



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Facultad de Medicina**

COMPARACIÓN POR GÉNERO Y POR EDAD DE LOS  
EFECTOS GENOTÓXICOS PRODUCIDOS POR LA  
INHALACIÓN DE PENTÓXIDO DE VANADIO, CLOURURO DE  
MANGANESO Y SU MEZCLA.

# **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**BIOL. MARCELA ROJAS LEMUS**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER  
GOES

MÉXICO D.F.

MARZO, 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de enero de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **ROJAS LEMUS MARCELA** con número de cuenta **98201730** con la tesis titulada "**COMPARACIÓN POR GÉNERO Y POR EDAD DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS PRODUCIDOS POR LA INHALACIÓN DE PENTÓXIDO DE VANADIO, CLORURO DE MANGANESO Y SU MEZCLA**", realizada bajo la dirección de la **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**:

Presidente: DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE  
Vocal: DRA. LAURA COLÍN BARENQUE  
Secretario: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES  
Suplente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO  
Suplente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 6 de marzo de 2009.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

... No me acostumbro a perder  
pero juego por placer  
y es el juego el que  
me da la vida...  
MB

*Dedicada a:*

*Sam*

*Milla*

*Ñaki*

*Christian*

*... porque son muy importantes en mi vida*

## Agradecimientos

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- Al apoyo recibido de:
  - CONACYT (Núm. de Becario 207165)
  - PAPIIT-DGAPA 2006-06
- A los miembros del Comité Tutorial:
  - Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
  - Dra. Laura Colín Barenque
  - Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
  - Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
  - Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
- Al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.
  - Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
- Al Laboratorio de Técnica Histológica del Departamento de Biología Celular y Tisular.
  - Téc. Acad. Verónica Rodríguez Mata
  - Téc. Acad. Judith Reyes Ruíz
- A la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM:
  - M.V.Z. Enrique Pinzón Estrada, Jefe de la Unidad
  - M.V.Z. Ismael Torres Saldaña
  - M.V.Z. Víctor Manuel Salgado Alfaro
- A la Unidad de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología Celular y Tisular:
  - M. en C. Patricia Bizarro Nevares
  - Biol. Armando Zepeda Rodríguez
  - Téc. Acad. Francisco Pasos Nájera

---

## Agradecimientos Especiales

### A mí Familia

#### Papá y Mamá:

Gracias por enseñarme lo más valioso que poseo: a ser yo misma y a luchar, sin miedo, hasta alcanzar mis sueños... ¿Cómo podría agradecerles todos y cada uno de los días que hemos pasado juntos...?

¡¡Terminamos un paso más...!!

Mi más profundo agradecimiento y amor...

#### Samuel

Porque somos espejo uno del otro... lo que veo en tus ojos, es lo que hay en mi corazón...

Te agradezco el tiempo en el que te has compartido, contigo he aprendido a aprender y a vivir... [..el tiempo pasa y no de largo... porque en un mundo que va a la velocidad de un rayo, aguanto el vuelo más si me agarro de tu mano y acompáñame hasta donde pueda llegar... en este mundo que va como la luz del pensamiento el mérito está en no quedarme en el intento...]

Entre tus brazos encuentro todo lo que me hace feliz...

Te Amo, Sam...

#### Adrián y Carmen

Desde que recuerdo, han estado conmigo... particularmente en la vida académica, apoyándome, escuchándome y compartiendo conmigo su experiencia... Gracias por su ayuda y su paciencia... espero que en esta segunda ocasión, estén felices con su trabajo y se sientan orgullosos de mí...

#### Olga

Hay muchas cosas que no se aprenden en la escuela, tal vez la mayoría... Gracias por mostrarme e invitarme a un mundo nuevo en el que difícilmente hubiese incursionado, gracias por las tardes y las noches de regaños y de reflexión...

#### Gabito y Michellita

Me faltan dedos de la mano para contar los años que hemos sido amigas... También me hacen falta palabras para agradecerles su compañía, su apoyo y sobre todo su cariño... ¡Muchas gracias, Manís, por estar conmigo!

#### A Mayrén

Y aunque estabas lejos, siempre estuviste aquí... Gracias por ser tú y por compartir conmigo desde hace tanto tiempo todos los andares de la vida, que ha sido grata e ilustrativa gracias a tu compañía...

[...Y sí hay que hacerlo todo por segunda vez...] Lo haría de nuevo, sin dudar...

## A mis maestros

### Tere

Por todo el apoyo que me has brindado, por lo que he aprendido de tí y bajo tu tutela, porque en el laboratorio de BCYT terminé mi formación y crecieron mis expectativas y porque ha sido mi segundo hogar durante seis años... ¡¡Gracias TERE!!

### Patito, Laurís y Armando

Durante muchos años han sido mis maestros... Gracias por su apoyo, por su amistad y sobre todo por la gran dotación de paciencia que siempre han tenido hacia mí.

### Dr. Abad

Mí querido titular... Gracias por todo lo que me ha enseñado, por los ratos agradables de charla y por compartir conmigo su experiencia y a sus pollos del grupo 1119.

### Dr. Castell y Miguel

Por su apoyo y sobre todo por su amistad durante el tiempo que he formado parte del Departamento... ¡Gracias!

## A mis compañeros y amigos

### Judith, Vero, Adriana y Patty

Por los ratos de esparcimiento, por las enseñanzas técnicas, por los consejos y por nuestra amistad que ha crecido a lo largo de las épocas...

### Celsius

Por tu amistad y tu cariño... ¡Gracias!

### Carmen De Gante

Que el camino de la ciencia sea tan grato para tí como lo es la salida del sol cada mañana o la brisa marina en una tarde de playa...

### Sofi-O, Carlos, Nelly, Gumaro y Jesús

¡¡Un día terminará la toma de muestras...!! Disfrútenlo, porque después se extraña... ¡Ánimo, ahora síguen ustedes!

## A grandes personajes

### **Familia Lemus-Hernández**

¡Gracias Padrinos, por estar conmigo desde que llegué a este mundo! Por que sé que en ustedes siempre encontraré cariño y comprensión... ¡Los quiero mucho, mucho!

### **Familia Mora-Paz**

Por recibirme en su hogar y por todas las amabilidades que han tenido conmigo durante el tiempo que nos hemos conocido... ¡Gracias!

### **Christían-élago**

¡¡Hermano!!

¿Cómo olvidar nuestra estancia en la Facultad de Ciencias?... ¡¡Bueno, aunque quisiera olvidarla, no podría!! Por tí (y gracias a tu sabio razonamiento al respecto), aprendí todo lo que sé de Dinosaurios, Cactáceas y Fotografía... Lo único que quiero agregar es que... ¡espero que estemos también en las dedicatorias de nuestras tesis de doctorado!

### **Gabita**

Por tu compañía, por tu cariño y por compartir tantos momentos gratos e inolvidables conmigo... ¡¡¡Seguimos en el camino, Amiga...!!!

**Y a todos los ratones que hicieron posible esta tesis... ¡Gracias!**



# Índice

	Páginas
1. Resumen	1
2. Introducción	4
2.1. Contaminación atmosférica	4
2.1.1. Contaminación atmosférica en la Ciudad de México	4
2.1.2. Partículas suspendidas	6
2.1.3. Partículas suspendidas y sus efectos sobre la salud	7
2.1.4. Metales	8
2.1.4.1. Estrés oxidante	8
2.1.5. Vanadio	9
2.1.5.1. Generalidades	9
2.1.5.2. Fuentes de emisión	9
2.1.5.3. Niveles de vanadio en el ambiente	9
2.1.5.4. Usos	10
2.1.5.5. Vías de exposición	10
a) Vía oral	10
b) Vía inhalada	10
2.1.5.6. Toxicocinética	10
2.1.5.7. Toxicodinámica	12
2.1.5.8. Efectos en la salud	12
2.1.5.9. Efectos genotóxicos	12
a) <i>In vitro</i>	12
b) <i>In vivo</i>	14
2.1.5.10. Efectos hematológicos	14
2.1.6. Manganeso	15
2.1.6.1. Generalidades	15
2.1.6.2. Fuentes de emisión	15
2.1.6.5. Niveles de manganeso en el ambiente	15
2.1.6.3. Usos	15
2.1.6.4. Vías de exposición	16
a) Vía oral	16
b) Vía inhalada	16
2.1.6.6. Toxicocinética	17
2.1.6.7. Toxicodinámica	17
2.1.6.8. Efectos en la salud	18
2.1.6.9. Efectos genotóxicos	18
a) <i>In vitro</i>	18
b) <i>In vivo</i>	19
2.1.6.10. Efectos hematológicos	20
2.2. Mezclas de compuestos como contaminantes atmosféricos	20
2.3. El género y la madurez sexual: Implicaciones en la respuesta a xenobióticos	21
2.4. Antecedentes directos: hallazgos con el modelo de inhalación	24

2.5. Técnicas para la detección de genotoxicidad	25
2.5.1. Ensayo de micronúcleos	25
3. Justificación	29
4. Hipótesis	30
5. Objetivo general	31
5.1. Objetivos particulares	31
6. Método	32
6.1. Selección de grupos expuestos	32
6.2. Esquema de inhalación	32
6.3. Ensayo de micronúcleos	32
6.4. Análisis estadístico	34
7. Resultados	35
7. 1. Comparación entre el tiempo de exposición-recuperación y el tiempo cero	35
7.1.1. Pentóxido de Vanadio ( $V_2O_5$ )	35
a) Hembras prepúberes	35
b) Hembras adultas	35
c) Machos prepúberes	36
d) Machos adultos	37
7.1.2. Cloruro de manganeso ( $MnCl_2$ )	38
a) Hembras prepúberes	38
b) Hembras adultas	38
c) Machos prepúberes	39
d) Machos adultos	40
7.1.3. Mezcla: Pentóxido Vanadio y Cloruro de Manganeso ( $V_2O_5$ - $MnCl_2$ )	41
a) Hembras prepúberes	41
b) Hembras adultas	41
c) Machos prepúberes	42
d) Machos adultos	43
7.2. Comparación por edad: Prepúberes <i>vs</i> Adultos	44
7.2.1. Hembras	44
a) Pentóxido de Vanadio ( $V_2O_5$ )	44
b) Cloruro de Manganeso ( $MnCl_2$ )	46
c) Mezcla: Pentóxido de Vanadio y Cloruro de Manganeso ( $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ).	48
7.2.2. Machos	50
a) Pentóxido de Vanadio ( $V_2O_5$ )	50
b) Cloruro de Manganeso ( $MnCl_2$ )	52
c) Mezcla: Pentóxido de Vanadio y Cloruro de Manganeso ( $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ).	54
7.3. Comparación por género: Hembras <i>vs</i> Machos	56
7.3.1. Pentóxido de Vanadio ( $V_2O_5$ )	56
a) Prepúberes	56
b) Adultos	58
7.3.2. Cloruro de Manganeso ( $MnCl_2$ )	60
a) Prepúberes	60
b) Adultos	62

7.3.3. Mezcla: Pentóxido de Vanadio y Cloruro de Manganeseo ( $V_2O_5$ - $MnCl_2$ )	64
a) Prepúberes	64
b) Adultos	66
7.4. Comparación por grupos expuestos ( $V_2O_5$ vs $MnCl_2$ vs $V_2O_5$ - $MnCl_2$ )	68
7.4.1. Hembras prepúberes	68
7.4.2. Hembras adultas	70
7.4.3. Machos prepúberes	72
7.4.4. Machos adultos	74
7.5. Resumen de Resultados	76
8. Discusión	78
8.1. Irrigación de la médula ósea	78
8.2. Orígenes de los micronúcleos	78
8.3. ¿Cómo el vanadio y el manganeso pueden producir MNs?	79
8.3.1. Mecanismo común: estrés oxidante	80
8.3.1.1. Radicales libres y daño al ADN	81
8.3.1.2. Interacción con los mecanismos antioxidantes	83
8.3.2. Interacción con el aparato mitótico	83
8.4. ¿Por qué se observaron diferencias entre hembras y machos?	84
8.4.1. Diferencias <i>per se</i>	84
8.4.2. Diferencias hormonales: estrógenos	85
8.5. ¿Cómo el vanadio y el manganeso pueden causar la disminución del conteo reticulocitario?	86
8.6. ¿Por qué no se observaron diferencias significativas entre los grupos expuestos?	91
9. Conclusiones	92
9.1. Relación con los hallazgos anteriores con el modelo de inhalación	93
10. Consideraciones finales	93
11. Referencias	94

## Lista de Abreviaturas

<b>ACe</b>	Aberraciones Cromosómicas Estructurales
<b>ACn</b>	Aberraciones Cromosómicas Numéricas
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza
<b>AP-1</b>	Proteína Activadora-1
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>BFU-E</b>	Unidades Formadoras de Brotes Eritroides
<b>CBNC</b>	Células Bronquiales No Ciliadas
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tetracloruro de Carbono
<b>CFCs</b>	Clorofluorocarbonos
<b>CFU-E</b>	Unidades Formadoras de Colonias Eritroides
<b>CHO-K1</b>	Células de Ovario de Hámster Chino
<b>CO</b>	Monóxido de Carbono
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>DCTI</b>	Transportador de Cationes Divalentes
<b>DMT1</b>	Transportador de Cationes Metálicos Divalentes-1
<b>ENCs</b>	Eritrocitos Normocromáticos o Eritrocitos
<b>EPA</b>	Agencia de Protección al Ambiente
<b>EPC-MN</b>	Eritrocitos Policromáticos Micronucleados
<b>EPCs</b>	Eritrocitos Policromáticos o Reticulocitos
<b>EPO</b>	Eritropoyetina
<b>ERE</b>	Receptor de Estrógenos
<b>ERO</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>Fe</b>	Hierro
<b>GSH</b>	Glutathión Reducido
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrógeno
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido Sulfúrico
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HC</b>	Hidrocarburos
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Ácido Nítrico
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Presión
<b>Ht</b>	Hematocrito
<b>IARC</b>	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
<b>ICH</b>	Intercambio de Cromátidas Hermanas
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL-3</b>	Interleucina-3
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>IRP</b>	Proteína Reguladora de Hierro
<b>KMnO<sub>4</sub></b>	Permanganato de Potasio
<b>MAPK</b>	Proteína Kinasa Activada por Mitógenos
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Proteína Inflamatoria de Macrófagos
<b>Mn</b>	Manganeso
<b>MN</b>	Micronúcleo
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Manganeso
<b>MnO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Manganeso
<b>MO</b>	Médula Ósea
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramos

<b>μL</b>	Microlitros
<b>μm</b>	Micrómetros
<b>NADH</b>	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina
<b>NADHP</b>	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Fosfato
<b>NF-κB</b>	Factor Nuclear Kappa-B
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Nitrógeno
<b>NO<sub>x</sub></b>	Óxidos de Nitrógeno
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozono Troposférico
<b>PM<sub>0.1</sub></b>	Partículas Suspendidas con diámetro aerodinámico ≤0.1 μm
<b>PM<sub>10</sub></b>	Partículas suspendidas con diámetro aerodinámico ≤10 μm y mayor a 2.5μm
<b>PM<sub>2.5</sub></b>	Partículas Suspendidas con diámetro aerodinámico ≤2.5 μm
<b>POE</b>	Personal Ocupacionalmente Expuesto
<b>PS</b>	Partículas Suspendidas
<b>PST</b>	Partículas Suspendidas Totales
<b>RCS</b>	Rompimientos de Cadena Sencilla de ADN
<b>RL</b>	Radical Libre
<b>SO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Azufre
<b>TfR</b>	Receptor de Transferrina
<b>TGF-β</b>	Factor de Crecimiento Transformante-beta
<b>TNF-α</b>	Factor de Necrosis Tumoral-alfa
<b>TPO</b>	Trombopoyetina
<b>V</b>	Vanadio
<b>V<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	Pentóxido de Vanadio

## 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 las partículas suspendidas a las que se adosan metales de transición como el vanadio y el manganeso, de hecho, a los metales de transición que son contenidos y transportados en las partículas suspendidas, son a quienes se les atribuyen los efectos adversos sobre la salud.

Tanto el vanadio como el manganeso pueden existir en diversos estados de oxidación; en el caso del vanadio la pentavalente es la más tóxica y para el 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 y su mezcla en eritrocitos de ratones hembras y machos, tanto prepúberes como adultos, expuestos a estos metales por vía inhalada, ya que esta es la vía por la que mejor se absorben estos elementos (del 90 al 100% en ambos casos).

Para ello, se emplearon 16 grupos ratones (con 6 individuos cada uno) de la cepa CD1, de los cuales 8 fueron de hembras y 8 de machos. Para cada género, 4 fueron de animales prepúberes y 4 de adultos. De acuerdo al grupo al que pertenecían (expuestos o testigos), se les administró por nebulización pentóxido de vanadio (0.02 M), cloruro de manganeso (0.02 M), mezcla: vanadio-manganeso (0.02M) o agua desionizada. Los animales inhalaban durante una hora, dos veces a la semana por espacio de 4 semanas.

Se obtuvieron muestras de sangre entera de todos los animales antes de comenzar con el esquema de inhalación y posteriormente a las 24 h y cada 7 días (durante 30 días) después de iniciado el esquema. Se tomaron muestras de todos los grupos a los 30, 60 y 90 días de post-exposición. Las muestras obtenidas se procesaron para el ensayo de micronúcleos con laminillas cubiertas con naranja de acridina.

Los resultados mostraron: a) que el vanadio, el manganeso y su mezcla son compuestos genotóxicos debido a que fueron capaces de inducir aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos (MNs) presentes en los eritrocitos policromáticos de los ratones expuestos (excepto en hembras adultas), b) los machos son más susceptibles al daño genotóxico inducido por estos compuestos, c) tanto el vanadio como el manganeso solos o en combinación, indujeron decremento significativo en el número de eritrocitos policromáticos en todos los casos (hembras y machos; prepúberes y adultos), d) los efectos observados, tanto en la cantidad de micronúcleos como en el conteo reticulocitario, persisten por un largo espacio de tiempo (90 días de post-exposición).

Los MNs inducidos por la inhalación de vanadio y manganeso, solos o en combinación, podría explicarse a varios niveles: i) ambos metales causan estrés oxidante, lo cual se traduce en aumento importante en la presencia de moléculas altamente reactivas que son los radicales libres (RLs). Los RLs dañan importantes biomoléculas, como lo son el ADN (fraccionándolo) y las proteínas (interaccionando con sus grupos sulfidrilo y generando así, pérdida de función). El origen de los MNs está relacionado con los dos eventos antes mencionados: rompimientos cromosómicos e interacción con las proteínas

del huso mitótico durante la división celular. Por otro lado, las hembras adultas mostraron susceptibilidad menor al daño genotóxico, esto podría ser debido a la presencia sustancial en esa etapa (sexualmente maduras) de los estrógenos. A los estrógenos se les atribuyen propiedades antioxidantes (debidas a su estructura química, muy parecida a la de los antioxidantes polifenólicos) y antiinflamatorias (por la interacción de su receptor y los factores de transcripción involucrados en esas vías).

Ambos metales y en su combinación, produjeron decremento significativo en la proporción de eritrocitos policromáticos, lo cual, nos indica que tienen efectos adversos sobre la eritropoyesis de los organismos expuestos. Esto podría deberse a las interacciones que llevan a cabo estos metales con moléculas importantes en la producción de eritrocitos, tales como inhibición de cinasas y fosfatasas o la inhibición de la producción de eritropoyetina.

Este trabajo contribuye al mejor entendimiento de los mecanismos por los cuales los metales ejercen su toxicidad, aunado a la evidencia de que estos efectos persisten a lo largo del tiempo, no obstante, la exposición haya concluido.

## Abstract

Mexico City is considered one of the most polluted cities worldwide. Suspended particles are discharged into the atmosphere as a consequence of fuel combustion, and metals are adhered to its surface. Vanadium (V) and manganese (Mn) are attached to the smallest particles and travel through the air, entering to the respiratory tract reaching the systemic circulation. Both elements in nature are in diverse oxidative states, relating its oxidative state with its toxicity. Other factors associated with metal toxicity are age and gender.

In this study we decided to explore the modifications that hormonal state and metal mixture made in the genotoxic potential of these elements by inhalation in a mice model. Sixteen groups were structured, six individuals each, of CD-1; eight groups were for each gender; from each gender, four were pre-pubers and the remained four, adults. Mice inhaled V, Mn or V-Mn (0.02M) one hour twice a week during four weeks. A basal sample from the tail was obtained from each mouse before the inhalation protocol began; from that point samples were obtained at 24 h, and each week until the end of the 4 week inhalation. Afterwards, samples were obtained at 30, 60 and 90 days after the exposure ended. Samples were processed for micronuclei assay in slides covered with acridine orange.

Results showed that vanadium manganese and the mixture V-Mn are genotoxic agents: all (adult female except) mice showed an increase of MN in polychromatophil erythrocytes after the exposure. Males were more susceptible to genotoxicity after the three treatments compared with females. In all the experimental variables, a significant decrease in polychromatophil erythrocytes was observed. Micronuclei persisted after three months of recovery.

The observed MN increased could be explained by common mechanisms such as oxidative stress which injures all type of biomolecules, including DNA, and the interaction of the metals with sulphhydryl bonds, inhibiting functionality of the proteins. About hormonal state, estrogens are considered anti-oxidative and anti-inflammatory molecules.

About the effect on polychromatophil erythrocytes could be explained as a consequence of the interaction of the metals with the kinases and phosphatases that control erythropoiesis, or directly on erythropoietin production.

This work contribute to a better understanding of the mechanisms by which metals and its mixtures induce genotoxic and erythropoietic effects after its inhalation, and the information about a long lasting effect despite the fact that the exposure ended.

## 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 éstas, entre ellas 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 se cuentan minas, refinerías, centrales hidro, termo y nucleoelectricas, sitios en donde se desarrollan procesos industriales (p.e. fábricas de pintura y disolventes), lugares de almacenamiento y distribución de gasolina, entre otras. *Móviles*: las principales 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 están presentes 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 (CO<sub>2</sub>), dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), 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 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) y ozono troposférico (O<sub>3</sub>) (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 km<sup>2</sup> 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 km<sup>2</sup> (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 km<sup>2</sup> (Rivero-Rosas *et al.* 1997), con una densidad poblacional de 12 200 habitantes/km<sup>2</sup> (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 (Rivero-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 que viven al nivel del mar. A mayor altitud, debe ser inhalado más aire 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 (Rivero-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. Por otro lado, las partículas suspendidas totales y el plomo, sólo son monitoreados semanalmente. Sin embargo, además del plomo, la presencia de otros elementos como el cromo, el cobre, el zinc, el manganeso y el vanadio no ha sido cuantificada en esta ciudad (Riveros-Rosas *et al.* 1997).

Las megaciudades a menudo presentan altas concentraciones de: dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), monóxido de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles (COV's), hidrocarburos (HC), partículas suspendidas totales (PST) y ozono (O<sub>3</sub>) (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 fabricación 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 µm (PM<sub>10</sub>) y mayor a 2.5 µm (PM<sub>2.5</sub>) (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 µm (PM<sub>2.5</sub>) (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 µm (PM<sub>0.1</sub>) (Englert 2004, Vallejo *et al.* 2003). Están compuestas por los productos de las

quemadas 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 (PM<sub>0.1</sub>) están comprendidas dentro de las finas (PM<sub>2.5</sub>) y éstas a su vez, dentro de las gruesas (PM<sub>10</sub>) y todas juntas representan las Partículas Suspendidas Totales (PST) (Englert 2004, Molina y Molina 2004).

### **2.1.3. Partículas suspendidas y sus efectos sobre la salud**

Las partículas suspendidas son un tipo de contaminante atmosférico ubicuo, con 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 suspendidas <2.5 µm (PM<sub>2.5</sub>) son más dañinas que las PM<sub>10</sub> en términos de mortalidad y de enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Englert 2004, Molina y Molina 2004, Choi *et al.* 2004). Las partículas suspendidas en la Ciudad de México tienen gran relevancia debido a que estudios epidemiológicos indican que se produce un incremento del 1% en la mortalidad por cada 10 µg/m<sup>3</sup> de aumento en la concentración de PM<sub>10</sub> (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) (Katsouyanni 2003, Sorensen *et al.* 2005). 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 a 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 diversos 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 oxidante (Leonard et al. 2004a, b).

#### 2.1.4.1 Estrés oxidante

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), aunado a que cuando colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón (oxidándola), ésta pierde su función específica dentro de la célula

Un amplio rango de xenobióticos pueden generar estrés oxidante (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 (V), es un metal de transición miembro del grupo VB de la tabla periódica (Mukherjee *et al.* 2004) que está ampliamente distribuido en la corteza terrestre y en ella se encuentra 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 *et al.* 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). Al respecto, los petróleos de México y Venezuela acumulan grandes cantidades de vanadio. Entre el 12 al 15% de pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) está presente incluso después de ser procesado (Leónard y Gerber 1994).

Debido a que el vanadio es el elemento traza más abundante en los combustibles fósiles, la combustión de esos materiales provee una fuente significativa de este metal en el ambiente (De la Torre *et al.* 1999). 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, 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 (POE), el límite de exposición permisible determinado por la Administración para la Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) es 0.5 mg/m<sup>3</sup> 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  $0.62 \mu\text{g}/\text{m}^3$  comparado con  $0.011 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en las zonas rurales (Fortoul *et al.* 2002).

En años recientes, la evidencia de que los niveles en el ambiente se han incrementado debido a las actividades antropogénicas (De la Torre *et al.* 1999), son evidenciados, en la ciudad de México, por Fortoul y colaboradores (2002). Ellos reportan aumento significativo en los niveles de vanadio por medio de un estudio realizado en pulmones de casos de autopsias de habitantes de las décadas de los 60 y 90 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 *et al.* 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 es el compuesto más empleado (Ivancsits *et al.* *et al.* 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 *et al.* 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 *et al.* 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). La inhalación es la ruta principal de entrada al cuerpo (Cooper 2007).

#### **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.  $\text{HVO}_4^{2-}$  o  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ), esta forma predomina en el espacio extracelular; y vanadilo V(IV), el estado tetravalente usualmente como oxicación (p.e.  $\text{VO}^{2+}$ ), 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 *et al.* 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 *et al.* 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.* 1993) 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, fosfatasa, 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.* 1999). Por otro lado, varios genes son regulados por este elemento o por sus compuestos, se incluyen genes como: factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-8 (IL-8), proteína activadora 1 (AP-1), ras, c-raf, proteína activadora de genes mitógenos (MAPK), p53, factores nucleares-k $\beta$  (NF- k $\beta$ ), entre otros (Mukherjee *et al.* 2004).

El vanadato está ampliamente reconocido como un análogo estructural y electrónico del fosfato ( $\text{VO}_4^{3-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ), 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 *et al.* 2002, Kleinsasser *et al.* 2003), es importante mencionar que muchos de ellos son experimentos *in vitro* (Ivancsits *et al.* 2002). La información relacionada a la genotoxicidad y al potencial carcinogénico del pentóxido de vanadio 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.5-6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0.5-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,

respectivamente. Observaron que estos compuestos inducen 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 incremento significativo de aberraciones cromosómicas estructurales, con prevalencia de rompimientos e intercambios después de 2 h de tratamiento con 4, 8 y 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de metavanadato de amonio, 6, 12 y 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfato de vanadilo, y 12 y 18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de trióxido de vanadio, en ausencia y presencia de activación metabólica.

Roldán y Altamirano (1990) no observaron inducción de aberraciones cromosómicas estructurales (ACe) ni ICHs en linfocitos humanos sin activación metabólica tratados por 48 horas con 2, 4 y 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de pentóxido de vanadio. Sin embargo, sí encontraron a todas las dosis, 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), del metavanadato (0.28-8.96  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), del metavanadato de amonio (0.29-9.36  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y del sulfato de vanadilo (0.41-13.04  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para producir aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas (ACn), micronúcleos (MNs) e ICHs 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 incremento en la frecuencia de ICH y micronúcleos. Esto habla del posible mecanismo de acción del vanadio como un agente tóxico para el aparato mitótico. Los resultados obtenidos con los cuatro compuestos de vanadio, muestran que el 68% de los micronúcleos tienen centrómero, es decir, que provienen de cromosomas completos. Lo anterior, confirma el potencial aneuploidogénico del vanadio.

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  $\text{V}_2\text{O}_5$  (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), pero sí aumento en el número de micronúcleos. Estos micronúcleos fueron cinetocoro-positivos, lo cual indica que este compuesto tiene actividad aneuploidogénica en estas células.

En un estudio realizado por Rojas y colaboradores (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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o más. Por otro lado, en linfocitos estimulados sólo a altas concentraciones (540  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) se observó incremento significativo en el daño al ADN.

Ivancsits y colaboradores (2002) observaron que el ortovanadato aumenta significativamente la longitud de la cola de los cometas de linfocitos no estimulados y de fibroblastos humanos a dosis de 0.25- 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 0.025  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente.

Rodríguez-Mercado y colaboradores (2003) evaluaron la genotoxicidad del tetraóxido de vanadio (+4) a dosis 2- 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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  $\text{V}^{+4}$  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 incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales. Estos resultados apoyan la idea de que los micronúcleos están relacionados con procesos aneuploidogénicos.

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 incremento significativo en la migración del ADN de las células de riñón, hígado, corazón y pulmón. Un daño menor se evidenció 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 inducción de mutaciones somáticas detectadas como sectores rojos aberrantes en los ojos de la mosca adulta (Barrera-Ferrer y Villalobos-Cabrera 1998).

### 2. 1.6.10. Efectos hematológicos

Estudios en humanos han revelado que la exposición a vanadio induce cambios en el hematocrito, tales como leucopenia y anemia (Cooper 2007), debido a que tiene influencia en la formación de los eritrocitos (Leónard y Gerber 1994).

En este sentido, el vanadio ha sido de gran interés para muchos investigadores en los últimos años, sin embargo su papel bioquímico y fisiológico no está totalmente claro. Los efectos hematológicos reportados se pueden resumir en tres puntos (Zaporowska y Wasilewski 1992):

- Reduce la deformabilidad de los eritrocitos, así que las células son frecuentemente retenidas en el sistema retículoendotelial del bazo y son retiradas del torrente sanguíneo.
- Produce peroxidación lipídica en la membrana del eritrocito y esto lleva a hemólisis
- El conteo eritrocitario bajo es consecuencia de la hemólisis y del corto tiempo de sobrevivencia de los eritrocitos (Hogan 1990, Zaporowska y Wasilewski 1992).

## **2.1.6. Manganeso**

### **2.1.6.1. Generalidades**

El manganeso (Mn) es el 5to metal más abundante en la Tierra (Lima *et al.* 2008), es ubicuo en el ambiente y comprende aproximadamente el 0.1% de la corteza terrestre, es el décimo segundo elemento más abundante. 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**

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

El manganeso está enlistado como un agente 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 0.05µg/Mn/m<sup>3</sup> (Aschner *et al.* 2005).

### **2.1.6.4. Usos**

El manganeso es uno de los metales más ampliamente utilizados en la industria (Zhang *et al.* 2004). Debido a sus propiedades físicas, es principalmente empleado en la producción de acero y superaleaciones para proveer dureza a los productos (WHO 2004, Barceloux 1999).

Sus compuestos tienen una gran diversidad de usos como: producción de baterías secas, cerillos, 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**

En un mundo industrializado, en el que se emplean muchos metales (manganeso, hierro, aluminio, mercurio, cobre, plomo, zinc, vanadio, entre otros) y los humanos están expuestos a ellos ocupacionalmente o como resultado de la contaminación del agua, de los alimentos o del ambiente, los síntomas clínicos y los posibles efectos mutagénicos producidos por exposición crónica a los metales, revisten en la actualidad considerable interés (Lima *et al.* 2008).

##### **a) Vía Oral**

La biodisponibilidad del Mn está influenciada por la ruta de exposición. La dieta humana es relativamente alta en manganeso y los alimentos representan un gran fuente de este elemento para muchos individuos. Al ser un oligoelemento, la ingesta adecuada de Mn en adultos es de 2-5mg por día. Una pequeña fracción del manganeso que es ingerido está disponible para la liberación sistémica (Dorman *et al.* 2000). 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% 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.* 2001b), té y varias especias (Roth y Garrick 2003). Concentraciones menores se pueden presentar 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). En este sentido, por un lado, la absorción del manganeso en el pulmón es alta y por otro, su liberación sistémica es más eficiente que cuando el metal es ingerido (Dorman *et al.* 2000).

### 2.1.6.6. Toxicocinética

El manganeso es un elemento esencial que está presente en todos los tejidos de los mamíferos (Dorman *et al.* 2001b). 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 en estado trivalente ( $Mn^{+3}$ ), mientras que el resto está en el organismo en forma de cationes cuatro ( $Mn^{+4}$ ) o divalentes ( $Mn^{+2}$ ) (Aschner *et al.* 2005) estos últimos predominan en los tejidos biológicos (Dorman *et al.* 2001a, 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  $\beta$ -globulina y a la albúmina, y el 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 de transferrina (TfR) que subsecuentemente lo internaliza dentro de vesículas endosómicas. 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 endosómica 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 hierro (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 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 descarboxilasa y manganeso superóxidodismutasa (Aschner *et al.* 2005). Es necesario para el funcionamiento normal de los sistemas inmune, reproductor, 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 homeostáticos 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 regulador 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 oxidante del Mn, han mostrado que genera 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**

Los primeros órganos que se afectan por el manganeso son: cerebro, hígado, pulmón y los sistemas reproductores e inmune (Zhang *et al.* 2004). 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 reproductores (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 (Oberly *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 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 aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Con el mismo compuesto (NTP 1993) se trataron células de ovario de hámster Chino (CHO) y se evidenció inducción de aberraciones cromosómicas pero no de ICH. En neuronas del estriado que fueron expuestas a cloruro de managaneso por 48 h se notó 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 50 mg/kg de cloruro de manganeso por vía oral se observó 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 ( $MnCl_2$ ) a dosis de 0.014 mg/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.

La exposición de linfocitos humanos de POE a  $MnCl_2$ , muestra que a altas concentraciones (25  $\mu M$ ) el manganeso es clastogénico y la ausencia de células poliploides sugiere que no afecta la formación del aparato mitótico en las concentraciones probada, debido a que no presenta un efecto despolimerizante sobre los dímeros de tubulina (Lima *et al.* 2008). Pero Gerber y colaboradores en 2002 demostraron que a dosis elevadas (0.05 M) varios compuestos de Mn pueden afectar la reparación y la replicación del ADN.

El potencial genotóxico de la fórmula comercial del fungicida maneb (maneb 80, que contiene 80% etilenobisditiocarbamato de manganeso como ingrediente activo) fue evaluado por Arias (1988) utilizando ICHs y aberraciones cromosómicas, en embriones de pollo. Los embriones fueron expuestos a varias dosis de maneb y se observó incremento significativo en los intercambios de cromátidas hermanas, sin embargo, en ninguna de las dosis se encontraron efectos clastogénicos.

En otro estudio realizado por Jablonická y colaboradores (1989), se evaluó la producción de aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas hermanas en cultivos de linfocitos periféricos de 44 trabajadores ocupacionalmente expuestos a mancozeb durante la producción del plaguicida novozir Mn80. Los resultados sugieren que la exposición a mancozeb incrementa significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales y la cantidad de intercambios de cromátidas hermanas.

Li y colaboradores (2001) en ratones, analizaron a proporción de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea inducida por la exposición a manganeso a través de la inyección a dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Los resultados muestran aumento significativo de micronúcleos a dosis media y alta. Esto indica que a altas dosis los efectos genotóxicos son evidentes. Por lo anterior, los autores consideran que el  $MnCl_2$  tiene potencial mutagénico.

#### **2.1.6.10. Efectos Hematológicos**

Son pocos los estudios sobre los efectos hematológicos de este metal, al respecto Ziecik (1977), evaluó en ratas, los efectos sobre la eritropoyesis de la inyección intraperitoneal de tres diferentes dosis de  $MnCl_2$ . Este autor reporta que la cantidad de eritrocitos cambió considerablemente durante el período de investigación y que se observaron cambios histopatológicos de hígado, bazo y riñones. En estos órganos se encontró congestión y éstasis de la sangre en ellos, especialmente en los vasos glomerulares.

En otro estudio llevado a cabo en ratas expuestas crónicamente a óxidos de manganeso por Carter y colaboradores (1980) se observó que los animales experimentales desarrollaron anemia microcítica.

### **2.2. Mezclas de compuestos como contaminantes atmosféricos**

La mayor parte de los reportes experimentales que se han llevado a cabo para entender la toxicidad de los metales, han puesto poca atención al efecto que pueden tener las exposiciones simultáneas de más de un metal (Pillai y Gupta 2005). En ese sentido, las poblaciones en la vida cotidiana están expuestas simultáneamente a gran cantidad de compuestos, lo cual indica la necesidad del trabajo experimental con combinaciones de sustancias (Pillai *et al.* 2002, Pillai y Gupta 2005). Por otro lado, no hay reportes disponibles en la literatura de los efectos potenciales sobre los organismos de la inhalación de mezclas de metales presentes en la atmósfera (Bizarro *et al.* 2003).

Pocos son los estudios en la literatura al respecto, a continuación se citan algunos de los reportes disponibles.

Pillai y colaboradores (2002), evaluaron los efectos de la exposición sola y en combinación de acetato de plomo y acetato de cadmio por vía intraperitoneal (0.05 mg/kg) en ratas adultas. Evaluaron los cambios sobre la fluidez de la membrana de células hipofisarias. En este estudio se reporta que el plomo y el cadmio individualmente y en combinación causan cambios en las propiedades biofísicas de la membrana (decremento en la permeabilidad). Los cambios posteriores al tratamiento simultáneo son más parecidos a los que produce sólo el cadmio que a los que produce el plomo, los autores consideran que lo anterior es evidencia de que el cadmio media mayores efectos debido a su naturaleza más reactiva.

En 2003, Bizarro y colaboradores reportan los efectos ultraestructurales de la inhalación de acetato de plomo (0.01 M) y de cloruro de cadmio (0.006 M) sobre las mitocondrias de células testiculares de ratones CD-1. Los resultados muestran que el porcentaje de mitocondrias dañadas estuvo relacionado con el tiempo de exposición y el metal inhalado; el cadmio solo, causó mayor daño que el plomo solo. Importante es mencionar, que se observó mayor daño cuando los animales fueron expuestos a la mezcla de los compuestos, por tanto, la inhalación de la combinación de los metales fue más agresiva que por separado. Al respecto, los autores consideran que la exposición a metales puede generar decremento en los niveles de glutatión e interferir con los grupos sulfidrilo de las proteínas mitocondriales, lo cual permitiría un cambio en la permeabilidad de la membrana y la posterior muerte de la célula.

En otro estudio realizado por Pillai y Gupta (2005) en hígado de ratas hembras adultas, se reportan los efectos por vía intraperitoneal (0.05 mg/kg) del acetato de plomo y acetato de cadmio solos o en combinación. Los resultados muestran que la habilidad de ambos metales para inducir estrés oxidante (medido con la actividad de la superóxido

dismutasa, catalasa, glutatión y en los niveles de ácido tiobarbitúrico) en el hígado, no se intensifica cuando se administran los metales simultáneamente. Los autores argumentan que los cambios observados en los parámetros de las ratas co-expuestas, pueden ser el resultado de los efectos independientes del plomo y del cadmio, así como de su interacción.

Los cambios observados en los organismos, dependen del metal, la vía de exposición, la duración de la exposición, la dosis, entre otros factores. Por lo anterior, es muy importante evaluar los efectos que presentan los organismos cuando son expuestos a co-exposiciones de elementos toxicológicamente relevantes como lo son los metales de transición.

### **2.3. El género y la madurez sexual: implicaciones en la respuesta a xenobióticos**

Se ha reportado que existen diferencias por género en la respuesta posterior a la exposición a metales. Actualmente, existe un cuerpo creciente de evidencias sobre los efectos en la salud que ciertos metales tóxicos ejercen y que sus consecuencias se manifiestan de manera diferente en hombres y mujeres (hembras y machos en modelos experimentales). Estas respuestas distintas son debidas a las diferencias en la cinética, en el mecanismo de acción o la susceptibilidad. Sin embargo, los datos sobre este tópico, son aún escasos y, con pocas excepciones, las diferencias y las susceptibilidades por género debidas a la exposición de xenobióticos, no han sido consideradas en el riesgo a la salud que representan los contaminantes ambientales (Vahter *et al.* 2007).

Para muchos agentes (químicos o contaminantes ambientales), la investigación sobre el riesgo a la salud ha sido mayoritariamente basada en personal ocupacionalmente expuesto (con la excepción de aquellos estudios sobre los efectos reproductores), y los resultados han sido utilizados como si fueran representativos de la población general, incluidas mujeres, niños y ancianos (Vahter *et al.* 2007). Aunado a esto, los estudios toxicológicos son casi exclusivamente llevados a cabo en modelos experimentales que sólo incluyen animales machos (Vahter *et al.* 2002, Vahter *et al.* 2007). Por esta razón, no son detectados los posibles mecanismos diferenciales o las interacciones con las hormonas sexuales (Vahter *et al.* 2007).

Hoy día, es necesario prestar mucha atención a la investigación de interacciones potenciales entre el género y la exposición ambiental, para prevenir los posibles efectos sobre la salud y el entendimiento de los mecanismos de acción para identificar a los grupos susceptibles y determinar las medidas más efectivas para mitigar los efectos (Vahter *et al.* 2007).

A continuación, se mencionan algunos de los estudios que reportan diferencias por género sobre la salud, debidas a la exposición a metales.

#### *Estudios epidemiológicos*

**Níquel:** La alergia a este metal es un ejemplo de efectos género-específico causadas por diferencias en la exposición. El níquel es la causa más común de alergia por contacto de todos los sensibilizadores de la piel y también es causa importante de

eczema. El número de mujeres sensibles al níquel es mucho mayor que el de hombres sensibles (Vahter *et al.* 2007).

**Cadmio:** Los efectos en la salud relacionados con cadmio son más comunes entre las mujeres que entre los hombres. A mitad del siglo pasado, fue considerado que las mujeres podían estar más afectadas por el cadmio que los hombres. La enfermedad de Itai-Itai (una combinación de daño renal, osteomalacia y osteoporosis) está relacionada con la intoxicación por cadmio. Esta enfermedad afecta casi exclusivamente a mujeres ancianas y multíparas. Además, los hombres presentan concentraciones de cadmio críticamente menores comparados con los niveles que presentan las mujeres. Los efectos del cadmio sobre el hueso se cree que están causadas por la interferencia con el metabolismo del calcio y de la vitamina D, secundario al daño renal. Recientes experimentos indican que los efectos sobre los niveles séricos de hormonas calciotrópicas y los desórdenes en el metabolismo del calcio y del fosfato, son más comunes en mujeres que en hombres (Vahter *et al.* 2007).

**Plomo:** La exposición crónica a plomo puede tener efectos adversos sobre el sistema nervioso central y sobre los sistemas: renal, cardiovascular, reproductor y hematológico. En general, los hombres tienen mayores niveles de plomo en sangre que las mujeres, debido a que están más expuestos y porque tienen un conteo eritrocitario mayor y el plomo se une a los eritrocitos. Pero las mujeres liberan el plomo que acumulan en el hueso, más lentamente que los hombres (Vahter *et al.* 2007).

**Mercurio:** Los efectos en la salud del mercurio dependen en gran medida de la forma química. El metilmercurio (MeHg) es un bien conocido neurotóxico. Por otro lado, los estudios epidemiológicos de humanos neonatos así como también en animales experimentales, han reportado efectos adversos importantes en el desarrollo embriológico principalmente de los machos (Vahter *et al.* 2007).

**Arsénico:** Un gran número de estudios, indican que los hombres son mayormente afectados por los efectos en la piel relacionados con arsénico, incluido el cáncer de piel, que las mujeres. Otros reportes indican que los efectos del arsénico relacionados con el riñón, pulmones y cáncer de vejiga así como también la diabetes, proveen cierta evidencia de que las mujeres están en mayor riesgo que los hombres (Vahter *et al.* 2007).

#### *Estudios Experimentales*

Scheirs y colaboradores (2006) reportaron que en ratones silvestres residentes de lugares altamente contaminados, el daño genético (rompimientos de cadena sencilla de ADN) fue mayor en los ratones machos que en las hembras. Se encontró que el metal más abundante en esas zonas era el cadmio, por lo tanto los autores atribuyen los efectos observados a la presencia de ese metal.

En humanos, Fortoul y colaboradores (2004) describieron el daño genotóxico e histológico de células del epitelio nasal encontrado en una población de estudiantes de medicina (hombres y mujeres) expuestos a una atmósfera altamente oxidante. En este estudio, se reporta que el daño al ADN fue mayor en los hombres que en las mujeres (tanto en los expuestos como en los testigos). Asimismo, los porcentajes de metaplasia escamosa fueron mayores en los hombres. Los autores indican que los hombres, comparados con las mujeres, presentan mayor susceptibilidad de desarrollar daño genotóxico.

En 2005, el grupo de Fortoul y colaboradores identificó la diferencia en la concentración de plomo en pulmones y en la respuesta bronquiolar de ratones expuestos a este metal por vía inhalada. En este estudio, las hembras presentaron mayores concentraciones de plomo en los pulmones. Sin embargo, los machos mostraron un daño celular mayor: en ellos se encontró mayor proporción de pérdida de células bronquiales no ciliadas (CBNC), descamación y necrosis. En ambos trabajos, los autores explican que pueden existir diferencias en: la eliminación de partículas, respuesta al estrés oxidante, actividad de enzimas importantes en la desintoxicación (p.e. citocromo P450) y que todo lo anterior, podría estar influenciado por las hormonas sexuales. Las hormonas sexuales (estrógenos y testosterona) se ha sugerido que juegan un papel esencial en estas respuestas diferenciales.

Morgan y El-Tawil (2003) expusieron ratas hembras y machos sexualmente maduros a metavanadato de amonio en agua de bebida. En ambos casos, la fertilidad se redujo significativamente, pero en los machos este efecto fue más pronunciado.

La ingestión crónica de cloruro de manganeso produce, según el reporte de Elbetieha y colaboradores (2001), disminución significativa de la fertilidad en los ratones hembras y machos que ingirieron la dosis más alta (8000 mg/L), por lo que los autores concluyen que en los ratones la ingestión crónica de manganeso causa algunos efectos adversos sobre la fertilidad y la reproducción.

En pacientes (hombres y mujeres) con carcinoma gástrico que iban a entrar a gastrectomía, Ono y colaboradores (2005) midieron TNF-alfa (Factor de Necrosis Tumoral-alfa), interleucina 10 (IL-10) e INF-gamma (Interferon-gamma), el día previo a la cirugía, y posteriormente, 1 y 3 días post-cirugía. Ellos reportan que las mujeres presentaron niveles mayores de TNF-alfa e IL-10, y después de la cirugía los hombres mostraron mayores niveles de TNF-alfa y menores niveles de INF-gamma, sugiriendo que esos son factores que contribuyen al incremento de susceptibilidad de los hombres a desarrollar respuesta inflamatoria sistémica y complicaciones post-operatorias.

Al respecto, los estudios que se han llevado a cabo utilizando diferentes modelos animales, han mostrado que en roedores hembras se observa una mejor respuesta inmunológica que los machos, lo que resulta en una mayor tasa de sobrevivencia después de sufrir algún daño. Por otro lado, en machos y en hembras ovariectomizadas, la administración de 17-beta-estradiol después de un trauma hemorrágico, se ha notado que se restablece la función cardíaca, hepática e inmune (Ono *et al.* 2005).

Todos los anteriores son ejemplos que muestran la necesidad de llevar a cabo investigación para identificar las diferencias por género en exposición, cinética y toxicidad de los contaminantes (Vahter *et al.* 2007).

Por otro lado, es de interés mencionar, que la edad de los organismos (lo cual indica la madurez sexual), es un factor importante en la respuesta diferencial ante la exposición que pueden presentar. Sin embargo, los estudios relativos a este punto, son escasos. En los reportes, lo que se evalúa con mayor frecuencia, es la disimilitud que existe entre animales que son considerados adultos jóvenes y animales ancianos, pero no hay reportes en la literatura que indiquen las posibles diferencias que presenten animales sexualmente inmaduros (prepúberes), puesto que el estado hormonal del organismo puede ser un factor de suma importancia en los efectos que ejercen los xenobióticos y por lo tanto, en la respuesta de los individuos.

Al respecto, López-Diazguerrero y colaboradores (2005) evaluaron la severidad del daño genotóxico, tanto *in vivo* como *in vitro*, causado por tetracloruro de carbono

(CCl<sub>4</sub>) y por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre ratones jóvenes (60 días de edad) y ratones ancianos (420 días de edad). Sus resultados indican que los niveles de 8-oxoGua fueron significativamente más altos en los ratones ancianos que en los jóvenes cuando fueron expuestos simultáneamente a ambos compuestos. Sin embargo, el daño inicial de ambas edades, fueron similares. Los autores sugieren que el daño al ADN observado en los animales ancianos, es probablemente el resultado de la acumulación del daño endógeno relativo a la edad (p.e. reparación insuficiente, lo cual genera que aumente el efecto causado por la exposición a agentes tóxicos).

Dorman y colaboradores (2004) reportan la influencia del género y la edad de ratas adultas y ancianas sobre la farmacocinética del sulfato y fosfato de manganeso. Los autores indican que el género y la edad no afectan la distribución del manganeso en algunas zonas del sistema nervioso central (estriado), pero sí influyen las concentraciones de manganeso en otros tejidos; al final del período de exposición, estructuras tales como el bulbo olfatorio, los pulmones y tejidos como la sangre, presentaron mayores concentraciones de manganeso, particularmente en los machos jóvenes que las hembras de la misma edad y que en los machos ancianos. Lo anterior, indica que existen diferencias sustanciales entre organismos de la misma especie, mismo género pero con distinto estado hormonal.

En farmacología clínica, los cambios relacionados con la edad han sido revisados exhaustivamente y aunque está bien establecido el manejo diferente de los xenobioticos en términos fisiológicos y toxicológicos por los animales más jóvenes con respecto a los adultos, pocos esfuerzos se han hecho en investigar las alteraciones relacionadas con la edad en las respuestas toxicológicas y más específicamente en relación con los agentes tóxicos ambientales (De la Torre *et al.* 1999).

#### **2.4. Antecedentes directos: hallazgos con el modelo de Inhalación**

La inhalación es la vía por la cual los organismos estamos principalmente expuestos a los contaminantes atmosféricos y ésta es, además, por la que mejor se absorben tanto el vanadio como el manganeso (del 90 al 100%, respectivamente). Por lo que el grupo de Fortoul y colaboradores, han desarrollado un modelo experimental en el cual los animales son expuestos a la inhalación de partículas de diámetro similar a las que respiramos cotidianamente (0.5-5 µm). Con este esquema de inhalación se han obtenido una serie de resultados que son importantes para el presente trabajo.

Al respecto, González-Villalba (2004) obtuvo resultados que indican que la inhalación de pentóxido de vanadio en ratones machos, causa daño ultraestructural de las células de timo, bazo y médula ósea. En estudios posteriores, Piñón-Zárate (2005) encontró que la exposición a vanadio produce el incremento significativo de megacariocitos en el bazo de los ratones, aunado a que en las hembras se observó una mayor proliferación. Los dos trabajos anteriores sugirieron que este metal tiene efectos sobre la hematopoyesis.

Concerniente a la genotoxicidad del vanadio y del managaneso, Rojas-Lemus (2006) reportó que la inhalación de pentóxido de vanadio y cloruro de manganeso causa daño genotóxico (identificado como rompimientos de cadena sencilla: RCS) en los leucocitos de sangre periférica de los ratones machos, sin mostrar disminución en la viabilidad celular. Pérez-De Gante (2008) observó que el pentóxido de vanadio produce daño genotóxico (RCS) en células de médula ósea, presentándose en los machos, mayores proporciones de células dañadas comparadas con las hembras, en este trabajo,

también se reportó que no hay disminución de la viabilidad celular en las células de este tejido. Ambos trabajos indicaron que el vanadio y el manganeso eran elementos con actividad genotóxica, sin producir citotoxicidad y que los machos presentan mayor susceptibilidad a sufrir daño genotóxico.

Por otro lado Mussali y colaboradores (2005), reportaron que el pentóxido de vanadio causa decremento significativo en la gamma-tubulina, proteína importante para la formación de los microtúbulos, por lo que el vanadio podría tener efectos adversos sobre la formación del aparato mitótico durante la división celular.

## 2.5. 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 la 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 (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).

### 2.5.1. Ensayo de micronúcleos

El ensayo de micronúcleos en roedores, ha sido ampliamente utilizado para detectar genotoxicidad. La evaluación de la frecuencia de MNs es, *in vivo*, la prueba primaria en la batería de técnicas para detectar actividad genotóxica y está recomendada por las agencias reguladoras en el mundo para ser llevado a cabo como parte de la evaluación de seguridad (Krishna y Hayashi 2000).

Los trabajos sobre los mecanismos por los cuales los agentes median los efectos genéticos adversos y los estudios epidemiológicos de la frecuencia de los efectos genéticos relativos a la exposición a xenobióticos, son de gran importancia para dilucidar mayor información sobre los tres niveles de mutación: a) genes, b) cromosomas y c) aparato celular necesario para la segregación cromosómica. Esta información es necesaria para proveer una amplia cobertura de la mutagenicidad y del potencial carcinogénico del xenobiótico evaluado. En este sentido, el ensayo de micronúcleos ha sido ampliamente validado para evaluar genotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Krishna y Hayashi 2000).

#### ¿Qué es un Micronúcleo?

Es un cuerpo citoplásmico de naturaleza nuclear que corresponde a material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular (Zalacain *et*

*al.* 2005), por tanto, es un pequeño núcleo, separado del núcleo principal de la célula, que se produce durante la mitosis (en telofase) (EPA 1998). Los MN (conocidos también como cuerpos de Howell-Jolly), son de forma redonda y de contorno liso (Krishna y Hayashi 2000). Reflejan aberraciones cromosómicas que pueden ser debidas a errores durante la replicación del material genético y/o por la exposición a agentes genotóxicos (Zalacain *et al.* 2005). Un micronúcleo contiene material genético que puede provenir de fragmentos cromosómicos o cromosomas completos (EPA 1998).

El propósito de este ensayo, es identificar a los xenobióticos que causan formación de MNs, los cuales son resultado de rompimientos cromosómicos (clastogenicidad) o de cromosomas completos (aneugenicidad). En este sentido, el ensayo de micronúcleos con laminillas cubiertas con naranja de acridina, aprovecha el proceso de eritropoyesis (producción de eritrocitos) (Krishna y Hayashi 2000).

En el ratón adulto, el bazo y la médula ósea son órganos hematopoyéticos, en los cuales las células troncales forman la base de la eritropoyesis; estas células deben pasar por diversos estadios de proliferación y maduración (Krishna y Hayashi 2000). Durante la proliferación, las células se dividen, también en ese momento el agente es administrado, por lo tanto, puede actuar y causar daños, tales como: cromosómico (rompimientos e intercambios) a las biomoléculas relacionadas con la disyunción de las cromátidas hermanas (p.e. tubulina), causando de esta manera que el aparato mitótico no funcione adecuadamente. Estos efectos, dependerán del mecanismo de acción del agente evaluado (Krishna y Hayashi 2000).

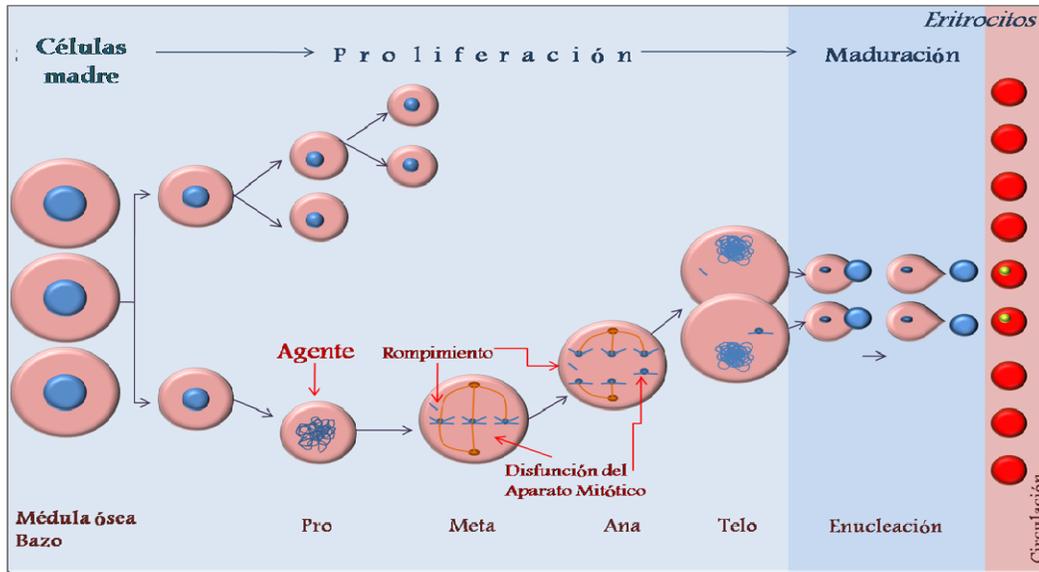
El material genético (un cromosoma completo o un fragmento de cromosoma) no integrado al núcleo de la célula hija, puede quedarse atrás durante la división celular y permanecer en forma de micronúcleo que puede ser observado en el citoplasma de la célula que lo heredó (Krishna y Hayashi 2000).

Durante la diferenciación del linaje eritroide, cuando un eritroblasto se desarrolla en un eritrocito policromático (eritrocito joven que aún contiene ARN), el carácter que define esta etapa es la expulsión del núcleo principal, por tanto, cualquier micronúcleo que se haya formado permanece en el citoplasma de la célula, que ahora es una célula anucleada, lo cual facilita la visualización de los micronúcleos (Krishna y Hayashi 2000).

El incremento en la frecuencia de EPC micronucleados (EPCMN) en los animales tratados con el agente, es una indicación de daño genético (Krishna y Hayashi 2000).

Los EPC, con el tiempo, degradan el ARN y contienen primordialmente hemoglobina, entonces se conocen como eritrocitos normocrómicos (ENC) o eritrocitos maduros. Los EPC y los ENC se tiñen de manera diferencial cuando se fluorocromizan con naranja de acridina (NA) (Krishna y Hayashi 2000). Los eritrocitos policromáticos o inmaduros son células que tienen menos de 24 h de haber sido liberadas a la circulación, por lo tanto, la naranja de acridina al interaccionar con el ARN de los ribosomas, emite fluorescencia rojo-naranja; los eritrocitos inmaduros, por tanto, pueden ser distinguidos fácilmente de los maduros que no emiten fluorescencia, debido a que éstos últimos no presentan ningún tipo de ácido nucleico en su citoplasma (EPA 1998). Los resultados positivos indican que el xenobiótico induce la formación de micronúcleos, los cuales son resultado de daño cromosómico y/o daño en el aparato mitótico de los eritroblastos (EPA 1998). Si se obtienen resultados positivos en la prueba de rutina, pueden emplearse posteriormente, anticuerpos centroméricos o pruebas de ADN, para determinar el mecanismo de formación de MNs (Krishna y Hayashi 2000) (Figura 1).

Por otro lado los reticulocitos son liberados normalmente desde la médula ósea de 18 a 36 horas antes de su maduración final en eritrocitos. Por lo tanto, proveen una evaluación en tiempo real del estado funcional de la eritropoyesis, por lo que el conteo de reticulocitos periféricos refleja el estado funcional de este importante proceso (Goodnough *et al.* 2000).



**Figura 1.** Mecanismo de generación de micronúcleos durante la eritropoyesis (Modificado de Krishna y Hayashi 2000).

Ventajas del Ensayo de Micronúcleos con laminillas cubiertas de Naranja de Acridina (Hayashi *et al.* 1990, Yamamura *et al.* 1992, Krishna y Hayashi 2000):

- La población celular se distribuye de manera uniforme, por lo tanto, es más sencillo cuantificar a las subpoblaciones.
- El reconocimiento de las subpoblaciones es objetiva: evidencia las diferencias cuantitativas y cualitativas entre los reticulocitos y los eritrocitos maduros.
- Se requiere una pequeña cantidad de sangre periférica que puede ser tomada repetidamente sin sacrificar a los animales tratados.
- Es posible hacer preparaciones a diferentes tiempos del tratamiento por muestreo periódico del mismo individuo.
- El procedimiento para obtener las muestras es muy sencillo; se pueden obtener muestras de buena calidad sin requerir entrenamiento exhaustivo previo.
- El ensayo requiere poco tiempo para obtener resultados.
- Con las modificaciones necesarias, puede detectar agentes clastógenos y aneugénicos.
- Puede ser fácilmente integrado dentro de los estudios toxicológicos generales.

Actualmente, el ensayo de micronúcleos está considerado como una prueba práctica, universalmente validada y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes con actividad genotóxica (Zalacain *et al.* 2005).

### 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 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.

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 controvertidos, 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.

En estudios previos con nuestro modelo, se ha reportado que en células de timo, bazo y médula ósea de ratones expuestos a 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, sin embargo, dado que no estamos expuestos a un solo contaminante a la vez, es relevante evaluar la respuesta que presentan los individuos cuando son expuestos a las mezclas de los compuestos.

Por otro lado, la diferencia en la susceptibilidad por género en la respuesta a agentes tóxicos ambientales, es un tópico aún pobremente reportado en la literatura, por ello, cobra cada día más importancia investigar sobre las posibles diferencias o similitudes entre las respuestas de las hembras y los machos sometidos a un mismo esquema de inhalación. En este sentido, el estado hormonal de los individuos, dado por la edad, nos podría ayudar a dilucidar los mecanismos por los cuales los metales ejercen su toxicidad.

#### 4. Hipótesis

- Si el pentóxido de vanadio (0.02 M), el cloruro de manganeso (0.02 M) o la mezcla de los compuestos (0.02 M), son capaces de producir daño genotóxico, identificado como micronúcleos, entonces se encontrará aumento de éstos en los eritrocitos de ratones expuestos por vía inhalada durante 4 semanas.
- Si el pentóxido de vanadio (0.02 M), el cloruro de manganeso (0.02 M) o la mezcla de los compuestos (0.02 M), son capaces de producir alteraciones en la eritropoyesis o son compuestos citotóxicos entonces se observarán cambios en el número de eritrocitos policromáticos de los ratones expuestos.
- Si el estado hormonal de los ratones es un factor importante para la respuesta, entonces se encontrarán diferencias entre los ratones prepúberes y adultos expuestos al mismo compuesto.
- Si el género es un factor importante, entonces se observarán diferencias entre los machos y las hembras expuestos al mismo compuesto.
- Si los compuestos se comportan en el organismo de manera diferente (sinergismo, antagonismo, aditivismo), entonces se notarán diferencias entre los grupos de exposición.

## 5. Objetivo general

Determinar y comparar, mediante el ensayo de micronúcleos, los efectos sobre los eritrocitos policromáticos de ratones prepúberes y adultos, tanto en hembras como en machos, expuestos durante 4 semanas a pentóxido de vanadio (0.02M), cloruro de manganeso (0.02) o la mezcla de los compuestos por vía inhalada, así como evaluar los parámetros antes mencionados, durante 1, 2 y 3 meses post-exposición (recuperación).

### 5.1. Objetivos particulares

En los eritrocitos de ratones prepúberes y adultos tanto en hembras como en machos, expuestos a la inhalación de  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y posteriormente, durante el período de recuperación:

1. Determinar el efecto genotóxico de los compuestos mediante el ensayo de micronúcleos.
2. Determinar la citotoxicidad de los tres compuestos.
3. Comparar por edad: la presencia de micronúcleos y los cambios cuantitativos de los eritrocitos policromáticos.
4. Comparar por género: la presencia de micronúcleos y los cambios cuantitativos de los eritrocitos policromáticos.
5. Comparar los efectos de los tres compuestos sobre los distintos grupos expuestos.

## 6. Método

### 6.1. Selección de grupos expuestos

Se emplearon ratones hembras y machos de la cepa CD-1. La selección de edades se consideró con respecto a las etapas de vida del ratón y de acuerdo a Saiz y colaboradores (1983).

Se eligieron ratones prepúberes (30 días de edad) y adultos (60 días, edad de la primera cubrición); con estas diferencias de edad, se asegura que los ratones prepúberes no presenten los cambios hormonales propios de la madurez sexual, y de este modo, tratar de omitir los efectos de las hormonas (testosterona y estrógenos) en esos grupos expuestos. Por otro lado, los ratones de 60 días, son considerados como animales sexualmente maduros que son totalmente aptos para la reproducción, lo cual indica que se encuentran en un momento en el que sus hormonas sexuales están en niveles óptimos.

Se emplearon 16 grupos de 6 ratones cada uno. De los cuales: 8 grupos fueron de hembras y 8 de machos. De los 8 grupos de hembras o machos, 4 fueron de animales prepúberes y 4 de adultos. De éstos, cada subgrupo inhaló:  $V_2O_5$ [0.02M],  $MnCl_2$ [0.02M],  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ [0.02M] (grupos expuestos) o agua desionizada (grupo testigo).

En todos los casos, los animales experimentales se mantuvieron en condiciones de luz-oscuridad (12:12 h) con agua y alimentación *ad libitum*.

### 6.2. Esquema de inhalación

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

Transcurridas las primeras 24 h y cada 7 días (durante la exposición) y posteriormente cada 30, 60 y 90 días de post-exposición, se tomó por corte de la vena caudal una pequeña muestra de sangre entera (7.5  $\mu$ L) de 5 ratones de cada grupo. Las muestras de sangre se procesaron para el ensayo de micronúcleos con naranja de acridina (Figura 2).

### 6.3. Ensayo de micronúcleos

El ensayo de micronúcleos con laminillas cubiertas con naranja de acridina (NA) se llevó a cabo de acuerdo con Hayashi y colaboradores (1990) y Hayashi y Krishna (2000) con algunas modificaciones.

*Preparación de laminillas:* El fluorocromo (NA) se disolvió en agua destilada (1mg/ml). Una pequeña cantidad de la solución de NA (10  $\mu$ L) se extendió sobre una laminilla precalentada ( $\sim 70^\circ\text{C}$ ) y libre de impurezas. Las laminillas cubiertas con NA se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar seco hasta que se utilizaron (Figura 3).

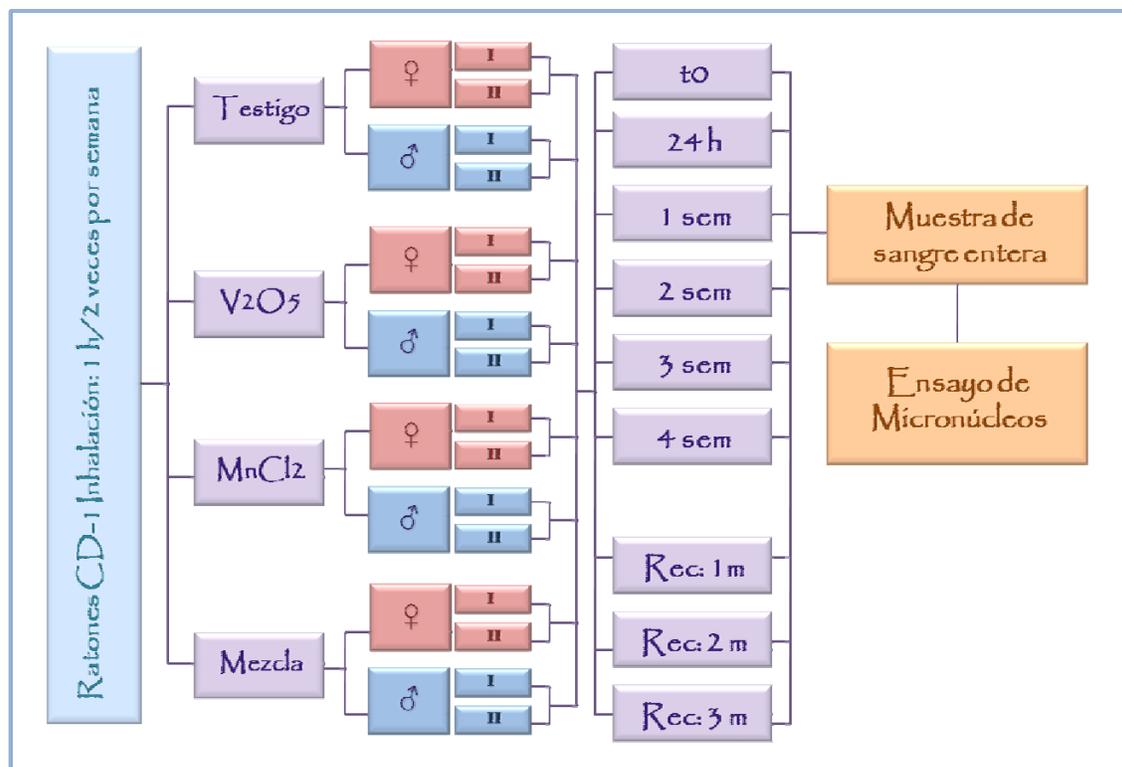
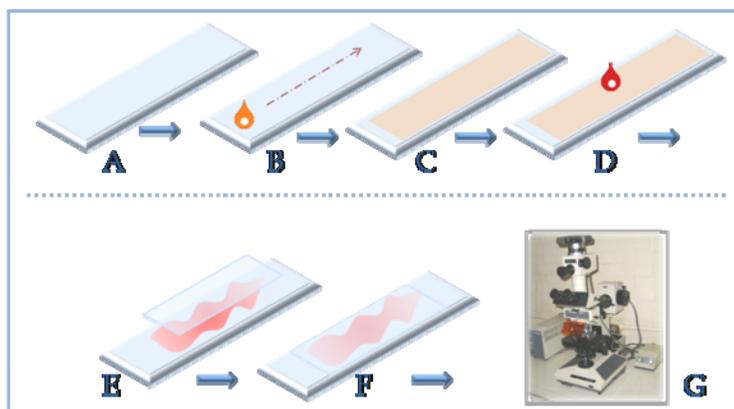


Figura 2. Representación esquemática del método.

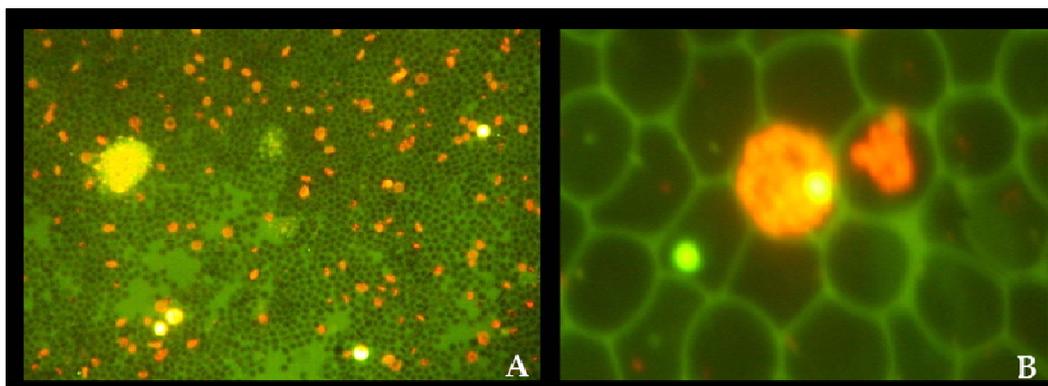
*Preparación de muestras:* La sangre periférica fue obtenida por corte de la vena caudal del ratón y se recolectó con una micropipeta. 5  $\mu$ L de sangre fueron colocados en el centro de una laminilla cubierta con NA y se cubrió con un cubreobjetos; cada muestra se realizó por duplicado. Las preparaciones se colocaron en cajas portalaminillas y se mantuvieron a 4°C durante al menos 24 h (para maximizar la tinción) y hasta 3 días. Las laminillas no pueden ser almacenadas por largos períodos, así que se analizaron a la brevedad, dentro de las 48 a 72 hrs siguientes (Figura 3).

*Microscopía de fluorescencia:* Una región adecuada de la preparación se seleccionó con un objetivo de bajo aumento (20X) antes de comenzar la cuantificación de los micronúcleos que se realizó con un objetivo de mayor aumento (100X). En la preparación se observaron: i) células intactas, ii) el núcleo de los leucocitos exhibiendo fluorescencia verde-amarilla y iii) la estructura reticular de los reticulocitos (eritrocitos policromáticos) con fluorescencia rojo-naranja. Los eritrocitos que presenten en su citoplasma sólo puntos rojos, no son considerados ya como reticulocitos. Por otro lado, el reconocimiento de un micronúcleo es sencillo: presentan forma redonda y muestran una fuerte fluorescencia verde-amarilla. La observación fue hecha con un microscopio de fluorescencia Olympus equipado con un filtro de excitación azul y un filtro barrera de 515-530 nm.

*Cuantificación de MNs y EPCs:* A 5 animales por cada condición se les tomó muestra. Por cada 1000 eritrocitos se cuantificó el número de eritrocitos policromáticos. De esta manera se obtuvo la proporción de EPC de los individuos. Posteriormente, 2000 EPC fueron contados y de éstos, cuántos micronúcleos fueron observados, de esta manera se obtuvo el número de MN presentes en los EPC (Figura 4).



**Figura 3.** Método para realizar preparaciones de laminillas cubiertas con naranja de acridina. A) Laminilla precalentada, B) Naranja de acridina, C) Laminilla cubierta con naranja de acridina, D) Muestra de sangre, E) Cubreobjetos, F) Muestra fluorescente durante 24 h, G) Microscopía de fluorescencia.



**Figura 4.** Observación al microscopio de fluorescencia. A) Conteo de eritrocitos policromáticos y B) Conteo de micronúcleos. En ambas fotomicrografías, observe la tinción diferencial de los eritrocitos con la tinción supravital de naranja de acridina: eritrocitos maduros o eritrocitos ormocromáticos (negros), reticulocitos o eritrocitos policromáticos (rojos), en el citoplasma de un EPC se observa un micronúcleo (amarillo-limón).

#### 6.4. Análisis Estadístico

Las diferencias significativas para cada grupo fueron determinadas por pruebas de ANOVA utilizando la prueba post-hoc Holm-Sidak (en el caso de las comparaciones entre el tiempo cero y el tiempo de exposición/recuperación, asimismo en las comparaciones por grupo de exposición). Para el caso de las comparaciones por género y edad, se empleó la prueba t-student (2 colas), para ambas pruebas se utilizó el paquete estadístico SigmaStat versión 3.1 para Windows.

En todos los experimentos los datos fueron reportados como Media  $\pm$  Error Estándar y los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

## 7. Resultados

### 7.1. Comparación entre el tiempo de exposición/recuperación y el tiempo cero

#### 7.1.1. Pentóxido de Vanadio ( $V_2O_5$ )

##### a) Hembras prepúberes

###### i) Micronúcleos

Los resultados obtenidos con el ensayo de micronúcleos muestran, que el número de MN presentes en los eritrocitos policromáticos (EPC) aumentó significativamente durante las 4 semanas de exposición (excepto en la semana 1), y posteriormente, no existe diferencia significativa entre ellos y el tiempo 0 durante los 3 meses de recuperación (Figura 5A).

###### ii) Eritrocitos Policromáticos

El número de EPC disminuyó significativamente a partir de las 24 h hasta la semana 4 de exposición, patrón que se repitió durante los 3 meses de recuperación (Figura 5B).

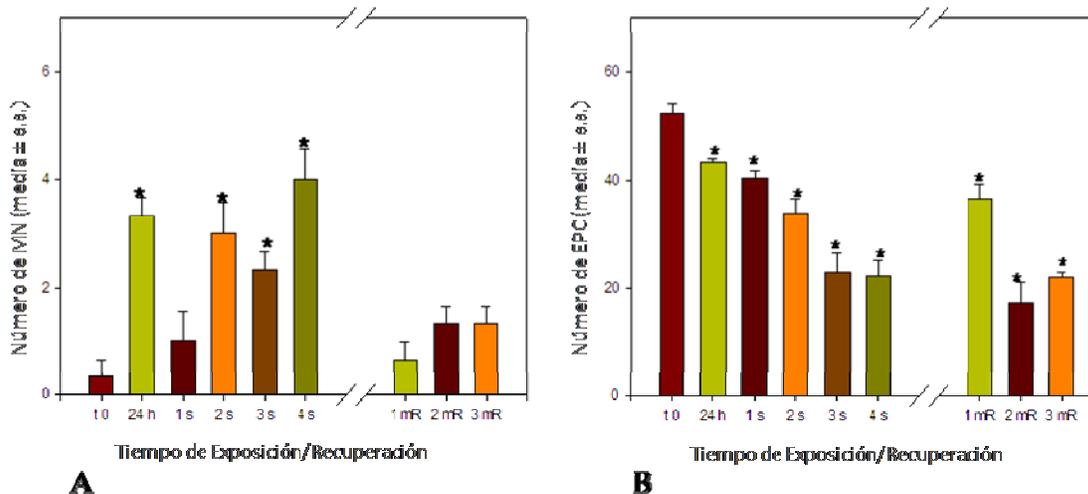


Figura 5. En A) Número de micronúcleos (MN) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos, de las hembras prepúberes expuestas a  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\* $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak).

##### b) Hembras adultas

###### i) Micronúcleos

No se observó diferencia significativa en el número de MN durante la exposición y de igual manera durante el período de recuperación (Figura 6A).

###### ii) Eritrocitos policromáticos

Se observa decremento significativo en el número de EPC durante el tiempo de exposición y el de recuperación, sin embargo durante el primer mes de recuperación se nota incremento significativo comparado con la semana 4 de exposición y los meses 2 y 3 de recuperación. No obstante, en todos los tiempos la diferencia con respecto al tiempo 0 es significativa (Figura 6B).

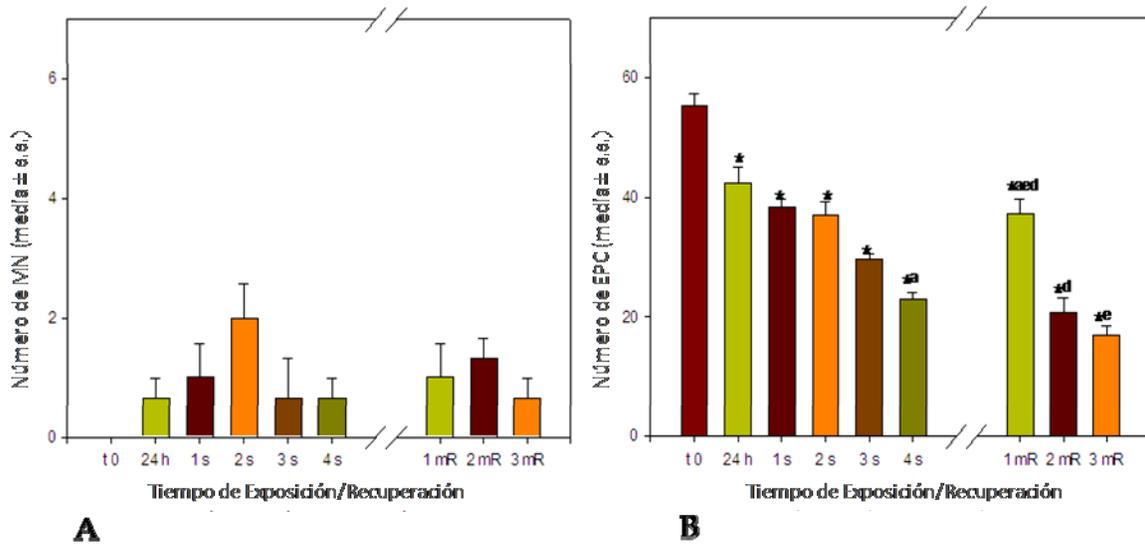


Figura 6. En A) Número de micronúcleos (MN) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos (EPCs), de las hembras adultas expuestas a  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak en donde: a= 4ª sem  $\neq$  1mR, b= 4ª sem  $\neq$  2mR, c= 4ª sem  $\neq$  3mR, d= 1mR  $\neq$  2mR, e= 1mR  $\neq$  3mR).

### c) Machos prepúberes

#### i) Micronúcleos

Se presenta aumento significativo en el número de MNs durante el tiempo de exposición y durante el período de recuperación (Figura 7A).

#### ii) Eritrocitos policromáticos

Se observa decremento significativo y progresivo del número de EPCs a partir de las 24 h de exposición y hasta los 3 meses de recuperación (Figura 7B).

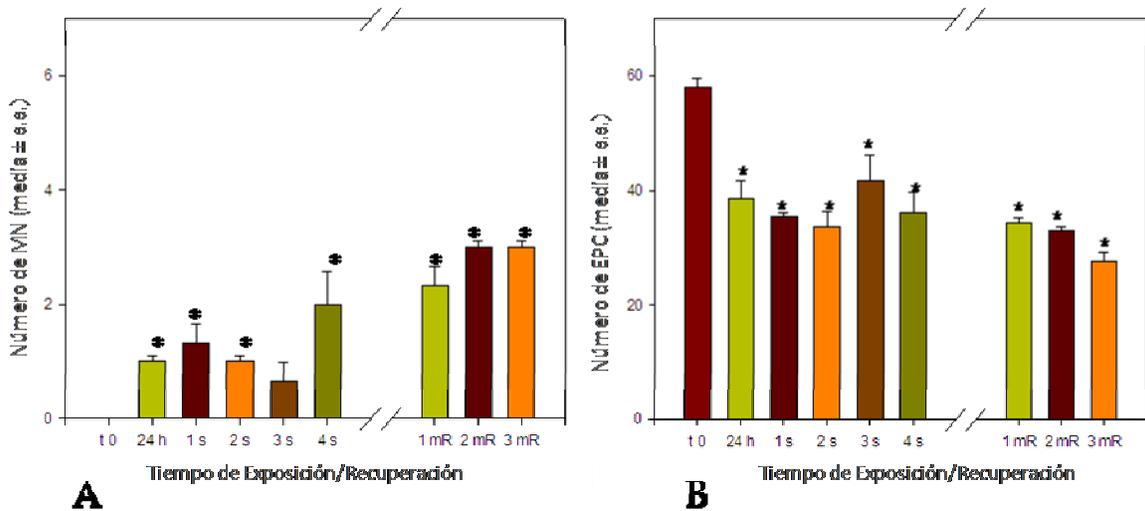


Figura 7. En A) Número de micronúcleos (MNs) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos, de los machos prepúberes expuestas a  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak).

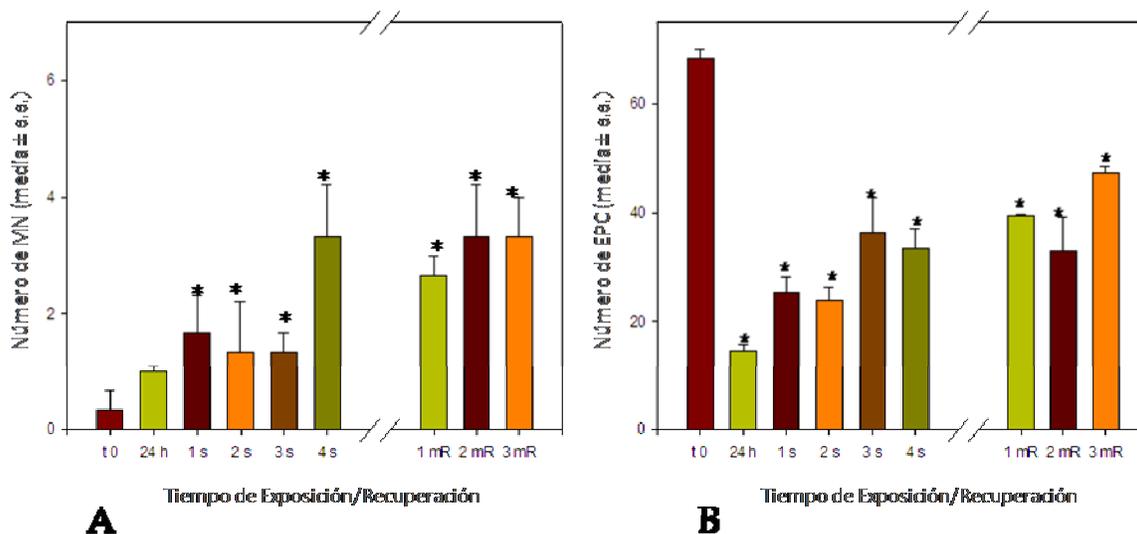
#### d) Machos adultos

##### i) Micronúcleos

Se observa aumento significativo en el número de MNs a partir de la semana 1 de exposición y, de igual manera, durante los 3 meses de recuperación (Figura 8A).

##### ii) Eritrocitos policromáticos

Durante la exposición y la recuperación se encontró disminución significativa del número de EPCs de los ratones expuestos en comparación con el tiempo cero. Se observa una caída drástica en las primeras 24 h de exposición y posterior aumento paulatino durante el resto del tiempo, hasta llegar al valor más alto en el mes 3 de recuperación, pero sin alcanzar los valores del tiempo cero (Figura 8B).



**Figura 8.** En A) Número de micronúcleos (MNs) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos, de los machos adultos expuestas a  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak).

## 7.1.2. Cloruro de Manganeso (MnCl<sub>2</sub>)

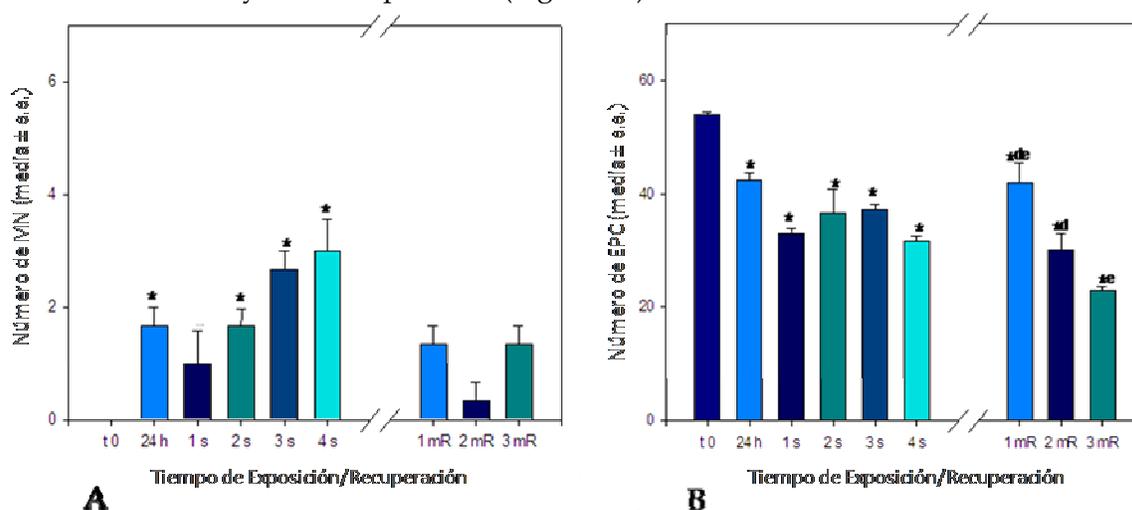
### a) Hembras prepúberes

#### i) Micronúcleos

Se observa aumento significativo a partir de las 24 h de y hasta las 4 semanas de exposición, sin embargo durante los 3 meses de recuperación los valores no son significativamente diferentes al tiempo cero (Figura 9A).

#### ii) Eritrocitos policromáticos

Se observa decremento significativo y progresivo a partir de las 24 h y hasta la semana 4 de exposición, con un ligero aumento durante el mes 1 disminuyendo posteriormente durante los meses 2 y 3 de recuperación (Figura 9B).



**Figura 9.** En A) Número de micronúcleos (MNs) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos, de las hembras prepúberes expuestas a MnCl<sub>2</sub> durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\* P<0.05, ANOVA- Holm-Sidak en donde: a= 4ª sem ≠ 1mR, b= 4ª sem ≠ 2mR, c= 4ª sem ≠ 3mR, d= 1mR ≠ 2mR, e= 1mR ≠ 3mR).

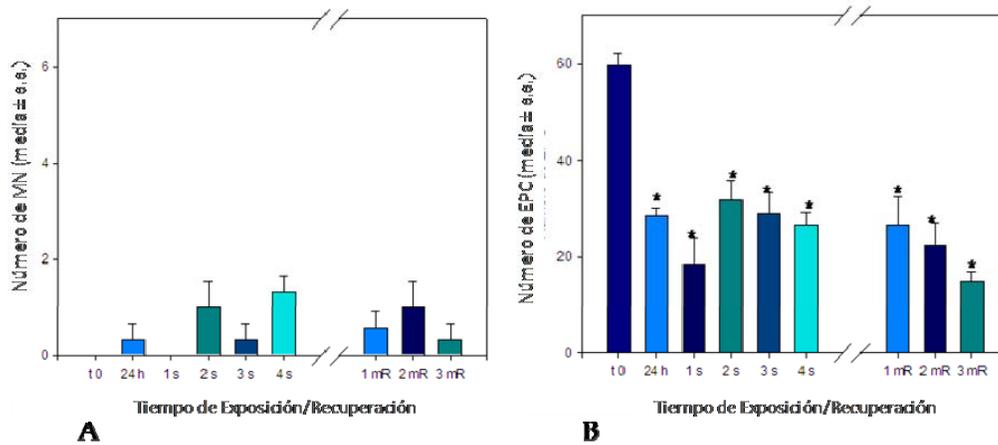
### b) Hembras adultas

#### i) Micronúcleos

No se presenta diferencia significativa entre el tiempo cero, la exposición y la recuperación de las hembras adultas que inhalaban MnCl<sub>2</sub> (Figura 10A).

#### ii) Eritrocitos policromáticos

Se observa disminución significativa y progresiva a partir de las 24 h de exposición y hasta los 3 meses de recuperación, alcanzando en ese tiempo, su valor más bajo (Figura 10B).



**Figura 10.** En A) Número de Micronúcleos (MNs) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos, de las hembras adultas expuestas a  $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak).

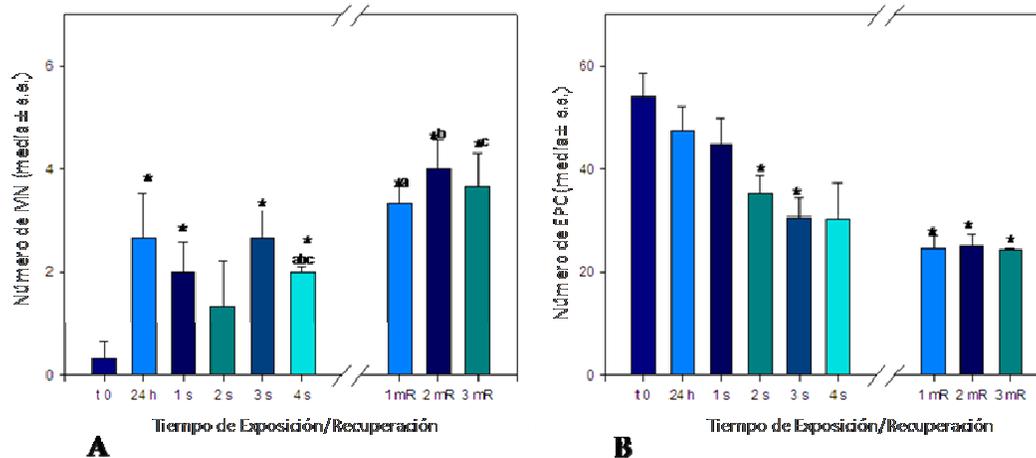
### c) Machos prepúberes

#### i) Micronúcleos

Se observa aumento significativo en el número de micronúcleos durante el tiempo de exposición y el período de recuperación. En los meses 1, 2 y 3 de recuperación se observa aumento significativo comparado con la semana 4 de exposición (Figura 11A).

#### ii) Eritrocitos Policromáticos

Se observa disminución progresiva y significativa desde la semana 2 de exposición y durante todo el período de recuperación, en éste último se observa que el número de EPCs se mantiene constante (Figura 11B).



**Figura 11.** En A) Número de micronúcleos (MNs) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos, de los machos prepúberes expuestos a  $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak en donde: a= 4ª sem  $\neq$  1mR, b= 4ª sem  $\neq$  2mR, c= 4ª sem  $\neq$  3mR, d= 1mR  $\neq$  2mR, e= 1mR  $\neq$  3mR).

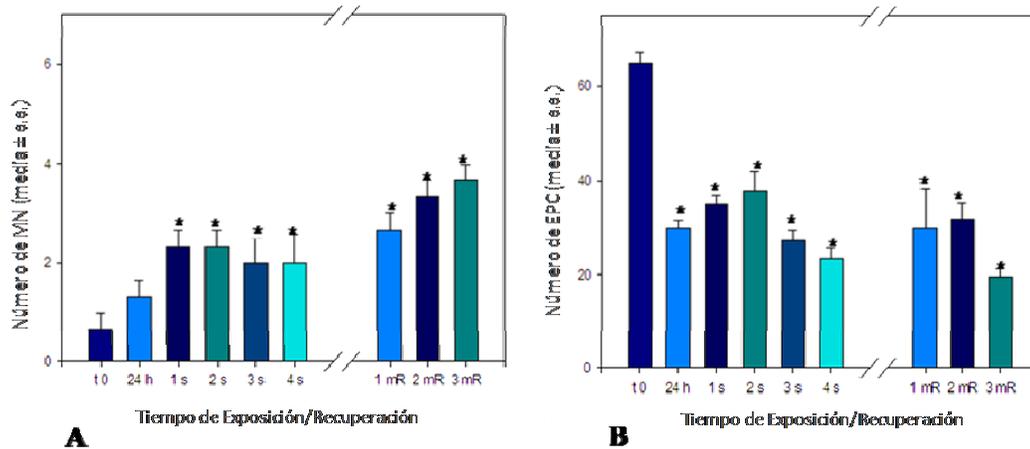
#### d) Machos adultos

##### i) Micronúcleos

Se observa aumento significativo y constante a partir de la semana 1 de exposición. Durante el período de recuperación se presenta aumento significativo y progresivo desde el mes 1 hasta el mes 3 (Figura 12A).

##### ii) Eritrocitos policromáticos

El número de EPCs disminuye significativamente a partir de las primeras 24 h de exposición. En el conteo, se observa el valor mínimo durante el mes 3 de recuperación (Figura 12B).



**Figura 12.** En A) Número de micronúcleos (MNs) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos, de los machos adultos expuestos a  $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak).

### 7.1.3. Mezcla: Pentóxido de Vanadio-Cloruro de Manganeso ( $V_2O_5$ - $MnCl_2$ )

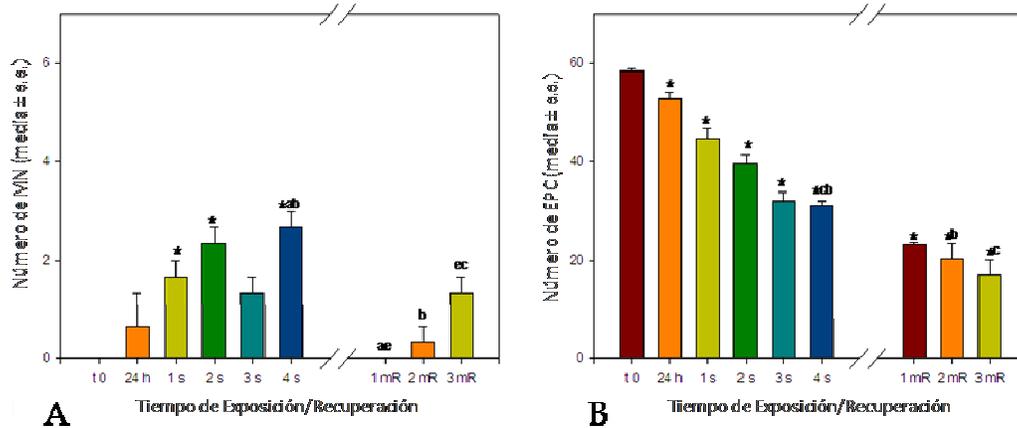
#### a) Hembras prepúberes

##### i) Micronúcleos

Se observa aumento significativo durante las semanas 1, 2 y 4 de exposición, el pico máximo del número de MNs se presenta durante la semana 4, sin embargo, durante el tiempo de recuperación no se observa diferencia significativa con el tiempo cero pero sí con respecto a la semana 4 de exposición (Figura 13A).

##### ii) Eritrocitos policromáticos

Se observa disminución significativa y progresiva tanto en el tiempo de exposición como en el de recuperación. Durante los meses 2 y 3 de recuperación se presenta disminución significativa con respecto a la semana 4 de exposición (Figura 13B).



**Figura 13.** En A) Número de micronúcleos (MNs) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos, de las hembras prepúberes expuestas a la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak en donde: a= 4ª sem  $\neq$  1mR, b= 4ª sem  $\neq$  2mR, c= 4ª sem  $\neq$  3mR, d= 1mR  $\neq$  2mR, e= 1mR  $\neq$  3mR).

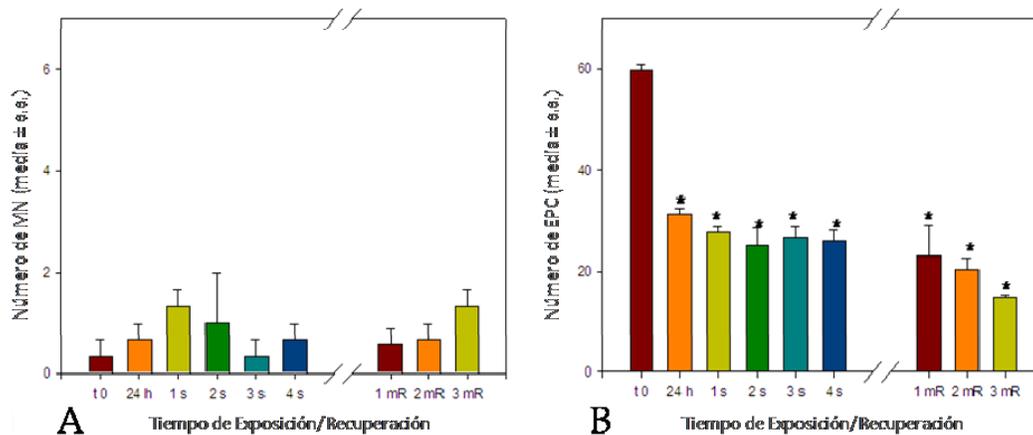
#### b) Hembras adultas

##### i) Micronúcleos

No se observan cambios significativos durante el período de exposición, de igual manera sucede en el período de recuperación (Figura 14A).

##### ii) Eritrocitos policromáticos

Se presenta disminución significativa que se mantiene relativamente constante durante el período de exposición, esta disminución se presenta de manera progresiva durante el período de recuperación (Figura 14B).



**Figura 14.** En A) Número de micronúcleos (MNs) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos, de las hembras adultas expuestas a la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak).

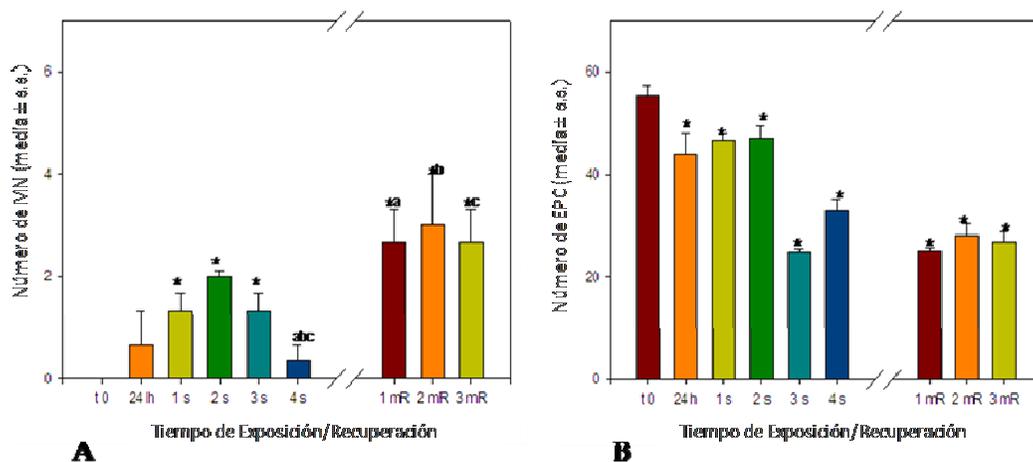
### c) Machos prepúberes

#### i) Micronúcleos

Se observa aumento significativo durante las semanas 1, 2 y 3 durante la exposición, y el período de recuperación, es diferente tanto al tiempo cero así como a la semana 4 de exposición (Figura 15A).

#### ii) Eritrocitos policromáticos

Se presenta disminución significativa a partir de las primeras 24 h de exposición hasta los 3 meses de recuperación, siendo esta disminución más evidente en el período de recuperación (Figura 15B).



**Figura 15.** En A) Número de micronúcleos (MNs) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos, de los machos prepúberes expuestos a la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak en donde: a= 4<sup>a</sup> sem  $\neq$  1mR, b= 4<sup>a</sup> sem  $\neq$  2mR, c= 4<sup>a</sup> sem  $\neq$  3mR, d= 1mR  $\neq$  2mR, e= 1mR  $\neq$  3mR).

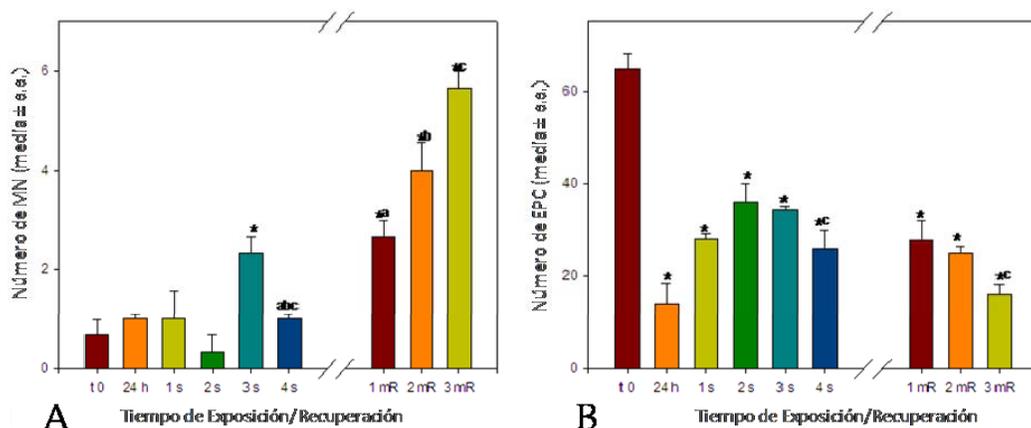
#### d) Machos adultos

##### i) Micronúcleos

Se observa aumento significativo y progresivo durante los meses 1, 2 y 3 de recuperación, siendo diferentes estadísticamente a la semana 4 de exposición (Figura 16A).

##### ii) Eritrocitos policromáticos

Se observa decremento significativo y drástico a partir de las primeras 24 horas de exposición, que aumenta ligeramente durante la exposición sólo para decaer de nuevo durante el tiempo de recuperación (Figura 16B).



**Figura 16.** En A) Número de micronúcleos (MNs) presentes en los EPCs y en B) Número de eritrocitos policromáticos, de los machos adultos expuestos a la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak en donde: a= 4ª sem  $\neq$  1mR, b= 4ª sem  $\neq$  2mR, c= 4ª sem  $\neq$  3mR, d= 1mR  $\neq$  2mR, e= 1mR  $\neq$  3mR).

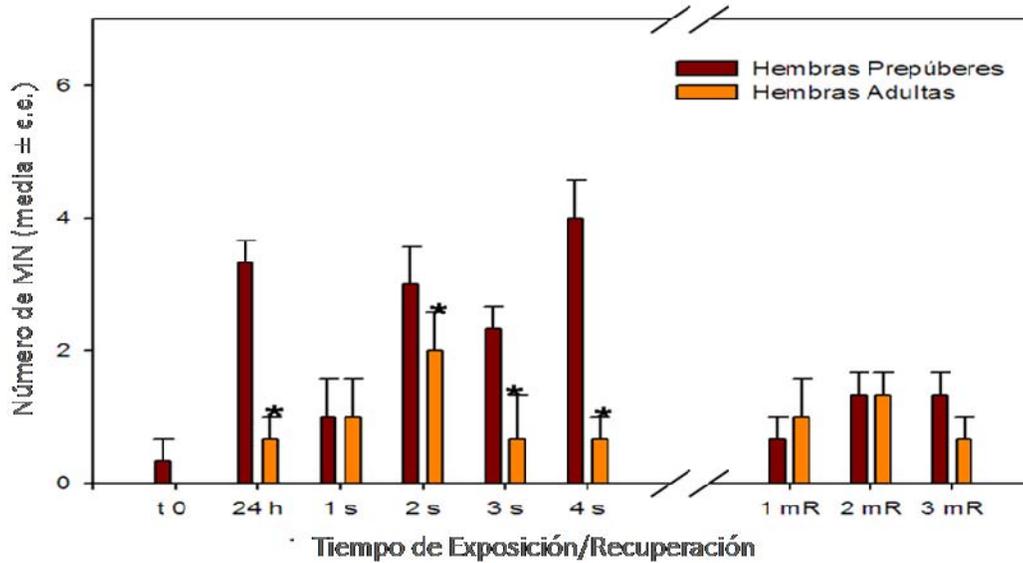
## 7.2. Comparación por Edad: Prepúberes vs Adultos

### 7.2.1. Hembras

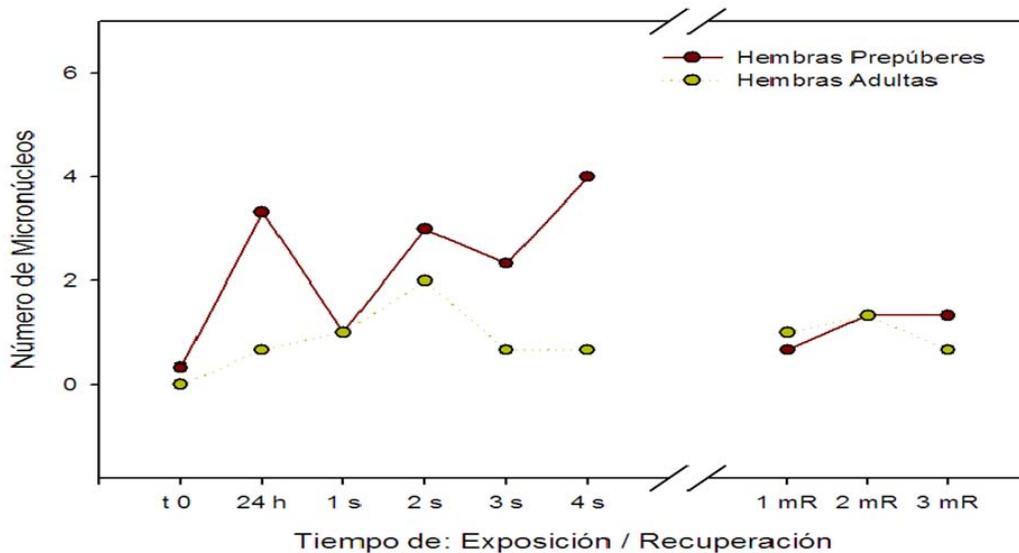
#### a) Pentóxido de Vanadio ( $V_2O_5$ )

##### i) Micronúcleos

Se observó aumento significativo en el número de MNs presentes en las hembras prepúberes con respecto a las hembras adultas que inhalaban  $V_2O_5$ , desde las primeras 24 h hasta las 4 semanas de exposición. Sin embargo, durante los 3 meses de recuperación, no se observó diferencia significativa entre ambos grupos (Figuras 17 y 18).



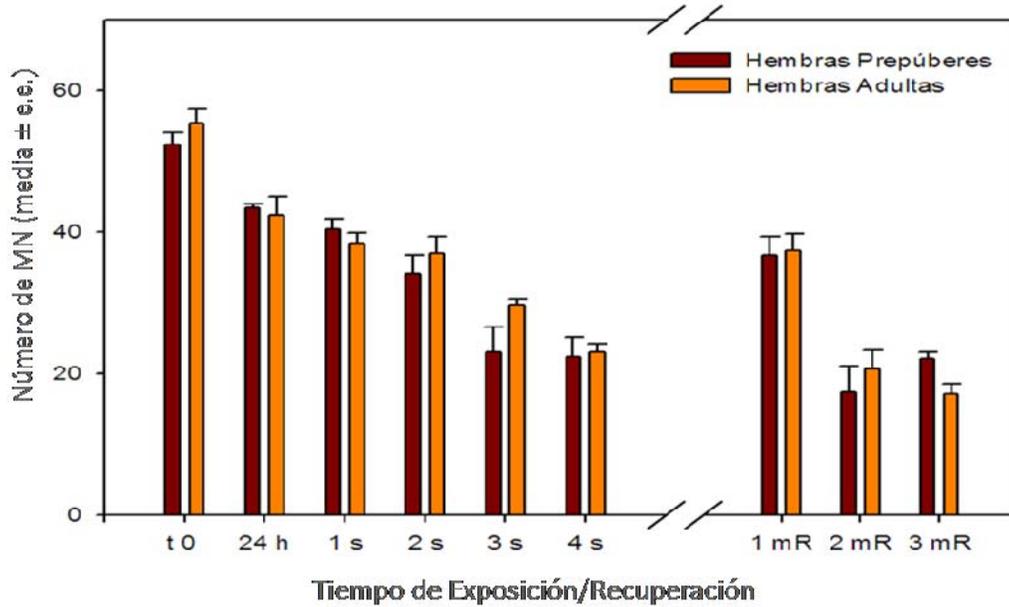
**Figura 17.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de MNs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaban  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\* $P < 0.05$  t-test).



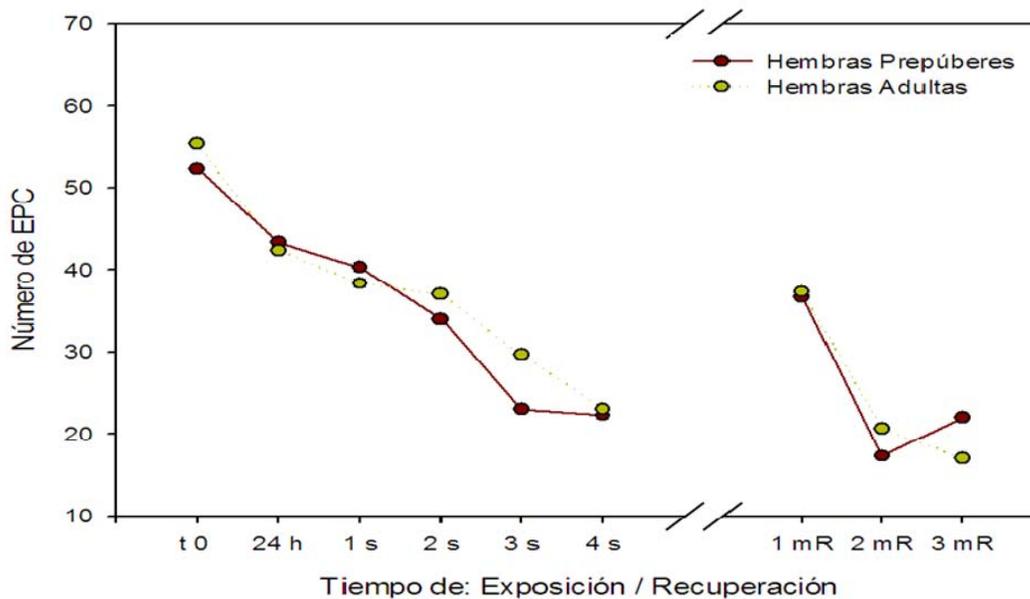
**Figura 18.** Media del número de MNs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaban  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

ii) Eritrocitos policromáticos:

No se observó diferencia significativa entre las hembras adultas y las prepúberes que inhalaron  $V_2O_5$ , ni durante las 4 semanas de exposición ni durante el período de 3 meses de recuperación. La disminución en el conteo de EPCs es constante y progresiva en ambas edades (Figuras 19 y 20).



**Figura 19.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaron  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\* $P < 0.05$  t-test).

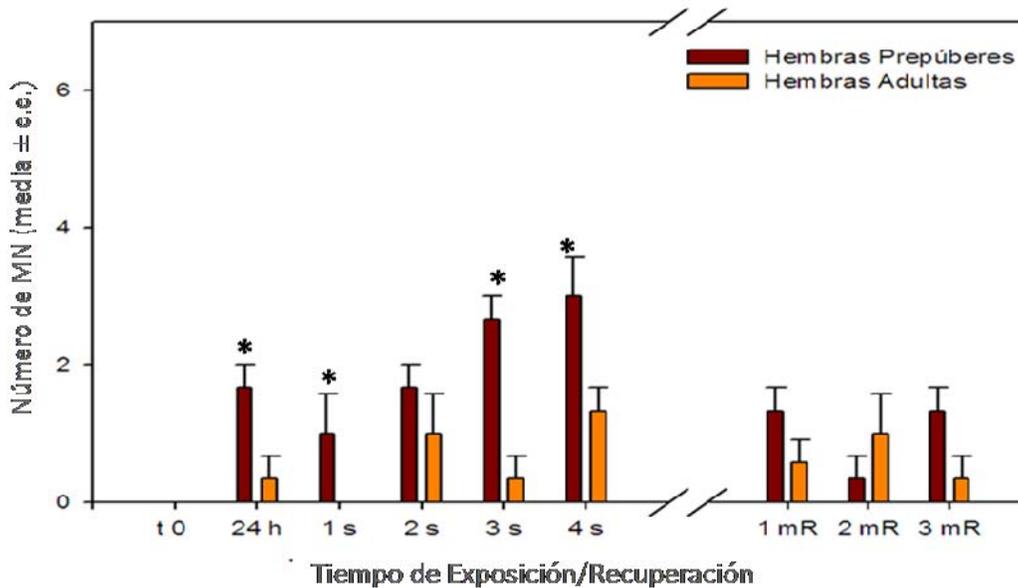


**Figura 20.** Media del número de EPCs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaron  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

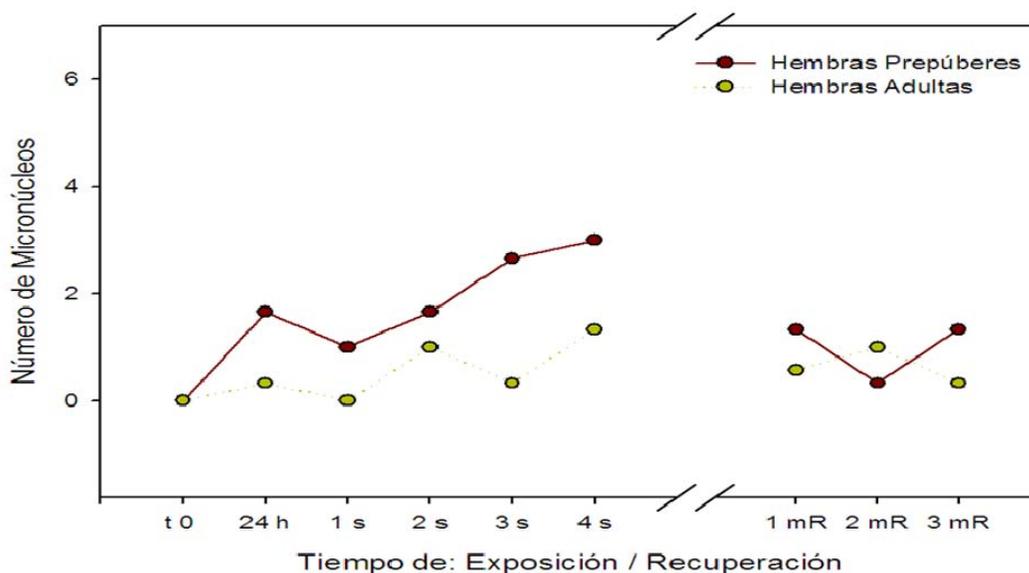
## b) Cloruro de Manganeso (MnCl<sub>2</sub>)

### i) Micronúcleos

Se observó diferencia significativa del número de MNs presentes en los EPCs de las hembras prepúberes con respecto a las adultas que inhalaron MnCl<sub>2</sub> a partir de los primeros 24 h y hasta 4 semanas de exposición. Sin embargo, durante el período de recuperación, no existe diferencia entre ambos grupos (Figuras 21 y 22).



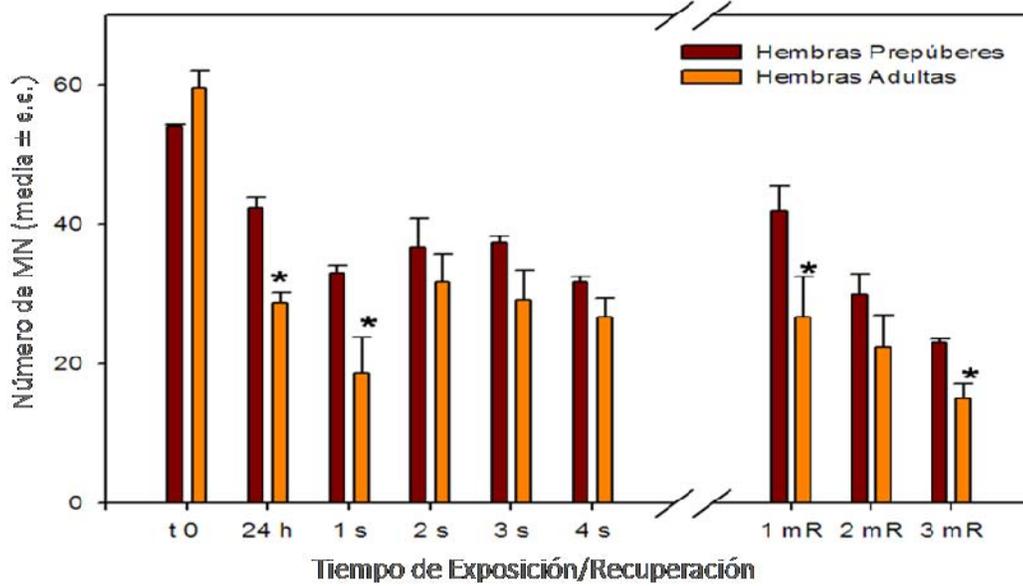
**Figura 21.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de MNs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaron MnCl<sub>2</sub> durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\* P<0.05 t-test).



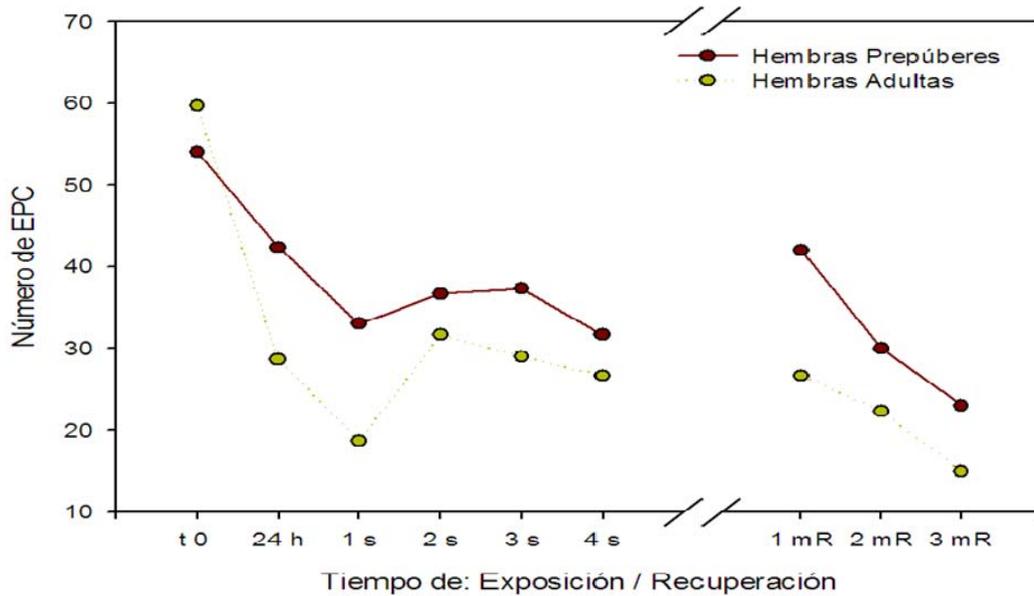
**Figura 22.** Media del número de MNs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaron MnCl<sub>2</sub> durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

ii) *Eritrocitos policromáticos*

Se observó disminución significativa en el número de EPCs de las hembras adultas con respecto a las hembras prepúberes que inhalaban  $MnCl_2$  en las primeras 24 h y la semana 1 de exposición y posteriormente durante los meses 1 y 3 de recuperación (Figuras 23 y 24).



**Figura 23.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaban  $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$  t-test).



**Figura 24.** Media del número de EPCs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaban  $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

c) Mezcla: Pentóxido de Vanadio y Cloruro de Manganeso ( $V_2O_5$ - $MnCl_2$ )

i) Micronúcleos

Se observa que las hembras adultas presentan un número significativamente menor de MNs durante las semanas 3 y 4 de exposición con respecto a las hembras prepúberes. Sin embargo, durante los 3 meses de recuperación, no se observa diferencia entre ambos grupos (Figuras 25 y 26).

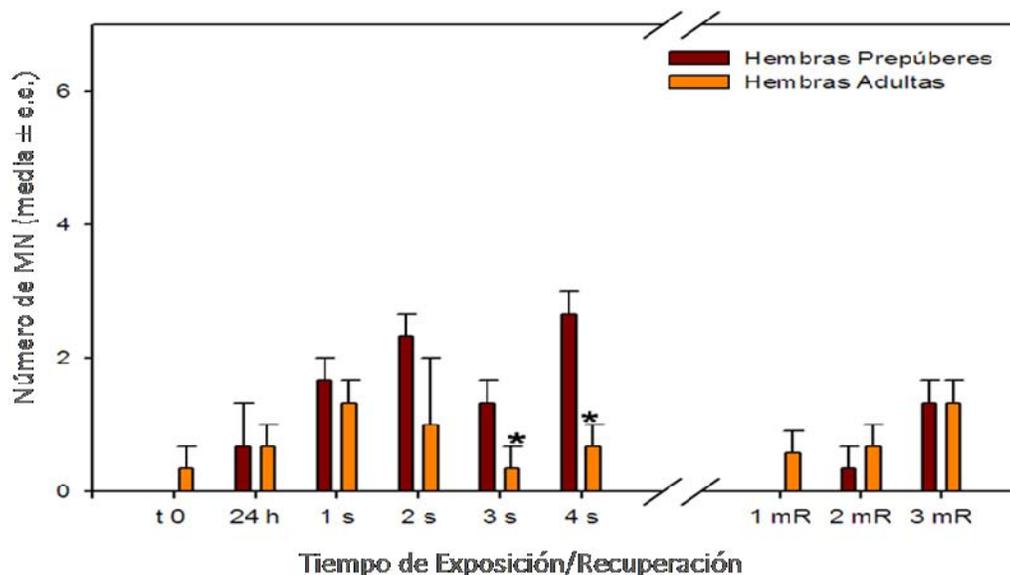


Figura 25. Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de MNs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaban la mezcla de los compuestos  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$  t-test).

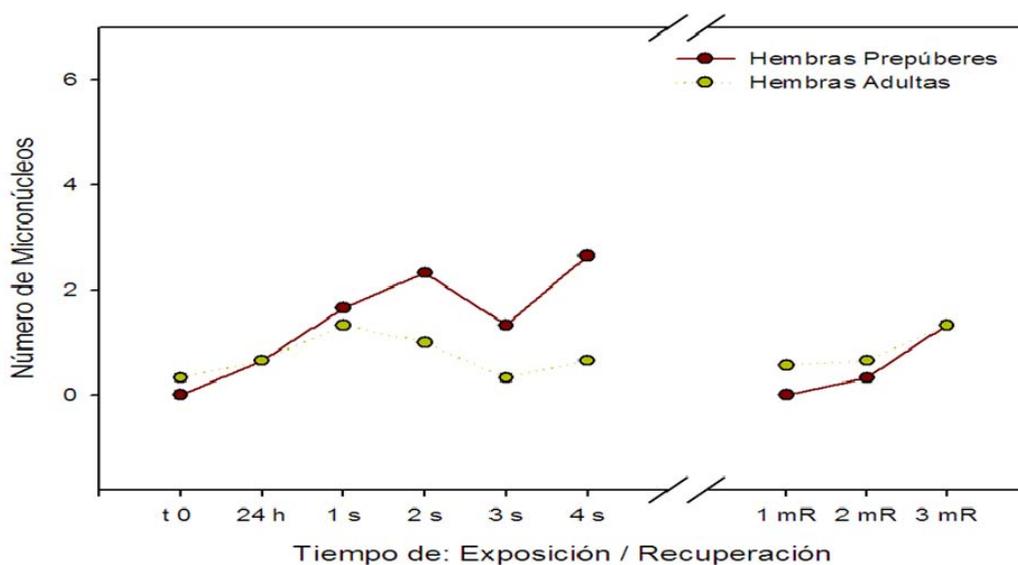
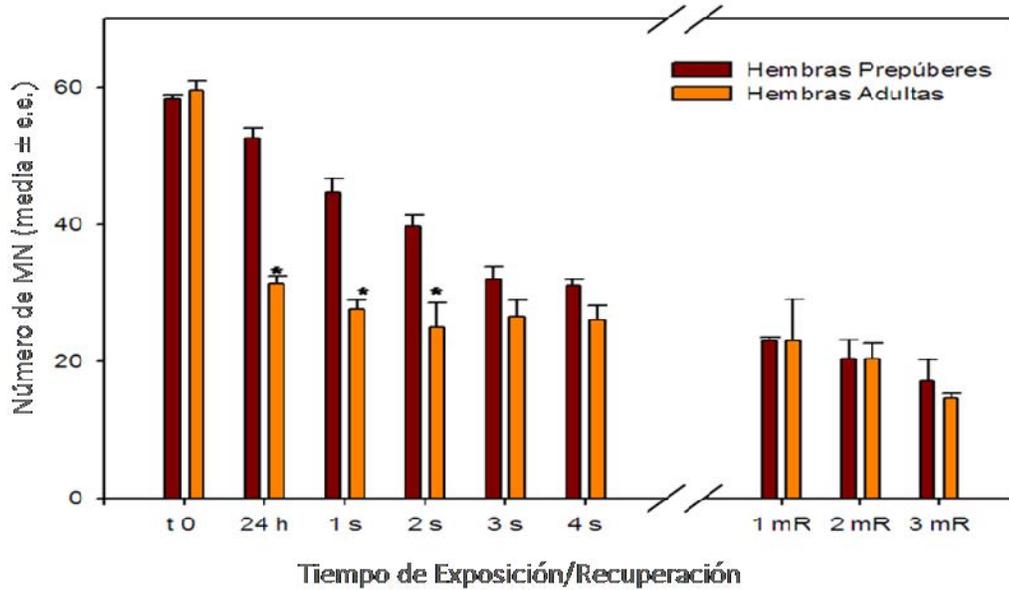


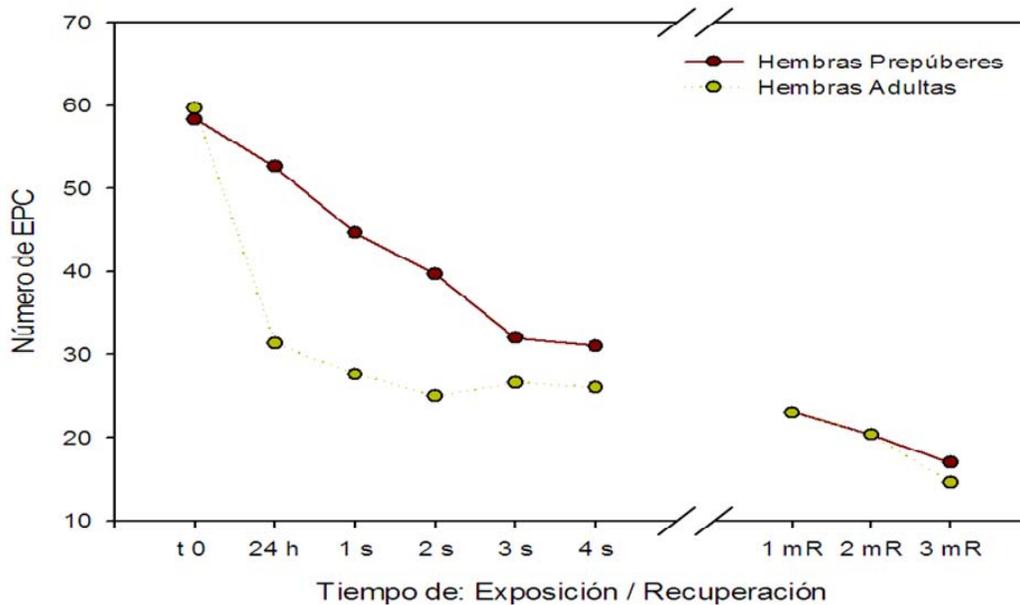
Figura 26. Media del número de MNs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaban  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

ii) Eritrocitos Policromáticos

Se observó disminución significativa del número de EPCs de las hembras adultas a partir de las primeras 24h y hasta la semana 2 de exposición, sin embargo esta diferencia desaparece durante el resto de la exposición y de igual manera, durante los 3 meses de recuperación (Figuras 27 y 28).



**Figura 27.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaban la mezcla de los compuestos  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$  t-test).



**Figura 28.** Media del número de EPCs presentes en las hembras prepúberes y las hembras adultas que inhalaban  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

## 7.2.2. Machos

### a) Pentóxido de Vanadio ( $V_2O_5$ )

#### i) Micronúcleos

No se observó diferencia significativa en el número de MNs de los ratones adultos y prepúberes expuestos a  $V_2O_5$  ni durante la exposición, ni en el período de recuperación. Se observa tendencia a aumentar en este parámetro durante el tiempo de recuperación para ambas edades (Figuras 29 y 30).

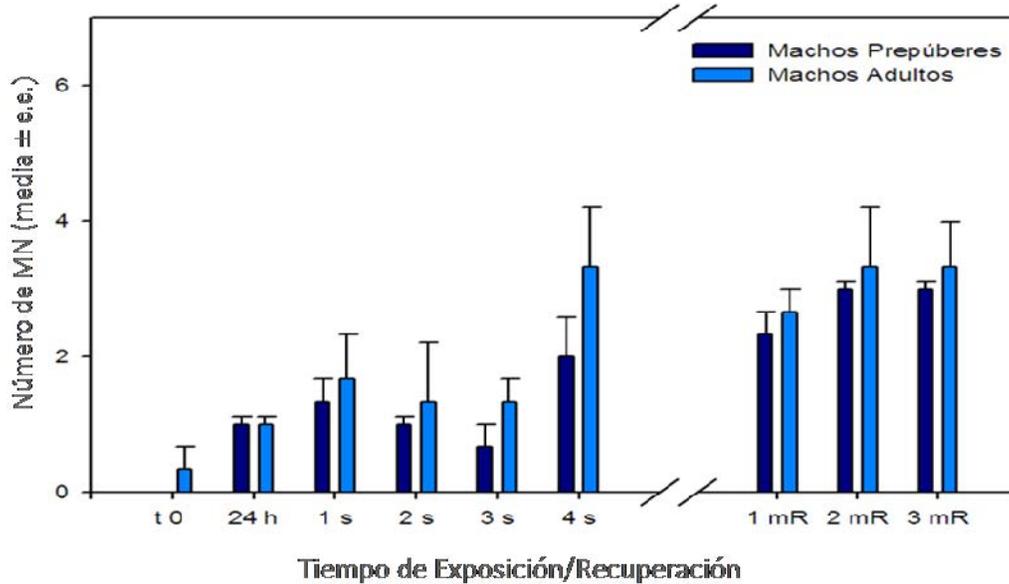


Figura 29. Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de MNs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalan  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$  t-test).

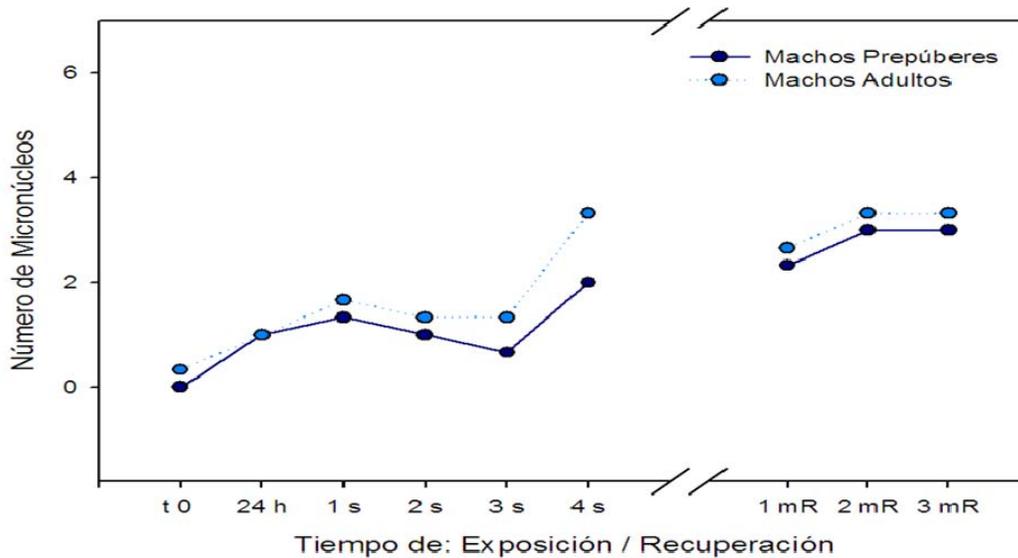
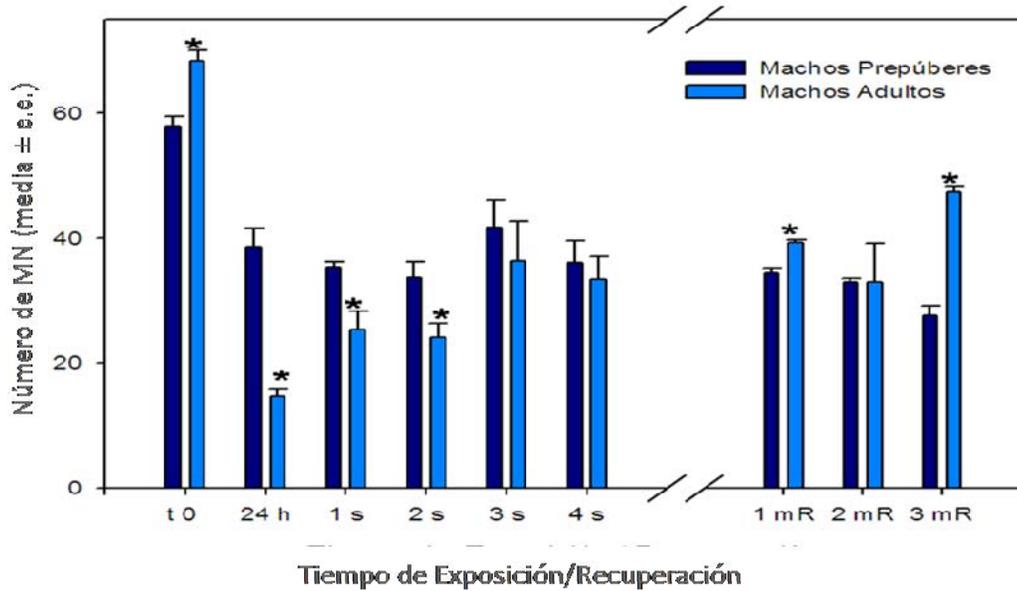


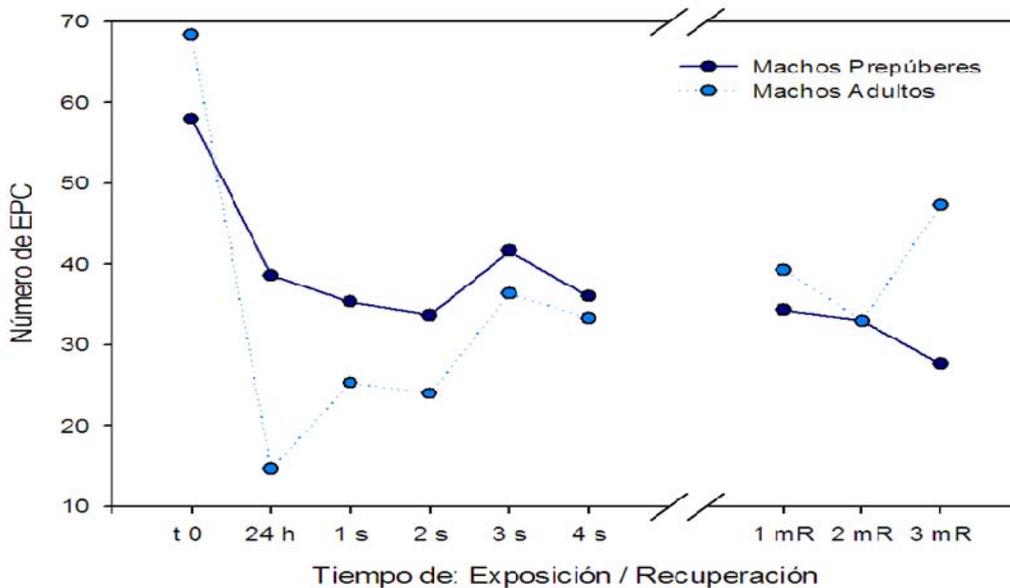
Figura 30. Media del número de MNs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalan  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

ii) Eritrocitos policromáticos

Durante las primeras 24 h, la semana 1 y 2 se observa disminución significativa del número de EPCs de los machos adultos con respecto a los prepúberes, sin embargo durante las semanas 3 y 4 esta diferencia desaparece. Posteriormente, durante el período de recuperación, se observa que los machos adultos presentan un número significativamente mayor de EPCs durante los meses 1 y 3 comparados con los machos prepúberes (Figuras 31 y 32).



**Figura 31.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalan  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\* $P < 0.05$  t-test).

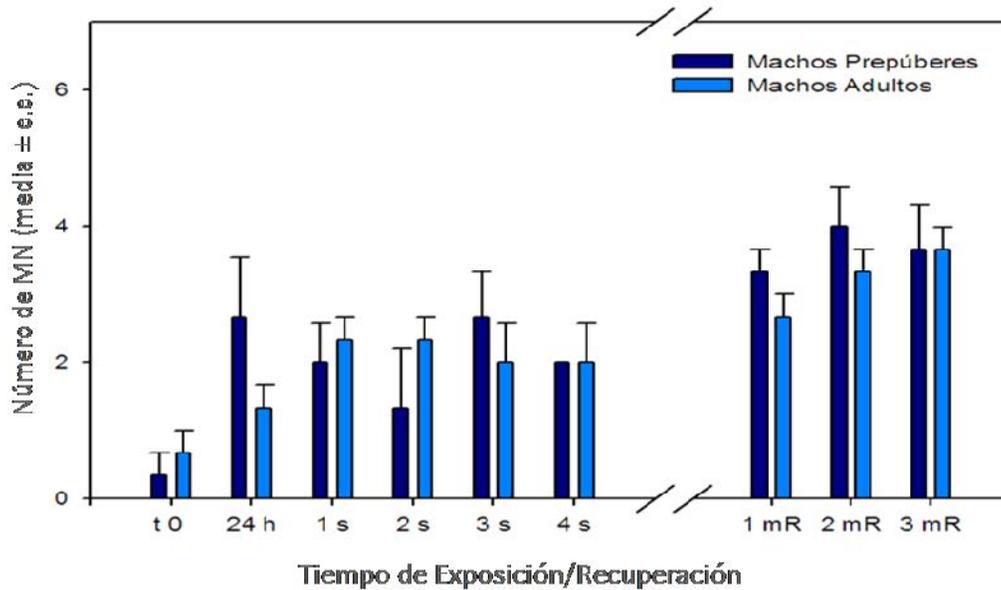


**Figura 32.** Media del número de EPCs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalan  $V_2O_5$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

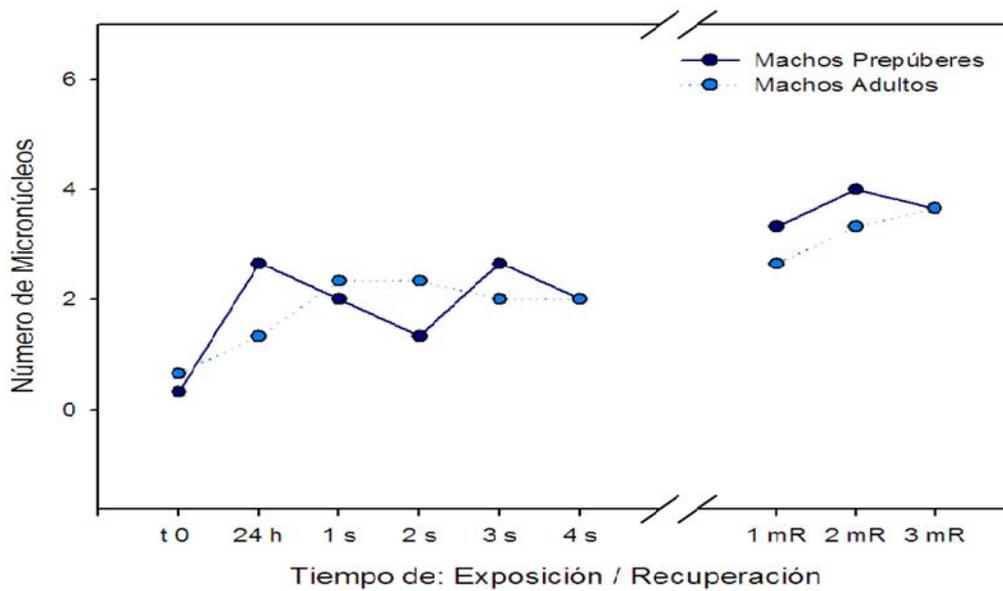
## b) Cloruro de Manganeso (MnCl<sub>2</sub>)

### i) Micronúcleos

No se observaron diferencias significativas en el número de MNs presentes en los EPCs de los ratones machos adultos y prepúberes que inhalaron MnCl<sub>2</sub> durante 4 semanas ni durante su posterior período de 3 meses de recuperación (Figuras 33 y 34).



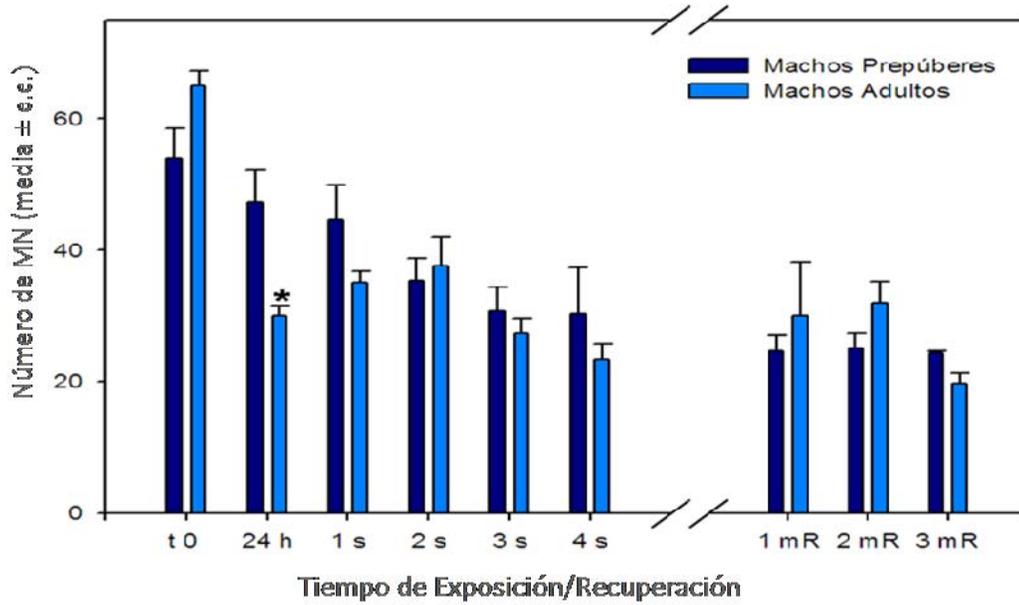
**Figura 33.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de MNs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalaron MnCl<sub>2</sub> durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$  t-test).



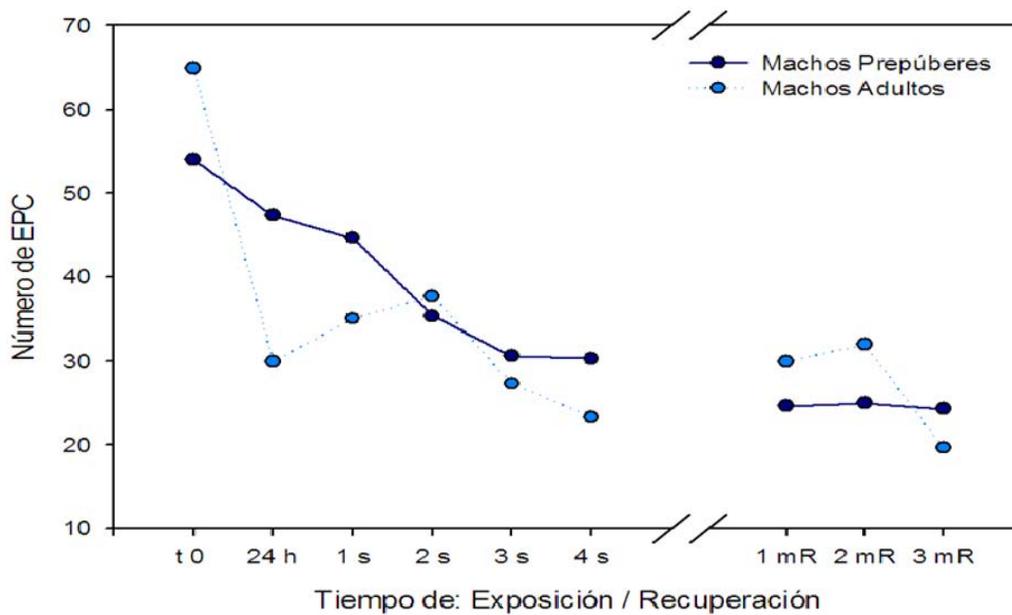
**Figura 34.** Media del número de MNs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalaron MnCl<sub>2</sub> durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

ii) Eritrocitos policromáticos

No se observó diferencia significativa en el número de EPCs de los machos prepúberes y adultos que inhalaron  $MnCl_2$ , durante las 4 semanas de exposición ni durante los 3 meses de recuperación (Figuras 35 y 36).



**Figura 35.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalaron  $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$  t-test).



**Figura 36.** Media del número de EPCs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalaron  $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

## b) Mezcla: Pentóxido de Vanadio y Cloruro de Manganeso ( $V_2O_5$ - $MnCl_2$ )

### a) Micronúcleos

No se observa diferencia significativa en el número de MNs presentes en los EPCs de los ratones machos adultos y prepúberes expuestos a la inhalación de la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante las 4 semanas de exposición. Sin embargo, durante el período de recuperación se presenta aumento significativo en el grupo de machos adultos durante el mes 3. La tendencia para ambos grupos es a aumentar (Figuras 37 y 38).

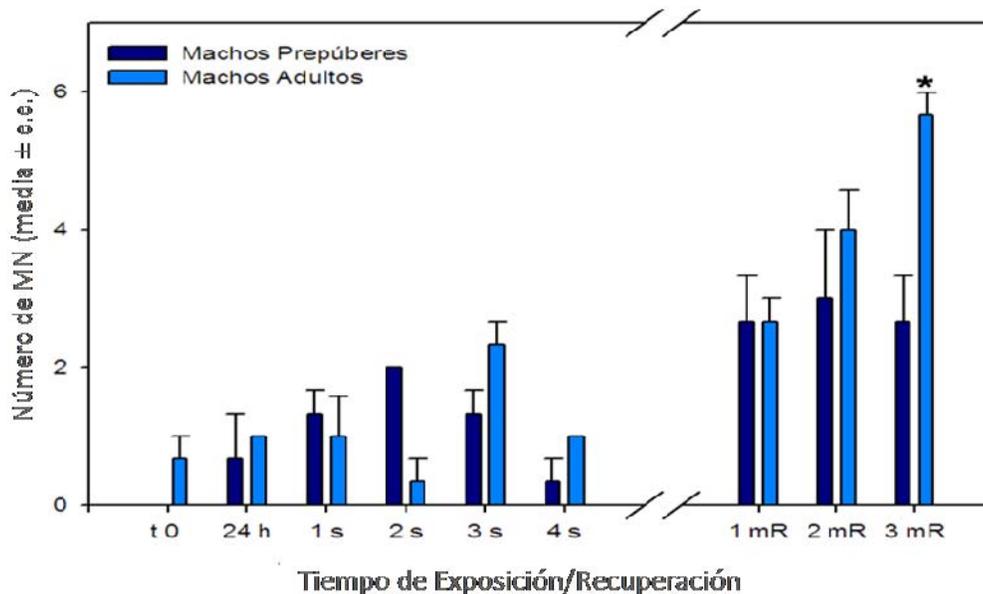


Figura 37. Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de MNs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalan la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$  t-test).

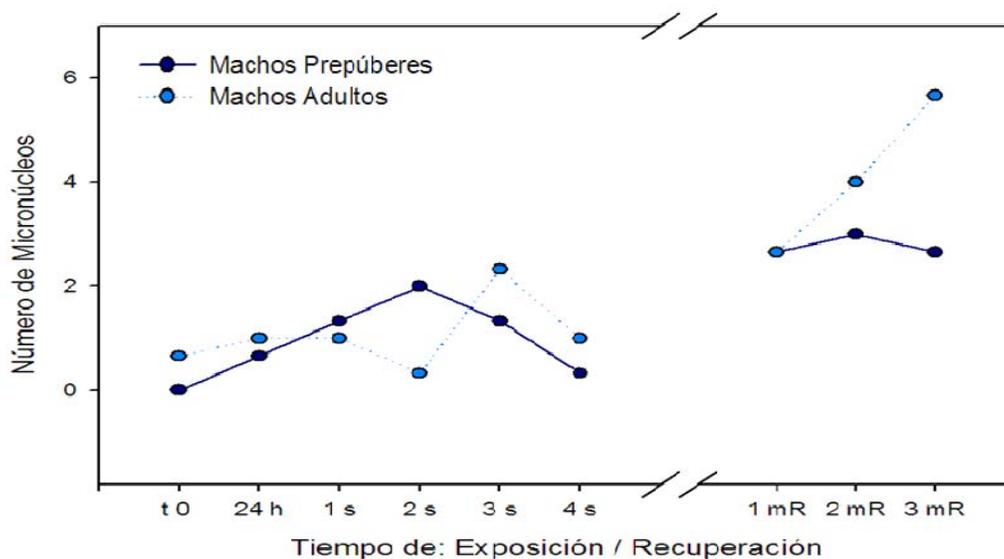


Figura 38. Media del número de MNs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalan la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

ii) Eritrocitos policromáticos

Se observa disminución significativa en el número de EPCs de los machos adultos con respecto a los machos prepúberes que inhalaron la mezcla de los compuestos, desde las primeras 24 h hasta la semana 2 de exposición, y durante la recuperación, en el mes 3. La tendencia para ambos grupos es a disminuir (Figuras 39 y 40).

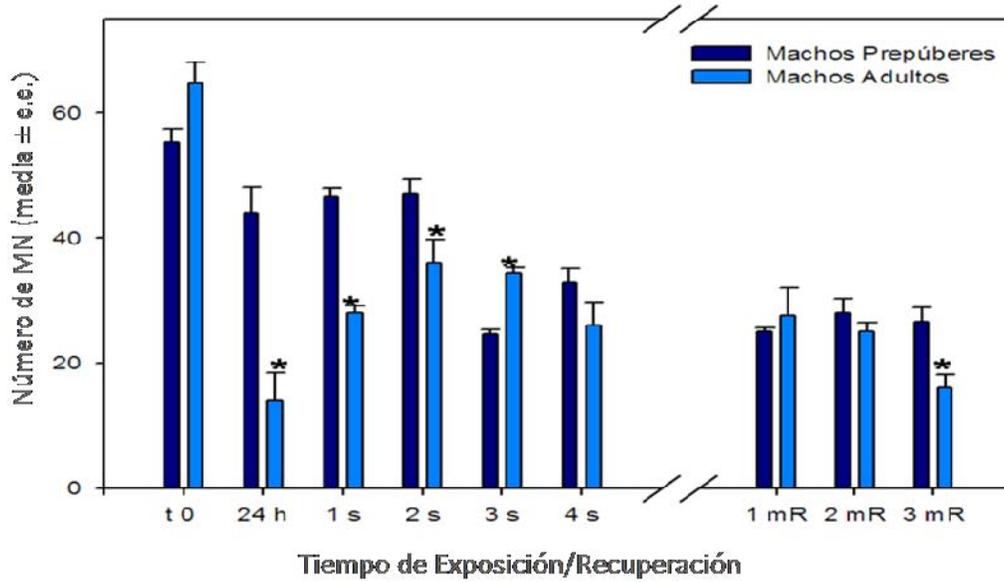


Figura 39. Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del del número de EPCs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalaron la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 mes (\*  $P < 0.05$  t-test).

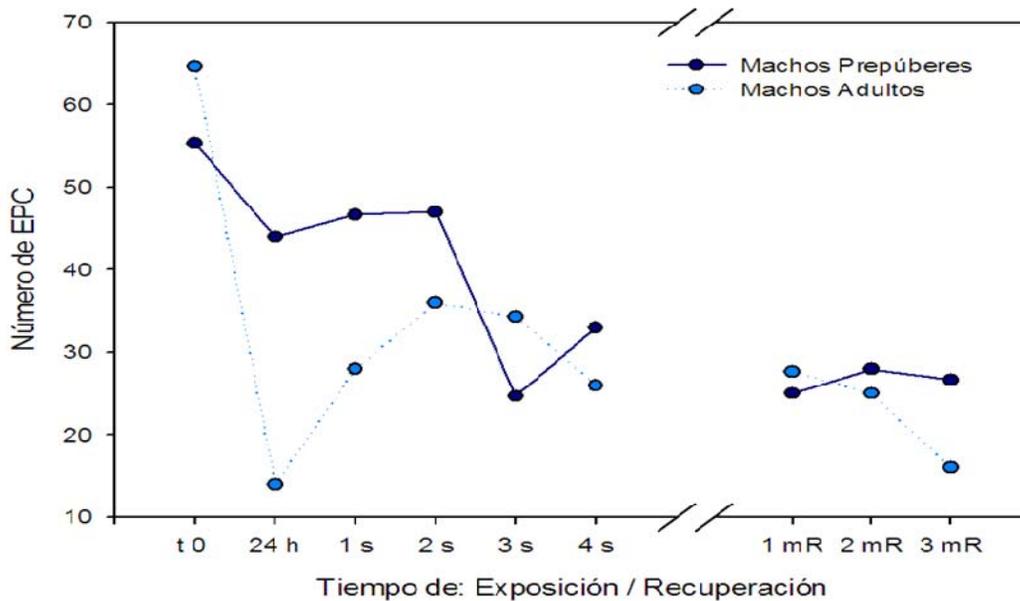


Figura 40. Media del número de EPCs presentes en los machos prepúberes y los machos adultos que inhalaron la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y su posterior recuperación durante 3 meses.

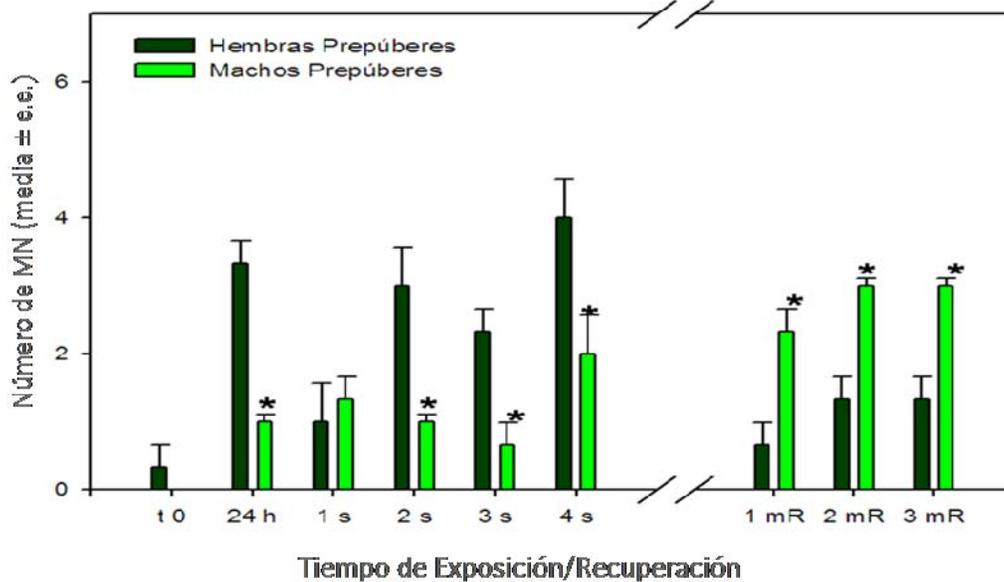
### 7.3. Comparación por género: Hembras vs Machos

#### 7.3.1. Pentóxido de Vanadio ( $V_2O_5$ )

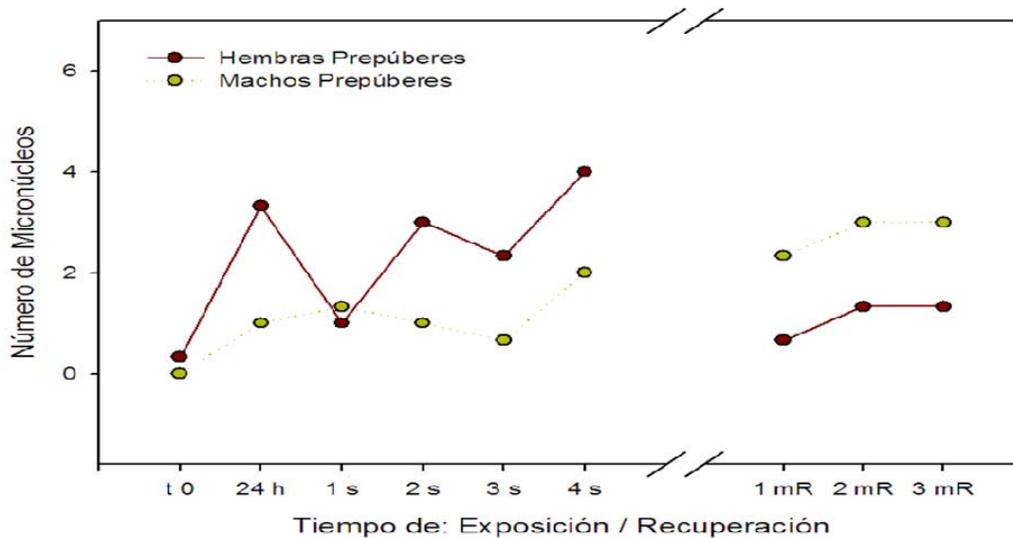
##### a) Prepúberes

###### i) Micronúcleos

Las hembras prepúberes expuestas a  $V_2O_5$  presentan un número significativamente mayor de micronúcleos durante las 4 semanas de exposición (excepto en la semana 1) que los machos de la misma edad, sin embargo esta respuesta se invierte durante el período de recuperación (Figuras 41 y 42).



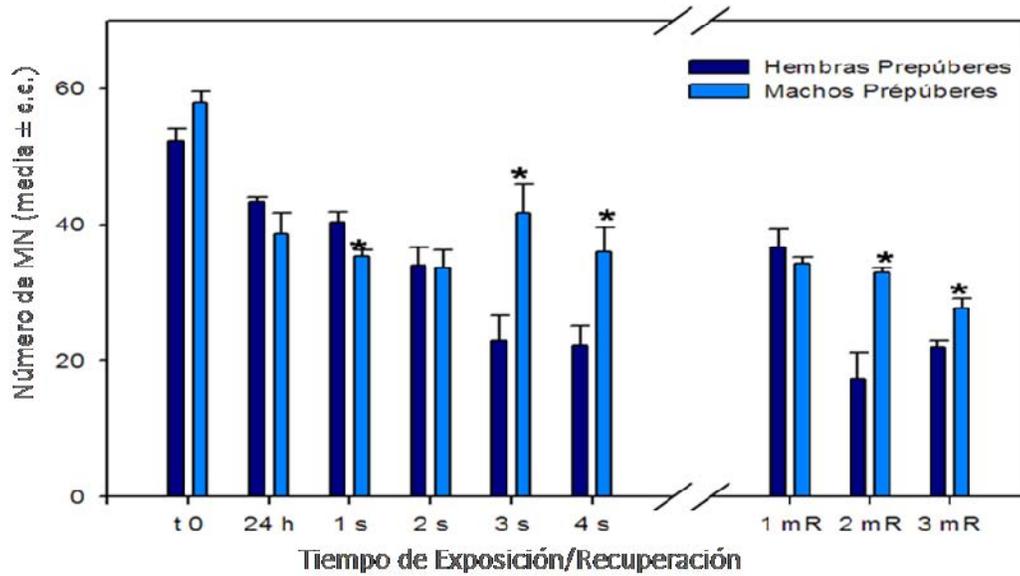
**Figura 41.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de micronúcleos presentes en los EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a  $V_2O_5$  durante 4 semanas y posterior período de recuperación (\*  $P < 0.05$  t-test).



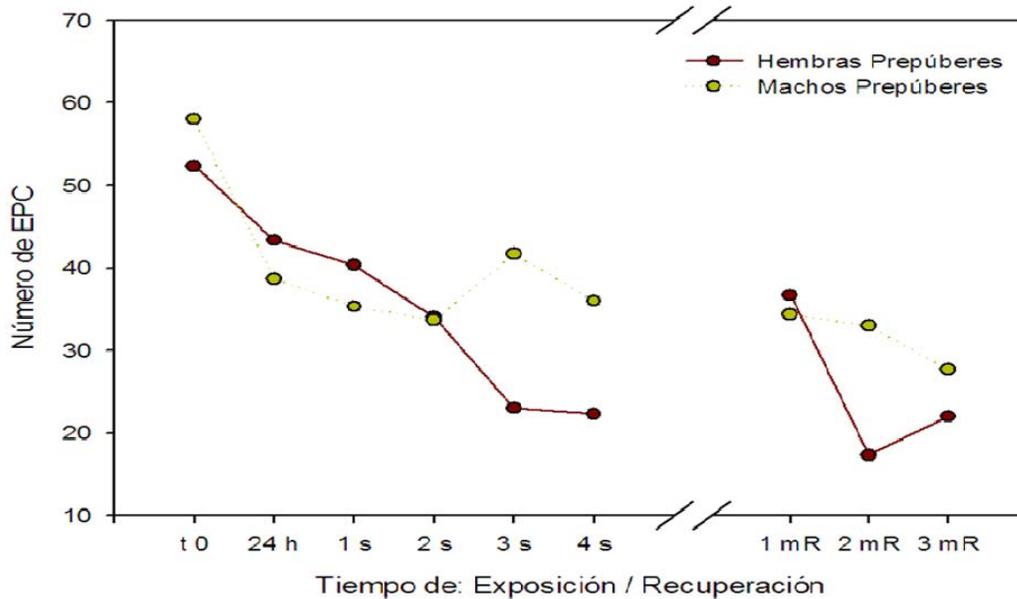
**Figura 42.** Micronúcleos presentes en los EPCs de los machos y las hembras prepúberes que inhalaban  $V_2O_5$  durante 4 semanas y posterior recuperación durante 3 meses.

ii) Eritrocitos policromáticos

Los machos prepúberes presentan un número de EPCs significativamente mayor que las hembras de la misma durante la semana 3 y 4 de exposición y posteriormente durante los meses 2 y 3 de recuperación (Figuras 43 y 44).



**Figura 43.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a  $V_2O_5$  durante 4 semanas y posterior período de recuperación de 3 meses (\*  $P < 0.05$  t-test).

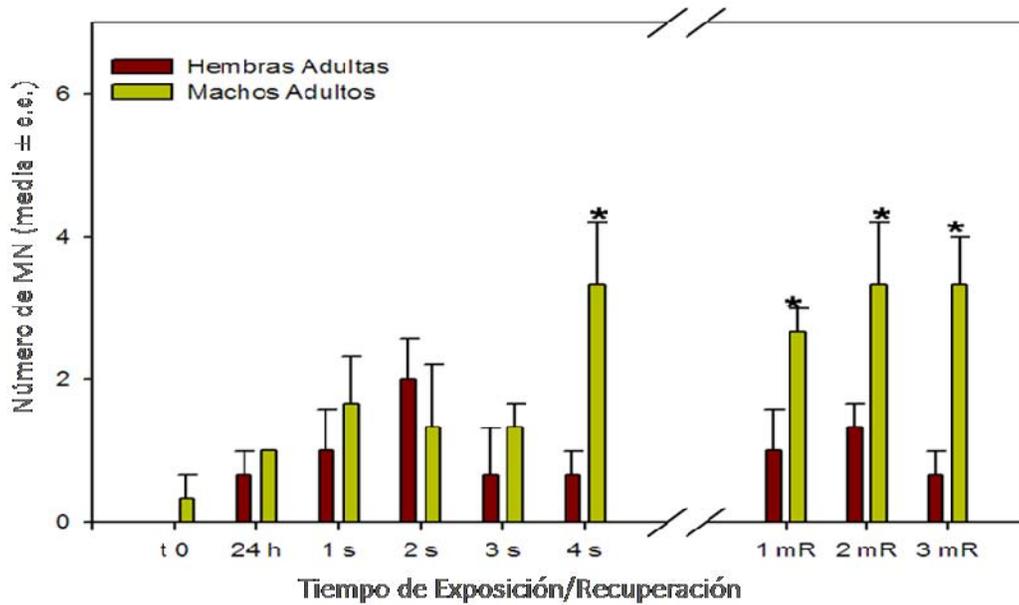


**Figura 44.** Media del número de EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a  $V_2O_5$  durante 4 semanas y posterior período de recuperación de 3 meses.

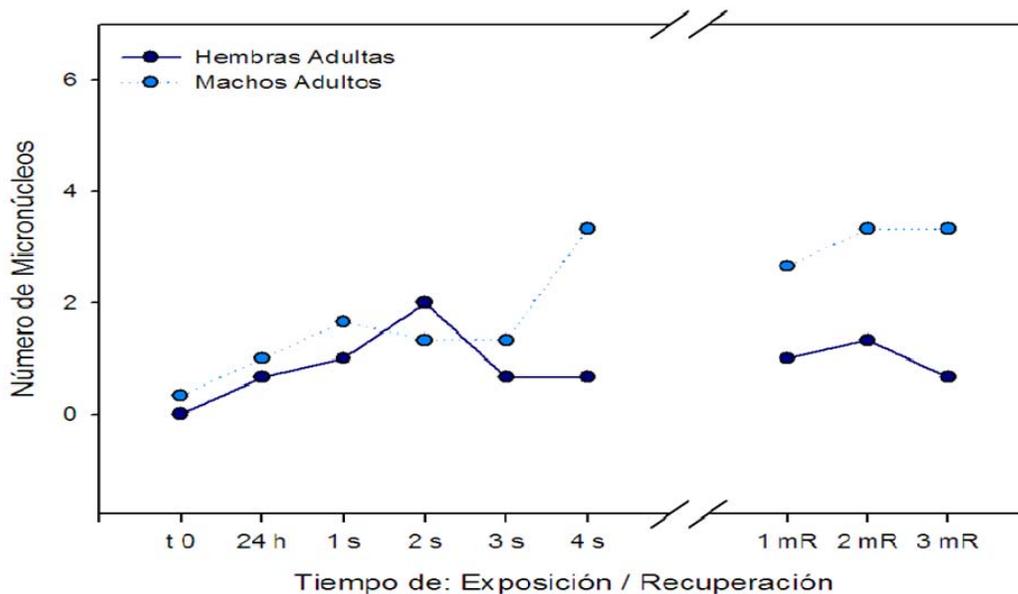
## b) Adultos

### i) Micronúcleos

Se observó aumento significativo en el número de MNs de los machos adultos expuestos a  $V_2O_5$  durante la semana 4 de exposición y posteriormente, durante los 3 meses de recuperación (Figuras 45 y 46).



**Figura 45.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de micronúcleos presentes en los EPCs de los ratones machos y hembras adultos expuestos a  $V_2O_5$  durante 4 semanas y posterior período de recuperación (\*  $P < 0.05$  t-test).



**Figura 46.** Media del número de micronúcleos presentes en los EPCs de los ratones machos y hembras adultos expuestos a  $V_2O_5$  durante 4 semanas y posterior período de recuperación.

ii) Eritrocitos policromáticos

El número de EPCs de los machos adultos es significativamente mayor que el número de EPCs de las hembras adultas en el tiempo cero. Durante la exposición en las primeras 24h y las semanas 1 y 2, el número de EPCs de los machos es significativamente menor que en las hembras de la misma edad. Sin embargo, el patrón se invierte durante la semana 4 de exposición y en el mes 3 de recuperación (Figuras 47 y 48).

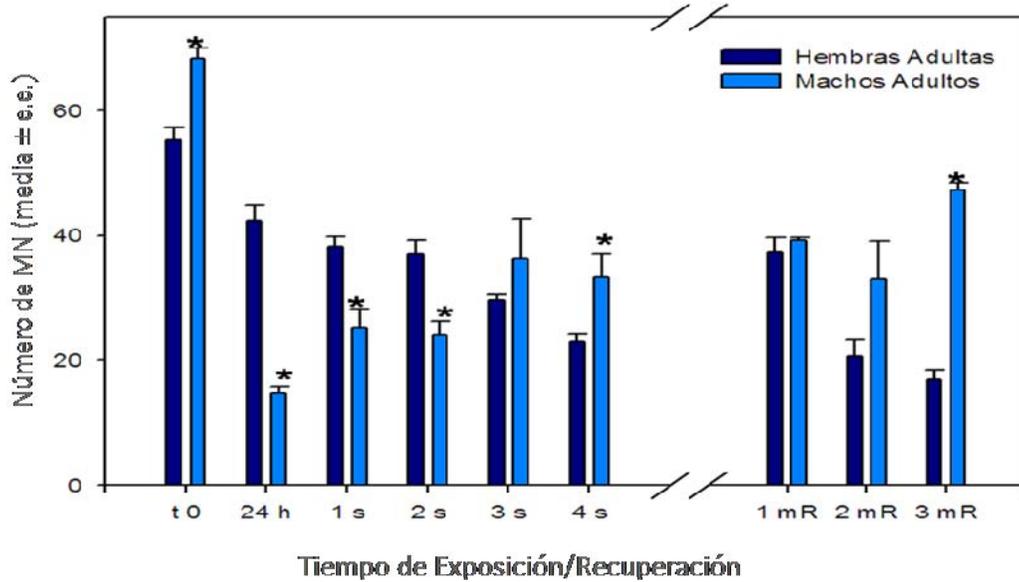


Figura 47. Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a  $V_2O_5$  durante 4 semanas y posterior período de recuperación de 3 meses (\*  $P < 0.05$  t-test).

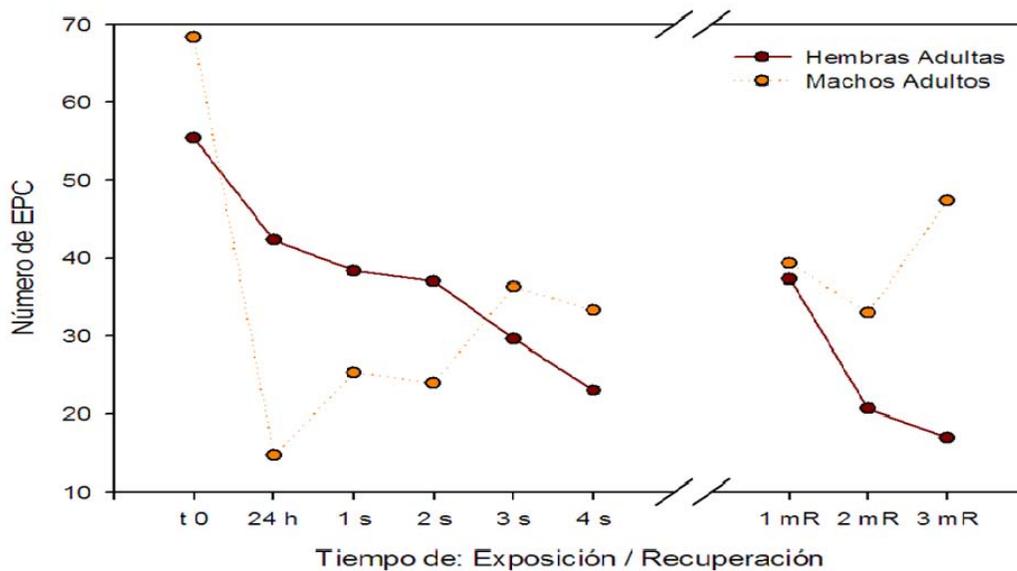


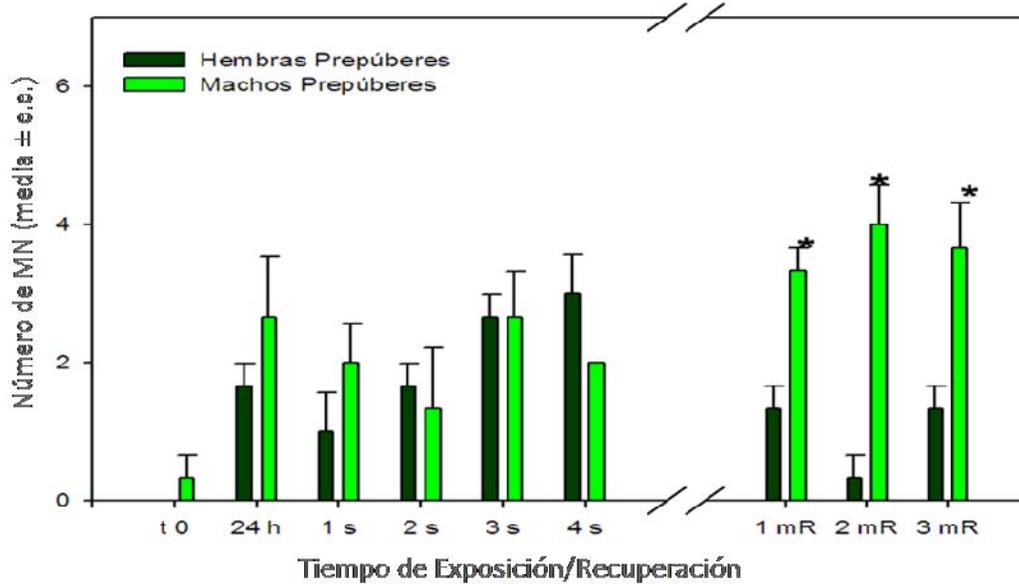
Figura 48. Media del número de EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a  $V_2O_5$  durante 4 semanas y posterior período de recuperación de 3 meses.

### 7.3.2. Cloruro de Manganeso (MnCl<sub>2</sub>)

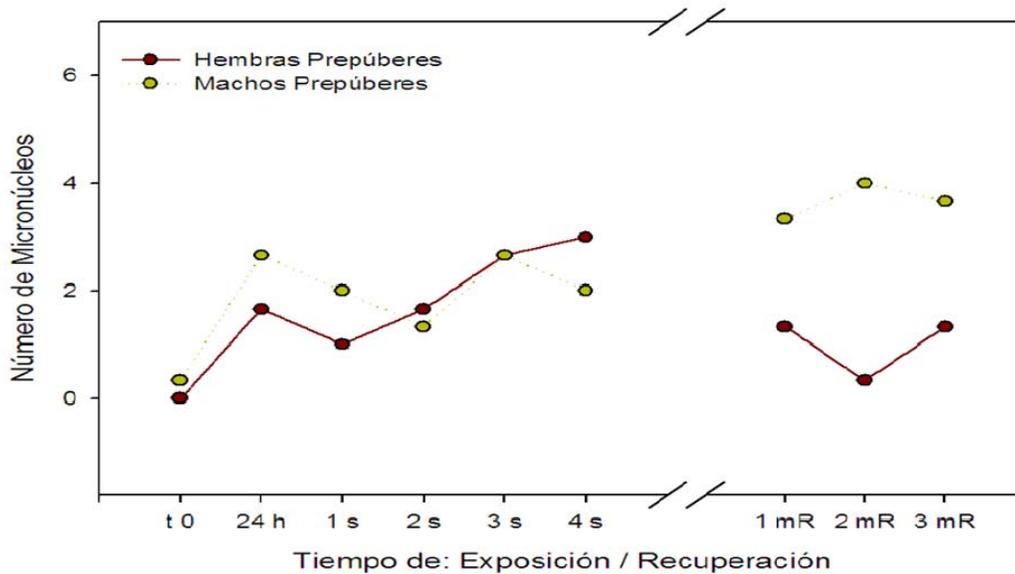
#### a) Prepúberes

##### i) Micronúcleos

Desde el tiempo cero hasta la semana 4 de exposición, no hay diferencias significativas en el número de micronúcleos entre ambos grupos de ratones prepúberes. Durante el período de recuperación, se presenta aumento significativo del número de MNs en los machos prepúberes que fueron expuestos a MnCl<sub>2</sub> (Figuras 49 y 50).



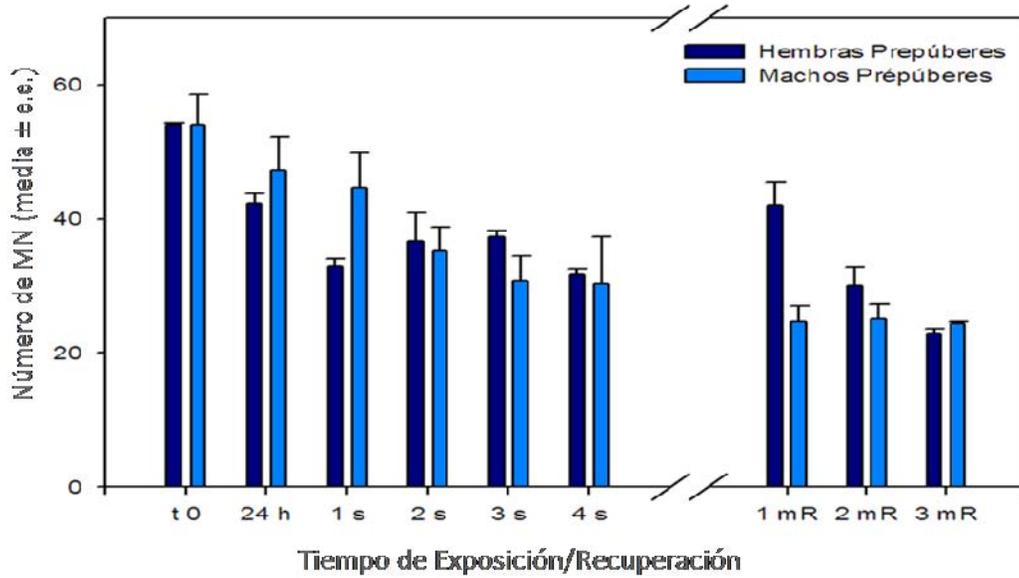
**Figura 49.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de micronúcleos presentes en los EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a MnCl<sub>2</sub> durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación (\*  $P < 0.05$  t-test).



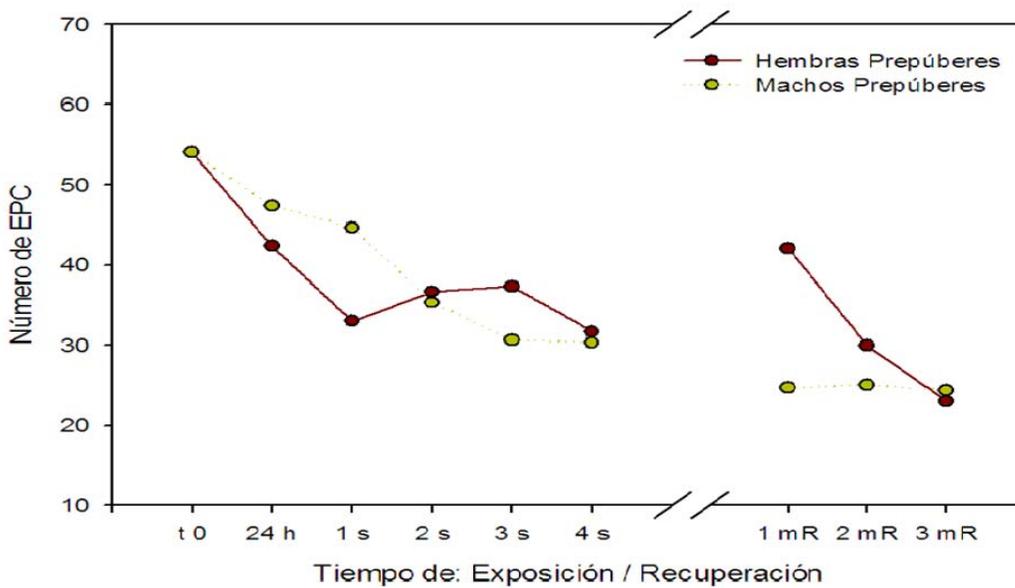
**Figura 50.** Media del número de micronúcleos presentes en los EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a MnCl<sub>2</sub> durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación.

ii) Eritrocitos policromáticos

El número de EPCs de los ratones hembras y machos expuestos a  $MnCl_2$ , no presenta diferencia significativa entre géneros durante el período de exposición, ni durante la recuperación (Figuras 51 y 52).



**Figura 51.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a  $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de recuperación de 3 meses (\*  $P < 0.05$  t-test).

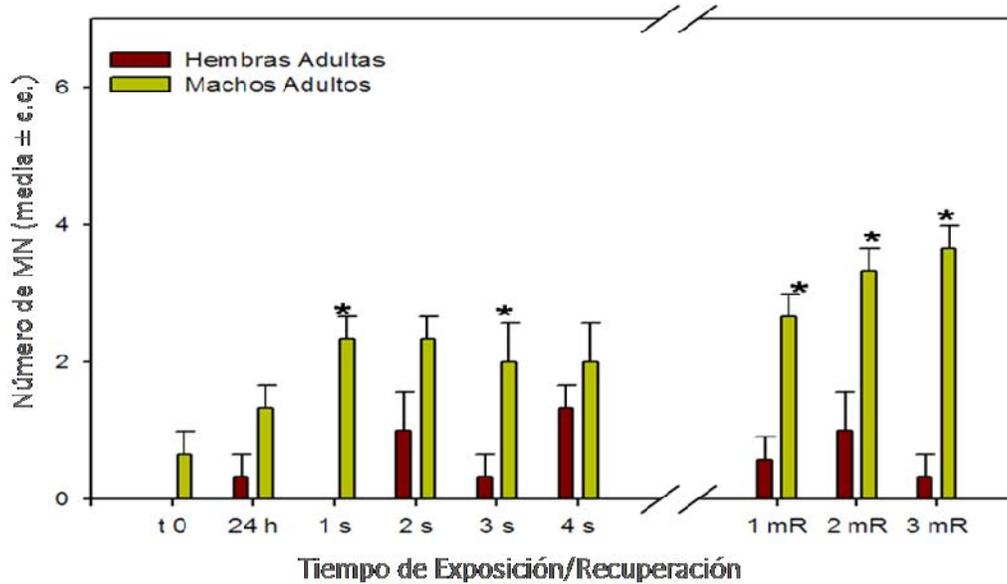


**Figura 52.** Media del número de EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a  $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de recuperación de 3 meses.

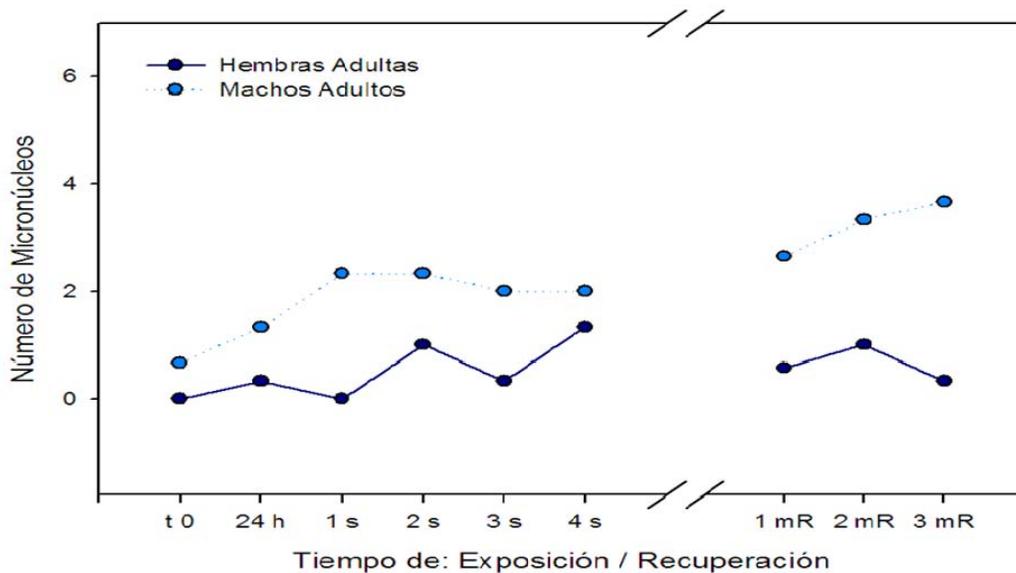
## b) Adultos

### i) Micronúcleos

Durante la exposición se observa que los machos presentan un número significativamente mayor de MNs que las hembras durante las semanas 1 y 3. En los meses de recuperación, los machos adultos presentan aumento significativo y progresivo del número de MNs comparado con las hembras de la misma edad (Figuras 53 y 54).



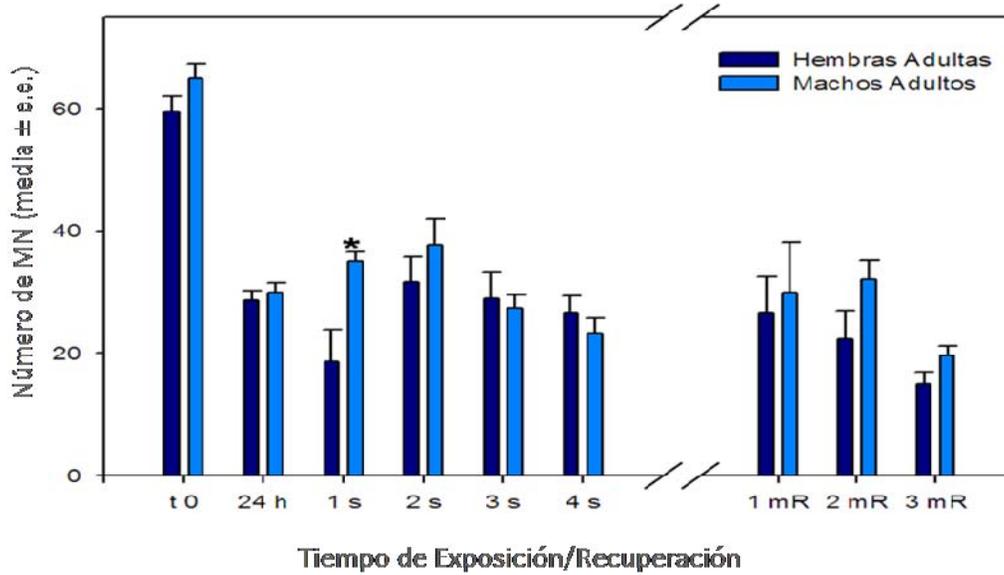
**Figura 53.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de micronúcleos presentes en los EPCs de los ratones machos y hembras adultos expuestos a  $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación (\*  $P < 0.05$  t-test).



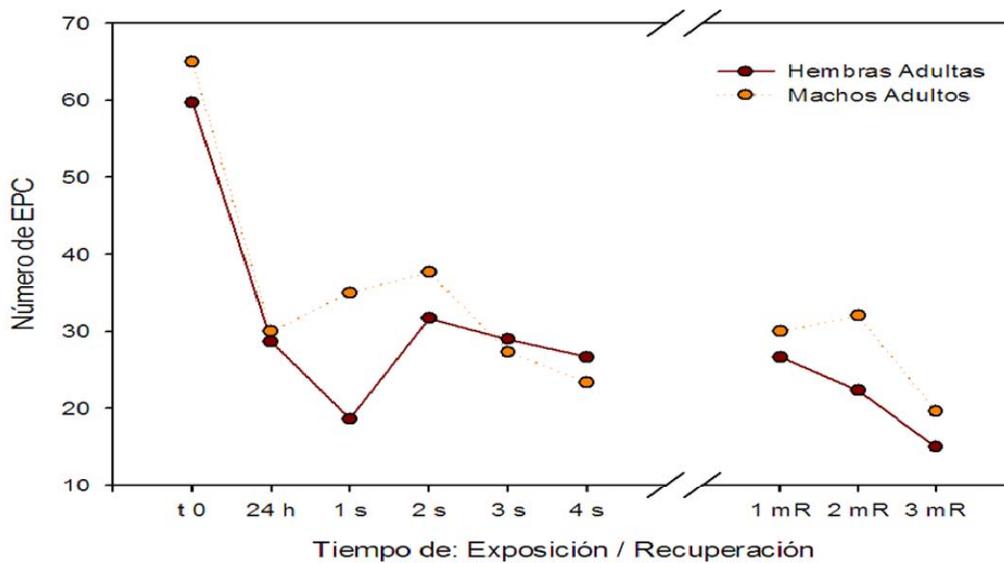
**Figura 54.** Media del número de micronúcleos presentes en los EPCs de los ratones machos y hembras adultos expuestos a  $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación.

ii) Eritrocitos policromáticos

No existen diferencias entre el número de EPCs de los ratones hembras y machos adultos que inhalaron MnCl<sub>2</sub> durante 4 semanas, de igual manera, no se presentan diferencias durante los 3 meses de recuperación (Figuras 55 y 56).



**Figura 55.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs de los ratones machos y hembras adultos expuestos a MnCl<sub>2</sub> durante 4 semanas y posterior período de recuperación de 3 meses (\*  $P < 0.05$  t-test).



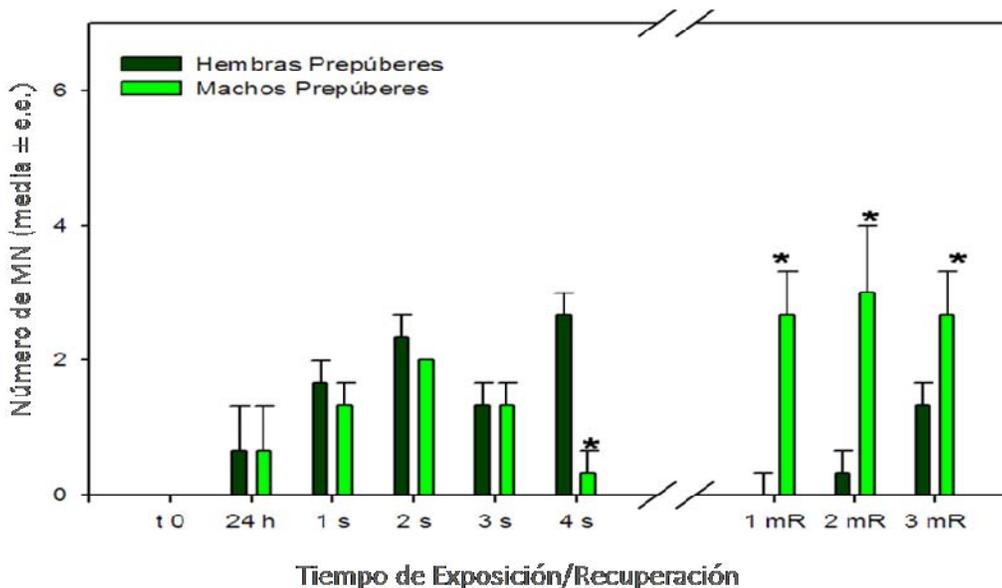
**Figura 56.** Media del número de EPCs de los ratones machos y hembras adultos expuestos a MnCl<sub>2</sub> durante 4 semanas y posterior período de recuperación de 3 meses.

### 7.3.3. Mezcla Pentóxido de Vanadio y Cloruro de Manganeso ( $V_2O_5$ - $MnCl_2$ )

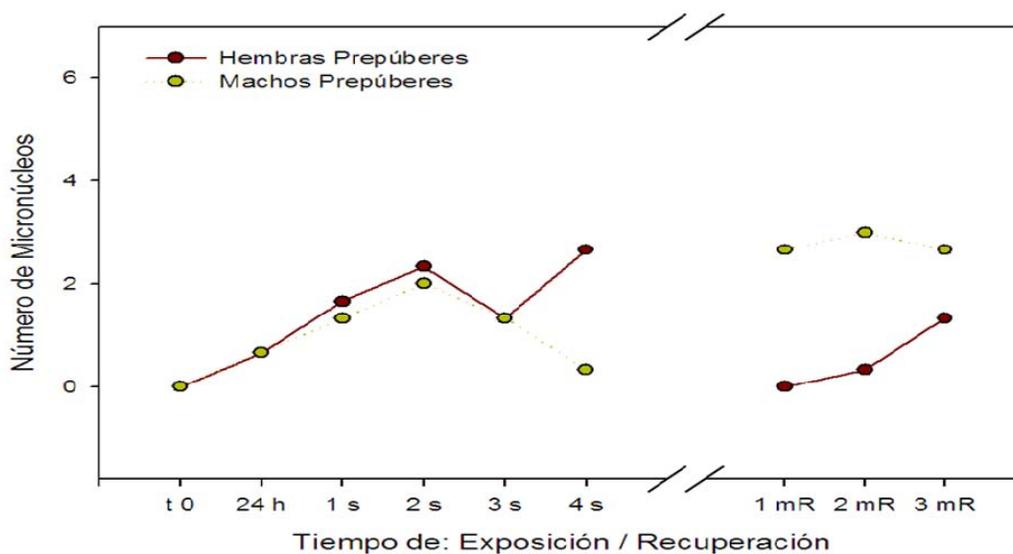
#### a) Prepúberes

##### i) Micronúcleos

No existe diferencia significativa (excepto en la semana 4) entre los ratones machos y hembras prepúberes que inhalaron la mezcla de los compuestos. Sin embargo, durante el período de recuperación, los machos prepúberes presentan aumento significativo en el número de MNs durante los 3 meses (Figuras 57 y 58).



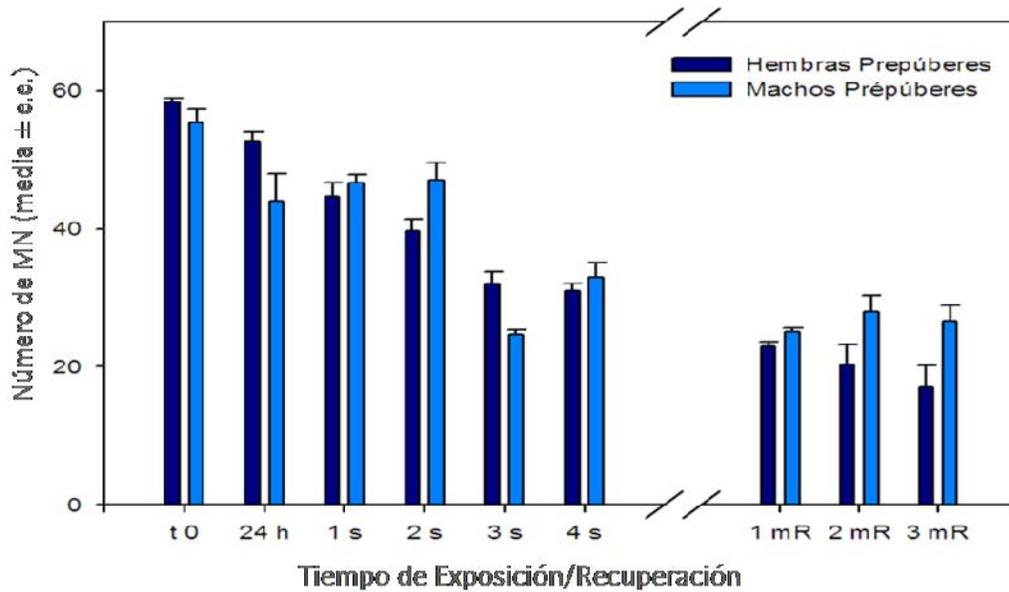
**Figura 57.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de micronúcleos presentes en los EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación (\*  $P < 0.05$  t-test).



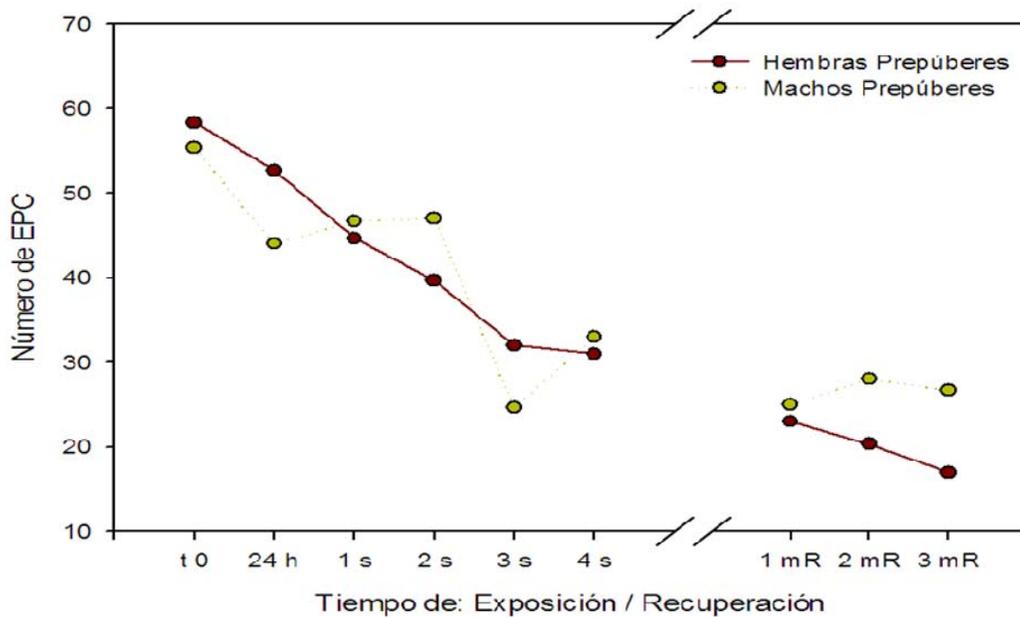
**Figura 58.** Media del número de micronúcleos presentes en los EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación.

ii) Eritrocitos policromáticos

No existe diferencia significativa en el número de EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes que inhalaron la mezcla  $V_2O_5-MnCl_2$ , durante el período de exposición ni durante el período de recuperación (Figuras 59 y 60).



**Figura 59.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a la mezcla  $V_2O_5-MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación (\*  $P < 0.05$  t-test).

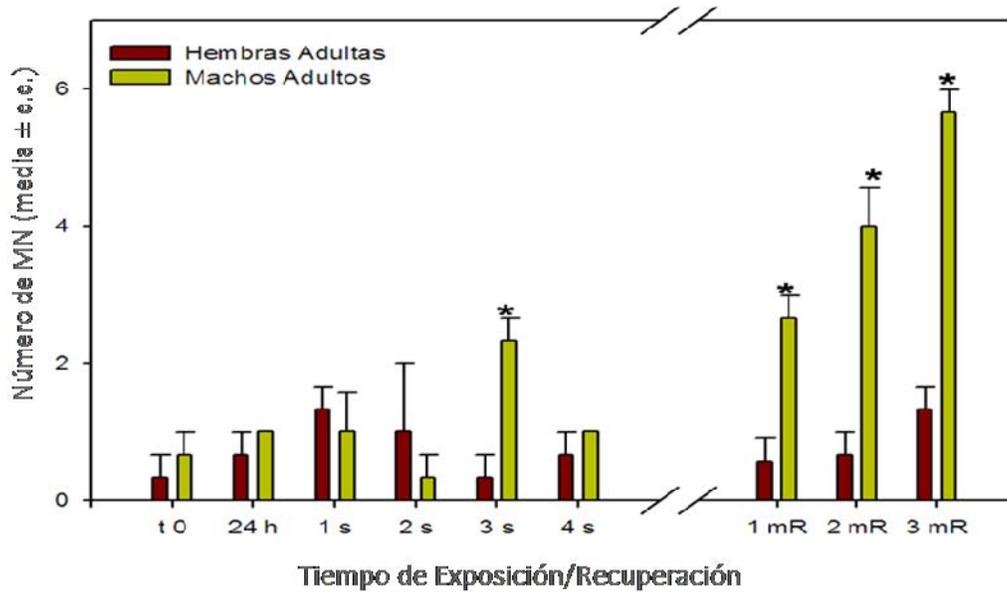


**Figura 60.** Media del número de EPCs de los ratones machos y hembras prepúberes expuestos a la mezcla  $V_2O_5-MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación.

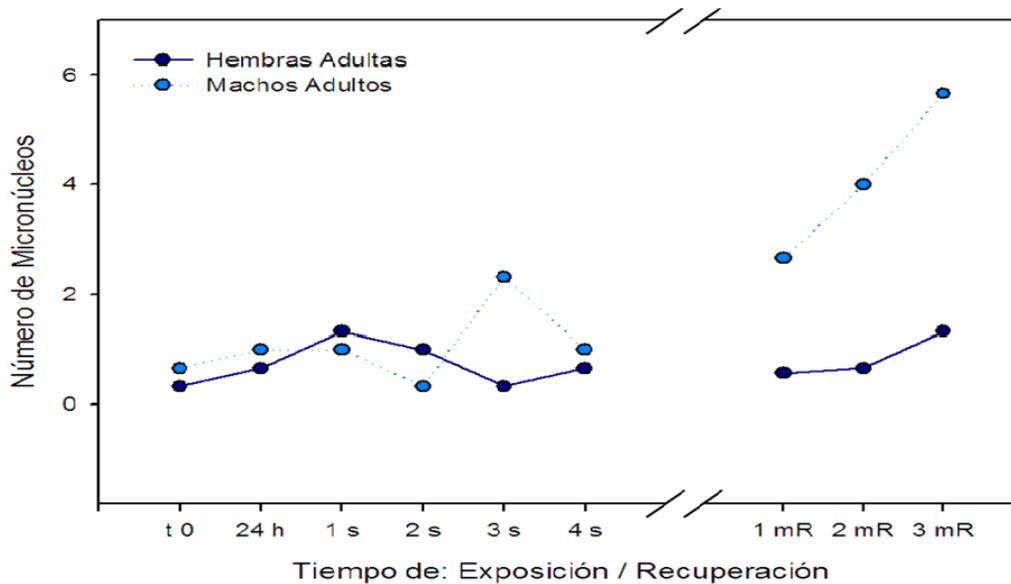
## b) Adultos

### i) Micronúcleos

Se presenta aumento significativo en el número de MNs de los machos adultos sólo durante la semana 3 de exposición. Sin embargo, durante los tres meses de recuperación, los machos presentan un mayor número de MNs que las hembras de la misma edad (Figuras 61 y 62).



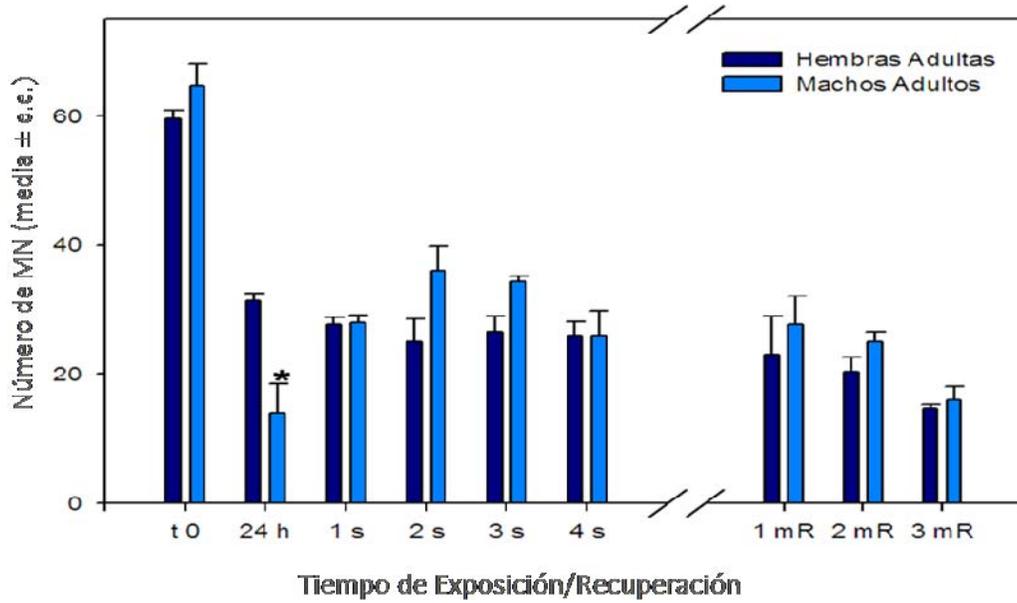
**Figura 61.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de micronúcleos presentes en los EPCs de los ratones machos y hembras adultos expuestos a la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación (\*  $P < 0.05$  t-test).



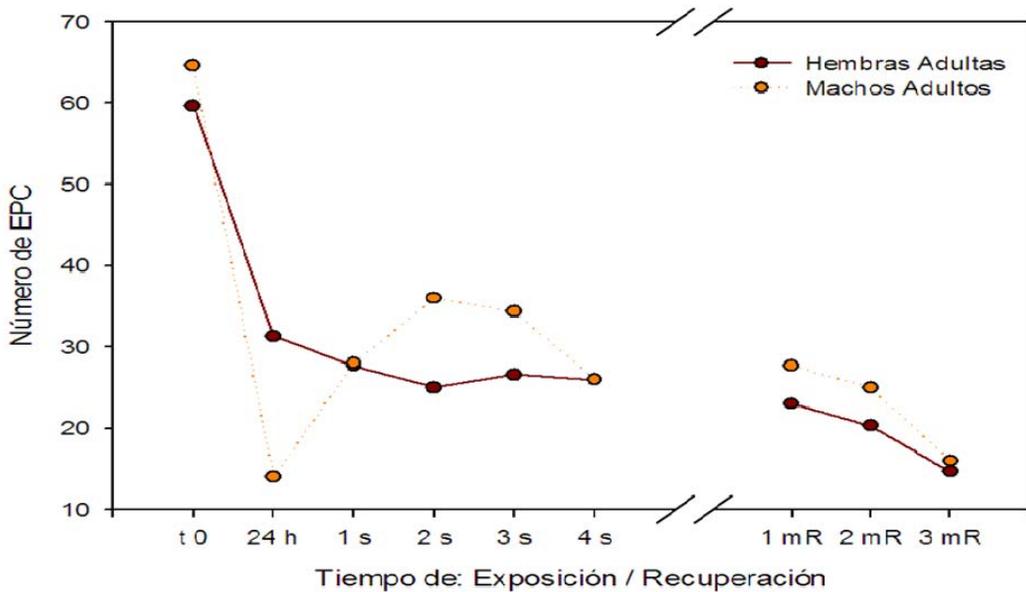
**Figura 62.** Media del número de micronúcleos presentes en los EPCs de los ratones machos y hembras adultos expuestos a la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación.

ii) Eritrocitos policromáticos

No existe diferencia significativa entre los machos y hembras adultos expuestos a la inhalación de la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas, ni durante los 3 meses de recuperación (Figuras 63 y 64).



**Figura 63.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs de los ratones machos y hembras adultos expuestos a la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación (\*  $P < 0.05$  t-test).



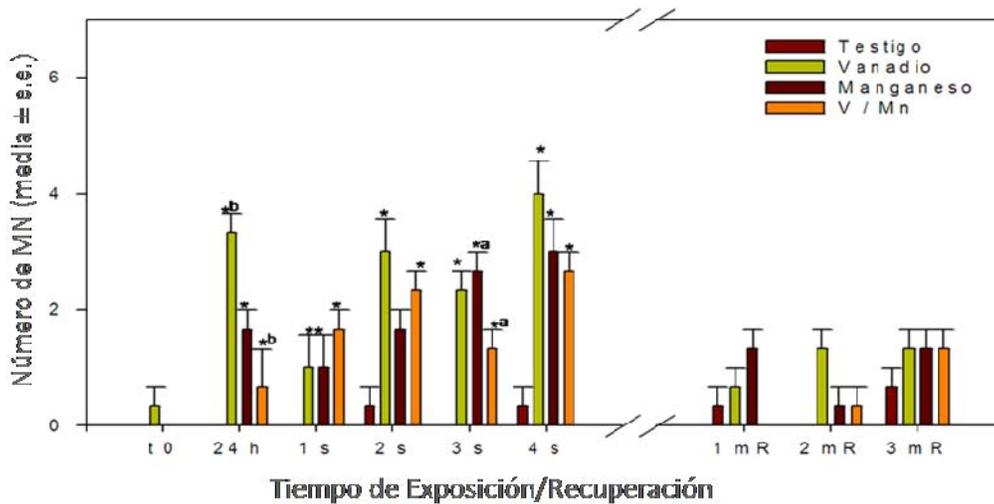
**Figura 64.** Media del número de EPCs de los ratones machos y hembras adultos expuestos a la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior período de 3 meses de recuperación.

## 7.4. Comparación por grupo de exposición ( $V_2O_5$ vs $MnCl_2$ vs $V_2O_5$ - $MnCl_2$ )

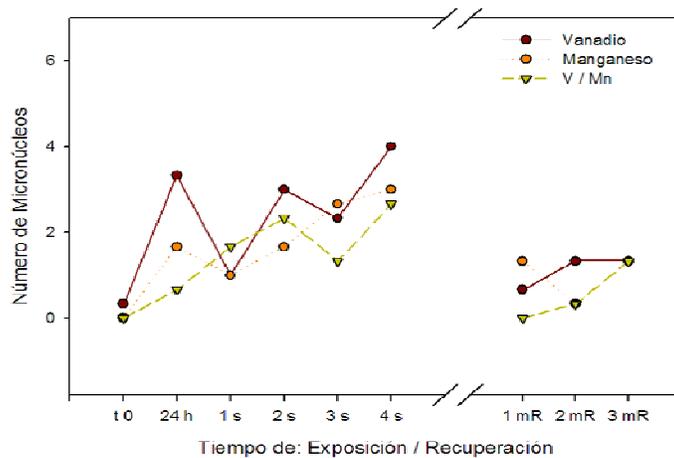
### 7.4.1. Hembras prepúberes

#### i) Micronúcleos

Se observó incremento significativo en los 3 grupos ( $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  y  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ) durante las primeras 24 h, y las semanas 1, 3 y 4. En general, se observa una tendencia a presentar mayor cantidad de MNs a partir de las 24h hasta la semana 4 de exposición en los tres grupos experimentales. Sólo a las 24 h de exposición el grupo que inhaló  $V_2O_5$ , presenta un mayor número de MNs que el grupo que inhaló la mezcla de los compuestos, lo mismo sucede en la semana 3 de exposición con el grupo que inhaló  $MnCl_2$  en comparación con el grupo que inhaló la mezcla. Con respecto al tiempo de recuperación, ninguno de los grupos experimentales presenta diferencia significativa entre grupos ni con respecto al testigo (Figuras 65 y 66).



**Figura 65.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de MNs presentes en hembras prepúberes expuestas a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante cuatro semanas y posterior recuperación durante 3 meses. (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak en donde: a=  $MnCl_2 \neq V_2O_5$ - $MnCl_2$ , b=  $V_2O_5 \neq V_2O_5$ - $MnCl_2$ , c=  $V_2O_5 \neq MnCl_2$ ).

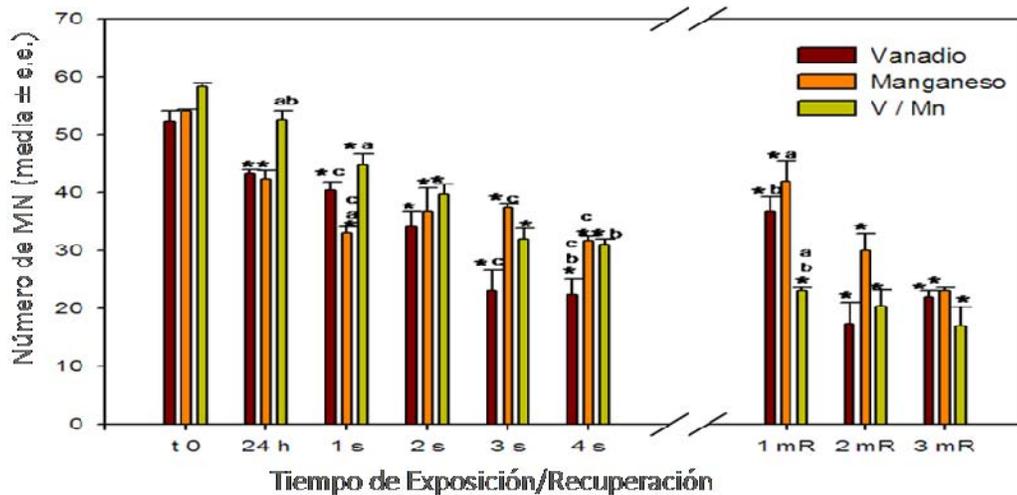


**Figura 66.** Media del número de MNs presentes en hembras prepúberes expuestas a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  durante cuatro semanas y posterior recuperación durante 3 meses.

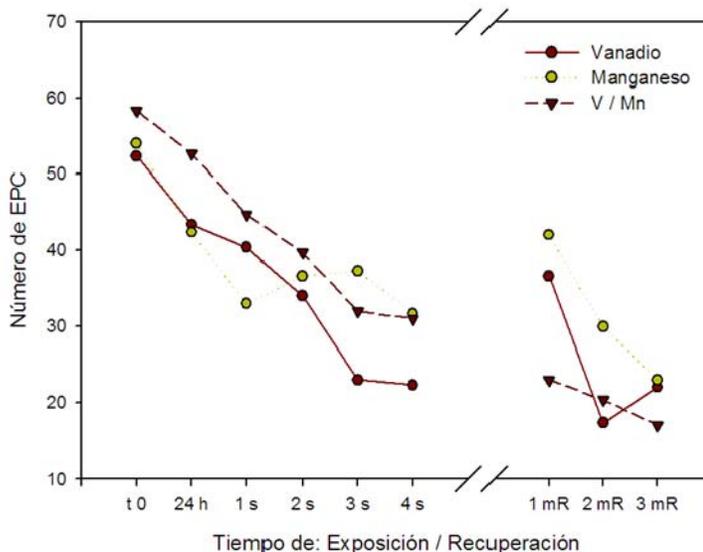
ii) Eritrocitos Policromáticos

No se encontró diferencia entre los tiempos cero de cada uno de los grupos experimentales. En los tres grupos, durante la exposición y la recuperación se observa disminución significativa del número de EPCs con respecto al tiempo cero de cada uno de los grupos.

Durante la semana 4 de exposición el grupo que inhaló  $V_2O_5$ , presenta disminución significativa en el número de EPCs con respecto a los otros dos grupos experimentales. Durante el mes 1 de recuperación el grupo  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  se observa el conteo más bajo de EPCs comparado con los grupos  $V_2O_5$   $MnCl_2$ , sin embargo esta diferencia no persiste durante los siguientes 2 meses. Al final del tiempo de recuperación, no existen diferencias entre los grupos experimentales, observándose en el tercer mes, los conteos más bajos (Figuras 67 y 68).



**Figura 67.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs entre los 3 grupos experimentales de hembras prepúberes expuestas durante 4 semanas a la inhalación de los compuestos. Se observa una disminución significativa durante el tiempo de exposición y de recuperación. Esta diferencia se presenta en los 3 grupos experimentales (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak en donde: a=  $MnCl_2 \neq V_2O_5$ - $MnCl_2$ , b=  $V_2O_5 \neq V_2O_5$ - $MnCl_2$ , c=  $V_2O_5 \neq$  - $MnCl_2$ ).

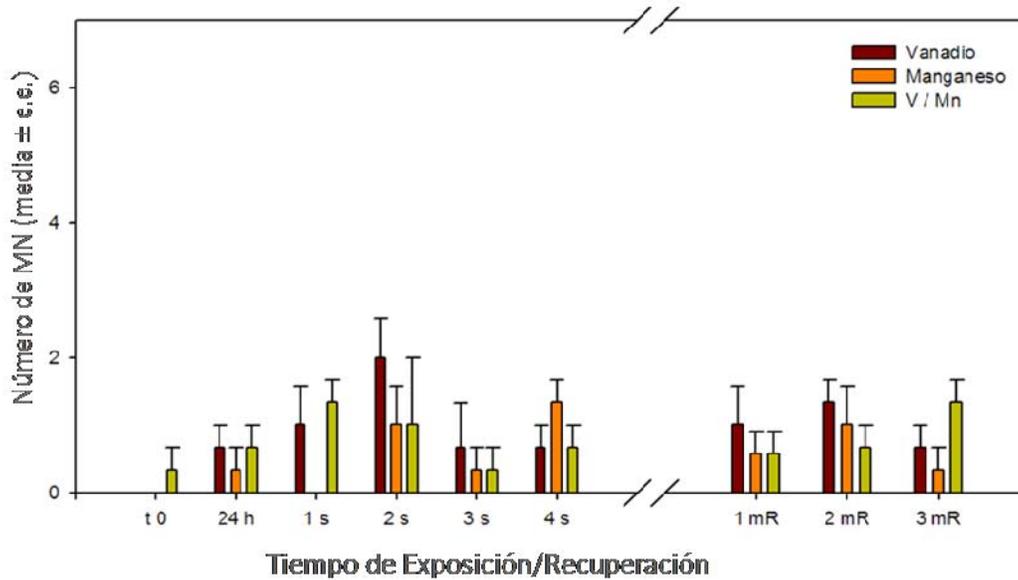


**Figura 68.** Media del número de MNs presentes en los EPCs de las hembras prepúberes expuestas a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ .

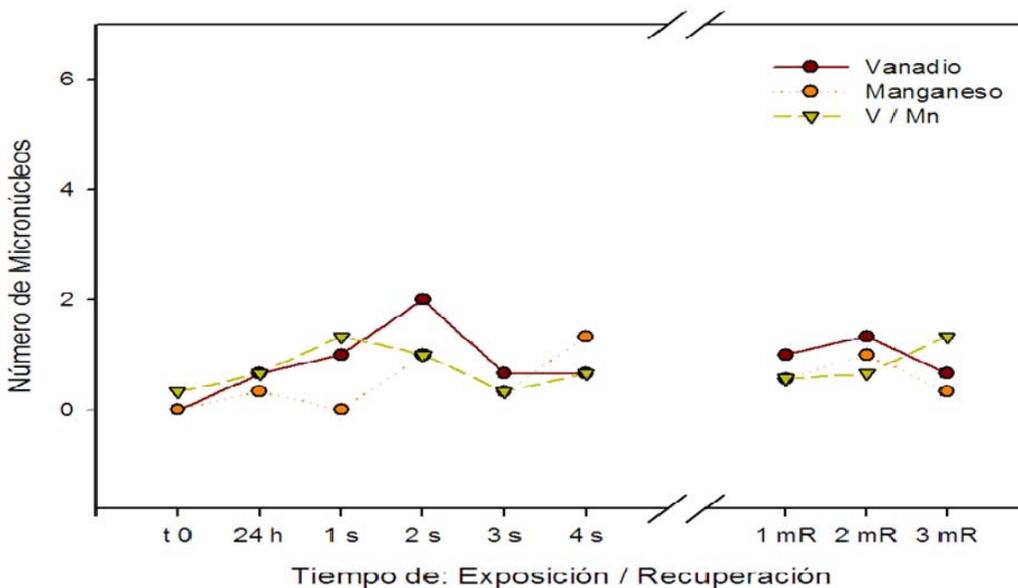
## 7.4.2. Hembras adultas

### i) Micronúcleos

No se observa diferencia significativa en el número de MNs durante el tiempo de exposición ni durante el tiempo de recuperación ambos respecto al tiempo cero. De igual manera, no existe diferencia entre los tres grupos experimentales (Figuras 69 y 70).



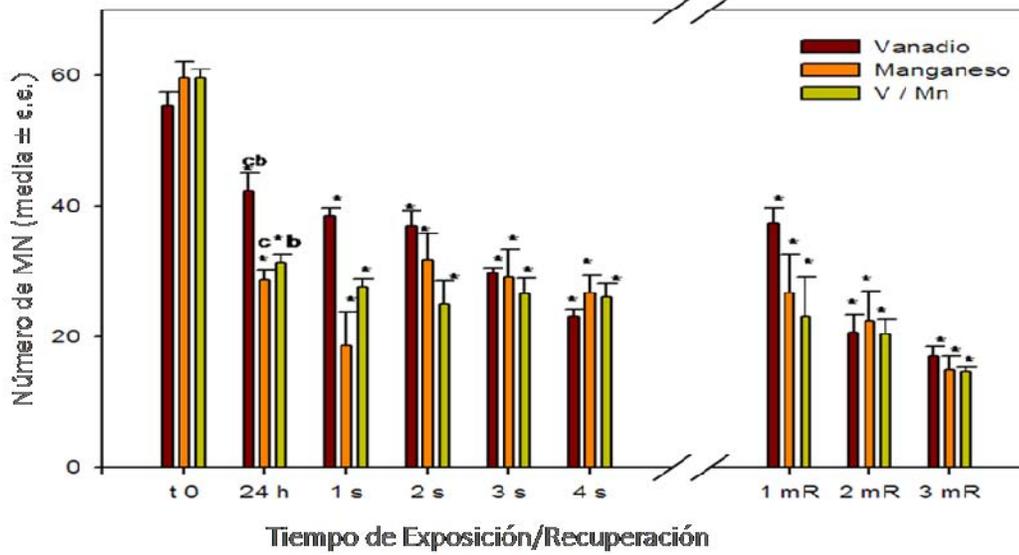
**Figura 69.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de MNs presentes en los EPCs de hembras adultas expuestas a  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ - $MnCl_2$  (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak).



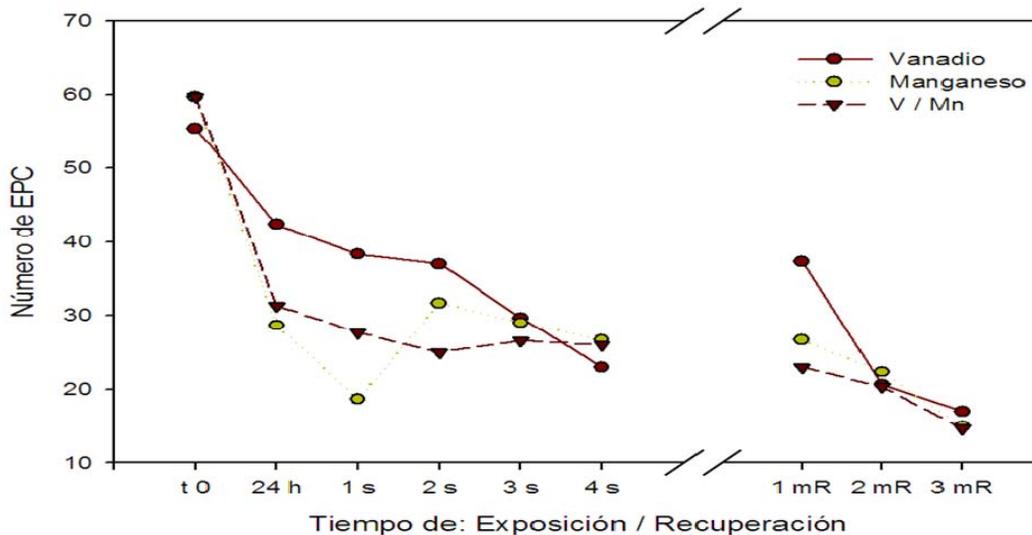
**Figura 70.** Media del número de MNs en EPCs de hembras adultas expuestas a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ . Se observa la ausencia de cambios significativos durante la exposición y la recuperación, comparados con el tiempo cero entre los 3 grupos experimentales.

ii) Eritrocitos policromáticos

No se observa diferencia significativa entre los tiempos cero de cada uno de los grupos. Durante el tiempo de exposición y durante el tiempo de recuperación se presenta disminución significativa del número de EPCs. En las primeras 24 h de exposición se nota que los grupos que inhalaron  $MnCl_2$  y  $V_2O_5-MnCl_2$  presentan disminución significativa con respecto al grupo que inhaló  $V_2O_5$ , sin embargo esta diferencia desaparece inmediatamente. Durante la recuperación, no existe diferencia entre ninguno de los grupos, y se observa el conteo más bajo de EPCs durante el mes 3 de recuperación para los tres grupos experimentales (Figuras 71 y 72).



**Figura 71.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs presentes en las hembras adultas expuestas a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5-MnCl_2$  durante 4 semanas y el posterior período de 3 meses de recuperación (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak en donde: a=  $MnCl_2 \neq V_2O_5-MnCl_2$ , b=  $V_2O_5 \neq V_2O_5-MnCl_2$ , c=  $V_2O_5 \neq -MnCl_2$ ).

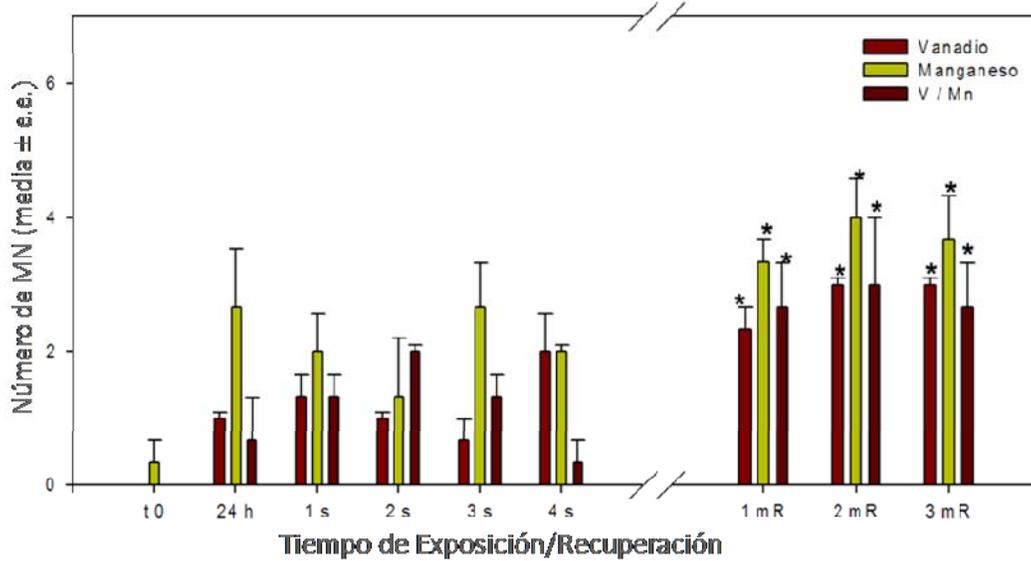


**Figura 72.** Media del número de EPCs en hembras adultas expuestas a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5-MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior recuperación durante 3 meses.

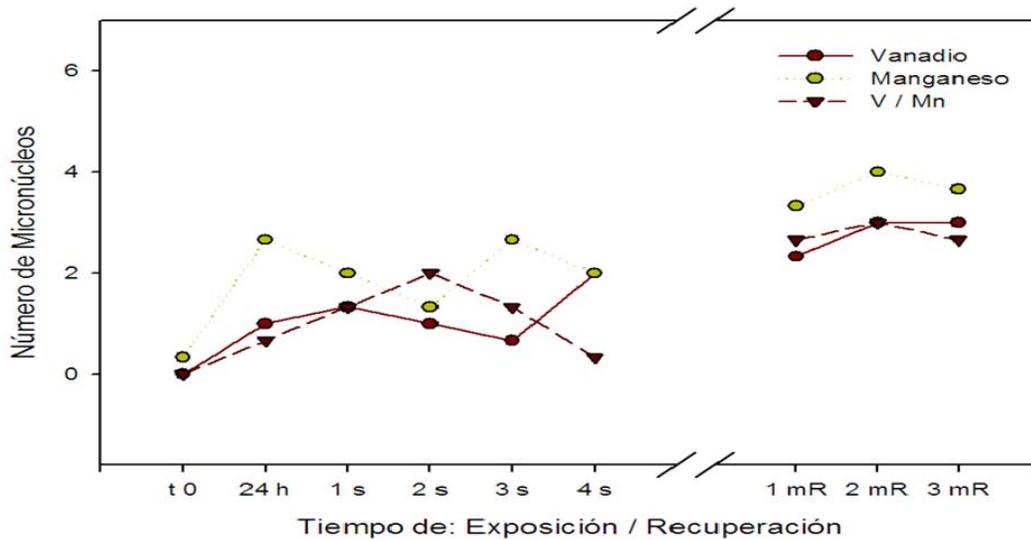
### 7.4.3. Machos prepúberes

#### i) Micronúcleos

No se observa diferencia significativa entre los tiempos cero de cada uno de los grupos experimentales, de igual manera no existe diferencia entre ninguno de los grupos ni durante el período de exposición. Sin embargo, se presenta aumento significativo en el número de MNs durante los tres meses correspondientes al período de recuperación. No existe diferencia significativa entre grupos experimentales (Figuras 73 y 74).



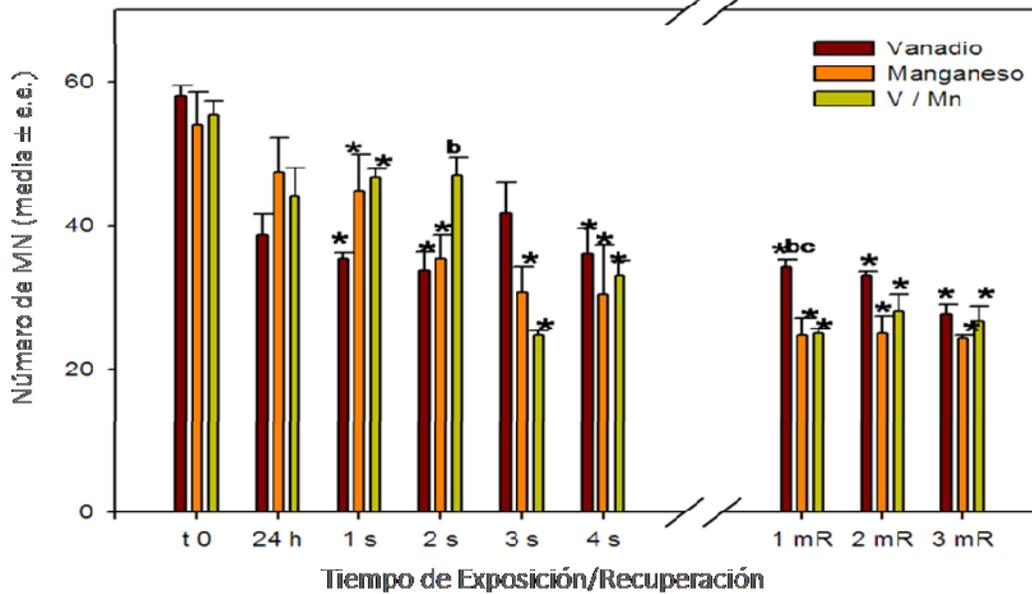
**Figura 73.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de MNs presentes en EPCs de ratones macho prepúberes de ratones expuestos a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ -  $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak).



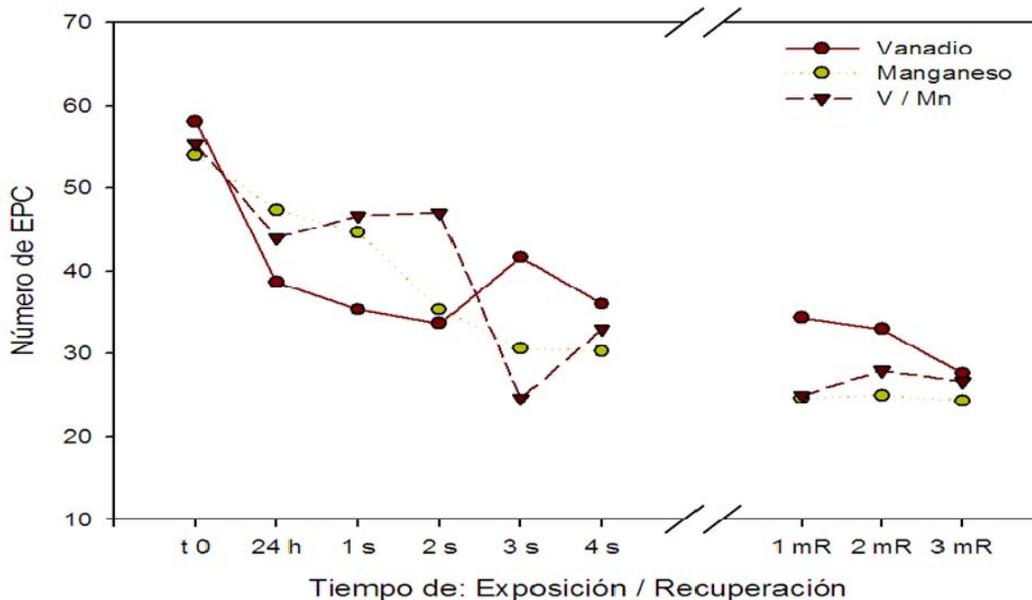
**Figura 74.** Media del número de MNs en EPCs de ratones macho prepúberes expuestos a,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ -  $MnCl_2$  durante 4 semanas. Se observa el aumento de MNs durante el período de recuperación en los 3 grupos experimentales.

ii) Eritrocitos policromáticos

Los tiempos cero de los grupos tratados no presentan diferencia significativa entre ellos. Por otro lado, durante la exposición y la recuperación se observa disminución significativa de los grupos experimentales con respecto al tiempo cero. Sin embargo, entre ellos prácticamente no existe diferencia (Figuras 75 y 76).



**Figura 75.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de EPCs en ratones prepúberes macho expuestos a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ -  $MnCl_2$  y posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA-Holm-Sidak en donde: a=  $MnCl_2 \neq V_2O_5$ - $MnCl_2$ , b=  $V_2O_5 \neq V_2O_5$ - $MnCl_2$ , c=  $V_2O_5 \neq$  - $MnCl_2$ ).

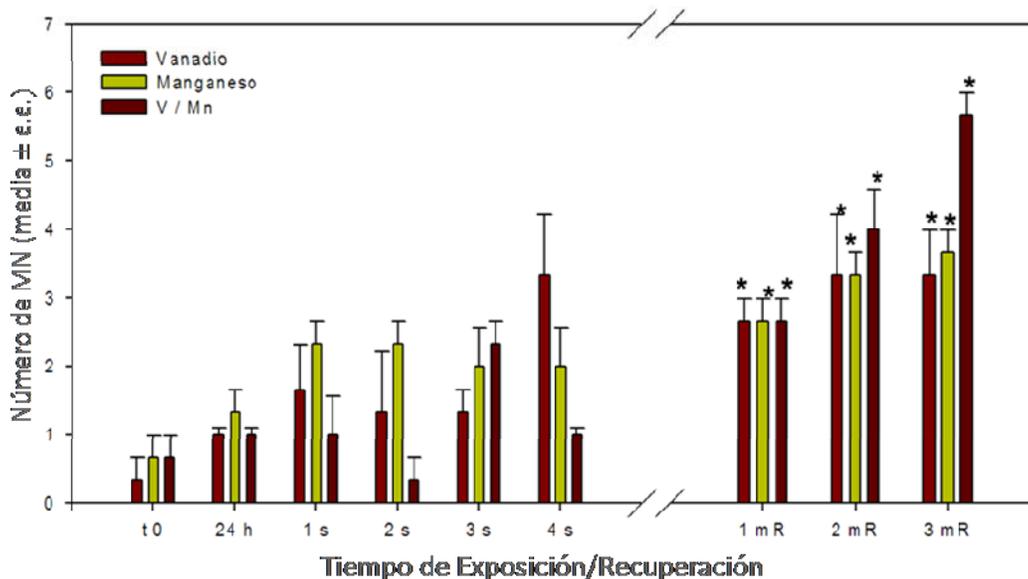


**Figura 76.** Media del número de EPCs en machos prepúberes expuestos a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ -  $MnCl_2$  y posterior recuperación durante 3 meses.

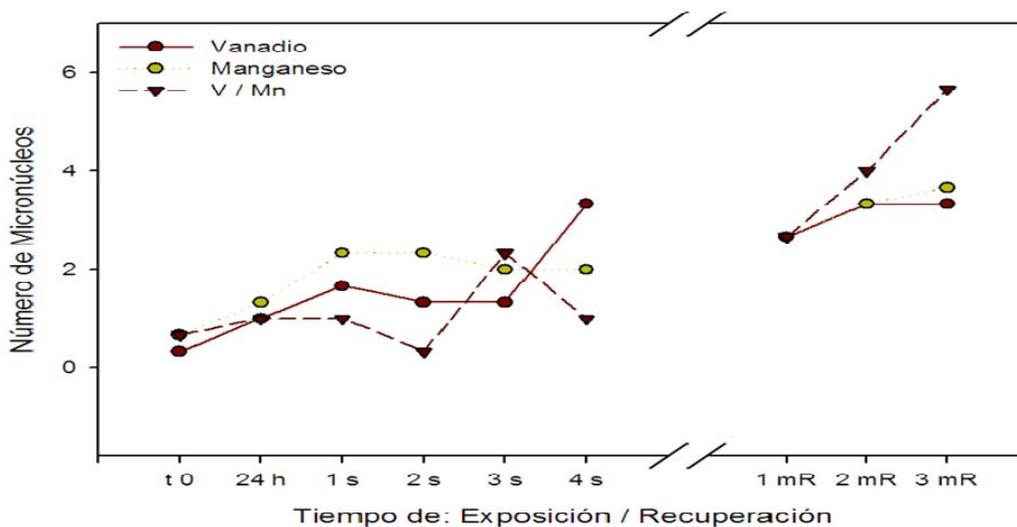
#### 7.4.4. Machos adultos

##### i) Micronúcleos

No se observa diferencia significativa entre los tiempos cero de los grupos experimentales ni durante el tiempo de exposición. Sin embargo, se presenta incremento en el número de MNs durante el período completo de recuperación en los tres grupos experimentales, pero no se evidenció diferencia entre ellos (Figuras 77 y 78).



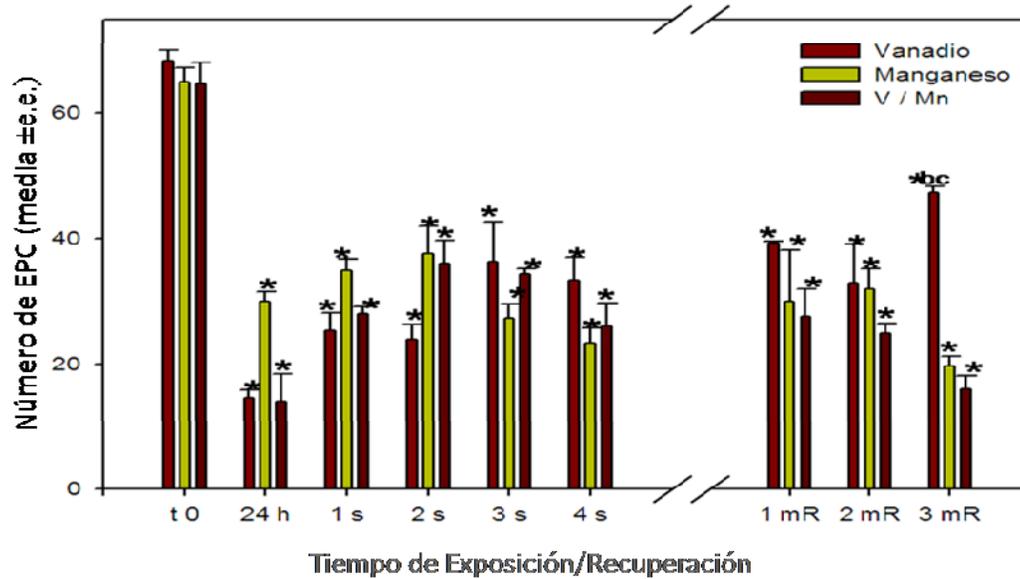
**Figura 77.** Comparación de las medias ( $\pm$  e.e.) del número de MNs presentes en los EPCs de los ratones machos adultos expuestos a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ -  $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA- Holm-Sidak).



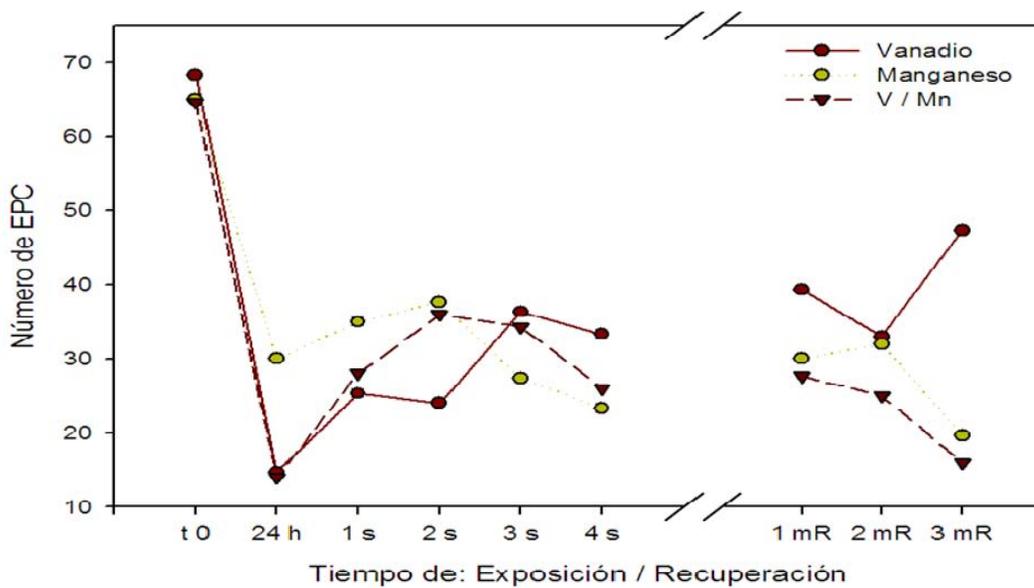
**Figura 78.** Número de MNs en EPCs de ratones machos adultos expuestos a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ -  $MnCl_2$  durante 4 semanas. Se observa el aumento de MNs durante el período de recuperación en los 3 grupos experimentales.

ii) Eritrocitos policromáticos

No se observa diferencia significativa entre los tiempos cero de cada uno de los grupos experimentales. Durante todo el período de exposición y de recuperación se presenta disminución significativa del número de EPCs de los 3 grupos experimentales con respecto al tiempo cero. Sólo durante el mes 3 de recuperación el grupo que inhaló  $V_2O_5$  tuvo una cantidad significativamente mayor de EPCs que los otros dos grupos experimentales (Figuras 79 y 80).



**Figura 79.** Comparación entre el número de EPCs de los ratones machos adultos expuestos a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ -  $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior recuperación durante 3 meses (\*  $P < 0.05$ , ANOVA-Holm-Sidak en donde: a=  $MnCl_2 \neq V_2O_5$ - $MnCl_2$ , b=  $V_2O_5 \neq V_2O_5$ - $MnCl_2$ , c=  $V_2O_5 \neq$  - $MnCl_2$ ).



**Figura 80.** Media del número de EPCs en machos adultos expuestos a:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$  o  $V_2O_5$ -  $MnCl_2$  durante 4 semanas y posterior recuperación durante 3 meses.

## 7.5. Resumen de resultados

### 1. Comparación entre el tiempo de exposición/recuperación y el tiempo cero.

#### i) Micronúcleos

- Las hembras prepúberes (en los 3 grupos de exposición:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$ ,  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ) presentan un número significativamente mayor de MNs durante el tiempo de exposición (24h hasta la semana 4) comparados con el tiempo cero. Sin embargo, durante el tiempo de recuperación, no se observa diferencia significativa entre la recuperación y el tiempo cero.
- Las hembras adultas (en los 3 grupos de exposición:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$ ,  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ) no presentan diferencia significativa en el número de MNs ni durante el tiempo de exposición ni en la recuperación.
- En los machos prepúberes (en los 3 grupos de exposición:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$ ,  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ), se presenta aumento significativo del número de MNs durante el tiempo de exposición comparado con el tiempo cero. Sin embargo, durante los tres meses de recuperación, se observa en todos los casos, aumento significativo en la presencia de MNs comparados con el tiempo cero y en algunos casos, con la cuarta semana de exposición.
- En los machos adultos (en los 3 grupos de exposición:  $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$ ,  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ) se observa aumento significativo en el número de MNs durante el tiempo de exposición y durante la recuperación, comparados con el tiempo cero.

#### ii) Eritrocitos Policromáticos

- En todos los grupos de exposición ( $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$ ,  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ), en las dos edades (prepúberes y adultos) y en ambos géneros (hembras y machos), se observó a partir de las primeras 24 hrs de exposición, disminución significativa del número de eritrocitos policromáticos que perduró hasta los 3 meses de recuperación.

### 2. Comparación por edad: Prepúberes vs Adultos

#### i) Micronúcleos

- Las hembras prepúberes en todos los grupos de exposición ( $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$ ,  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ), presentan en la mayor parte de los tiempos de exposición, un número significativamente mayor de MNs que las hembras adultas. Sin embargo, estas diferencias desaparecen durante el tiempo de recuperación.
- Los machos prepúberes de todos los grupos de exposición ( $V_2O_5$ ,  $MnCl_2$ ,  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ), no presentan diferencias significativas ni durante la exposición ni en el período de recuperación (excepto en el mes 3 de recuperación en el grupo  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ) en el número de MNs comparados con los machos adultos.

#### ii) Eritrocitos policromáticos

- Sólo en el ~25% de los tiempos (tanto de exposición como de recuperación), las hembras adultas presentan un número significativamente menor de EPCs comparadas con las hembras prepúberes.

- Los machos adultos que inhalaron  $V_2O_5$ , presentan durante las primeras 24 h y las semanas 1 y 2, disminución significativa en el número de EPCs, comparados con los machos prepúberes. Sin embargo, durante la recuperación se observa aumento significativo durante los meses 1 y 3.
- No se presenta diferencia entre los machos prepúberes y adultos que inhalaron  $MnCl_2$ .
- Los machos adultos que inhalaron la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ , al igual que el grupo que inhaló sólo  $V_2O_5$ , presenta disminución significativa, comparados con los machos prepúberes, durante las primeras 24 hrs y las semanas 1 y 2 de exposición y durante el mes 3 de recuperación.

### 3. Comparación por género

#### i) Micronúcleos

- Los animales prepúberes (hembras y machos) expuestos a  $MnCl_2$  y a la mezcla  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ , no exhiben diferencias significativas en el número de MNs durante el tiempo de exposición. Por otro lado, el grupo de hembras prepúberes que inhalaron  $V_2O_5$ , sí tienen un número significativamente mayor de MNs comparado con los machos prepúberes. Por otro lado, durante los 3 meses de recuperación los machos prepúberes de los 3 grupos de exposición, presentan un número de MNs significativamente mayor que las hembras prepúberes expuestas a los compuestos.
- Los animales adultos (hembras y machos) presentan aumento significativo en algunos casos comparados con las hembras adultas en el número de MNs durante el tiempo de exposición. Sin embargo durante el tiempo de recuperación, en los tres grupos de exposición, los machos adultos tienen un número significativamente mayor de MNs comparados con las hembras adultas.

#### ii) Eritrocitos policromáticos

- Los machos prepúberes comparados con las hembras prepúberes de los 3 grupos de exposición, prácticamente no presentan diferencias significativas en el número de EPCs.
- Sólo en el grupo de machos adultos que inhaló  $V_2O_5$ , se observa disminución significativa del número de EPCs durante algunos tiempos de exposición. Sin embargo, durante el mes 3 de recuperación esta diferencia se invierte significativamente. En los dos grupos restantes ( $MnCl_2$  y  $V_2O_5$ - $MnCl_2$ ) no se presentan diferencias significativas entre hembras y machos.

### 4. Comparación por grupo de exposición: $V_2O_5$ vs $MnCl_2$ vs $V_2O_5$ - $MnCl_2$

- No se observan diferencias significativas entre grupos de exposición en ninguno de los dos parámetros analizados.

## 8. Discusión

### 8.1. Irrigación de la médula ósea

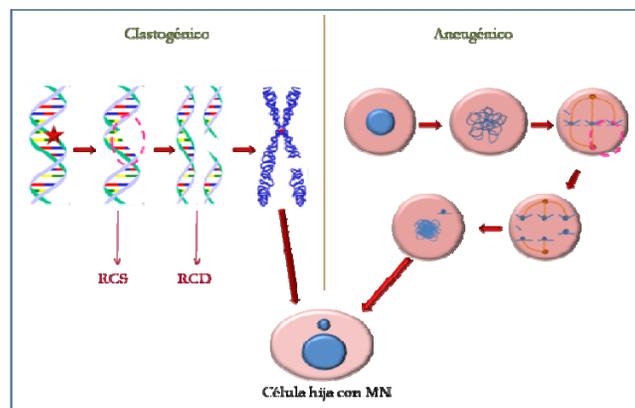
La médula ósea (MO) en los mamíferos superiores, constituye aproximadamente del 1 al 2.5% del total del peso corporal (Iversen 1997). Es el principal tejido en el que se lleva a cabo la producción de células sanguíneas, a través del complejo proceso conocido como *hematopoyesis* (Mayani *et al.* 2007). Para mantener una hematopoyesis adecuada, la MO depende de un aporte sanguíneo adecuado. En reposo, recibe del 2 al 4% del gasto cardíaco. La microvasculatura de la médula ósea, consiste en una red de sinusoides fenestrados (endotelio y lámina basal discontinua) lo cual permite alta permeabilidad a los solutos (Iversen 1997), entre ellos cualquier xenobiótico que viaje en el torrente sanguíneo.

### 8.2. Orígenes de los micronúcleos

Los micronúcleos se originan de dos maneras (Fenech 2000):

1. *Por el rompimiento de la doble hebra de ADN:* lo cual generaría que el MN observado contenga un fragmento de cromosoma que al no tener centrómero, no puede migrar ni incorporarse al núcleo de la célula hija. El rompimiento cromosómico se debe a daño al ADN, entre ellos: aductos, bases oxidadas o rompimientos de cadena sencilla, es decir daños que deban ser escindidos por los mecanismos de reparación. De esta manera, un rompimiento de cadena sencilla, cuando el material genético pasa por la fase de síntesis, se puede convertir en un rompimiento de cadena doble y generarse así, un micronúcleo.
2. *Por la alteración del aparato mitótico o la inhibición del centrómero:* lo cual generaría que el MN observado en el citoplasma del EPC contenga un cromosoma completo que no se incorporó correctamente al núcleo de la célula hija. Durante la división celular, es de vital importancia que el aparato mitótico y/o el centrómero lleven a cabo sus funciones adecuadamente, si esto no es así, el huso acromático podría no interactuar con los cromosomas y generar pérdidas de material genético.

Ambos mecanismos se resumen en la figura 81.



**Figura 81.** Mecanismos de generación de micronúcleos: Agente clastogénico (izq) y Agente aneugénico (der).

### 8.3. ¿Cómo el vanadio y el manganeso pueden producir micronúcleos?

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).

El daño al ADN puede ser producido por gran variedad de agentes, éstos pueden ser exógenos como los rayos ultravioleta, el humo del cigarro, las radiaciones gamma, los antibióticos, 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 radicales libres (Lindahl y Wood 1999).

En un estudio previo con el modelo de inhalación, Rojas-Lemus (2006) reportó, 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, lo cual concuerda 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, Kleinsasser *et al.* 2003, Rodríguez-Mercado *et al.* 2003). La inducción de micronúcleos por el vanadio o sus compuestos han sido reportados por varios autores (Migliore *et al.* 1993, Zhong *et al.* 1994 y Ciranni *et al.* 1995). En el caso del cloruro de manganeso, aunque la información sobre su potencial genotóxico es escasa, los resultados observados en este estudio para el caso de los rompimientos de cadena sencilla, concuerdan con lo reportado por De Méo (1991) y por Malecki (2001), y en el caso de los micronúcleos, por Joardar y Sharma (1990) y Sadykov (2008).

#### *Vanadio y Manganeso: ingreso al sistema*

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  $\beta$ -globulina, mientras que la forma trivalente lo hace 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 ingresa a las células por canales iónicos inespecíficos, ambas formas de vanadio pueden penetrar, 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). 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 oxidante: generación de especies reactivas de oxígeno y de radicales libres (Evangelou 2002). Este metal en diferentes estados de oxidación es capaz de interactuar con gran número de componentes celulares, ejerciendo al mismo tiempo 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 (Attia *et al.* 2005, Ávila-Costa *et al.* 2005, Leopardi *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. También 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). En el interior, es oxidado a la forma trivalente (Aschner *et al.* 2005). El manganeso, en condiciones fisiológicas, existe 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 oxidante (Ali *et al.* 1995, Keller *et al.* 2005).

El manganeso intracelular, se concentra específicamente en la mitocondria (Chen *et al.* 2001, HaMai *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 oxidante (Aschner *et al.* 2005, Keller *et al.* 2005), aunado al descenso 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 e 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).

### **8.3.1. Mecanismo común: estrés oxidante.**

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)  $V^{4+} + H_2O_2 \rightarrow V^{5+} + OH^{\cdot} + \cdot OH$  (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)  $Mn^{2+} + H_2O_2 \leftrightarrow [Mn^{2+}-OH \leftrightarrow Mn^{3+}-\cdot OH] \leftrightarrow Mn^{3+} + \cdot OH + OH^{\cdot}$  (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 oxidantes 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 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.

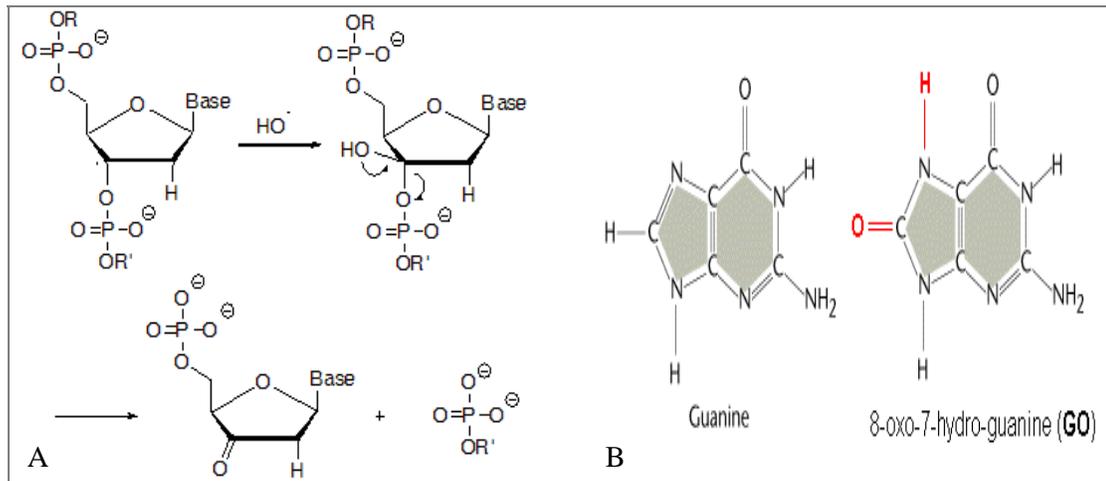
Por otro lado, es importante mencionar que el pentóxido de vanadio demostró ser un compuesto capaz de generar peroxidación lipídica en tejido hepático en este modelo (Acevedo- Nava 2005).

### 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 (Chihuaif *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 éstos (Evangelou 2002). El radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) 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). El aumento en la producción de  $\cdot OH$  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  $\cdot OH$  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 puede iniciar el proceso de la ruptura oxidante (Lorente 2005) (Figura 82). 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 82).



**Figura 82.** 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 oxidante. 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  $\text{Ca}^{2+}$ . 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  $\text{Ca}^{2+}$ , 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  $\text{Ca}^{2+}$ . 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 oxidante 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), todos ellos son daños al ADN que en células que se encuentran en proliferación, podrían traducirse en micronúcleos. 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).

### 8.3.1.2. Vanadio y Manganeso: Interacción con los mecanismos antioxidantes

Dado que las EROs y otras formas de radicales libres se producen constante e inevitablemente durante los procesos metabólicos o aquellos implicados en la patogenicidad, la célula ha desarrollado un poderoso y complejo sistema de defensa para limitar la exposición a estos agentes. Las moléculas que previenen la formación descontrolada de RLs o inhiben sus reacciones con estructuras biológicas, reciben el nombre genérico de antioxidantes (Chihuilaf *et al.* 2002, Scibior y Zaporowska 2007). La gama de antioxidantes celulares endógenos incluyen al glutatión reducido (GSH), la dismutasa de súper óxido, la glutatión peroxidasa, así como también a los exógenos como el alfa-tocoferol, el beta-caroteno y al ácido ascórbico, todos ellos son importantes componentes de la defensa antioxidante de los mamíferos (Scibior y Zaporowska 2007).

Se ha reportado que el vanadio puede disminuir significativamente los niveles de la concentración de ácido ascórbico y de GSH en la sangre y en algunos órganos importantes como hígado y riñón (Scibior y Zaporowska 2007).

Por otra parte, Zhang y colaboradores (2004) indican que la exposición subcrónica de Mn podría resultar en un marcado decremento de la actividad de la glutatión peroxidasa en las mitocondrias del hígado y del cerebro de ratas expuestas a este metal.

### 8.3.2. Interacción con el aparato mitótico

La interferencia con la organización y el ensamblaje del huso mitótico es un proceso crítico para el movimiento normal de los cromosomas, de hecho es el mecanismo propuesto de cómo contribuye pentóxido de vanadio al incremento de las aneuploidías (Ramírez *et al.* 1997).

El ortovanadato de sodio inhibe de manera considerable el ensamble (más del 65%) y la tasa de desensamble (aprox el 60%) de los microtúbulos. Aparentemente el vanadio produce un cambio alostérico en las proteínas de los microtúbulos lo que conlleva a una cinética de polimerización anormal de la tubulina (Kirazov y Weiss, 1986). El resultado, es la alteración en el aparato mitótico y, por tanto, cambios relacionados con el número cromosómico que puede producir transformaciones neoplásicas en una vía similar a la previamente observada con colcemida y dietilestilbestrol (Ramírez *et al.* 1997).

Los mecanismos por los cuales este metal interfiere con el ensamble de los microtúbulos no es totalmente conocido, sin embargo su toxicidad ha sido atribuida por su alta afinidad por los grupos sulfidrilo de las proteínas. Ramírez y colaboradores (1997) reportaron que las tubulinas alfa y la beta contienen 12 y 8 residuos de cisteína (un aminoácido que contiene abundantes grupos sulfidrilo), respectivamente y que algunos de esos residuos son críticos para la formación y función normal de la proteína.

Los datos indican de manera más convincente, que los compuestos de vanadio tienen potencial aneugénico. Son potentes inhibidores de fosfatasas de tirosina, incluyendo a las fosfatasas cdc25 y de la dineína ATP-asa, lo cual explica porqué interfieren con la formación apropiada del aparato mitótico y predisponen a la mala segregación cromosómica (Attia *et al.* 2005).

Por otro lado, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y las proteínas son los blancos fundamentales de las reacciones de los radicales libres. Debido a la reactividad de los radicales libres con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones aminoacídicas mediadas por RLs (Martínez-Cayuela 1998). Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Martínez-Cayuela 1998), como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína, formación de grupos carbonilos e impiden el desarrollo normal de sus funciones (Rodríguez *et al.* 2001).

Los enlaces peptídicos también son susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido (Martínez-Cayuela 1998). Aunado a que los grupos tioles son inactivados por las ERO's (Chihuilaf *et al.* 2002).

Por todo lo anterior, tanto el pentóxido de vanadio como el cloruro de manganeso son compuestos que pueden ser considerados mutagénicos y genotóxicos con efectos clastogénicos y/o aneuploidogénicos y, aunque no existen datos que indiquen que el vanadio o el manganeso son carcinógenos, no debe eliminarse esa posibilidad, debido a que interfieren con la distribución cromosómica, así que podría considerarse que presentan propiedades carcinogénicas (Leónard y Gerber 1994).

## **8.4 ¿Por qué se observaron diferencias entre hembras y machos?**

### **8.4.1. Diferencias *per se***

En 2003, Borrás y colaboradores aportan evidencia experimental sobre las diferencias *per se* entre hembras y machos. Debido a que la mitocondria es la mayor fuente de radicales libres en las células, se analizaron los niveles basales de antioxidantes mitocondriales en hembras sanas, hembras ovariectomizadas y en machos adultos. En ese estudio, los autores reportan que las hembras generan la mitad de la cantidad de peróxidos que los machos y esto no ocurre en hembras ovariectomizadas, aunado a que las hembras presentan mayores niveles de glutatión reducido que los machos, mientras que las ovariectomizadas tienen los mismos niveles que éstos últimos.

Las mitocondrias hepáticas de los machos, producen 40% más de peróxido que las mitocondrias hepáticas de las hembras, de igual manera, las mitocondrias cerebrales de los machos generan 80% más de peróxidos que las de las hembras de la misma edad (Borrás *et al.* 2003).

Por otro lado, el daño oxidante al DNA mitocondrial en los machos es 4 veces mayor que en las hembras, el nivel de 8-Oxo-Gua en la mitocondria de los machos es mayor en un 400%. Esto es debido a la alta expresión y a la gran actividad de la Mn-superóxido dismutasa y de la glutatión peroxidasa en hembras, lo cual confiere protección contra el daño oxidante (Borrás *et al.* 2003).

Importante es mencionar que cuando a las hembras ovariectomizadas y a los machos se les administraron estrógenos, se observó que éstos tienen un efecto protector

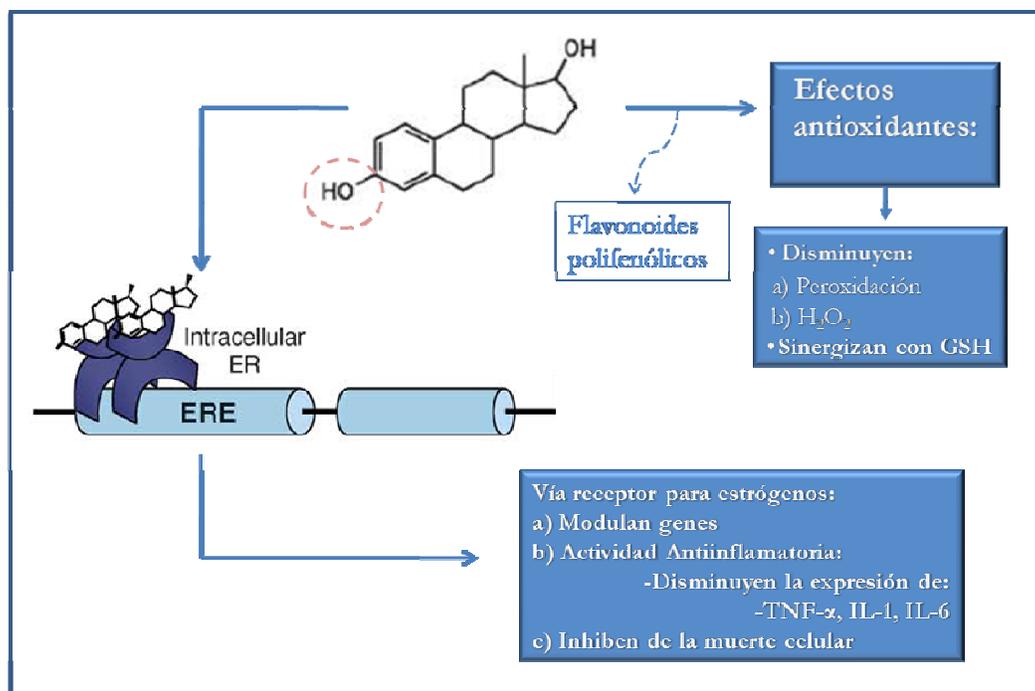
contra la producción de radicales libres en la mitocondria. Esto refuerza la idea de la actividad protectora de los estrógenos (Borrás *et al.* 2003).

También se reconocen diferencias por género en la farmacocinética de los xenobióticos. Los reportes indican que los hombres tienen menos concentración de ferritina en el suero y absorben significativamente menos manganeso desde el tracto gastrointestinal, que las mujeres. Sin embargo, las concentraciones de manganeso en el suero son más altas en hombres sanos que en mujeres sanas; los hombres tienen aproximadamente 24% más alta la concentración de Mn en el suero que las que tienen las mujeres, además de que este metal, en los hombres, es retenido por un tiempo significativamente mayor (Dorman *et al.* 2004).

#### 8.4.2. Diferencias hormonales: estrógenos

La formación intracelular de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs), están implicadas en la patogénesis de gran cantidad de enfermedades (Tamir *et al.* 2002). Hoy día, es bien conocido que los estrógenos confieren protección a la célula en varias enfermedades relacionadas con estrés oxidante (p.e. Alzheimer y Parkinson) (Tamir *et al.* 2002).

La protección de los estrógenos en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* incluyen: activación del receptor nuclear a estrógenos, expresión de Bcl2 y de proteínas antiapoptóticas relacionadas, activación de la vía de las MAPKs, activación de las vías de transducción de AMPc, modulación de la homeostasis del calcio y actividad directamente antioxidante (Tamir *et al.* 2002) (Figura 83).



**Figura 83.** Mecanismos de protección celular propuestos para los estrógenos. El grupo OH del anillo fenólico A se señala con la línea punteada rosa.

Los datos sugieren, que los estrógenos y sus derivados funcionan como antioxidantes por ser 'barredores' de radicales libres y que ejercen esta función de manera independiente del receptor e involucra el atrapamiento de radicales así como también la reducción y/o quelación de los iones oxidantes (Badeau *et al.* 2005). Los requerimientos estructurales para la actividad antioxidante de los estrógenos son: los compuestos que presentan un anillo monofenólico son poderosos barredores de RL porque pueden donar con facilidad electrones (p.e. los antioxidantes flavonoides polifenólicos como la vitamina E y A). Los reportes indican que el grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo fenólico A de los estrógenos, es de suma importancia (Amantea *et al.* 2005, Badeau *et al.* 2005). Este grupo hidroxilo del anillo A, puede donar un hidrógeno, desintoxicando así, la acumulación de radicales libres (como es el caso del radical hidroxilo). De esta manera, los estrógenos pueden actuar como "escudo químico" en contra del estrés oxidante (Behl 2002).

Aunado a su estructura química, los estrógenos pueden interactuar con otros antioxidantes, proveyendo protección adicional (Badeau *et al.* 2005).

Experimentalmente, se ha sugerido que la conexión entre las propiedades antioxidantes de los estrógenos y la protección, es debida a que las propiedades protectoras a bajas concentraciones de estradiol (<1nM) aumentan considerablemente en la presencia de glutatión (Xia *et al.* 2002).

Por otro lado, la disfunción mitocondrial resultado del estrés oxidante ha sido implicado en la cascada patológica que culmina en la muerte de la célula. Se ha propuesto que los estrógenos que ejercen un efecto estabilizante sobre la mitocondria y mitigan el daño mitocondrial. Los estrógenos proveen un efecto citoprotector contra el estrés oxidante *in vitro*, manteniendo la integridad y previniendo la despolarización mitocondrial (Moor *et al.* 2004).

Los niveles de estrógenos en los machos adultos sanos, son inmensamente menores que en las hembras adultas sanas, por lo que las concentraciones mayores de estrógenos en los ratones hembra (tanto en las adultas, como en las prepúberes durante el período de recuperación), podrían estar ejerciendo un efecto protector, previniendo el daño genotóxico.

### **8.5. ¿Cómo el vanadio y el manganeso podrían causar la disminución del conteo eritrocitario?**

Todos los mecanismos que se describen a continuación, podrían estar implicados en mayor o menor medida en la disminución del conteo reticulocitario que se observó en los animales expuestos, para ello es importante hacer una breve reseña del proceso esencial conocido como *eritropoyesis*.

#### **Eritropoyesis**

La eritropoyesis es un complejo proceso de la producción de las células de la serie roja a través de la promoción de la supervivencia, proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides en la médula ósea. El balance entre la división y la maduración requiere la expresión coordinada de factores de transcripción linaje-específicos, proteínas estructurales y receptores de factores de crecimiento que confieren una fisiología única a la célula eritroide (Aguirre *et al.* 2005). Los progenitores eritroides

más primitivos son denominados unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E), estos proliferan y dan origen a progenitores eritroides más maduros, denominadas unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E). Estos progenitores dan lugar a precursores eritroides dentro de los que se incluyen: proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos, eritroblastos ortocromáticos y reticulocitos, estos últimos a su vez dan origen a los eritrocitos (Mayani *et al.* 2007).

A lo largo de esta ruta de diferenciación, la Eritropoyetina (EPO) actúa como una de las principales citocinas reguladoras de la eritropoyesis. Esta molécula es producida por células renales y en menor proporción por las células hepáticas (Mayani *et al.* 2007).

Además de la EPO, citocinas como interleucina 3 (IL-3), trombopoyetina (TPO), ligando de tirosina fetal 3 (FLT-3L) y el factor de células seminales (SCF) participan también en la eritropoyesis; estas citocinas son capaces de sinergizar con EPO y regular la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de células progenitoras y precursores eritroides (Mayani *et al.* 2007).

Cabe mencionar que además de las citocinas estimuladoras de la mielopoyesis existe un número considerable de citocinas que la inhiben, como: el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), la proteína inflamatoria de macrófagos-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) y los interferones (IFN), entre otras (Mayani *et al.* 2007). Estas moléculas son capaces de disminuir los niveles de células troncales y progenitoras hematopoyéticas, mediante la inhibición de su proliferación; dicha inhibición puede ocurrir de manera directa -por inducir la disminución de la expresión de receptores de moléculas estimuladoras- o a través del efecto sinérgico entre dos o más factores, causando un efecto supresor en la proliferación y formación de colonias hematopoyéticas (Mayani *et al.* 2007).

Es evidente que la hematopoyesis es un proceso muy complejo, en el que participan diversos tipos celulares y sus productos: todos estos interactúan estrechamente para permitir que la producción de células sanguíneas ocurra de manera controlada, es claro también que al ocurrir alteraciones en algunos de los compartimientos celulares del sistema hematopoyético, sobre todo en los más primitivos, la producción de células sanguíneas puede verse modificada, de manera que los niveles de células circulantes sean abatidos drásticamente o incrementados muy por encima de lo normal; cualquiera de estas dos condiciones puede conducir a estados patológicos, e incluso a la muerte del organismo (Mayani *et al.* 2007).

### ***Factores implicados en la disminución de la eritropoyesis***

#### ***i) Inhibición de Fosfatasas y Cinasas***

La eritropoyesis es un proceso finamente regulado, aproximadamente  $10^{11}$  células tienen que ser reemplazadas diariamente. La citocina principal que controla la producción apropiada de eritrocitos, es la Eritropoyetina (EPO), la cual es principalmente sintetizada en el riñón. La EPO actúa con múltiples vías de señalización que son transducidas por el receptor de EPO en los eritroides progenitores (von Lindern *et al.* 2004).

En condiciones normales, la EPO controla principalmente la sobrevivencia celular durante la diferenciación eritroide, sin embargo en condiciones anormales, la EPO coopera con otros factores tales como el factor de células stem (SCF o c-Kit). Los

receptores para EPO y c-Kit se asocian y forman complejos con cinasas de tirosina, cinasas de lípidos, fosfatasas y algunas otras moléculas, las cuales son las responsables del mantenimiento del fenotipo y progresión hacia la diferenciación del linaje eritroide (von Lindern *et al.* 2004). En este sentido, el vanadio es un potente inhibidor de una gran variedad de enzimas entre ellas, cinasas y fosfatasas (Ciranni *et al.* 1995), por lo que es posible, que interfiera directamente con el proceso de diferenciación eritroide. La evidencia experimental apoya esta teoría, debido a que Aguirre y colaboradores (2005) encontraron cambios en los conteos de los precursores eritroides en médula ósea después de la inyección de ortovanadato. Se observó incremento significativo en la proporción de eritroblastos policromáticos y normoblastos ortocromáticos, lo cual indica que la eritropoyesis se detiene en estadios previos al de reticulocito.

### *ii) Inducción de TNF- $\alpha$*

El vanadato y los radicales libres inducen la activación del promotor de TNF- $\alpha$  lo cual a su vez incrementa la concentración de esta molécula (Ye *et al.* 1999). La importancia radica en que esta citocina es capaz de inhibir los procesos mielopoyéticos en médula ósea (Mayani *et al.* 2007).

### *iii) Compuestos hepatotóxicos y nefrotóxicos*

La exposición a vanadio (aguda o crónica) tanto en modelos experimentales como en estudios en humanos, indica que este metal influencia el metabolismo celular y la función de los tejidos provocando procesos patológicos y fisiopatológicos (Cooper 2007).

En 2007, Cooper reporta que la exposición crónica a la inhalación de pentóxido de vanadio (27mg/m<sup>3</sup> durante 70 días) produce cambios histopatológicos en el hígado, estos cambios incluyen: congestión de la vena central con pequeñas hemorragias y degeneración de los hepatocitos. Por otro lado, la exposición a este compuesto, estimula la secreción por los hepatocitos de citocinas y quimiocinas que están asociadas con hepatotoxicidad.

La secreción de EPO está fuertemente regulada por el estado funcional del riñón, por ejemplo en los casos de glomerulonefritis, la anemia aguda que se produce, es debida a la falta de secreción renal de eritropoyetina, en la que la liberación de citocinas pro-inflamatorias en el tejido renal inhibe la secreción de EPO y esto lleva a anemia. Este tipo de anemia se caracteriza por presentar un hematocrito bajo con una reticulocitemia inferior a la normal. Al respecto, De la Torre y colaboradores (1999) reportan que el vanadio es nefrotóxico *in vivo*.

Por lo anterior, si los compuestos tienen efectos adversos sobre los dos órganos principales de producción de EPO, factor esencial en la eritropoyesis, entonces es posible que este sea, en parte, el mecanismo por el cual la producción eritrocitaria se ve afectada.

### *iv) Eriptosis*

La muerte por 'suicidio' de los eritrocitos (eriptosis) está caracterizada por vesiculación de la membrana, activación de proteasas y la exposición de fosfatidilserina en la hojuela externa de la membrana. La exposición de la fosfatidilserina es reconocida por los macrófagos que engullen y degradan a las células afectadas. La eriptosis excesiva

favorece el desarrollo de anemia. La eritropoiesis es disparada por el eritrocito en respuesta a varios factores, entre ellos el estrés oxidante, deficiencia de hierro, intoxicación por plomo o mercurio, talasemia, deficiencia en la glucosa-6-fosfato (Lang *et al.* 2006) y al incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el eritrocito (Föller *et al.* 2008).

Dentro de la batería de enzimas que son inhibidas por el vanadio y sus compuestos se encuentra la glucosa-6-fosfato, por lo que este podría ser un factor más que conlleva al bajo conteo eritrocitario (Leónard y Gerber 1994), aunado a la generación del estrés oxidante que causan tanto el vanadio como el manganeso.

#### *v) Interacción con el metabolismo del hierro*

Se ha reportado, que grandes cantidades de manganeso en la dieta de ratas, causan anemia, lo cual indica un efecto negativo del manganeso sobre la absorción del hierro y subsecuentemente sobre la eritropoyesis (Rossander-Hultén *et al.* 1991).

*In vitro*, la exposición a manganeso puede perturbar la regulación celular del hierro (Fe) debido a que altera directamente a la proteína reguladora del hierro (IRP), una consecuencia tóxica y funcional de ello, puede ser su incremento intracelular (Reaney y Smith, 2005). Por otro lado, el manganeso es un antagonista del hierro (Rodríguez *et al.* 2001). Particularmente, la exposición a Mn(III) afecta el metabolismo del hierro en mayor medida que el Mn(II). Por lo anterior, se sugiere que la exposición a este metal produce una disminución muy importante en las reservas celulares de hierro (Reaney y Smith 2005).

El hierro sirve como transportador de oxígeno de los pulmones a los tejidos a través de la hemoglobina de los glóbulos rojos, como transportador de electrones en la membrana intracelular y como integrante del sistema enzimático en diversos tejidos (Baiocchi 2006).

La absorción del hierro es facilitada por el transportador de metales divalentes (DMTI) conocido también como transportador divalente de cationes (DCTI) (Baiocchi 2006). El hierro circula en el plasma unido a la transferrina y en pequeña proporción a la albúmina que lo transportan desde las células intestinales a los receptores celulares de hierro. Todas las células del organismo tienen receptores de membrana para transferrina (RTf) aunque la mayoría de ellos se encuentran en los precursores eritroides de médula ósea (Baiocchi 2006). Cabe mencionar que el manganeso utiliza prácticamente las mismas vías de entrada a la célula y a las mismas proteínas transportadoras, con la excepción de que este metal tiene una mayor afinidad por ellas debido a que es el competidor más eficaz del  $\text{Fe}^{2+}$ .

En la anemia ferropénica, los depósitos de hierro se encuentran agotados, el transporte de hierro reducido y la concentración de hemoglobina por debajo de los límites normales, los eritrocitos se observan más pequeños (microcitos) e hipocrómicos (Baiocchi 2006). Una de las causas de la anemia ferropénica es por una pobre absorción del hierro.

La evidencia sugiere que la absorción de manganeso inhalado comparado con la que es ingerido sea mayor y que el incremento en la absorción esté asociada a la deficiencia de hierro (Cooper 2007). Lo anterior está apoyado por la evidencia obtenida con POE, en los que se ha observado que altos niveles de manganeso correlacionan perfectamente con la deficiencia de hierro (Boojar *et al.* 2002).

La biodisponibilidad del hierro es esencial para la eritropoyesis y ésta puede disminuir si el hierro no está disponible (Baiocchi 2006).

Por todo lo anterior, la interacción del metabolismo del manganeso con el metabolismo del hierro, puede tener efectos adversos sobre la biodisponibilidad de este último por parte de las células de médula ósea, e interferir de esta manera con los procesos eritropoyéticos.

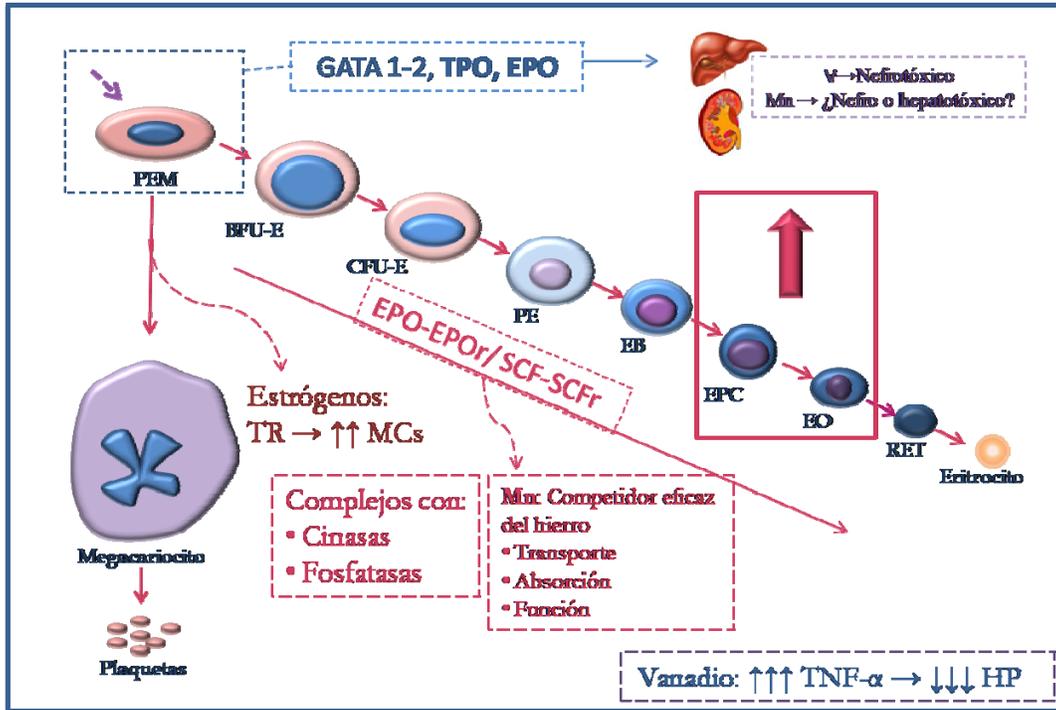


Figura 84. Posibles mecanismos por los cuales el vanadio y el manganeso causan la disminución del conteo reticulocitario.

### 8.6. ¿Por qué no se observaron diferencias significativas entre los grupos expuestos?

Cuando los organismos son sometidos a exposiciones simultáneas los resultados pueden ser muy variables, entre lo que se ha encontrado podemos mencionar:

- a) Ausencia de diferencia entre el grupo expuesto a la mezcla y los grupos individuales (Pillai y Gupta 2005).
- b) Un efecto potenciado en el grupo expuesto a la mezcla (Bizarro *et al.* 2003).
- c) Efecto en el grupo expuesto más parecido al efecto que causa uno de los dos compuestos (Pillai y Gupta 2002).

El efecto que se observa, depende de varios factores como: diferencias específicas en las toxicidades de los metales, la solubilidad, la absorbilidad, el transporte dentro del cuerpo, la actividad química del elemento y los complejos que éste o éstos puedan formar en el organismo.

En este caso, no hubo efecto diferencial en la exposición de la mezcla vanadio-manganeso. Lo cual podría deberse a que estos metales compiten entre sí para ejercer su toxicidad o debido a que tienen mecanismos de acción muy similares. Por lo anterior, en exposiciones simultáneas, es necesario realizar investigaciones dirigidas al entendimiento de las interacciones de los metales que se administran y de las respuestas de los organismos.

## 9. Conclusiones

1. El  $V_2O_5$ , el  $MnCl_2$  y su mezcla, son compuestos genotóxicos debido a que fueron capaces de inducir **aumento** significativo en el número de **MNs** de los individuos expuestos por vía inhalada, lo cual podría deberse a la interacción de los metales con el huso acromático o al rompimiento de las cadenas de DNA, que al tratarse de células en proliferación, se pueden convertir en rompimientos de cadena doble y generar de este modo, pérdida importante de material genético evidenciada como micronúcleos.
2. Nuestros resultados indican que la presencia de MNs está relacionada con el género y con el estado hormonal (edad) de los individuos.
  - Los animales prepúberes presentan una mayor susceptibilidad al daño genotóxico que los animales adultos. En el caso de las hembras, los efectos desaparecen conforme maduran sexualmente, lo cual indica que la presencia de estrógenos podría ser un factor de protección importante.
  - Los machos adultos son más susceptibles al daño genotóxico que las hembras adultas. Lo anterior podría estar mediado por la presencia de estrógenos, a los cuales se les considera eficaces antioxidantes que pueden presentar en las células diversos mecanismos de acción.
3. El  $V_2O_5$ , el  $MnCl_2$  y su mezcla, fueron capaces de inducir **decremento** significativo en el número de **EPCs** de los individuos expuestos por vía inhalada, lo anterior sugiere que son compuestos citotóxicos para las células de médula ósea o que pueden actuar desfavorablemente sobre los procesos eritropoyéticos.
4. Nuestros resultados indican, que el efecto de estos compuestos sobre la disminución de EPCs, no está relacionado con factores como el estado hormonal o el género, sino que todos los individuos son igualmente susceptibles a los efectos adversos de estos metales.

## 9.1. Relación con los hallazgos anteriores con el modelo de inhalación

- González-Villalva (2004), reportó la disminución de hematocrito y de hemoglobina en animales expuestos a vanadio. En este sentido, los datos obtenidos en este trabajo experimental apoyan la teoría de que el vanadio por vía inhalada es capaz de generar un cuadro de anemia en los organismos expuestos, la cual persiste a lo largo del tiempo.
- Piñón-Zárate (2005) observó aumento en el número de Megacariocitos de ratones hembras (mayor proliferación y ploidía) y machos expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio. En nuestros resultados se observó una disminución significativa en el número de EPCs, lo cual abre la posibilidad de que la célula madre bipotencial que da origen a ambos linajes (megacariocítico y eritroide) se encuentre afectada. Por otro lado, se ha reportado que los estrógenos inducen la proliferación de los megacariocitos, así que esto nos permite abrir el panorama para la siguiente cuestión: ¿Qué papel juegan los estrógenos o sus receptores en nuestro modelo?
- Pérez-De Gante (2009) reporta rompimientos de cadena sencilla en células de médula ósea de ratones hembras y machos expuestos a  $V_2O_5$ , observando que los machos presentan mayor proporción de células dañadas. En ese sentido, el patrón diferencial de daño genotóxico se confirma con este modelo de exposición.
- **Este trabajo es el primero en reportar los efectos a largo plazo que causan la inhalación de vanadio, manganeso y su mezcla, lo cual indica la importancia no sólo de los efectos que se presentan durante el período de exposición, sino también de los efectos que persisten, no obstante, la exposición haya concluido.**

## 10. Consideraciones finales

La contaminación ambiental es un problema que se acrecienta día con día en las megaciudades, particularmente es de nuestro interés, la Zona Metropolitana del Valle de México, debido a que en ella habitamos 22 millones de personas que estamos expuestas diariamente a su atmósfera. Este trabajo aporta información en varios sentidos:

1. Sobre el potencial genotóxico experimental de dos contaminantes toxicológicamente relevantes (puesto que se adosan a las partículas suspendidas) los cuales respiramos cotidianamente.
2. Sobre la susceptibilidad por género y edad que puede presentarse ante la exposición a xenobióticos, así como la respuesta que no está influenciada por este factor.
3. Sobre los efectos a largo plazo de estos metales, que persisten aún después de concluirse la exposición. Esto reviste especial interés, debido a que, en futuras investigaciones, se debe tomar en cuenta que la respuesta del organismo expuesto, va más allá del período experimental.
4. La correlación con otros trabajos experimentales con este modelo de inhalación, nos ayuda al entendimiento de los mecanismos de acción por los cuales los metales ejercen su toxicidad y a comprender nuestro modelo biológico. Esto evidencia la importancia del trabajo multidisciplinario y en conjunto.

## 11. Referencias

- **Acevedo-Nava, S.** La participación de la peroxidación lipídica en el daño hepático por la inhalación de vanadio. 2005. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UNAM.
- **Aguirre MV, Juaristi JA, Alvarez MA, Brandan NC.** Characteristic of *in vivo* murine erythropoietic response to sodium orthovanadate. *Chemico Biological Interactions*. 2005; 156:55-68.
- **Ali SF, Duhart HM, Newport GD, Lipe GW, Slikker W.** Manganese-induced reactive oxygen species: comparison between Mn<sup>2+</sup> and Mn<sup>3+</sup>. *Neurodegeneration*. 1995; 4: 329-334.
- **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 (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 1999; 19: 243-255.
- **Amantea D, Russo R, Bagetta G, Corasaniti MT.** From clinical evidence to molecular mechanism underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacological Research*. 2005; 52: 119-132.
- **Arias E.** Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in chick embryos after treatment with the fungicide maneb. *Mutation Research*. 1988; 206: 271-3.
- **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 responsible for effects on human lung epithelial cells. *Research Report (Health Effects Institute)*. 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 immunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical Research*. 2004; 29: 1365-1369.
- **Badeau M, Adlercreutz H, Kaihovaara P, Tikkanen MJ.** Estrogen A-ring structure and antioxidative effects on lipoproteins. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2005;96: 271-278.
- **Baiocchi Ureta, N.** Anemia por deficiencia de hierro. *Revista Peruana de Pediatría*. Setiembre-Diciembre, 2006: 20-27.
- **Barceloux DG.** Manganese. *Clinical Toxicology*. 1999; 37: 293-307.
- **Barceloux DG.** Vanadium. *Clinical Toxicology*. 1999; 37: 265-278.
- **Barrera-Ferrer SM, Villalobos-Cabrera HD.** Genotoxic effects of vanadyl sulphate in *Drosophila melanogaster*. *Investigation Clinical*. 1998; 39: 123-137.

- **Behl C.** Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002; 3: 433-442.
- **Bizarro P, Acevedo S, Niño-Cabrera G, Mussali-Galante P, Pasos F, Ávila-Costa MR, Fortoul TI.** Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead-cadmium mixture. *Reproductive Toxicology*. 2003; 17: 561-566.
- **Boojar MM, Goodarzi F, Basedaghat MA.** Long-term follow-up of workplace and well water manganese effects on iron status indexes in manganese miners. *Archives of Environmental Health*. 2002; 57: 519-28.
- **Borrás C, Satre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J.** Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 34: 546-552.
- **Brenneman KA, Wong BA, Buccellato MA, Costa ER, Gross EA, Dorman DC.** Direct olfactory transport of inhaled manganese (MnCl<sub>2</sub>) to the rat brain: toxicokinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000; 169: 238-248.
- **Carter SD, Hein JF, Rehnberg GL, Laskey JW.** Chronic manganese oxide ingestion in rats: hematological effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1980; 6: 207-16.
- **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. *Veterinaria México*. 2002; 33: 265-283.
- **Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH, Cho MH.** Comparative study of PM<sub>2.5</sub>- and PM<sub>10</sub>-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.
- **Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J.** Oxidative DNA damage: mechanism, mutation and disease. *The FASEB Journal*. 2003; 17: 1995- 1214.
- **Cooper R.** Vanadium pentoxide inhalation. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2007; 11(3): 97-103.
- **Cooper WC.** The health implications of increased manganese in the environment resulting from the combustion of fuel additives: a review of the literature. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1984; 14: 23-46.
- **Crans DC, Smee JJ, Gaidamauskas E, Yang L.** The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chemical Reviews*. 2004; 104: 849-902.
- **De la Torre A, Granero S, Mayayo E, Corbella J, Domingo JL.** Effect of age on vanadium nephrotoxicity in rats. *Toxicology Letters*. 1999; 105: 75-82.
- **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*. 2001a; 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*. 2001b; 170: 79-87.
- **Dorman** DC, Struve MF, Vitarella D, Byerly FL, Goetz J, Miller R. Neurotoxicity of manganese chloride in neonatal and adult CD rats following subchronic (21 day) high-dose oral exposure. *Journal of Applied Toxicology*. 2000; 20: 179-287.
- **Dorman** DC, McManus BE, Marshall MW, James RA, Struve MF. Old age and gender influence the pharmacokinetics of inhaled manganese sulfate and manganese phosphate in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004; 197:113-24.
- **Elbetieha** A, Bataineh H, Darmani H, Al-Hamood MH. Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice. *Toxicology Letters*. 2001; 8: 193-201.
- **Englert** N. Fine particles and human health- a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters*. 2004; 149: 235-242.
- **Environmental Protection Agency** (EPA). Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5395 Mammalian erythrocyte micronucleus test. Prevention, pesticides and toxic substances (7101). EPA 712-C-98-226. August, 1998.
- **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.
- **Fenech** M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000; 455: 81-95.
- **Flores** RJ. Contaminación Atmosférica. En: *Toxicología Ambiental*. Lilia A. Albert (ed). 2004. México: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- **Föller** M, Sopjani M, Mahmud H, Lang F. Vanadate-induced suicidal erythrocyte death. Kidney. *Blood Press Research*. 2008; 31: 87-93.
- **Fortoul** TI, Moncada-Hernández S, Saldivar-Osorio, Espejel-Maya G, Mussali-Galante P, Ávila-Casado MC, Colín-Barenque L, Hernández-Serrato MI, Ávila-Costa MR. Sex differences in bronchiolar epithelium response after the inhalation of lead acetate (Pb). *Toxicology*. 2005; 207: 323-330.
- **Fortoul** TI, Valverde M, López MC, Avila-Costa MR, Avila-Casado MC, Mussali-Galante P, Gonzalez-Villalva A, Rojas E, Ostrosky-Shejet P. Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area. *Environmental Research*. 2004; 94: 243-8.
- **Fortoul** TI, Quan-Torres A, Sánchez I, López IE, Bizarro P, Mendoza ML, Saldivar 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.
- **Gerber** GB, Leonard A, Hantson P. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002; 42: 25-34.
- **Ghio** AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic Effects of oil fly ash. *Environmental Health Perspectives*. 2002; 110: 89-94.
- **González-Villalva** AE. Alteraciones morfológicas secundarias a la inhalación aguda, subcrónica y crónica de vanadio en médula ósea, timo y sangre periférica. Modelo en ratón. 2004. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UNAM.
- **Goodnough** LT, Skikne B, Brugnara C. Erythropoietin, iron and erythropoiesis. *Blood*. 2000; 96: 823-833.
- **Halliwell** B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal*. 1984; 21: 1-14.
- **HaMai** D, Bondy SC. Pro-or-anti-oxidant manganese: a suggested mechanism for reconciliation. *Neurochemistry International*. 2004; 44: 223-229.
- **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.
- **Hayashi** M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The Micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*. 1990; 245: 245-249.
- **Herrera** NP, Quintal JMC, Escalante DP. Prevalencia de intercambio de cromátides hermanas en una población libre de exposición a agentes clastogénicos. *Revista Biomédica*. 1999; 10: 71-76.
- **Hogan** GR. Peripheral erythrocyte levels, hemolysis and three vanadium compounds. *Experientia*. 1990 15; 46: 444-6
- **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.
- **Iversen** PO. Blood flow to the haemopoietic bone marrow. Review article. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1997; 159: 269-276
- **Jablonická** A, Poláková H, Karelová J, Vargová M. Analysis of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of workers with occupational exposure to the mancozeb-containing fungicide Novozir Mn80. *Mutation Research*. 1989; 224(2): 143-6
- **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.
- **Kehrer** JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*. 1993; 23: 21-48.
- **Keller** J, Owens CT, Lai JCK, Devaud LL. The effects of 17 $\beta$ -estradiol and ethanol on zinc- or manganese-induced toxicity in SK-N-SH cells. *Neurochemistry International*. 2005; 46: 293-303.
- **Kirazov** EP, Weiss DG. Effects of vanadate on the assembly and disassembly of purified tubulin. *Cell Motility Cytoskeleton*. 1986; 6: 313-323.
- **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.

- **Krishna G**, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*. 2000; 455: 155-166.
- **Lang F**, Lang KS, Lang PA, Huber SM, Wieder T. Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2006; 8: 1183-92.
- **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.
- **Li G**, Chu J, Wu Q, Gu Y. Effect of manganese on the ratio of micronucleus cells in mice marrow. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2001; 30: 137-8
- **Lima PDL**, Vasconcellos MC, Bahia MO, Montenegro RC, Pessoa CO, Costa-Lotuf LV, Moraes MO, Burbano RR. Genotoxic and cytotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Toxicology In Vitro*. 2008. In Press.
- **Lindahl T**, Word RD. Quality control by DNA repair. *Science*. 1999; 286: 76-82.
- **López-Diazguerrero NE**, Luna-López A, Gutiérrez-Ruiz MC, Zentella A, Königsberg M. Susceptibility of DNA to oxidative stressors in Young and aging mice. *Life Sciences*. 2005; 77: 2840-2854.
- **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. *Toksikol Proizvod Ispolz Fosfororg Plastik*. 1966; 10: 209-212.
- **Mandzgaladze RN**. On the mutagenic properties of manganese compounds. *Toksikol Proizvod Ispolz Fosfororg Plastik*. 1966; 10: 225-226.
- **Marconi A**. Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*. 2003; 39: 329-342.
- **Martínez-Cayuela M**. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*. 1998; 39: 5-18.
- **Mayani H**, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. Hematopoyesis. *Cancerología*. 2007; 2: 95-107.
- **Migliore L**, Bocciardi R, Macrì C, Lo Jacono F. Cytogenetic 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: 205-13
- **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.
- **Moor** AN, Gottipati S, Mallet RT, Sun J, Giblin FJ, Roque R, Cammarata PR. Aputative mitochondrial mechanism for antioxidative cytoprotection by 17beta-estradiol. *Experimental Eye Research*. 2004; 78: 933-944.
- **Morgan** AM, El-Tawil OS. Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. *Pharmacological Research*. 2003; 47: 75-85.
- **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.
- **Mussali** GP, Rodríguez LV, Hernández TB, Ávila-Costa MR, Colín BL, Bizarro NP, Martínez LG, Rojas LM, Piñón ZG, Saldívar OL, Herrera EMA, Tovar SE and Fortoul T. Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times. *Toxicology and Industrial Health*. 2005; 21: 215-222.
- **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.
- **Ono** S, Tsujimoto H, Hiraki S, Takahata R, Kinoshita M, Mochisuki H. Sex differences in cytokine production and surface antigen expression of peripheral blood mononuclear cells after surgery. *The American Journal of Surgery*. 2005; 190: 439-444.
- **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.
- **Pérez- De Gante** CL. Efecto del pentóxido de vanadio sobre las células de médula ósea. Comparación por género. 2009. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- **Pillai** A, Gupta S. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver of female rats co-exposed to lead and cadmium: effects of vitamin E and Mn<sup>2+</sup>. *Free Radical Research*. 2005; 39: 707-712.
- **Pillai** A, Priya PNL, Gupta S. Effects of combined exposure to lead and cadmium on pituitary membrane of female rats. *Archives of Toxicology*. 2002; 76: 671-675.
- **Piñón-Zárate** G. Alteraciones morfológicas de bazo secundarias a la inhalación aguda, subaguda y crónica de pentóxido de vanadio. Modelo en ratón. 2005. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- **Ramírez** P, Eastmond DA, Lacleite JP, Ostrosky-Wegman P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 1997; 386: 291-8.
- **Reaney** SH, Smith DR. Manganese oxidation state mediates toxicity in PC12 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005; 205: 271-281.

- **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** PJM, Menéndez LJR, Trujillo LY. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar*. 2001; 30(1): 36-44.
- **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.
- **Rojas-Lemus M.** Pentóxido de Vanadio y Cloruro de Manganeso: Comparación de sus efectos genotóxicos en leucocitos. Modelo murino de exposición por inhalación. 2006. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- **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.
- **Rossander-Hultén** R, Brune M, Sandström B, Lönnerdal B, Hallberg L. Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1991; 54: 152-156.
- **Roth** JA, Garrick MD. Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochemical Pharmacology*. 2003; 66: 1-13.
- **Sadykov** KI. Cellular and cytogenetic evaluation of manganese-containing dust in experiment. *Meditsina Truda I Promyshlennaiia Ekologiya*. 2008; 2: 18-22.
- **Saiz** Moreno L, García de Osma JL, Compañe Fernández C. Animales de laboratorio, producción, manejo y control sanitario. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias Madrid. Colección de Monografías INIA, 1983. 596 pp.
- **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.
- **Scheirs** J, De Coen A, Covaci A, Beernaert J, Kayawe VM, Caturia M, De Wolf H, Baert P, Van Oostveldt P, Verhagen R, Blust R, De Coen W. Genotoxicity in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a pollution gradient: exposure-age- and gender-related effects. *Environmental Toxicology Chemistry*. 2006; 25: 2154-62.
- **Scibior** A, Zaporowska H. Effects of vanadium(V) and/or chromium (III) on L-ascorbic acid and glutathione as well as iron, zinc, and copper levels in rat liver and kidney. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2007; 70: 696-704.
- **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.
- **Sloot 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. *Biochemistry and Cell Biology*. 1993; 71: 103-112.
- **Tamir S, Izrael S, Vaya J.** The effect of oxidative stress on ER-a and ER-b expression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2002; 81: 327-332.
- **Taylor JS.** Unraveling the molecular pathway from sunlight to skin cancer. *Accounts of Chemical Research*. 1994; 27: 76-82.
- **Thompson KH.** Vanadium and diabetes. *Biofactors*. 1999; 10: 43-51.
- **Vahter M, Akesson A, Lidén C, Ceccatelli S, Berglund M.** Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environmental Research*. 2007; 104: 85-95.
- **Vahter M, Berglund M, Akesson A, Lidén C.** Metals and women's health. *Environmental Research Section*. 2002; 88: 145-155.
- **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.
- **Von Lindern M, Schimdt U, Beug H.** Control of erythropoiesis by erythropietin and stem cell factor. A novel role for bruton's tyrosine kinase. *Cell Cycle*. 2004; 3: 876-879.
- **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*. 2000; 343: 201-207.
- **Wei EP, Christman CW, Kontosw HA, Povlishock JT.** Effects of oxygen radicals on cerebral arterioles. *The American Journal of Physiology*. 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).** 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. Concise International Chemical Assessment Document 12. 1999.

- **World Health Organization** (WHO). Manganese and its compounds: environmental aspects. Concise International Chemical Assessment Document 63. 2004.
- **Xia S, Cai ZY, Thio LL, Kim-Ham JS, Dugan LL, Covey DF, Rothman SM.** The estrogen receptor is not essential for all estrogen neuroprotection: new evidence from a new analog. *Neurobiology of Disease*. 2002; 9: 282-293.
- **Yamamura E, Hirono H, Takeuchi M, Kojima M, Aoki S.** The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides with triethylenemelamine. *Mutation Research*. 1992: 127-130.
- **Ye J, Ding M, Zhang X, Rojanasakul Y, Nedospasov S, Vallyathan V, Castranova V, Shi X.** Induction of TNF-alpha in macrophages by vanadate is dependent on activation of transcription factor NF-kappaB and free radicals reactions. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1999; 198: 193-200.
- **Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A.** El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2005; 28: 227-236.
- **Zaporowska H, Wasilewski W.** Haematological effects of vanadium on living organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*. 1992: 102; 223-231.
- **Zaporowska H, Wasilewski W.** Haematological results of vanadium intoxication in Wistar rats. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*. 1992; 101:57-61.
- **Zhang S, Fu J, Zhou Z.** In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. *Toxicology in Vitro*. 2004; 18: 71-77.
- **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.
- **Ziecik A.** Effect of large doses of manganese on erythropoietic activity1: *Acta Haematologica Polonica*. 1977; 8:181-7