que se generó dentro del endosoma, tiene que ser reducido a su forma divalente para poder ser transportado a través de la membrana endosomal hacia el citoplasma celular vía proteína transportadora DMT1 (Divalent Metal Transporter 1). El manganeso también puede entrar directamente a la célula por un mecanismo que no involucra al receptor TfR pero sí a DMT1 (Roth y Garrick 2003). El Mn tiene una alta afinidad por DMT1 y es un competidor eficaz del Fe por este

receptor (Roth y Garrick 2003). A nivel celular, el manganeso se concentra principalmente en la mitocondria, y el exceso es secuestrado por los lisosomas (Malecki 2001).

La eliminación del manganeso es bifásica (Aschner *et al* 2005). La mayor parte del manganeso se excreta por vía biliar (Barceloux 1999, WHO 1999), en menor medida se elimina por orina, leche y sudor (WHO 1999).

2.1.6.7. Tóxicodinámica

El Mn es un nutriente esencial, importante en una gran variedad de procesos fisiológicos (Roth y Garrick 2003); es necesario para el metabolismo normal de los aminoácidos, lípidos, proteínas y carbohidratos (Aschner *et al* 2005). Numerosas familias de enzimas dependen de él: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (Aschner *et al* 2005). También es necesario para el funcionamiento de metaloenzimas como: arginasa, glutamina sintetasa, fosfoenolpiruvato decarboxilasa y manganeso superóxidodismutasa (Aschner *et al* 2005). Es necesario para el funcionamiento normal de los sistemas inmune, reproductivo, digestivo, para el crecimiento óseo y para los mecanismos de defensa contra los radicales libres. El Mn en conjunto con la vitamina K, ayudan a mantener los procesos hemostáticos de los organismos (Aschner *et al* 2005).

Desde el punto de vista químico el Mn es parecido al Fe en varias características: tienen radio iónico similar, se presentan en valencias +2 y +3 en condiciones fisiológicas y poseen alta afinidad por la proteína transportadora transferrina (Chen *et al* 2001). Debido a estas similitudes se propone que el Mn no sólo interactúa con el mecanismo regulatorio del Fe, si no también que actúa directamente sobre ciertas enzimas con centros activos que comprenden uniones [Fe-S] como: aconitasa, NADH-ubiquinona reductasa (complejo I) y succinato deshidrogenasa (SDH, complejo II) (Chen *et al* 2001).

Evaluaciones sobre el carácter oxidativo del Mn, se ha observado una acelerada formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) debida a los estados divalente y trivalente del metal (HaMai *et al* 2001), se considera que este último es un poderoso oxidante (Woolf *et al* 2002).

2.1.6.8. Efectos en la salud

En personas expuestas a altas concentraciones de este metal se han observado efectos adversos en la salud que incluyen: incremento en la frecuencia de enfermedades respiratorias (neumonía mangánica, bronquitis, función pulmonar anormal) (Roth y Garrick 2003), desórdenes neurológicos (manganismo) y reproductivos (pérdida de la libido, impotencia y decremento en la fertilidad) (Vitarella *et al* 2000, Aschner *et al* 2005).

2.1.6.9. Efectos genotóxicos

Basados en los datos actuales, no es posible dar una conclusión contundente sobre el posible peligro genotóxico para los humanos (SCF 2000), por otro lado, no existen datos sobre el potencial genotóxico por vía inhalada del manganeso (ATSDR 1992).

A continuación se citan algunos trabajos realizados para evaluar la genotoxicidad del Mn o sus compuestos tanto *in vitro* como *in vivo*.

a) *In Vitro*

En células de linfoma de ratón (Oberley *et al* 1982) y en células de embrión de hámster Chino (Casto *et al* 1979) tratadas con cloruro de manganeso, se encontró que este compuesto produjo mutaciones en ambas líneas celulares. En un estudio realizado por De Méo *et al* (1991) se expusieron a linfocitos humanos con cloruro de manganeso en presencia y en ausencia de la fracción S9 y se observó sólo en el segundo caso que el compuesto causó daño al ADN.

Singh (1984) trató levaduras de la especie *Sacharomyces cerevisiae* con sulfato de manganeso y observó un aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en este organismo. Con el mismo compuesto (NTP 1993) se trataron células de ovario de hámster Chino (CHO) y se observó inducción de aberraciones cromosómicas pero no de ICH. En neuronas del estriado que fueron expuestas a cloruro de manganeso por 48 h se observó que estas células mostraron fragmentación del ADN (Malecki 2001).

b) *In vivo*

Los estudios sobre genotoxicidad en animales muestran resultados no concluyentes (EPA, 2003).

En células de médula ósea de rata tratada con 50mg/kg de cloruro de manganeso por vía oral se observó un incremento en la incidencia de aberraciones cromosómicas (30.9%) comparada con los animales testigo (8.5%) (Mandzgaladze 1966; Mandzgaladze y Vasakidze 1966). Sin embargo, en otro estudio realizado con cloruro de manganeso (0.014mg/kg/día) administrado por vía oral a ratas macho durante 180 días, no se encontró daño significativo en los cromosomas de células de médula ósea ni en células espermáticas (Dikshith y Chandra 1978).

Joardar y Sharma (1990) administraron sulfato de manganeso (102, 202 y 610 mg/kg) y permanganato de potasio (65, 130 y 380 mg/kg) por vía oral por tres semanas a ratones albinos. Ambos compuestos presentaron actividad clastogénica, y el sulfato de manganeso resultó ser más tóxico. Las frecuencias de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en células de médula ósea se incrementaron significativamente con ambas sales.

2.2. Técnicas para la detección de genotoxicidad

La generación de daño al ADN es considerado como un evento inicial importante en la carcinogénesis (Moller 2005); es más probable que las células con ADN dañado desarrollen mutaciones después de bajos niveles de exposición a agentes genotóxicos (Olive *et al* 2001).

Hoy día, se utilizan diferentes pruebas, con un alto grado de sensibilidad para evaluar diversos tipos de daño al ADN (Fatima *et al* 2001). Existe una considerable batería de técnicas para la detección de efectos genotóxicos (Moller 2005) tanto *in vitro* como *in vivo* en sistemas celulares procarióticos y eucarióticos (Sorsa *et al* 1988, Fatima *et al* 2001) que son utilizadas para evaluar diferentes agentes ya sea en condiciones experimentales, ambientales u ocupacionales (Moller 2005). Entre ellas están la prueba de Ames, micronúcleos, aberraciones cromosómicas (Sorsa *et al* 1988, Fatima *et al* 2001), aductos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), intercambio de cromátidas hermanas (ICH) (Herrera *et al* 1999, Shahan *et al* 2001) y la electroforesis unicelular o Ensayo Cometa (Rojas *et al* 2000, Vrhovac y Zeljezic 2000). Sin embargo, algunas de estas pruebas pueden tener usos limitados por tener complicaciones técnicas o por ser aplicables sólo a unos cuantos tipos celulares (Moller 2005).

Durante la última década, el Ensayo Cometa ha sido uno de los métodos estándar para evaluar daño al ADN que ha encontrado aplicaciones en pruebas de genotoxicidad, biomonitorio, epidemiología molecular, ecogenotoxicología, y fundamentalmente en la investigación sobre daño y reparación del ADN (Tice *et al* 2000, Collins 2004). Este ensayo se ha establecido como una prueba específica y sensible para evaluar genotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Rodríguez-Mercado *et al* 2003).

2.2.1. Electroforesis Unicelular Alcalina (Ensayo Cometa)

Comparado con otras pruebas para evaluar genotoxicidad, las ventajas del ensayo cometa incluyen una demostrada sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN, el requerimiento de un bajo número de células por muestra, flexibilidad, relativamente bajo costo, sencilla aplicación y se requiere corto tiempo para realizarla (Tice *et al* 2000) aunado a que puede ser aplicado en cualquier tipo de célula eucarionte sin requerir cultivo celular (Moller 2005).

En esta técnica, las células son embebidas en agarosa y sometidas a lisis, esto genera en el gel estructuras parecidas a núcleos (referidas como nucleoides). Durante la electroforesis horizontal en condiciones alcalinas, las cadenas de ADN disociadas migran hacia el ánodo, y la extensión de la migración (“cola” del cometa) depende del número de rompimientos en las cadenas del nucleoide. La migración es visualizada y cuantificada por medio de fluorocromos (Moller 2005). Es de especial interés el efecto adverso potencial de la degradación del ADN asociado con la citotoxicidad en la interpretación de resultados del ensayo cometa, por lo tanto es necesario aplicar una prueba de viabilidad celular simultáneamente con el ensayo (Tice *et al* 2000).

La versión alcalina ($\text{pH} > 13$) es capaz de detectar rompimientos de cadena sencilla (RCS), sitios álcali lábiles (SAL), entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteína y rompimientos de cadena sencilla asociados con sitios de reparación por escisión incompleta (Tice *et al* 2000).

3. Justificación

La posición geográfica de la Ciudad de México aunada a los altos niveles de contaminación atmosférica que en ella se encuentran, representan un problema grave para la salud humana. La exposición continua de los habitantes a altos niveles de contaminación por largos períodos de tiempo es un fenómeno que se da cotidianamente.

Diariamente se emiten a la atmósfera grandes cantidades de contaminantes, provenientes principalmente de la quema de combustibles fósiles y de las industrias, entre los que podemos contar a las partículas suspendidas que son consideradas, junto con el ozono, como uno de los dos contaminantes más importantes de esta ciudad. Las partículas suspendidas contienen agentes, como el vanadio y el manganeso, que son dañinos para los organismos. Por esta razón ha cobrado una gran importancia determinar los efectos sobre la salud causados por la exposición a los contaminantes.

Se sabe de manera indirecta que las concentraciones de vanadio en el ambiente de esta ciudad se han incrementado en las últimas décadas. Por otro lado, tanto el vanadio como el manganeso son metales de transición a los que se les atribuyen diversos efectos adversos sobre la salud humana.

Evaluar la genotoxicidad de los contaminantes es importante para conocer el riesgo potencial que ellos representan sobre el ADN. En el caso del vanadio y del manganeso los estudios que se han realizado sobre su potencial genotóxico son controversiales, aunado a que no se ha establecido su posible riesgo por vía inhalada ya que esta es la vía por la que mejor se absorben estos metales de transición.

Por otro lado, en estudios previos con nuestro modelo, se ha reportado que en células de timo, bazo y médula ósea de ratones tratados con estos metales, mostraron alteraciones en la cromatina, lo cual podría ser un indicio de la presencia de daño genotóxico causado por la inhalación de estos compuestos.

4. Hipótesis

Si el pentóxido de vanadio o el cloruro de manganeso son capaces de producir daño genotóxico, identificado como rompimientos de cadena sencilla del ADN, entonces en los leucocitos de ratones expuestos a la inhalación durante 4 semanas de pentóxido de vanadio (0.02 M) o cloruro de manganeso (0.02 M) se observará un aumento en la migración del ADN que se manifestará como la presencia de “colas” que incrementaran su frecuencia y su longitud dependiendo del tiempo de exposición.

5. Objetivo general

Determinar y comparar, mediante el Ensayo Cometa, los efectos genotóxicos en leucocitos de ratones expuestos durante 4 semanas a pentóxido de vanadio (0.02 M) o cloruro de manganeso (0.02 M) por vía inhalada.

5.1. Objetivos particulares

1. Identificar los efectos citotóxicos en los leucocitos de los ratones expuestos a V_2O_5 o $MnCl_2$ por vía inhalada durante 4 semanas.
2. Identificar la presencia de migración de ADN en leucocitos de ratones expuestos a V_2O_5 o $MnCl_2$ por vía inhalada a diferentes tiempos de exposición.
3. Comparar la migración del ADN de leucocitos de ratones expuestos a V_2O_5 con la migración del ADN de leucocitos expuestos a $MnCl_2$ a lo largo de las exposiciones.

6. Material y Método

6.1. Modelo Experimental

Se emplearon 18 ratones macho de la cepa CD1 de 35 ± 5 g de peso que se mantuvieron en condiciones de luz-oscuridad (12:12 h) con agua y alimentación *ad libitum*.

Los 18 animales se dividieron en tres grupos de 7, 7 y 4 ratones cada uno. El primer grupo inhaló V_2O_5 (0.02 M); el segundo grupo inhaló $MnCl_2$ (0.02M) y el tercero (4 ratones) inhaló agua desionizada. Éste último fue considerado como grupo testigo.

Modelo de inhalación: los animales se colocaron en una caja de acrílico transparente (45 x 21 x 35 cm) conectada a un ultranebulizador UltraNeb[®]99 con flujo de 10 L/min que contenía el compuesto respectivo para cada grupo. Los animales se sometían a este procedimiento durante 1 hora dos veces a la semana, hasta completar 4 semanas de tratamiento.

Transcurridas 24 h de la primera exposición y posteriormente cada 7 días, se tomó por punción de la cola una pequeña muestra de sangre entera (7.5 μ L) de 3 ratones al azar de cada grupo. Las muestras de sangre se procesaron para dos técnicas: viabilidad celular por fluorocromos y Electroforesis Unicelular Alcalina (Figura 1).

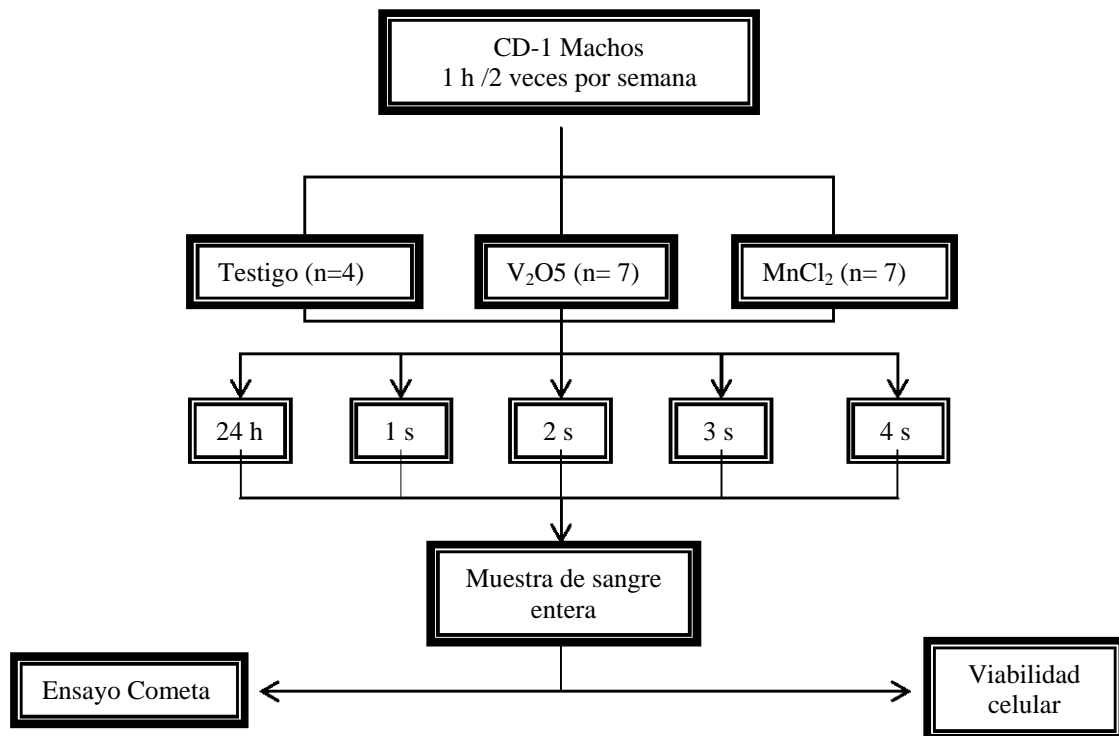


Figura 1. Representación esquemática del método.

6.2. Método de Viabilidad Celular por Fluorocromos

La técnica de viabilidad celular por fluorocromos se llevó a cabo como reporta Strauss (1991) con algunas modificaciones. Cinco mg/ml de diacetato de fluoresceína (FDA) se disolvieron en 1 ml de acetona y 2 mg/ml de bromuro de etidio (Br-Et) en 1 ml de buffer de fosfatos (PBS). Posteriormente, 15 μ L de la solución de FDA y 100 μ L de Br-Et se disolvieron en 2.4 ml de PBS, esta solución fue utilizada inmediatamente.

5 μ L de sangre entera se mezclaron con 5 μ L de solución BrEt-FDA-PBS y se observaron con microscopía de fluorescencia a 200 X. Se cuantificaron las células muertas (fluorescen en rojo) y las metabólicamente activas (fluorescen en verde) en campos al azar hasta completar un total de 100 células, obteniéndose la proporción de células vivas con respecto a las muertas.

6.3. Electroforesis Unicelular Alcalina (Ensayo Cometa)

La técnica se llevó a cabo como reporta Singh *et al* (1988) con ciertas modificaciones. De cada muestra de sangre entera se tomaron 7.5 μ L y se mezclaron con 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) y fueron colocados en una laminilla a la que previamente se le había extendido una primera capa de agarosa regular (0.5%). La muestra se extendió con un cubreobjetos libre de impurezas, formando así una segunda capa de agarosa. La laminilla se colocó en hielo durante 5 minutos, tiempo en el que la agarosa se solidifica. Se retiró suavemente el cubreobjetos para extender una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión. Una vez solidificada la agarosa, las muestras se sometieron a una solución de lisis (EDTA 100 mM-Tris 10 mM-NaCl 2.5 M, Tritón X-100 1%, DMSO 10%) y se mantuvieron a 4°C en condiciones de oscuridad durante 1h. Es importante mencionar que cada muestra se realizó por duplicado.

Posteriormente, para llevar a cabo la electroforesis horizontal, las muestras fueron embebidas en buffer de corrida (NaOH 300mM-EDTA 1mM, pH>13) durante 20 min (tiempo de desenrollamiento del ADN) y posteriormente 20 minutos de corrimiento a 300 mA y 25V. Todo lo anterior se llevó a cabo en condiciones de luz indirecta.

Para neutralizar las muestras, éstas se lavaron en una solución de TRIS (0.4 M) a pH 7.5 durante 15 minutos. Al término de la neutralización, se empleó etanol absoluto para fijarlas.

La observación de las muestras se llevó a cabo en un microscopio de fluorescencia Olympus BH2-RFCA a 200X con reglilla integrada en el ocular y equipado con un filtro de excitación de 480-550 nm y uno de absorción de 570 nm.

Para visualizar las muestras se empleó bromuro de etidio (0.02 mg/ml) disuelto en agua destilada y de esta solución se tomaron 50 μ L que se colocaron sobre la muestra, extendiéndose posteriormente con un cubreobjetos.

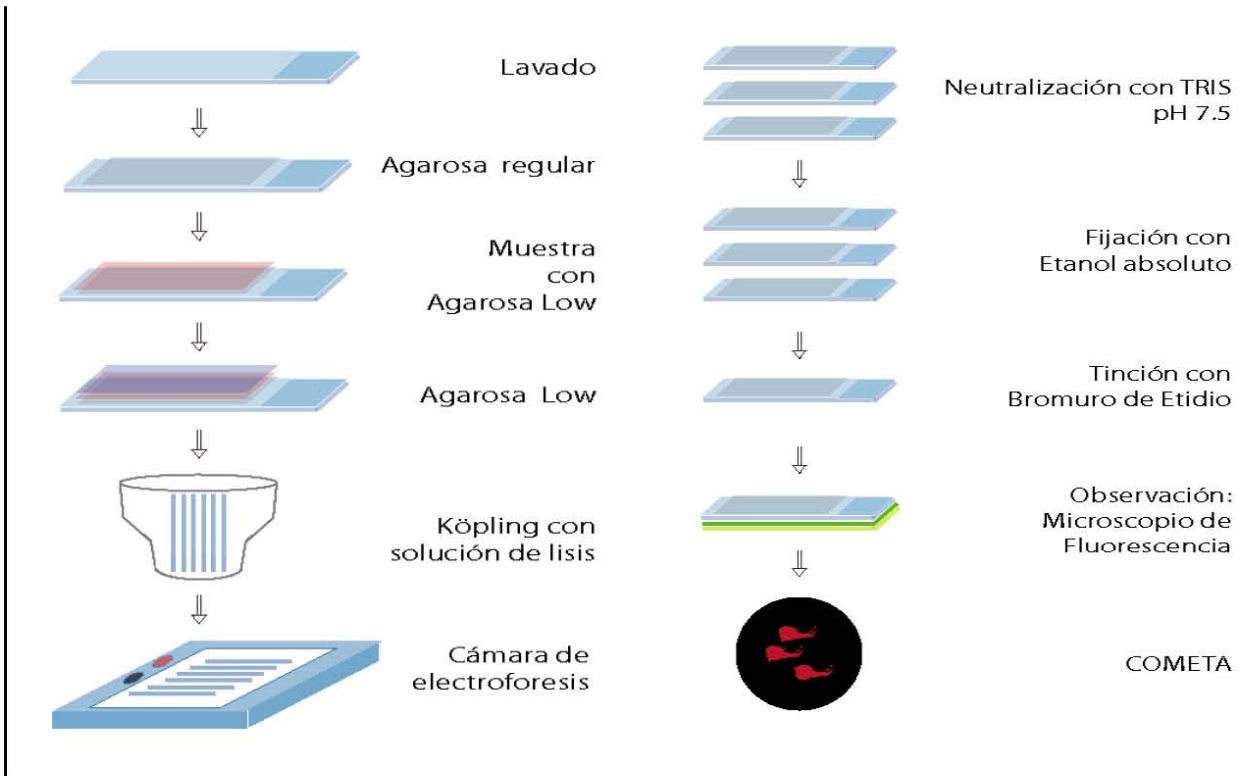


Figura 2. Representación esquemática del Ensayo Cometa.

Se consideraron al azar 200 células por individuo, esto es 600 por condición. En cada muestra se cuantificaron las células sin daño, células con daño y las células con daño total y se obtuvieron los porcentajes respectivos. Por otro lado, de las células que presentaron migración del ADN, se midió la longitud de la cola y la longitud de la cabeza (Figura 3), posteriormente fueron clasificadas (Altamirano-Lozano *et al* 1999) de acuerdo con el grado de daño del ADN mediante la fórmula: longitud de la cola/ longitud de la cabeza, en tres categorías de daño: bajo (≤ 1), medio (≤ 2) y alto (>2) (Figura 4).

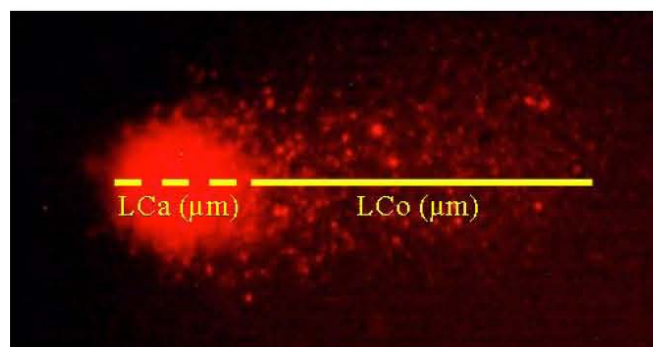


Figura 3. Forma es que se midió la longitud de la cabeza y longitud de la cola de los cometas analizados de leucocitos de ratones expuestos a V_2O_5 o $MnCl_2$ y testigos. (LCa: longitud de la cabeza; LCo: longitud de la cola).

6.4. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía) con el paquete estadístico SigmaStat versión 2.0, para evaluar las diferencias entre cada uno de los grupos tratados y el grupo testigo con respecto al tiempo de exposición.

7. Resultados

7.1. Viabilidad celular por fluorocromos

En todos los casos (grupo V_2O_5 , $MnCl_2$ y testigo) el porcentaje de células viables fue mayor al 85%.

7.2. Genotoxicidad inducida por pentóxido de vanadio o cloruro de manganeso.

En las muestras analizadas fue posible observar tres tipos de células: células sin daño (sin cola), células con daño (cometas) y células con daño total (nubes) (Figura 4).

De acuerdo con las categorías de daño asignadas a los cometas, con ambos tratamientos se observó un incremento gradual de las células que presentaron daño alto (Figuras 5 y 6). En el caso del tratamiento con $MnCl_2$, un alto porcentaje de células (22 %) presentaron daño total, situación que no se presentó en las células de ratones tratados con V_2O_5 (Tabla 1).

En todos los casos se midió la longitud de las colas de las células que presentaron daño (cometas), se realizó un análisis de varianza para identificar diferencias significativas entre la migración de los grupos tratados con respecto al grupo control. Se encontró un aumento significativo en la longitud de la migración del ADN en los leucocitos de ratones tratados con $MnCl_2$ (excepto en la semana 1). El grupo tratado con V_2O_5 no presentó diferencia significativa en este análisis (Tabla 1 y Figura 7).

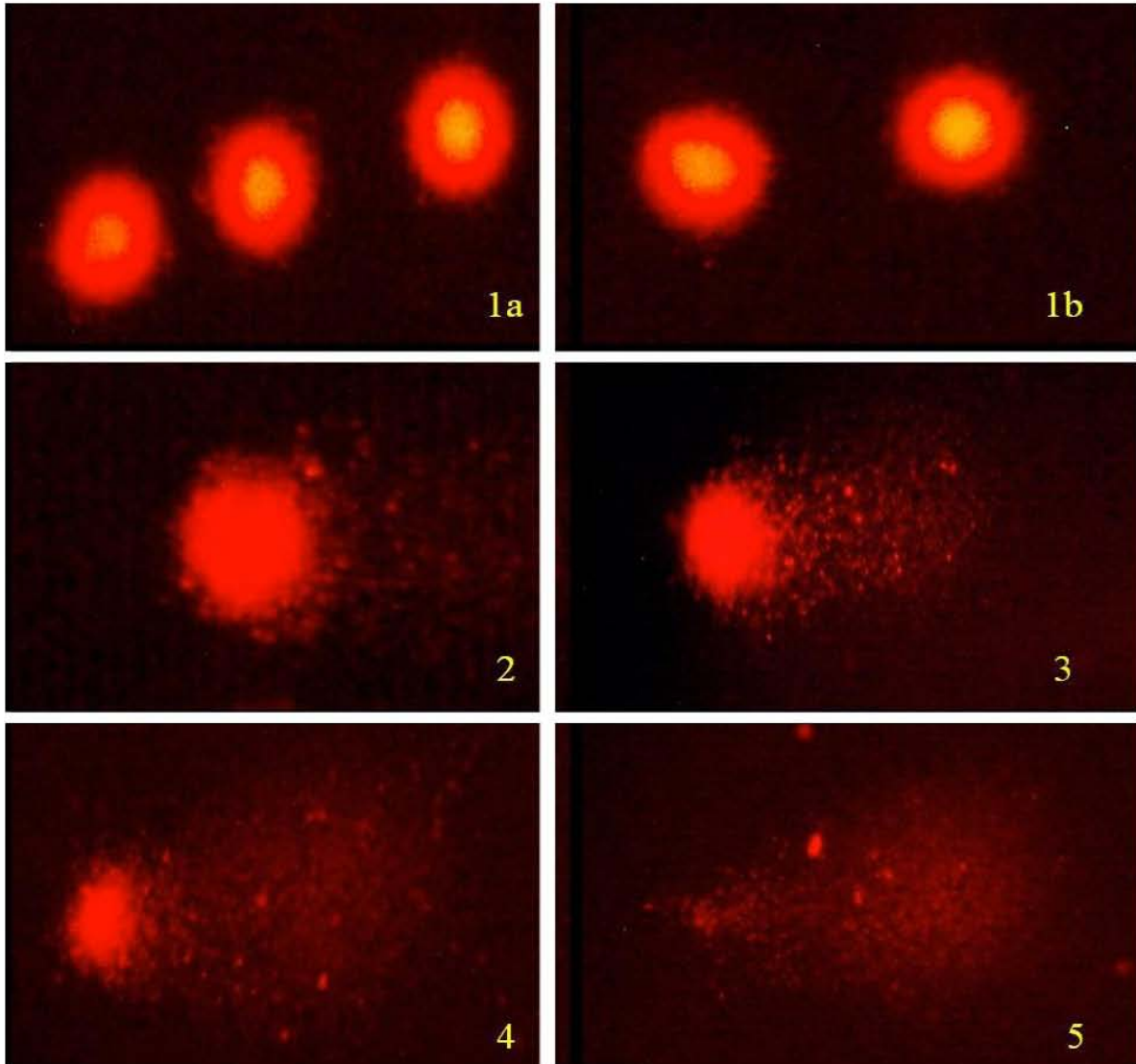


Figura 4. Fotomicrografías representativas de los tipos de células observadas en las muestras analizadas. 1a y 1b: células sin daño; 2, 3 y 4: células con daño bajo, medio y alto respectivamente; 5: daño total o nube

Tabla 1. Promedio de la migración del ADN (μm) de leucocitos de ratones tratados con V_2O_5 o MnCl_2 por 4 semanas.

	Migración del ADN de las células dañadas (\pm DE)	Categorías de daño al ADN (%)				
		Sin daño	Bajo	Medio	Alto	Total
Testigo	18.88 \pm 0.56	96.09	0.72	0.45	1.81	0.00
V_2O_5						
24 h	19.99 \pm 1.11	83.33	0.28	1.56	14.55	0.25
1 s	18.48 \pm 1.73	82.86	0.00	0.49	15.24	1.39
2 s	20.85 \pm 1.62	65.30	3.74	10.58	19.47	0.88
3 s	19.65 \pm 0.41	58.08	8.64	6.72	23.03	3.53
4 s	19.62 \pm 1.34	43.84	0.00	2.40	49.27	4.48
MnCl_2						
24 h	21.61 \pm 0.68 *	60.72	10.56	6.93	20.28	1.50
1 s	19.32 \pm 0.48	50.00	15.23	6.29	25.50	2.97
2 s	21.31 \pm 0.62 *	66.56	05.41	1.27	22.73	4.01
3 s	25.70 \pm 0.15 *	32.69	27.56	8.97	27.81	2.95
4 s	24.83 \pm 0.90 *	35.87	18.36	7.06	16.61	22.0

D.E., Desviación estándar

* $P < 0.05$ (ANOVA) comparado con el grupo testigo.

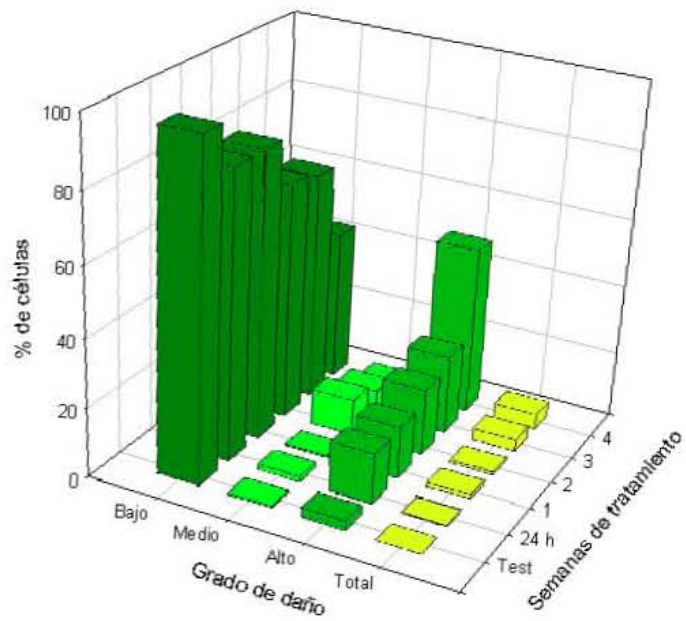


Figura 5. Efecto genotóxico del V₂O₅ en leucocitos de ratones tratados por 4 semanas. Porcentajes de células agrupadas por categorías de daño.

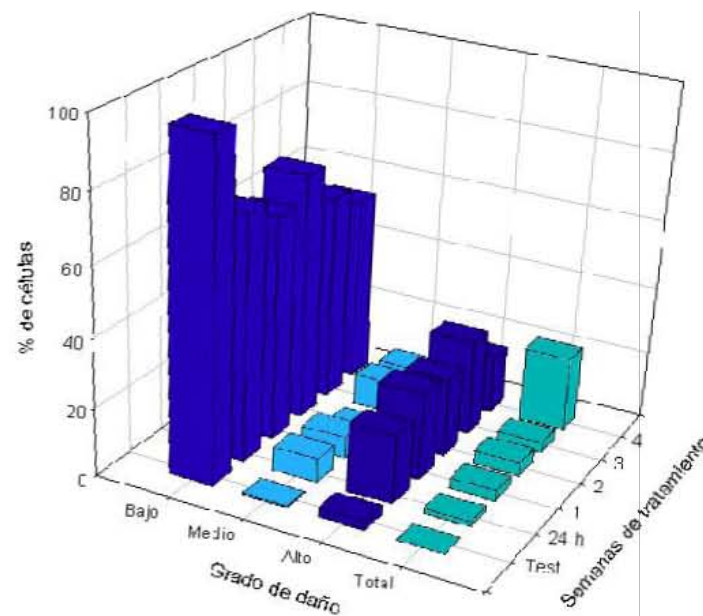


Figura 6. Efecto genotóxico del MnCl₂ en leucocitos de ratones tratados por 4 semanas. Porcentajes de células agrupadas por categorías de daño.

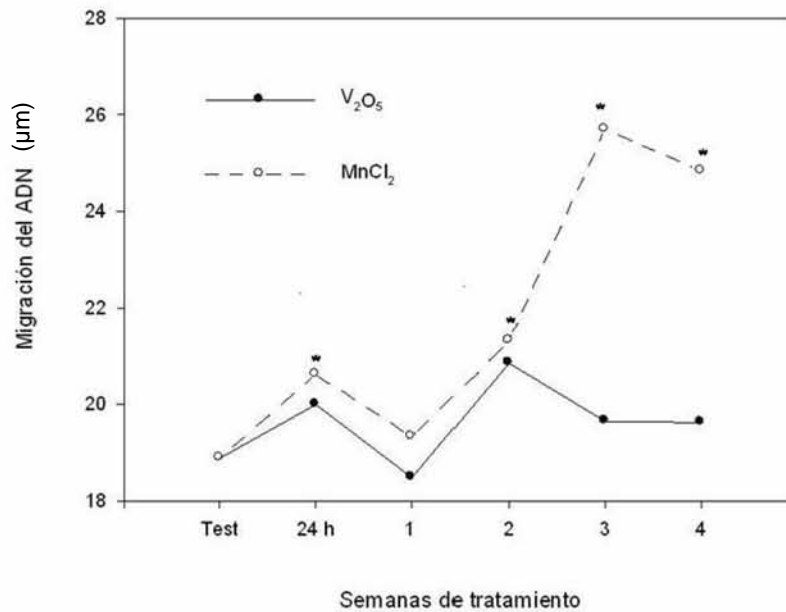


Figura 7. Comparación de la longitud en la migración del ADN de los leucocitos de ratones tratados por 4 semanas con V₂O₅ o MnCl₂ con respecto al grupo testigo (ANOVA p < 0.01).

Se realizó un análisis de varianza para identificar diferencias entre el porcentaje de células sin daño y de células dañadas (sólo se incluyeron las 3 categorías de daño, no se incluyeron nubes) entre los grupos de ratones tratados con V₂O₅ o MnCl₂ y el grupo testigo. Se encontró un aumento significativo en el porcentaje de células con daño en todos los tiempos de exposición y con ambos tratamientos. El porcentaje máximo de células con daño en el caso del tratamiento con pentóxido de vanadio fue en la cuarta semana de exposición y en el caso del cloruro manganeso, en la tercera. (Tabla 2 y Figura 8).

Tabla 2. Comparación de los porcentajes entre células con daño y células sin daño con los diferentes tratamientos y el grupo testigo.

		Tiempos de tratamiento				
		24 h	1 s	2 s	3 s	4 s
Testigo	Células con daño (%)	3.9	5.2	2.5	4.6	3.6
	Células sin daño (%)	96.1	94.8	97.5	95.4	96.4
V ₂ O ₅	Células con daño (%)	16.7 *	17.2 *	34.7 *	41.92 *	56.1 *
	Células sin daño (%)	83.3	82.8	65.3	58.1	43.84
MnCl ₂	Células con daño (%)	39.28*	50 *	33.4 *	67.31 *	64.1 *
	Células sin daño (%)	60.72	50	66.6	32.69	35.87

* p < 0.05 (ANOVA) comparado con el grupo testigo.

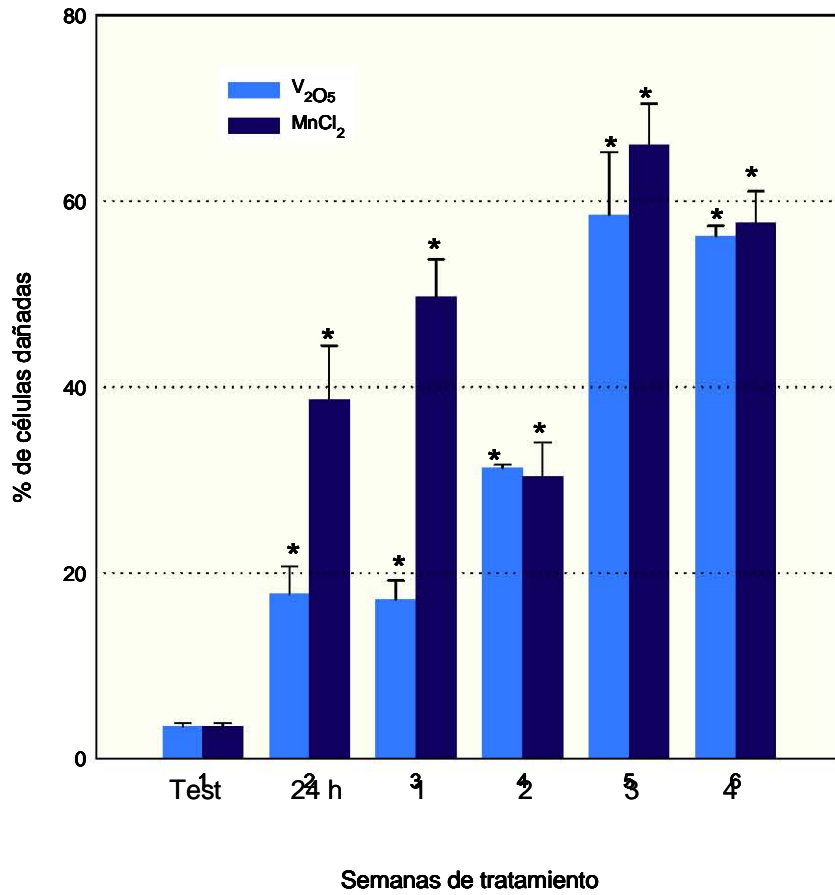


Figura 8. Comparación entre porcentajes de células dañadas de leucocitos de ratones tratados con V₂O₅ o MnCl₂ con respecto al grupo testigo. (ANOVA *p < 0.05).

8. Discusión

Se ha reportado que una gran variedad de metales pueden actuar como agentes mutagénicos y carcinogénicos en modelos humanos y animales (Leonard *et al* 2004a), muchos estudios se han enfocado en el mecanismo por el cual los metales inducen efectos adversos como es el caso de los efectos genotóxicos (Valko *et al* 2006), sin embargo en el caso del pentóxido de vanadio y del cloruro de manganeso los resultados en este último aspecto no son concluyentes (Opresko 1991, WHO 1999).

8. 1. Viabilidad celular

La viabilidad celular no se modificó por efecto de ambos tratamientos. En todos los animales tratados con pentóxido de vanadio o con cloruro de manganeso, la viabilidad celular fue mayor al 85 %, lo cual nos indicó que los compuestos, en este modelo no mostraron actividad citotóxica y por otro lado, nos permitió llevar a cabo la electroforesis unicelular alcalina, ya que es requerida una viabilidad mayor al 80% en las muestras para evitar resultados erróneos debidos a los rompimientos del ADN generados por la propia muerte de la célula (Tice *et al* 2000).

8.2. Genotoxicidad inducida por pentóxido de vanadio o por cloruro de managaneso.

El daño al ADN puede ser producido por una gran variedad de agentes, éstos pueden ser exógenos como los rayos ultravioleta, el humo del cigarro, las radiaciones gamma, los antibióticos y los contaminantes (Taylor 1994), y también por agentes endógenos como las especies reactivas de oxígeno (Lindahl y Wood 1999). Los tipos de daño son tan numerosos como los agentes que los causan. Un ejemplo de ello son los rompimientos de cadena sencilla que son frecuentemente el resultado del ataque a esta biomolécula por especies radicales libres (Lindahl y Wood 1999).

En este estudio se encontró que tanto el pentóxido de vanadio como el cloruro de manganeso fueron capaces de generar rompimientos de cadena sencilla en leucocitos de ratones expuestos a estos metales por vía inhalada. Los resultados encontrados con pentóxido de vanadio concuerdan con estudios previos que se han llevado a cabo con otros modelos y con otros compuestos de este metal (Roldán y Altamirano 1990, Cohen *et al* 1992, Migliore *et al* 1993, Rodríguez Mercado 1996, Rojas *et al* 1996, Altamirano-Lozano *et al* 1996, Altamirano *et al* 1999, Ivancsist *et al* 2002, Evangelou 2002, Rodríguez-Mercado *et al* 2003, Kleinsasser *et al* 2003). En el caso del cloruro de manganeso, aunque la información sobre su potencial genotóxico es escasa, los resultados observados en este estudio concuerdan con lo reportado por De Méo (1991) y por Malecki (2001).

Tanto el pentóxido de vanadio como el cloruro de manganeso cuando son inhalados, ingresan profundamente en las vías respiratorias, llegan a los sacos alveolares y posteriormente alcanzan el torrente sanguíneo (Rosales-Castillo *et al* 2001). En el caso del primer compuesto, en el plasma el V^{5+} es rápidamente reducido a V^{4+} , sin embargo ambos estados de oxidación existen debido a que el V^{4+} sufre oxidación espontánea a V^{5+} (Evangelou 2002, Mukherjee *et al* 2004). El vanadio tetravalente es transportado

por albúmina y transferrina, mientras que el vanadio pentavalente sólo por transferrina (Mukherjee *et al* 2004, Gandara *et al* 2005). En el caso del manganeso, una vez en la sangre, la ceruloplasmina puede oxidar al Mn^{2+} a Mn^{3+} (Aschner *et al* 2005). El 80 % del manganeso se une a las proteínas transportadoras albúmina y β -globulina, mientras que la forma trivalente se une preferencialmente a transferrina (Aschner *et al* 2005) y a transmanganina (Barceloux 1999), unidos a estas proteínas tanto el vanadio como el manganeso pueden alcanzar los órganos y tejidos (Rosales-Castillo *et al* 2001, Mukherjee *et al* 2004, Gandara *et al* 2005).

El vanadio entra a las células por canales iónicos inespecíficos, ambas formas de vanadio pueden entrar, sin embargo, el V^{5+} se absorbe cinco veces más que el V^{4+} (Rodríguez-Mercado *et al* 2003). Una vez dentro de la célula, el vanadio pentavalente es reducido nuevamente por antioxidantes enzimáticos (p.e. NADPH) y no enzimáticos (p.e. L-ácido ascórbico) (Valko *et al* 2006). Por la evidencia disponible, se considera que los efectos adversos que el vanadio ejerce sobre los sistemas biológicos tanto *in vivo* como *in vitro*, así como también por diferente vía de exposición, son debidos en gran medida a la inducción de estrés oxidativo: generación de especies reactivas de oxígeno y de radicales libres (Evangelou 2002). Este metal en diferentes estados de oxidación es capaz de interactuar con un gran número de componentes celulares, ejerciendo al mismo tiempo una gran variedad de efectos biológicos: lipoperoxidación de las membranas, desnaturalización y oxidación de proteínas y daño al ADN tal como oxidación de bases, rompimientos de cadena sencilla y doble, entrecruzamientos ADN-proteínas, entre otros (Leopardi *et al* 2005, Attia *et al* 2005, Ávila-Costa *et al* 2005). En este sentido, datos sobre el potencial mutagénico de este metal, muestran que el vanadoceno (Evangelou 2002) y el vanadio tetra y pentavalente son capaces de reaccionar con el grupo fosfato y con el azúcar de los nucleótidos, por otro lado, son efectivos inhibidores de proteínas propias del metabolismo del ADN como las polimerasas y ribonucleasas (Rodríguez-Mercado *et al* 2003).

Por otro lado, el manganeso divalente (Aschner *et al* 2005) entra a las células vía receptor TfR- transportador DMT1 o sólo por el transportador DMT1 del que es un eficaz competidor con el Fe (Roth y Garrick 2003). Una vez dentro, es oxidado a la forma trivalente (Aschner *et al* 2005). El manganeso en condiciones normales puede existir dentro de la célula como catión divalente y trivalente; la evidencia sugiere que cuando su concentración excede los niveles fisiológicos, puede causar efectos indeseables como la inhibición de la producción de energía celular y la generación de estrés oxidativo (Ali *et al* 1995, Keller *et al* 2005).

El manganeso intracelular, se concentra específicamente en la mitocondria (HaMai *et al* 2001, Chen *et al* 2001), en donde puede formar complejos con el ATP (Aschner *et al* 2005) e inducir el decremento de glutatión (GSH) comprometiendo de esta manera la mayor defensa de la célula contra los radicales libres (Sloot *et al* 1996). Se ha demostrado que en la mitocondria puede inhibir al complejo I de la cadena respiratoria, propiciando con ello el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Aschner *et al* 2005, Keller *et al* 2005), aunado al decremento en la producción de ATP y al incremento en la producción de lactato (Sloot *et al* 1996). En resumen, el manganeso puede propiciar el desacoplamiento entre los saltos energéticos para la formación de ATP en de la cadena respiratoria mitocondrial; bloquear este mismo proceso debido al aumento de calcio acumulado en el organelo, interferir con los mecanismos de defensa antioxidantes de la célula. Todo lo anterior facilita la hiperproducción de especies

reactivas de oxígeno y de radicales libres (Halliwell y Gutteridge 1984, Wei *et al* 1985, Erikson *et al* 2004).

8.2.1. Mecanismo común de genotoxicidad: Inducción de estrés oxidativo

La valencia del metal de transición, como en el caso del Fe y del Cu, ha sido establecida como un factor importante en la habilidad del metal para catalizar la formación de ERO's en reacciones de tipo Fenton. (HaMai *et al* 2001, HaMai y Bondy 2004):

El vanadio es un metal que se puede encontrar en varios estados de oxidación y puede participar en reacciones que conllevan a la producción de radicales libres y que pueden tener lugar dentro de la célula. (Valko *et al* 2006):

- 1) $V^{4+} + O_2 \rightarrow V^{5+} + O_2^{\cdot-}$ (Radical superóxido)
- 2) $V^{5+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow [V^{4+}-OO^{\cdot}]$ (Radical peroxovanadilo)
- 3) $V^{4+} + H_2O_2 \rightarrow V^{5+} + OH^- + \cdot OH$ (Radical hidroxilo)

En el caso del manganeso, la interacción entre el ión divalente y el trivalente de manganeso podrían conllevar a la formación de radicales libres como se observa en la siguiente cadena de reacciones (HaMai *et al* 2001, HaMai y Bondy 2004):

- 1) $Mn^{2+} + H_2O_2 \leftrightarrow [Mn^{2+}-OH \leftrightarrow Mn^{3+}-\cdot OH] \leftrightarrow Mn^{3+} + \cdot OH + OH^-$ (Radical hidroxilo)

Se considera que el Mn^{2+} no es capaz de producir ERO's por sí mismo (Aschner *et al* 2005) o que sólo es un modesto pro-oxidante (HaMai *et al* 2001). Sin embargo, la presencia traza del manganeso en su forma trivalente es suficiente para catalizar la formación de radicales libres (Erikson *et al* 2004, Aschner *et al* 2005) en interacción con el Mn^{2+} (HaMai y Bondy 2004). Aunado a lo anterior, el Mn en cualquier estado de oxidación puede espontáneamente convertirse en manganeso trivalente (Aschner *et al* 2005).

Las diferentes propiedades del Mn^{2+} y Mn^{3+} y su interacción durante los eventos oxidativos pueden ser particularmente relevantes en el contexto de los sistemas biológicos; mientras que el estado divalente es la forma más estable del manganeso, la forma trivalente es el estado predominante en muchos tejidos biológicos (HaMai *et al* 2001).

Ambos metales son capaces de producir diferentes radicales libres, entre ellos el altamente reactivo radical hidroxilo.

Por otro lado, es importante mencionar que el pentóxido de vanadio demostró ser un compuesto capaz de generar peroxidación lipídica en tejido hepático en este modelo (Acevedo- Nava 2005).

8.2.2. Radicales libres y daño al ADN

Dentro del espectro de alteraciones que puede sufrir el ADN por acción de los RL se describe la oxidación de desoxirribosas, ruptura y entrecruzamientos de cadenas y la modificación de bases nitrogenadas, principalmente (Chihuailaif *et al* 2002). Los

rompimientos de cadena doble o sencilla que se generan por la interacción de radicales libres con el ADN, son producidos por la fragmentación del esqueleto de la desoxirribosa o indirectamente por la escisión de bases oxidadas (Mitra *et al* 2002).

La generación de radicales hidroxilo que son altamente tóxicos pueden a su vez disparar nuevas reacciones que generan más radicales, ocasionando lo que se conoce como reacción en cadena, perpetuando así la generación de estos (Evangelou 2002). El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es presumiblemente el más reactivo de los radicales, y puede ser *in vivo* el oxidante más importante de componentes celulares como es el caso del ADN, proteínas y lípidos (Mitra *et al* 2002). La incrementada producción de $\cdot\text{OH}$ puede conducir a que este radical reaccione con las bases nitrogenadas o con el esqueleto de la desoxirribosa del ADN y de esta manera producir daño a las bases o rompimientos de cadenas (Rodríguez-Mercado *et al* 2003). Se ha propuesto que los rompimientos producidos por el radical $\cdot\text{OH}$ en esta biomolécula son debidos a la accesibilidad de los átomos de hidrógeno del esqueleto del ADN. Este radical es conocido por reaccionar con todos los componentes de la molécula del ADN, dañando tanto bases púricas como pirimídicas y también al esqueleto del azúcar desoxirribosa (Valko *et al* 2006). Otro radical considerado como importante es el superóxido, que también puede oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Slupphaug *et al* 2003). En el caso de la oxidación a nivel del azúcar desoxirribosa, la abstracción de uno de los hidrógenos del azúcar puede iniciar el proceso de la ruptura oxidativa (Lorente 2005) (Figura 9). La oxidación de bases nitrogenadas ocurre preferentemente a nivel de la guanina fundamentalmente por ser la base nucleica de menor potencial de oxidación (Lorente 2005) (Figura 9).

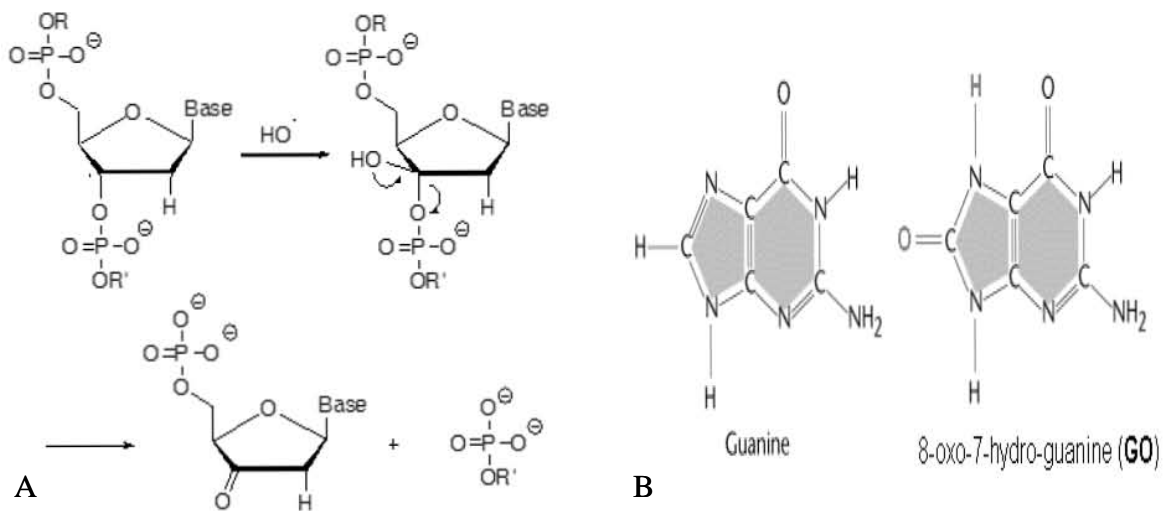


Figura 9. **A:** Rompimiento de la cadena de ADN por la interacción del radical hidroxilo con el esqueleto del azúcar desoxirribosa. **B:** Oxidación de las bases nitrogenadas (p.e. Guanina).

Se han identificado más de 20 diferentes tipos de daño a las bases del ADN por estrés oxidativo. El más común es a la purina 7, 8-dihidro-8-oxoguanina, comúnmente llamada 8-oxoguanina u 8-oxoG. Mientras que el daño más común a las pirimidinas es la formación de timina glicol (Tg) (Slupphaug *et al* 2003).

Por otro lado, Kehrer (1993) reporta los cambios que pueden desencadenar los RL en su acción sobre las proteínas al describir los efectos sobre el gradiente de iones de Ca^{2+} . El contenido intracelular de este ión es habitualmente diez mil veces menor en

comparación con concentración extracelular, y cualquier perturbación que afecte su transporte altera significativamente la función celular. La enzima calcio ATPasa, encargada de mantener el gradiente de iones Ca^{2+} , contiene grupos tioles que pueden ser inactivados por los RL. Cuando ello ocurre, la enzima pierde su actividad catalítica y se modifica la homeostasis del Ca^{2+} . El incremento en la concentración intracelular de estos iones estimula la activación de proteasas, que atacan al citoesqueleto y de nucleasas que fragmentan al ADN.

En general, el daño al ADN producido por estrés oxidativo comprende oxidación y modificación de bases nitrogenadas y grupos azúcares, entrecruzamientos y también rompimientos de cadena sencilla y doble (Slupphaug *et al* 2003; Valko *et al* 2006). Cualquier agente que reaccione con el ADN es potencialmente peligroso (Halliwell *et al* 1984); el daño al ADN puede resultar en arresto mitótico, inducción de la transcripción de genes, errores en la replicación e inestabilidad genómica, todo esto implicado en procesos carcinogénicos (Valko *et al* 2006).

9. Conclusiones

- Tanto el pentóxido de vanadio como el cloruro de manganeso por vía inhalada fueron capaces de inducir rompimientos de cadena sencilla en leucocitos de ratones tratados con estos compuestos, esto es, mostraron ser compuestos genotóxicos en este modelo.
- El cloruro de manganeso produce un aumento más rápido de células con daño alto desde las primeras 24 h de tratamiento, comparado con el vanadio en donde se observa un incremento paulatino de las células con daño alto hasta el final del tratamiento. En este sentido, se considera que la capacidad de este metal para desacoplar la cadena de transporte de electrones en la mitocondria provoca una producción acelerada de radicales libres, no así en el caso del vanadio.
- El cloruro de manganeso produjo una mayor proporción de células con daño total, aunado a un aumento significativo en la longitud de la migración del ADN de las células dañadas, lo que podría hablarnos de que el MnCl_2 es un compuesto más agresivo o que produce mayor cantidad de radicales libres que el V_2O_5 .
- Ambos metales de transición parecen tener mecanismos de acción muy parecidos: generación de radicales libres vía reacción de tipo Fenton, y en el caso de Mn también por interferir con la fosforilación oxidativa.
- Debido a las características topográficas y meteorológicas de la ciudad de México, los contaminantes ambientales cobran cada vez mayor importancia como agentes que deterioran la salud humana. Este trabajo contribuye al conocimiento actual sobre el potencial genotóxico de estos dos metales de transición que se encuentran como componentes importantes de las partículas suspendidas, uno de los dos contaminantes más importantes de esta ciudad.

9.1 Perspectivas

1. Identificar el mecanismo de acción (SAL o SRR) por el cual el pentóxido de vanadio o el cloruro de manganeso producen rompimientos de cadena sencilla en este modelo.
2. Identificar si el pentóxido de vanadio o el cloruro de manganeso son capaces de producir efectos genotóxicos en otros tipos celulares de ratones expuestos al esquema de inhalación empleado en este trabajo.
3. Determinar la generación de radicales libres producidos por la exposición a pentóxido de vanadio o el cloruro de manganeso.
4. Con el esquema de inhalación de metales estudiar el efecto de la mezcla de estos dos compuestos sobre las células de los ratones expuestos.

10. Referencias

- Ali SF, Duhart HM, Newport GD, Lipe GW, Slikker W. Manganese-Induced reactive Oxygen Species: Comparison Between Mn²⁺ and Mn³⁺. *Neurodegeneration*. 1995; 4: 329-334.
- Acevedo-Nava, S. La participación de la peroxidación lipídica en el daño hepático por la inhalación de vanadio. 2005. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Altamirano- Lozano M, Alvarez BL, Roldán RE. Cytogenic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Medical Science Research*. 1993; 21: 711-713.
- Altamirano-Lozano M, Alvarez-Barrera L, Basurto-Alcántara, Valverde M, Rojas E. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. 1996; 16:7-17.
- Altamirano-Lozano M, Valverde M, Alvarez BL, Molina B, Rojas E. genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in Male Mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 1999; 19: 243-255.
- Aschner M, Erikson KM, Dorman DC. Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. 2005; 35: 1-32.
- ATSDR. Toxicological Profiles of Manganese. 1992.
- Attia SM, Badary OA, Hamada FM, Hrab'e de Angelis M, Adler ID. Orthovanadate increased the frequency of aneuploid mouse sperm without micronucleus induction in mouse bone marrow erythrocytes at the same dose level. *Mutation Research*. 2005; 583: 158–167.
- Aust AE, Ball JC, Hu AA, Lighty JS, Smith KR, Straccia AM, Veranth JM, Young WC. Particle characteristics responsables for effects on human lung ephitelial cells. *Res. Rep. Health. Eff. Inst.* 2002; 110: 1-65.
- Ávila-Costa MR, Colín BL, Zepeda RA, Antuna BS, Saldivar L, Espejel MG, Mussali GP, Ávila CMC, Reyes OA, Anaya MV, Fortoul TI. Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation. A mice experimental model. *Neuroscience Letters*. 2005; 381: 21-25.
- Ávila-Costa MR, Montiel FE, Colín BL, Ordoñez JL, Gutiérrez AL, Niño CHG, Mussali GP, Fortoul TI. Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an inmunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical Research*. 2004; 29: 1365-1369.

- Barceloux DG. Manganese. *Clinical Toxicology*. 1999; 37(2): 293-307.
- Barceloux DG. Vanadium. *Clinical Toxicology*. 1999; 37(2): 265-278.
- Barrera-Ferrer SM, Villalobos-Cabrera HD. Genotoxic effects of vanadyl sulphate in *Drosophila melanogaster*. *Investigation Clinical*. 1998; 39: 123-137.
- Brenneman KA, Wong BA, Buccellato MA, Costa ER, Gross EA, Dorman DC. Direct olfactory transport of inhaled manganese (MnCl₂) to the rat brain: toxicokinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000; 169: 238-248.
- Casto BC, Meyers J, DiPaulo JA. Enhancement of viral transformation for evaluation of the carcinogenic or mutagenic potential of inorganic metal salts. *Cancer Research*. 1979; 39: 193-198.
- Chen JY, Tsao GC, Zhao Q, Zheng W. Differential cytotoxicity of Mn (II) y Mn (III): special reference to mitochondrial Fe-S containing enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2001; 175: 160-168.
- Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Méx.* 2002; 33: 265-283.
- Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH, Cho MH. Comparative study of PM_{2.5}- and PM₁₀-induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *Journal of Veterinary Science*. 2004; 5: 11-18.
- Ciranni R, Antonetti M, Migliore L. Vanadium salts induce cytogenetic effects in vivo treated mice. *Mutation Research*. 1995; 343: 53-60.
- Cohen MD, Klein CB, Costa M. Forward mutations and DNA-protein crosslinks induced by ammonium metavanadate in cultured mammalian cells. *Mutation Research*. 1992; 269: 141-148.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*. 2004; 26: 249-261.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanism, mutation and disease. *The FASEB Journal*. 2003; 17: 1995- 1214.
- Crans DC, Smeets JJ, Gaidamauskas E, Yang L. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem. Rev.* 2004; 104: 849-902.
- De Méo M, Laget M, Castegnaro M, Dumenil G. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mutation Research*. 1991; 260: 295-306.

- Dikshith TS, Chandra SV. Cytological studies in albino rats after oral administration of manganese chloride. *Bulletin of environmental contamination and Toxicology*. 1978; 19: 741-746.
- Dill JA, Lee KM, Mellinger KH, Bates DJ, Burka LT, Roycroft JH. Lung deposition and clearance of inhaled vanadium pentoxide in chronically exposed F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicological Sciences*. 2004; 77: 6-18.
- Dorman DC, Struve MF, Arden J, McManus BE, Marshall MW, Wong BA. Influence of dietary manganese phosphate in male sprague dawley rats following subacute (14-day) exposure. *Toxicological Sciences*. 2001; 60: 242-251.
- Dorman DC, Struve MF, Arden JR, Marshall WM, Parkinson CU, Wong BA. Influence of particle solubility on the delivery of inhaled manganese to the rat brain: manganese sulfate and manganese tetroxide pharmacokinetics following repeated (14-day) exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2001; 170: 79-87.
- Englert N. Fine particles and human health- a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters*. 2004; 149: 235-242.
- Erikson KM, Dobson AW, Dorman DC, Aschner M. Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. *Science of the Total Environment*. 2004; 334-335: 409-416.
- Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002; 42: 249-265.
- Fatima SK, Prabhavathi A, Reddy PP. Analysis of chromosomal aberrations in men occupationally exposed to cement dust. *Mutation Research*. 2001; 490: 179-186.
- Fernandez A, Wendt JOL, Wolski N, Hein KRG, Wang S, Witten ML. Inhalation health effects of fine particles from the co-combustion of coal and refuse derived fuel. *Chemosphere*. 2003; 51: 1129-1137.
- Flores RJ. Contaminación Atmosférica. En: Toxicología Ambiental. Lilia A. Albert (ed). 2004. México: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- Fortoul TI, Quan-Torres A, Sánchez I, López IE, Bizarro P, Mendoza ML, Saldívar L, Espejel-Maya G, Ávila-Casado MC, Ávila-Costa MR, Colín BL, Navarro VD, Olaiz-Fernández G. Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Archives of Environmental Health*. 2002; 57: 446-449.
- Gándara RMC, Soares SS, Martins H, Gutiérrez MC, Aureliano M. Vanadate oligomers: In vivo effects in hepatic vanadium accumulation and stress markers. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2005; 99: 1238-1244.

- Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic Effects of oil fly ash. *Environmental Health Perspectives*. 2002; 110: 89-94.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal*. 1984; 21: 1-14.
- HaMai D, Campbell A, Bondy SC. Modulation of oxidative events by multivalent manganese complexes in brain tissue. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001; 31: 763-768.
- HaMai D, Bondy SC. Pro-or-anti-oxidant manganese: a suggested mechanism for reconciliation. *Neurochemistry International*. 2004; 44: 223-229.
- Herrera NP, Quintal JMC, Escalante DP. Prevalencia de intercambio de cromátides hermanas en una población libre de exposición a agentes clastogénicos. *Rev Biomed*. 1999; 10: 71-76.
- Hu H. Human health and heavy metals exposure. En: *Life Support: The Environment and Human Health*. Michael McCally (ed). 2002. MIT press.
- Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Schaffer A, Rüdiger W. Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutation Research*. 2002; 519: 25-35.
- Joardar M, Sharma A. Comparison of clastogenicity of inorganic Mn administered in cationic and anionic forms in vivo. *Mutation Research*. 1990; 240: 159-163.
- Katsouyanni K. Ambient air pollution and health. *British Medical Bulletin*. 2003; 68: 143-156.
- Keller J, Owens CT, Lai JCK, Devaud LL. The effects of 17 β -estradiol and ethanol on zinc- or manganese-induced toxicity in SK-N-SH cells. *Neurochemistry International*. 2005; 46: 293-303.
- Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993; 23: 21-48.
- Kleinsasser NH, Dirschedl P, Staudenmaier R, Harréus UA, Wallner BC. Genotoxic effects of vanadium pentoxide on human peripheral lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract. *International Journal of Environmental Health Research*. 2003; 13: 373-379.
- Léonard A, Gerber GB. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutation Research*. 1994; 317: 81-88.
- Leonard SS, Bower JJ, Shi Xianglin. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004a; 255: 3-10.

- Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004b; 37: 1921-1942.
- Leopardi P, Villani P, Cordelli E, Siniscalchi E, Veschetti E, Crebelli R. Assessment of the in vivo genotoxicity of vanadate: Analysis of micronuclei and DNA damage induced in mice by oral exposure. *Toxicology Letters*. 2005;158: 39-49.
- Lindahl T, Wood RD. *Science*. 1999; 286: 76-82.
- Lorente, PA. Universidad de Alcalá, Departamento de Química Orgánica. 2005. <http://ww2.uah.es>
- Malecki EA. Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons. *Brain Research Bulletin*. 2001; 55 (2): 225-228.
- Mandzgaladze RN, Vasakidze MI. The effect of the small doses of manganese compounds, nitrogenous organomercury pesticides and some anticouglulants on chromosome rearrangement in white rat bone marrow cells. *Vopr. Gig. Tr. Proffpatol*. 1966; 10: 209-212.
- Mandzgaladze RN. On the mutagenic properties of manganese compounds. *Vopr. Gig. Tr. Proffpatol*. 1966; 10: 225-226.
- Manhanan SE. Toxicological Chemistry and Biochemistry, USA, Lewis Publishers. 2002. 448 pp.
- Marconi A. Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma. *Ann. Ist. Super Sanità*. 2003; 39: 329-342.
- Martínez-Cayuela M. Toxicidad de Xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*. 1998; 39: 5-18.
- Migliore L, Bocciardi R, Macrí C, Lo Jacono F. Cytogenic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*. 1993; 319: 205-213.
- Mitra S, Izumi T, Boldolgh I, Bhadak KK, Hill JW, Hazra TK. Choreography of oxidative damage and repair in mammalian genomes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002; 33: 15-28.
- Molina MJ, Molina LT. Megacities and atmospheric pollution. *Air and Waste Manage Association*. 2004; 54: 644-680.
- Moller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*. 2005; 96:1-42.

- Morinville A, Maysinger D, Shaver A. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. *TIPS*. 1998; 19: 452-460.
- Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. Vanadium- an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*. 2004; 150: 135-143.
- National Toxicology Program (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of manganese (II) sulfate monohydrate in F344/N rats and B6C3F mice. Research Triangle Park, NC, US Department of Health and Human Services. 1993.
- Oberly TJ, Piper CE, McDonald DS. Mutagenicity of metals salts in the L5178Y mouse lymphoma assay. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1982; 9: 367- 376.
- Olive PL, Durand RE, Banáth JP, Johnston PJ. Analysis of DNA Damage in Individual Cells. *Methods in Cell Biology*. 2001; 64: 235- 249.
- Opresko DM. Toxicity Summary for Vanadium and Vanadium compounds. Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program. 1991.
- Owusu-Yaw J, Cohen MD, Fernando SY, Wei CI. An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicology Letters*. 1990; 50:327-336.
- Ress NB, Chou BJ, Renne RA, Dill JA, Miller RA, Roycroft JH, Hailey JR, Haseman JK, Bucher JR. Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N Rats and B6C3F Mice. *Toxicological Sciences*. 2003; 74: 287-296.
- Riveros-Rosas H, Pfeifer GD, Lynam DR, Pedroza JL, Sánchez AJ, Canales O, Garfias J. Personal exposure to elements in Mexico City air. *The Science of the Total Environment*. 1997; 198: 79-96
- Rodríguez-Mercado JJ, Roldán-Reyes E, Altamirano-Lozano M. Genotoxic effects of vanadium(IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology Letters*. 2003; 144: 359-369.
- Rojas E, Valverde M, Herrera LA, Altamirano-Lozano M, Ostrosky-Wegman P. Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutation Research*. 1996; 359: 77-84.
- Rojas E, Valverde M, López MC, Naufal I, Sánchez I, Bizarro P *et al*. Evaluation of DNA in exfoliated tear Duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*. 2000; 468: 11-17.

- Roldán RE, Altamirano LM. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 1990; 245: 61-65.
- Rosales-Castillo JA, Torres-Meza VM, Olaiz-Fernández G, Borja-Aburto H. Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud Pública de México*. 2001; 43: 544-555.
- Roth JA, Garrick MD. Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochemical Pharmacology*. 2003; 66: 1-13.
- SCF. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of manganese. 2000.
- SCF. Opinion of the Scientific Panel of Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Vanadium. Request no. EFSA-Q- 2003- 018. *The EFSA Journal*. 2004; 33: 1-22.
- Shahan J, Kaufman Z, Gurvich R, Levi Z. Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers to pesticides. *Mutation Research*. 2001; 491: 71-80.
- Singh I. Induction of gene conversion and reverse mutation by manganese sulphate and nickel sulphate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*. 1984; 137: 47-49.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988; 175: 184-191.
- Sloom WN, Korf J, Koster JF, Wit LEA, Gramsbergens JBP. Manganese-Induced hydroxyl radical formation in rat striatum is not attenuated by dopamine depletion or iron chelation in vivo. *Experimental Neurology*. 1996; 138: 236-245.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research*. 2003; 531: 231-251.
- Sorensen M, Schins RPF, Hertel O, Loft S. Transition metals in personal samples of PM2.5 and oxidative stress in human volunteers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2005; 14: 1340-1343.
- Sorsa M, Pyy L, Salomaa S, Nylund L, Yager JW. Biological and environmental monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide in industry and hospitals. *Mutation Research*. 1988; 204: 465-479.

- Stern A, Yin X, Tsang SS, Davidson A, Moon J. Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogene expression. *Biochem. Cell. Biol.* 1993; 71: 103-112.
- Strauss GHS. Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocytes tests (BLT). I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation Research.* 1991; 252: 1-15.
- Taylor JS. Unraveling the molecular pathway from sunlight to skin cancer. *Acc. Chem. Res.* 1994; 27: 76-82.
- Thompson KH. Vanadium and diabetes. *Biofactors.* 1999; 10: 43-51.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC and Sasaki YF. Single cell gel comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2000; 35:206-221.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 2006; 160: 1-40.
- Vallejo M, Jáuregui-Renaud K, Hermosillo AG, Márquez MF, Cárdenas M. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica Mexicana.* 2003; 139: 57- 63.
- Vitarella D, Wong BA, Moss OR, Dorman DC. Pharmacokinetics of inhaled manganese phosphate in male sprague-dawley rats following subacute (14-day) exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2000; 163: 279-285.
- Vrhovac VG, Zeljezic D. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutation Research.* 1995; 343: 201-207.
- Wei EP, Christman CW, Kontosw HA, Povlishock JT. Effects of oxygen radicals on cerebral arterioles. *Am. J. Physiol.* 1985; 248: 157-162
- Woolf A, Wright R, Amarasiriwardena C, Bellinger D. A Child with chronic manganese exposure from drinking water. *Environmental Health Perspectives.* 2002; 110: 1-4.
- World Health Organization (WHO). Manganese and its compounds. Concise International Chemical Assessment Document 12. 1999.
- World Health Organization (WHO). International Program on Chemical Safety. Concise international chemical assessment document. Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds. 2001.

- World Health Organization (WHO). Manganese and its compounds: environmental aspects. Concise International Chemical Assessment Document 63. 2004.
- Zhong BZ, Gu ZW, Wallace WE, Whong WZ, Ong T. Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research*. 1994; 321: 35-42.