



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

EVALUACIÓN DE LA REPARACIÓN DEL DAÑO AL ADN  
INDUCIDO POR EL PENTÓXIDO DE VANADIO  
EN ESPERMATOZOIDES Y CÉLULAS SANGUÍNEAS  
DE RATÓN.

## TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

KARINA MELGAREJO RAMOS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y TOXICOLOGÍA  
AMBIENTAL

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.

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Mario Altamirano. Por su tiempo, su paciencia, sus valiosas enseñanzas y por impulsarme a ser mejor cada día. ¡Mil gracias! Por aguantarme tanto tiempo en su laboratorio.

A mis amigos: Ángel, Cindel, Reyna, Azucena, Sandra, Jonhatan, Itzel, Karina y Ana, por todos los grandes momentos que pasamos en la carrera. Gracias por compartir esa etapa conmigo, por su amistad y cariño.

A Román y la Doctora Adriana por ayudarme con los tratamientos y con las pruebas, además de brindarme su amistad y apoyo en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad y apoyo. Saben que los quiero.

## **DEDICATORIAS**

**A MIS QUERIDOS PADRES.** Por luchar para poder sobrevivir y seguir juntos cada momento pero sobre todo en los tiempos difíciles. Por estar conmigo siempre, por impulsarme a alcanzar mis sueños y apoyarme a realizarlos. Les dedico con todo mí ser este trabajo, que también es suyo.

**A MIS HERMANAS.** Por su apoyo, cariño y compañía. Por todo lo que hemos compartido y por todo lo que hemos luchado. ¡Las quiero mucho!

**A DAVID.** Por estar conmigo en los momentos felices y en los difíciles, por todo lo que hemos compartido, por todo el amor y el apoyo que me brindas siempre. Mil gracias por seguir a mi lado. ¡Te amo!

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	3
<b>Abreviaturas</b> .....	4
<b>Introducción</b> .....	6
Contaminación.....	6
Contaminación del aire.....	7
Contaminación en las grandes ciudades.....	7
Metales.....	9
Metales pesados.....	10
Vanadio.....	11
Características químicas.....	12
Usos.....	12
Contaminación por vanadio.....	14
Exposición, absorción y metabolismo.....	16
Importancia biológica.....	19
Genética Toxicológica.....	21
Pruebas de Mutagénesis.....	22
Intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y micronúcleos.....	22
Electroforesis unicelular en gel.....	26
Estudios de reparación del ADN.....	29
Genotoxicidad del vanadio.....	30
Toxicidad reproductiva del vanadio.....	31
Espermatozoide.....	32
Espermatogénesis.....	34
Espermatogonia.....	35
Espermatocitos.....	36
Espermiogénesis.....	36



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.

Condensación de la cromatina del espermatozoide.....	37
<b>Justificación.....</b>	<b>39</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>40</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>41</b>
Objetivo general.....	41
Objetivos particulares.....	41
<b>Método.....</b>	<b>42</b>
Animales.....	42
Tratamiento.....	42
Grupos.....	42
Electroforesis unicelular en gel.....	42
Análisis del daño al ADN.....	44
Evaluación espermática.....	44
Análisis estadístico.....	45
<b>Resultados.....</b>	<b>46</b>
Ensayo cometa (células sanguíneas).....	46
Ensayo cometa (espermatozoides).....	49
Morfología espermática.....	52
<b>Discusión.....</b>	<b>55</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>68</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>70</b>

## RESUMEN

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

El vanadio es un metal de transición que puede existir en diversos estados de oxidación y la forma pentavalente es la más tóxica de este metal. Los efectos adversos de los compuestos pentavalentes del vanadio sobre la integridad y segregación de los cromosomas principalmente en células somáticas ha dado como resultados la inducción de micronúcleos, rompimientos de la cadena de ADN, en diferentes sistemas *in vivo* e *in vitro*, sin embargo hasta ahora hace falta información acerca de la recuperación del daño causado por el pentóxido de vanadio, por lo que en este trabajo se evaluara si hay una reparación y reversibilidad del daño causado por el pentóxido de vanadio.

Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto sobre la morfología espermática, así como lesiones en el ADN en células espermáticas y sanguíneas de ratones machos de la cepa CD-1 expuestos a pentóxido de vanadio, mediante el ensayo cometa, así como la reparación del daño después de 0, 1, 2, 3 ó 4 semanas al término del tratamiento. Para ello, se empleó un grupo de 24 ratones machos de la cepa CD-1 a los que se les administró 8.5 µg/g de peso corporal, de pentóxido de vanadio por vía intraperitoneal (ip) cada tercer día durante 60 días. Un segundo grupo de 5 ratones fueron los testigos, los cuales no se sometieron a ningún tratamiento.

Después del tratamiento, un grupo de 5 animales fueron sacrificados cada semana hasta completar las 4 semanas de recuperación, tomando en cada caso muestras de espermatozoides y de sangre, las cuales se procesaron para la técnica de Electroforesis Unicelular Alcalina (ensayo cometa) pH>13. En el caso de las muestras de espermatozoides se procesaron, también para una evaluación morfológica.

Nuestros resultados mostraron una reducción del daño al ADN tanto en células sanguíneas como en espermatozoides de ratón, hubo diferencias en la recuperación entre ambos tipos celulares, por lo que las características particulares de cada tipo celular influyen en la rápida eliminación del daño. Con respecto a las anomalías espermáticas, estas se fueron incrementando a lo largo de las 4 semanas en las que se permitió la recuperación del daño.

Estos datos sugieren que el pentóxido de vanadio altera el proceso de espermatogénesis, lo que resulta en anomalías espermáticas.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## ABREVIATURAS

Dióxido de azufre	SO <sub>2</sub>
Óxidos de nitrógeno	NO <sub>x</sub>
Monóxido de carbono	CO
Compuestos orgánicos volátiles	COV
Partículas Suspendidas Totales	PST
Anión vanadato	H <sub>2</sub> VO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Pentóxido de vanadio	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Trióxido de vanadio	V <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Tetraóxido de vanadio	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Dinucleótido de nicotidamina y adenina reducido (por sus siglas en ingles)	NADH
Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenida reducido	NADHP
Aberraciones cromosómicas	AC
Intercambio de cromátidas hermanas	ICH
Micronúcleos	MN
Bromodesoxiuridina	Brdu
Citocalacina-B	Cit-B
Anión superóxido	O <sup>2-</sup>
Peróxido de hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Radical hidróxilo	OH <sup>-</sup>
Intraperitonealmente	i.p.
Cloruro de sodio	NaCl
Ácido etilendiamin tetracético	EDTA
Trizma base	TRIS
Dithiotreitol	DTT
Hidróxido de sodio	NAOH
Adenosin Trifosfato (por sus siglas en ingles)	ATP
Metil metano sulfonato	MMS



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.

Diepoxibutano

Metavanadato de sodio

Dosis Letal 50

DEB

$\text{NaVO}_3$

$\text{LD}_{50}$

## INTRODUCCIÓN

### Contaminación

Los seres vivos estamos expuestos a agentes físicos, químicos o biológicos de manera permanente, tanto en el ambiente como en el lugar de trabajo e inclusive en el hogar (Molina y Molina 2004).

Con el aumento de la actividad industrial en los últimos años, la emisión de sustancias peligrosas al ambiente también se ha elevado. Estas sustancias generadas durante los procesos industriales y la de los compuestos subproductos de la quema de combustibles fósiles, como lo son el dióxido de azufre, dióxido de carbono, los óxidos de nitrógeno, hidrocarburos, partículas suspendidas y metales, entre muchos otros contaminantes, y unido a la radiactividad, el calor y al ruido, han propiciado que se alteren los nichos ecológicos (Hu 2002, Rodríguez 2006, Rojas-Lemus *et al.* 2007).

Cuando la exposición de un organismo a un agente determinado tiene como consecuencia efectos nocivos se dice que el efecto es tóxico (del latín *toxicum*, y éste derivado a su vez del griego *toxicon*: veneno). Los efectos de los agentes tóxicos sobre los animales pueden variar según la naturaleza del agente, la ruta de exposición, la duración de la exposición y la dosis recibida (Guachalla y Ascarrunz 2003, Cuenca y Ramírez 2004). La calidad del aire en México es una preocupación permanente, ya que los signos más evidentes de su deterioro como el aumento en las molestias y las enfermedades asociadas a la contaminación, son ya cotidianos en las principales ciudades del país (Semarnat 2002).



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.

## **Contaminación del aire**

Se le define como la emisión de sustancias peligrosas al aire a una tasa que excede la capacidad de los procesos naturales de la atmósfera para transformarlos, precipitarlos, depositarlos o diluirlos por medio del viento y el movimiento del aire (Rodríguez-Lara 2008).

Los contaminantes del aire se deben en gran medida a las actividades antropogénicas como son los procesos de la industria metalúrgica, la combustión del petróleo y sus derivados durante la generación de electricidad y la combustión de gasolinas por los vehículos de motor, entre otras. Debido a ello, las zonas más afectadas por este tipo de contaminación son las grandes ciudades, en donde la concentración de estos tóxicos en el aire y su constante emisión, favorecen la exposición crónica y la acumulación en sus habitantes, lo cual tiene particular incidencia sobre su salud (Kampa y Castanas 2007).

## **Contaminación en las grandes ciudades**

Hay tres fuentes principales de contaminación atmosférica en las zonas urbanas, es decir, las emisiones de fuentes móviles, fuentes estacionarias, la quema a cielo abierto y las fuentes que pueden clasificarse en grupos de la fuente de generación: el transporte, la industria, las plantas de energía, el comercio y el combustible doméstico (Riccardia *et al.* 2008). La fuente más importante para los clásicos contaminantes dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), monóxido de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles (COV), los metales pesados y las partículas suspendidas totales (PST) es generalmente la combustión de combustibles fósiles. De particular importancia es la quema de combustibles del transporte por carretera y la generación de electricidad (Riccardia *et al.* 2008).

Los contaminantes, sin embargo, parten de algunas similitudes y pueden ser agrupados en 4 categorías.

1. Gases Contaminantes. Por ejemplo: SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, CO, ozono, compuestos orgánicos volátiles.
2. Contaminantes orgánicos persistentes (por ejemplo los plaguicidas organoclorados como el DDT)
3. Metales pesados (por ejemplo, plomo, mercurio)
4. Partículas suspendidas totales (PST).

Los gases contaminantes contribuyen en un mayor grado en las variaciones de la atmósfera y son principalmente debido a la combustión de combustibles fósiles (Katsouyanni 2003).

Las PST están constituidas principalmente por metales, compuestos orgánicos, material de origen biológico, iones, gases y carbón; provienen de la producción de cemento, la extracción de rocas y minerales, de los incendios, la erosión, las emisiones de automóviles e industrias y de la quema de combustibles fósiles. Las PST, incluyen a las partículas que miden entre 0.1 y 100 micras. Las partículas de entre 2.5 y 10 micras (PM<sub>10</sub>), y las que miden de 0.1 a 2.5 micras (PM<sub>2.5</sub>), forman la fracción respirable de las PST, las primeras, solo se depositan en el tejido pulmonar, mientras que la fracción fina o PM<sub>2.5</sub> llega a través de los bronquiolos respiratorios y la región alveolar al torrente sanguíneo mediante difusión causando efectos negativos sobre la salud, que se deben principalmente a su componente metálico. Las partículas mayores a 10 µm, son partículas que por su peso tienden a precipitarse con facilidad, razón por lo cual permanecen suspendidas en el aire en períodos cortos de tiempo. Por lo general no representan riesgos significativos a la salud humana. (Hinds 1982, Lippmann 1989, HEI 2002, Vallejo *et al.* 2002, Rodríguez-Lara 2008, INE 2004).

Recientemente la Organización Mundial de la Salud concluyó que hay suficiente evidencia para decir que las partículas suspendidas 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 una gran relevancia debido a que estudios epidemiológicos indican que se produce un

incremento del 1% en la mortalidad por cada 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de aumento en la concentración de  $\text{PM}_{10}$  (Molina y Molina 2004).

Está ampliamente aceptado que algunas de las PST son buenos receptores, contenedores y vehículos de componentes toxicológicamente relevantes (Vallejo *et al.* 2002, 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 (por ejemplo, vanadio (V) y manganeso (Mn)) (Sorensen *et al.* 2005, Katsouyanni 2003). Se considera que estos últimos pueden jugar un papel muy importante en la inducción de efectos tóxicos en los sistemas biológicos (Ghio *et al.* 2002).

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

## **Metales**

Los metales son componentes naturales de la corteza terrestre y se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. Algunos de ellos como el calcio (Ca), cobalto (Co), cobre (Cu), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), níquel (Ni) y Zinc (Zn), son micronutrientes y constituyen parte esencial en los sistemas biológicos. En la célula catalizan reacciones, son mediadores en el metabolismo y en el transporte de oxígeno, estabilizan macromoléculas y están involucrados en la traducción de señales (Ferré-Huguet *et al.* 2007, Lewin 2000, Nelson y Cox 2004). Sin embargo, en concentraciones altas algunos de ellos tienen propiedades genotóxicas y carcinógenas (Rodríguez y Altamirano 2006).

Aunque también son la mayor categoría 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 la inflamación de los tejidos, daño celular y cáncer, particularmente de pulmón y piel (Leonard *et al.* 2004). Cada metal tiene sus propios mecanismos de acción algunos pueden producir efectos adversos por sí mismos, mientras que otros interactúan con otros factores de manera sinérgica (Leonard *et al.* 2004).

### **Metales pesados**

Los metales pesados incluyen elementos básicos metálicos tales como el plomo (Pb), mercurio (Hg), cadmio (Cd), plata (Ag), níquel (Ni), vanadio (V), cromo (Cr) y manganeso (Mn). Estos son componentes naturales de la corteza terrestre; ellos no pueden ser degradados o destruidos, y pueden ser transportados por aire, y entran en el agua y en el alimento de consumo humano (Jarup 2003).

Adicionalmente ellos pasan a formar parte del ambiente a través de una gran variedad de fuentes, incluyendo la combustión y las descargas de las aguas residuales e instalaciones industriales. Una pequeña cantidad de ellos entra al cuerpo humano donde, como elementos traza, son esenciales para mantener las reacciones metabólicas normales. Sin embargo, a altas concentraciones pueden llegar a ser tóxicos (Jarup 2003).

Muchos metales pesados son peligrosos porque tienden a bio-acumularse en el cuerpo. La bioacumulación significa un incremento en la concentración de un químico en un organismo biológico por algún tiempo, comparado con la concentración de un químico en el ambiente (Kampa y Castanas 2007). Cuando se acumulan en los tejidos causan alteraciones principalmente en el tracto respiratorio y en los sistemas: nervioso, hematopoyético y cardiovascular, además producen daño renal, alteraciones en la fertilidad y recientemente se ha observado relación con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Rodríguez-Lara 2008).

Los principales metales considerados contaminantes del aire son; plomo, cobre, cromo, cadmio, manganeso, mercurio, zinc, hierro, berilio, talio, aluminio, níquel, entre otros (Jarup 2003, Rodríguez-Lara 2008). Algunos metales como el plomo y el cadmio se han estudiado ampliamente debido a sus efectos tóxicos. Sin embargo, existen en el aire otros metales, cuyos efectos sobre la salud han sido pobremente estudiados. Un ejemplo de ello lo constituye el vanadio, el cual es un metal pesado que en las últimas décadas ha tomado importancia debido a un incremento de su concentración en la atmósfera, principalmente en las grandes urbes, como la ciudad de México (Fortoul *et al.* 2002).

### **Vanadio**

El vanadio (V) es un metal ampliamente distribuido tanto en la naturaleza como en los sistemas biológicos y es uno de los elementos traza presente en los combustibles de tipo fósil. En la corteza terrestre ocupa el lugar 22 entre los elementos más abundantes con una presencia de 0.014 a 0.02%. Participa en la síntesis de clorofila en organismos fotosintéticos y es un micronutriente para varias especies marinas y terrestres. Su requerimiento para los humanos no ha sido confirmado, pero debido a sus múltiples mecanismos de acción se ha estimado que, en el caso de ser necesario, la ingesta aproximada sería de 15 µg/día (Lagerkvist *et al.* 1986, EFSA 2004).

## Características Químicas

Es un metal de color grisáceo con densidad de  $6.11 \text{ g/cm}^3$ . En la tabla periódica se ubica como primer elemento de transición del grupo VB, con número atómico 23, peso atómico 50.90, punto de fusión  $1950^\circ\text{C}$  y punto de ebullición de  $3600^\circ\text{C}$ . Existe en diferentes estados de oxidación que van de -1 a +5, y generalmente pasa de un estado a otro por transferencia de un electrón a través de procesos de oxido-reducción. Sin embargo, sólo los tres estados más altos,  $\text{V}^{\text{III}}$ ,  $\text{V}^{\text{IV}}$  y  $\text{V}^{\text{V}}$ , respectivamente, tienen funciones biológicas reconocidas (IPCS 1988, Rehder 1991, Hirao 2000, EFSA 2004). Tiene una posición excepcional dentro de los biometales, ya que participa en los procesos biológicos en forma de anión o catión. En condiciones fisiológicas  $\text{V}^{\text{V}}$  predomina como anión vanadato ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ) y  $\text{V}^{\text{IV}}$  como catión vanadilo ( $\text{VO}^{2+}$ ); aunque pueden presentarse otras especies de cationes y aniones tanto de  $\text{V}^{\text{V}}$  como de  $\text{V}^{\text{IV}}$ .

## Usos

El vanadio es altamente usado en las industrias del acero, química, electrónica y de la cerámica; además de que algunos compuestos tienen varios usos farmacológicos, tales como, tratamiento de la diabetes, anticonceptivo vaginal, suplemento nutricional, ayuda a mejorar el rendimiento físico de los atletas durante su entrenamiento y en la prevención de carcinomas (Friberg et al. 1986, Aragón y Altamirano 2001, Chandra et al. 2007).

Sus usos industriales, en la metalurgia, son principalmente en la manufactura de aleaciones de alta resistencia y baja corrosión; forma amalgamas principalmente con el aluminio (Al), el titanio (Ti), el boro (B), el cromo (Cr), el níquel (Ni), el manganeso (Mn) y el tungsteno (W). Se utiliza en la preparación de vidrio, de pinturas de aplicación común, en colorantes para fotografía y cinematografía. En la industria agrícola se emplea en la elaboración de fungicidas e insecticidas y como micronutriente en fertilizantes, además es empleado en la producción de ácido sulfúrico y caucho sintético. Se utiliza en materiales de superconductividad y es importante en la industria de la energía atómica, en la construcción

de maquinaria aérea y tecnología espacial (Stokinger 1981, Baroch 1983, Lagerkvist *et al.* 1986, Carson *et al.* 1987, Alessio *et al.* 1988, IPCS 1988 y 2001).

Para los procesos industriales el vanadio se obtiene de los minerales cuprodescloicita, descloicita, patronita, roscolelita, vanadinita, carnotita, corvuosita y fernandinita, entre otros menos abundantes que generalmente contienen sales y óxidos de este metal en forma de  $V^V$ ,  $V^{IV}$  y  $V^{III}$  (Baroch 1983).

Se conocen gran cantidad de compuestos inorgánicos de vanadio y los más utilizados en la industria y que son de interés toxicológico son: el pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ), es una sal de color amarillo-rojizo, con punto de fusión de 1750 °C y punto de ebullición de 690°C, es un agente químico peligroso, su límite de exposición ocupacional a polvos y humos es de 0.05 mg/m<sup>3</sup>. El trióxido de vanadio ( $V_2O_3$ ) se funde a 1970 °C, es una sal de color negro que al contacto con el aire se cristaliza de manera gradual en índigo-azulado formando tetróxido de vanadio ( $V_2O_4$ ) y se descompone al calentarla produciendo humos muy tóxicos. El  $V_2O_4$  es un polvo azul-negro que se usa para catalizar varias reacciones a temperaturas elevadas, es muy irritante y se funde a 1976 °C (Baroch 1983, Lagerkvist *et al.* 1986, Carson *et al.* 1987, Alessio *et al.* 1988, IPCS 1988 y 2001, Budavari *et al.* 1996).

CUADRO 1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE COMPUESTOS DE VANADIO

Nombre (fórmula química)	Peso molecular	Estado de oxidación	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Solubilidad
Pentóxido de vanadio (V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	181.88	V	3.357	Ligeramente soluble en agua, 8 g/L a 20 °C. Soluble en anhídrido acético, acetato de etilo y acetona
Metavanadato de amonio (NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> )	116.98	V	2.326	Soluble en agua, 5.2 g/L a 15 °C, 69.5 g/L a 96 °C. Insoluble en alcohol, éter ó NH <sub>4</sub> Cl
Metavanadato de sodio (NaVO <sub>3</sub> )	121.93	V	Sin datos	Soluble en agua, 211 g/L a 25 °C, 388 g/L a 75 °C
Ortovanadato de sodio (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	183.91	V	Sin datos	Soluble en agua
Oxitricloruro de vanadio (VOCl <sub>3</sub> )	173.30	V	1.829	Se descompone en solución. Soluble en alcohol, éter y ácido acético
Tetróxido de vanadio (V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	165.88	IV	4.339	Soluble en ácidos o bases. De insoluble a poco soluble en agua *
Sulfato de vanadilo (VOSO <sub>4</sub> )	163.00	IV	Sin datos	Muy soluble en agua fría (20-25 °C)
Tetracloruro de vanadio (VCl <sub>4</sub> )	192.75	IV	Sin datos	Se descompone en solución
Oxidicloruro de vanadio (VOCl <sub>2</sub> )	137.85	IV	2.88	Se descompone en agua fría. Soluble en ácido nítrico diluido
Trióxido de vanadio (V <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	149.88	III	4.87	Ligeramente soluble en agua fría. Soluble en agua caliente, ácido nítrico, ácido hidrofúorhídrico y bases
Tricloruro de vanadio (VCl <sub>3</sub> )	157.30	III	Sin datos	Soluble en alcohol absoluto y éter. Se descompone en agua (de 3 a 18 °C).

Tomado de Rodríguez y Altamirano (2006)

### Contaminación por Vanadio

En la naturaleza el vanadio no se encuentra en forma pura, por sus propiedades intrínsecas es propenso a reaccionar con otros elementos. El vanadio ha tomado importancia como contaminante ambiental en las últimas décadas; se emite a la atmósfera principalmente en forma de vapores y polvos de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> debido a actividades antropogénicas como la quema de combustibles fósiles (Fortoul et al. 2007). Estos compuestos son redistribuidos y se acumulan en los ecosistemas en concentraciones que pueden ser tóxicas para los organismos, sobre todo en zonas urbanas e industriales en donde se encuentra en elevadas cantidades (Aragón y Altamirano 2001).

La siderurgia del acero es uno de los procesos que libera grandes cantidades de vanadio a la atmósfera. Se ha estimado que de las 64 mil toneladas de vanadio descargadas anualmente, alrededor del 91% son producto de la actividad industrial, de la combustión de petróleo, carbón y aceites pesados, y el resto son derivadas de la erosión del suelo, emisiones volcánicas e incendios forestales (WHO 2001). Los recursos de vanadio a nivel mundial excedieron los 63 millones de toneladas en enero del 2008. Los principales exportadores de aleaciones de aluminio-vanadio y vanadio metálico son México con 2 540 000 kg de peso bruto, Canadá 716 000 kg, Japón 46 400 kg, Reino Unido 6 030 kg, India 1 060 y Alemania con 110 kg (Cuadro 2) (USGS 2007).

Cuadro 2. Principales países importadores y exportadores de ferrovandio, pentóxido de vanadio y otros óxidos.

	Ferrovandio (Kg)	Pentóxido de vanadio (Kg)	Otros óxidos e hidróxidos (Kg)
<b>Importadores</b>			
Austria	19 900	183	8 390
Canada	88 700		
China	19 000	17 000	
Republica Checa	60 200		
Alemania	226		
Korea	29 400		
Sudafrica		92 100	
TOTAL	217 000	109 000	8 390
<b>Exportadores</b>			
Bélgica			18 400
Brasil			2 710
Canadá	12 100	2 070	217
Alemania			6 540
México	396		
Rusia			45 700
TOTAL	12 500	2 070	73 600

(USGS 2007)

Los niveles en el ambiente dependen de las condiciones climáticas, la posición geográfica y de las condiciones de urbanización, entre otros factores. En las grandes urbes se han detectado concentraciones en el aire que van de 0.15 a 1.4  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Lagerkvist *et al.* 1986, IPCS 1988). Para la Ciudad de México se han reportado valores que alcanzan los 0.114  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en aeropartículas de 10  $\mu\text{m}$  y de 0.093  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en las de 2.5  $\mu\text{m}$  (Gutiérrez *et al.* 2006). En el agua para beber se describen valores por debajo de 10  $\mu\text{g}/\text{L}$ , con un promedio de 4.3  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Cantidades altas, que van de 49.2 a 70  $\mu\text{g}/\text{L}$ , se han encontrado en ríos cercanos a minas y mantos acuíferos ubicados cerca de zonas industriales en Norte América, Europa, China y Japón (Lagerkvist *et al.* 1986, IPCS 2001). El desgaste de las rocas oceánicas y de los minerales terrestres libera vanadio en el agua y en el aire.

Se considera que la concentración promedio de este metal en el suelo es alrededor de 100  $\mu\text{g}/\text{g}$  de peso seco, pero en suelos cercanos a plantas metalúrgicas los valores superan los 400  $\mu\text{g}/\text{g}$  (Lagerkvist *et al.* 1986, IPCS 1988 y 2001).

### **Exposición, Absorción y Metabolismo**

La entrada de vanadio al organismos de los mamíferos ocurre a través de la piel, el tracto gastrointestinal y el sistema respiratorio (Rodríguez y Altamirano 2006), y se sabe que la eliminación del vanadio del organismo es bifásica con una fase rápida (10-20 h) y una fase terminal larga (40-50 días) (Ivancsits *et al.* 2002).

La exposición a altas concentraciones de vanadio en el aire puede ocurrir en lugares de trabajo. En estos casos la inhalación es la principal ruta de entrada al cuerpo y puede resultar en una neumonía severa asociada con irritación en las membranas mucosas y desordenes gastrointestinales. Las cenizas de algunos compuestos de vanadio en el ambiente producen irritación de los ojos, nariz y garganta. La inhalación por largos períodos produce bronquitis crónica, lesiones en la piel, leves temblores de las extremidades y una coloración verdosa en la lengua (IAOH 2007).

Mientras que para la población en general la principal vía de exposición es la comida; el agua para beber contribuye en un menor grado, aunque se han registrado altas concentraciones de vanadio en algunos abastecimientos de agua en áreas volcánicas. Otro importante recurso de exposición a vanadio es el uso de suplementos minerales en la dieta, los cuales pueden proveer más de 10 mg vanadio/día (EFSA 2004, Villani *et al.* 2007).

Altas cantidades de vanadio pueden ser encontradas en la pimienta negra, setas, perejil y mariscos. En general el pescado y los mariscos contienen altas concentraciones de vanadio comparado los otros alimentos. Como dato adicional e importante, altas concentraciones de vanadio (de 1 a 8 ppm) han sido detectadas en el humo de tabaco (Ivancsits 2002)

Los estados biológicamente relevantes del vanadio son los siguientes: vanadato V (V), el estado pentavalente usualmente como oxianión (p.e.  $\text{HVO}_4^{2-}$ ), esta forma predomina en el espacio extracelular y vanadilo V(IV), el estado tetravalente usualmente como oxición (p.e.  $\text{VO}^{2+}$ ), más estable y predomina intracelularmente (Fortoul *et al.* 2002, SCF 2004).

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 oxidación espontánea a vanadato (V) *in vivo* (Mukherjee *et al.* 2004).

El vanadilo es transportado principalmente por albumina y transferrina y el vanadato solo 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 albumina (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) se acumula principalmente en hueso, riñón, hígado, bazo y en menor grado en pulmones y testículo (Aragón y Altamirano 2001, Evangelou 2002, Rodríguez y Altamirano 2006, Chandra *et al.* 2007). También se ha detectado en corazón, tiroides, cerebro, músculo esquelético, médula ósea y tejido graso. Los órganos que no remueven con facilidad el metal son hueso, músculos y pulmón, donde permanece por tiempo prolongado (Sharma y Talukder 1987, Alessio *et al.* 1988, Elinder *et al.* 1988, French y Jones 1993).

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 (Barceloux 1999, Evangelou 2002). Esta bio-reducción puede ser llevada a cabo por: glutatión celular, catecolaminas, cisteína, NADH, NADHP y L-acido 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).

Las formas tetra y pentavalentes del vanadio son las más estudiadas debido a que estas son capaces de reaccionar con la maquinaria genética; ellos pueden interactuar con los grupos fosfato y los grupos alcohol del azúcar de los nucleótidos para formar complejos que inhiben o estimulan la actividad de enzimas del ADN o del ARN (Crans *et al.* 1989, Baran 2000, Pyrzynska y Wierzbicki 2004).

En estudios de inhalación y de administración oral en animales de laboratorio, el vanadio absorbido en los estados pentavalente o tetravalente, se distribuye fundamentalmente en los huesos, el hígado, el riñón, el bazo y también se detecta en los testículos. Su principal vía de excreción del vanadio es a través de la orina y su pauta de distribución y excreción indica que es posible la acumulación y retención del vanadio absorbido, sobre todo en los huesos (IPCS 2001).

En un estudio realizado por Fortoul *et al.* (2002), se detectó que la cantidad de vanadio aumentó en pulmón en autopsias practicadas a residentes de la Ciudad de México que vivieron en la década de los 90 ( $1.36 \pm 0.08$   $\mu\text{g/g}$  en peso seco de pulmón) en comparación con los que vivieron en la década de los 60 ( $1.04 \pm 0.05$   $\mu\text{g/g}$  en peso seco de pulmón). Las concentraciones halladas no correlacionaron con el género, la edad, los hábitos al cigarro, su ocupación o la causa de muerte. Por otro lado, se detectaron valores de  $0.42 \pm 0.24$  ng/mL de vanadio en muestras de sangre de estudiantes de la ciudad de Taiwán, cuando en la literatura se reportan valores de  $0.10 \pm 0.07$  en residentes cercanos a zonas industriales y de 0.032 a 0.095 ng/mL para la población general. Lo anterior indica que los taiwanenses están expuestos ambientalmente a elevadas cantidades de vanadio y el aire representa tanto para estos habitantes como para los de la Ciudad de México un riesgo para la salud (Rodríguez y Altamirano 2006).

### **Importancia Biológica**

Al vanadio se le ha considerado como elemento esencial para muchas especies de algas, animales invertebrados como tunicados (ascidias) y anélidos poliquetos; así como en pollos y roedores (Rehder 1991 y 1993, WHO 2001). Se sabe que es un constituyente esencial de varios sistemas enzimáticos como algunas nitrogenasas de cianobacterias, haloperoxidasas en microalgas, líquenes y hongos (Crans *et al.* 2004), así como en peroxidases de algas marinas.

En pollos, una dieta deficiente de vanadio reduce el peso y la producción de huevo, retarda el crecimiento de plumas y el desarrollo esquelético, altera la concentración de triglicéridos y de colesterol en plasma (Kubena y Phillips 1983). En ratas la deficiencia afecta la función de la tiroides, provoca anemia y cambios en el crecimiento de huesos, cartílago y músculo, disminuye el índice de fertilidad y la producción de leche durante la lactancia (Nechay 1984, French y Jones 1993).

En alimentos de consumo cotidiano: semillas de cultivo, frutas, vegetales, carnes y derivados animales, se han determinado cantidades apreciables de vanadio III y IV, en los cuales hay una diferencia muy marcada en cuanto a la concentración de vanadio en los alimentos en fresco y los productos procesados, que van de 0.1 a 50 µg/kg de peso húmedo y de 40 a 2000 µg/kg de peso seco, respectivamente (WHO 1988, French y Jones 1993, Rojas *et al.* 1999).

Se tienen datos de que el vanadio puede encontrarse exclusivamente en los tejidos de mamíferos en su estado de oxidación IV. Experimentalmente se ha demostrado que después de una exposición a vanadio IV o vanadio V, el que circula en la sangre es la forma IV y pruebas *in vivo* e *in vitro* demuestran que en los fluidos del cuerpo y en el interior de las células respectivamente, el vanadio V es reducido a vanadio IV por distintas biomoléculas como el glutatión, ácido ascórbico, catecolaminas y muchos péptidos (Cantley y Phillips 1979, Sakurai *et al.* 1980, Nechay *et al.* 1986, Sakurai 1994, Rehder 1991), por lo que la forma reducida de este metal mantiene un contacto permanente con los tejidos, las células y los componentes celulares.

El vanadio IV tiene una fuerte afinidad por las moléculas fosfatadas, las proteínas férricas (transferrina, lactotransferrina y ovotransferrina), el glutatión y varios ligandos carboxilados (como los ácidos glutámico, aspártico, ascórbico y cítrico), a ellos se une para formar complejos y se almacena temporalmente (Nechay *et al.* 1986, Sakurai *et al.* 1987, Rehder 1991 y 1993).

Estudios bioquímicos, muestran que el vanadio II puede ser oxidado a su estado III o IV por la cisteína, las sales de vanadio III son agentes fuertemente reductores que reaccionan lentamente con el agua para liberar H<sup>+</sup> y producir vanadio IV, pero el oxígeno vanadilo es muy inestable a pH fisiológico y puede rápidamente oxidarse a vanadio V (VO<sup>3-</sup>) en la ausencia o disminución de agentes reductores en la sangre o en el citoplasma celular (Nechay et al. 1986, Crans et al. 1990).

### **Genética Toxicológica**

El reconocimiento de la mutagénesis, como paso previo para la carcinogénesis y los peligros potenciales de los agentes mutagénicos para la población humana y la biosfera, despertó el interés por desarrollar la Genética Toxicológica como ciencia, de ahí que, desde los años 80 en varios países industrializados se preocuparon por implementar tecnologías para evaluar las propiedades genotóxicas de agentes químicos, físicos y biológicos, en aditivos alimenticios, medicamentos, entre otros. Esta disciplina tiene como objetivo estudiar las mutaciones inducidas por estos agentes, e identificar como estos agentes, que son llamados genotóxicos, producen efectos tóxicos, letales y heredables sobre el material genético nuclear o extranuclear en células germinales y somáticas, además de enfocar su atención en aquellos niveles de exposición que no se consideran tóxicos, porque, aunque no causan efectos inmediatos fácilmente identificables, si dañan el ADN (Seoane 1999, Guachalla y Ascarrunz 2003, Cuenca y Ramírez 2004, Vinardell 2007).

## **Pruebas de Mutagénesis**

Algunos campos de estudio de la Genética Toxicológica buscan evaluar el riesgo genético de la ocupación laboral tratando de establecer una asociación entre la exposición a complejos metálicos y la presencia de ciertos marcadores de daño citogenético como son las aberraciones cromosómicas (AC), los Intercambios de crómatidas hermanas (ICH) y los micronúcleos (MN) (Ergene *et al.* 2007, Bolognesi 2003). Los efectos sobre la integridad y segregación de los cromosomas, como los micronúcleos, y lesiones primarias en el ADN, así como la detección por ensayo cometa ya han sido evaluados en muchos tejidos (Leopardi *et al.* 2005).

### **Intercambio de Cromátidas Hermanas, Aberraciones Cromosómicas y Micronúcleos**

El análisis del Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) es una técnica que sirve para medir el impacto de agentes mutágenos como carcinógenos sobre los cromosomas, y evaluar el daño al ADN mediante el incremento en la frecuencia de ICH (Latt *et al.* 1979). El ICH representa el intercambio de segmentos homólogos de cromátida en un mismo cromosoma, son percibidos mediante tinciones especiales en preparaciones citológicas de cromosomas metafásicos, donde se observan fragmentos de la cromátida teñida intensamente y su fragmento homólogo tenuemente (Latt *et al.* 1979, Morales 1988). El método de ICHs es recomendado para detectar mutagenicidad por parte de la Comunidad Económica Europea y la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (Kliesch *et al.* 1982), mientras que el Comité de Genética Toxicológica de los E.U lo ha incluido como sistema de prueba para detectar daño genético por diversos agentes (Morales 1988), además la formación de ICHs da información acerca de la estructura del cromosoma, así como la detección de agentes que dañan el ADN o inhiben su síntesis (Morales-Ramírez *et al.* 1994).

Aunque el mecanismo de formación de ICHs aún no es conocido, existe un modelo que asegura que es un efecto de la reparación del ADN durante la post-replicación. Se sugiere que los ICHs se forman probablemente en ciertas regiones del ADN, particularmente en los sitios dañados (Tucker *et al.* 1993). Por otra parte hay otra teoría que es la más aceptada, fue hecha por Painter en 1980, donde dice que este fenómeno ocurre al replicarse el ADN, ya que se forman dos cadenas nuevas de ADN entre las cuales existen intercambios de fragmentos homólogos, presumiblemente involucra rompimientos de ADN para su posterior reunión (Latt *et al.* 1979, Tucker *et al.* 1993, Morales-Ramírez *et al.* 1994).

Para que puedan ser apreciados los ICH, es necesario que ocurran como mínimo dos ciclos continuos de división celular en presencia de un análogo de base nucleotídica llamado “5-Bromodesoxiuridina” (Brdu), que es un compuesto con la capacidad de incorporarse al ADN sustituyendo a la timidina en la cadena sencilla que es sintetizada durante su replicación; por lo tanto, el resultado de metafases de las células en primera división serán cromosomas donde sus cromátidas contengan una cadena doble unisustituida de ADN (una cadena sencilla normal unida a su respectiva cadena sencilla sustituida con Brdu); mientras que metafases de células en segunda división resultaran cromosomas donde una de sus dos cromátidas contendrá ADN unisustituido y la otra estará su cadena doble totalmente sustituida por la Brdu (Morales 1988).

El análisis de ICH *in vitro* requiere de cultivos celulares que puedan realizar por lo menos dos ciclos celulares necesarios para la incorporación de la Brdu, ellos pueden emplear líneas celulares como fibroblastos, ovocitos, líneas celulares de pulmón, de piel, fetal humana, así como linfocitos humanos. Se pueden emplear especies como rata, ratón, hámster, conejo, también en plantas, insectos, peces y embriones de pollo. El cultivo de linfocitos humanos es el más práctico, debido a la facilidad de obtener las líneas celulares, su buena capacidad de división celular y la facilidad de lectura de los cromosomas humanos (Perry y Wolff 1974, Nylander 1988, Jacono *et al.* 1992).

El estudio *in vivo* de los ICHs se puede realizar en diversas especies de plantas, insectos, peces y mamíferos.

El ensayo de Aberraciones cromosómicas es el más extensivamente usado y es el mejor biomarcador validado de efectos biológicos primarios en estudios poblacionales. Este ensayo puede ser utilizado con gran confiabilidad para detectar la exposición a radiación ionizante, así como la exposición a químicos; los cuales usualmente inducen algún tipo específico de aberraciones tales como rompimientos o intercambios (Bonassi y Au 2002). Las aberraciones cromosómicas (AC) se pueden analizar en las células como anomalías estructurales, ya sean como cromosómicas, cromatídicas, o huecos. Generalmente son clasificadas como estructurales o numéricas. Las aberraciones estructurales incluyen translocaciones, inversiones, deleciones, inserciones y amplificaciones; mientras que las anomalías numéricas involucran pérdidas o duplicaciones de los cromosomas (Basak et al. 2000, Ergene et al. 2007).

Se sabe que las células con anomalías cromosómicas pueden llevar al desarrollo de cáncer como ocurre en la presencia de deleciones y translocaciones en los cromosomas en la mayoría de las células cancerígenas. Las aberraciones cromosómicas son predictivas del desarrollo del cáncer, indicando que el ensayo de AC es el biomarcador de efectos más importante; especialmente para predecir riesgos en la salud (Bonassi y Au 2002).

Quizás el ensayo citogenético más frecuentemente utilizado sea la prueba de micronúcleos. Esta consiste en la detección de las variaciones de las frecuencias de células micronucleadas y generalmente se realiza en linfocitos o eritrocitos. Los micronúcleos son producidos durante la mitosis, cuando un fragmento de cromosoma o un cromosoma entero no migra con uno de los dos núcleos hijos formados y se pueden encontrar en cualquier tipo de célula, somática ó germinal y aparecen en el citoplasma de las células que se dividieron como un pequeño núcleo adicional.

Algunas de las ventajas de esta prueba son: seguridad en la identificación de células que sólo completaron una división nuclear, sensibilidad, precisión, rapidez, simplicidad y una buena reproducibilidad (Norppa *et al.* 1993, Bolognesi 2003, Ergene *et al.* 2007, Udrouiu 2007).

Otro tipo de células que también pueden ser examinadas en humanos son las células uroteliales (Tucker y Preston 1996). Muchos mecanismos diferentes están involucrados en la formación de micronúcleos incluidos el rompimiento cromosómico (clastogénesis) y la interrupción del huso (aneuploidogénesis), además son eventos importantes en la aparición del cáncer y el envejecimiento.

En el ensayo de micronúcleos con células binucleadas, las células que han completado una división nuclear son bloqueadas en la citocinesis usando Citocalacina-B (Cit-B) y son por consecuencia fácilmente identificadas por su apariencia binucleada. La Cit-B es un compuesto tóxico que inhibe a la actina, encargada de la formación del anillo contráctil que separa al citoplasma para la formación de las células hijas (Heddle *et al.* 1983, Sanjeev *et al.* 2006).

El análisis de micronúcleos ha ido ganando popularidad como una prueba de genotoxicidad *in vitro* y como biomarcador de exposición genotóxica en humanos. Esto se debe a que en comparación con la prueba de aberraciones cromosómicas (AC), el conteo en MN es más simple, requiere menor tiempo de entrenamiento para su evaluación y el conteo es más sencillo, además es estadísticamente más sensible que la prueba de AC (Norppa y Falck 2003).

## Electroforesis unicelular en gel (Ensayo Cometa)

La Electroforesis Unicelular en Gel o Ensayo Cometa es un método sensible, seguro y rápido para detectar rompimientos sencillos de la cadena de ADN, sitios alcali-lábiles y detección de sitios que tardan en repararse, en células eucarióticas individuales y debido a esto es altamente utilizado en pruebas de genotoxicidad *in vitro*.

En los últimos años la electroforesis unicelular alcalina ha sido una excelente herramienta en el área de toxicología genética, ya que permite la valoración de daño genético *in vitro* e *in vivo* en gran variedad de células y tejidos de animales y plantas (Tice et al. 2000, Lee et al. 2003).

El análisis implica la detección, bajo condiciones alcalinas, de los fragmentos de ADN de la célula, que en la electroforesis migran del núcleo originando una imagen semejante a la cola de un cometa y estas son las medidas para determinar la extensión de daño al ADN (figura 1) (Rojas et al. 1999a, Hartmann et al. 2003, Danadevi et al. 2004, Udrouiu 2007).

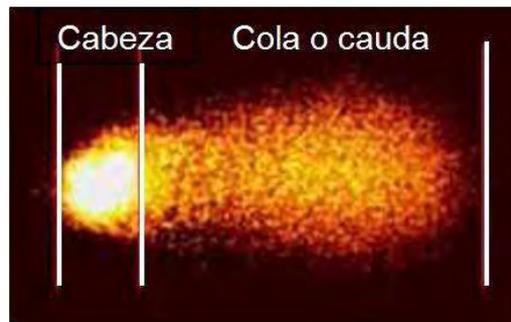


Figura 1. La Técnica del Ensayo cometa, nos permite visualizar una imagen que semeja un cometa con cabeza y una cola o cauda

La formación del cometa deriva de varios mecanismos y los daños que se detectan son lesiones iniciales o primarias (Rojas et al. 1999a).

En condiciones neutras la migración del ADN debe a la detección de rupturas de hebra doble, cuando el pH es cercano a 12 la migración se da por las rupturas de hebra sencilla y doble, y si el pH se eleva a 13 o más se presentan ambos tipos de eventos, además de rupturas simples producto de sitios sensibles al álcali (Tice *et al.* 2000, Rodríguez 2006).

El ensayo cometa fue originalmente desarrollado por Östling y Johanson (1984) para cuantificar rompimientos en la cadena de ADN en células individuales expuestas a radiación ionizante. En los primeros intentos para detectar el daño emplearon un sistema en el cual las células embebidas en un gel de agarosa mostraron un halo de ADN fragmentado alrededor del núcleo. Después el ensayo se mejoró, realizando la lisis en una solución detergente neutra y aplicando un campo eléctrico débil para atraer hacia el ánodo los fragmentos de ADN localizados en el núcleo. Como la corriente eléctrica pasa a través del gel, la doble cadena de ADN rota se desenrolla y es arrastrada formando una cauda detrás de la cabeza nuclear. El ADN se tiñe con bromuro de etidio y las células se visualizan usando un microscopio de fluorescencia, resultando una imagen parecida a un cometa. Midieron la cauda y determinaron la diferencia entre células irradiadas y no irradiadas, la longitud se incrementó con relación a la dosis de radiación, las condiciones neutras limitaron la utilidad del ensayo ya que fue usado solamente para cuantificar células con y sin daño al ADN (Tice *et al.* 2000, Collins 2002, Bowden *et al.* 2003).

Un intento por superar las limitaciones cuantitativas, Singh *et al.* (1988), basados en la electroforesis neutra descrita por Östling y Johanson (1984) introdujeron la versión alcalina, aumentando el pH y el contenido de sales en la electroforesis (pH13) para detectar rompimientos de cadena de ADN y sitios álcali-lábiles en células individuales, las condiciones alcalinas causaron la desnaturalización del ADN e hicieron al ensayo más sensible a la fragmentación de una sola cadena, midieron la longitud de la cauda del cometa a partir del primer borde del núcleo y observaron que células con la misma longitud de migración tenían diferente intensidad en la cauda (Ashby *et al.* 1995, Tice *et al.* 2000, Collins 2002, Olive 2002, Speit y Hartmann 2002, Bowden *et al.* 2003, Lee *et al.* 2003, Faust *et al.* 2004).

Posteriormente, Olive y colaboradores (1990) tomaron en cuenta el diámetro de la cabeza y la longitud de la cauda (midiendo la longitud de la cauda desde el centro de la cabeza), desarrollaron un método de lisis seguida por electroforesis neutra para detectar rompimiento de doble cadena y electroforesis alcalina (pH 12.1) para fragmentación de una cadena de ADN, sin embargo y debido a que la mayoría de los agentes genotóxicos inducen rompimientos de una cadena y sitios álcali-lábiles, la versión alcalina es la más aplicada. Por otro lado y debido a la presencia de caudas cortas con mayor fragmentación y largas con pocos fragmentos de ADN, adicionalmente estos investigadores propusieron otro parámetro, la intensidad de la cauda al cual llamaron “momento de la cauda”, el cual se definió como la distancia entre el centro de la masa de cauda y el centro de la masa de la cabeza, multiplicado por el porcentaje de ADN en la cauda, esta metodología requirió de la ayuda de un sistema de computo para analizar y cuantificar cada imagen de cometa, el momento de la cauda comenzó entonces a ser la norma para medir el daño al ADN (Tice *et al.* 2000, Collins 2002, Speit y Hartmann 2002, Bowden *et al.* 2003).

Por su parte Tice *et al.* (1990) utilizando la electroforesis unicelular alcalina, midieron el diámetro de la célula perpendicular a la dirección de electroforesis para definir la cabeza del cometa y calcularon el momento de la cauda multiplicando la fracción de ADN en la cauda por la mitad de la longitud de la cauda. Debido a que las tres metodologías anteriores tomaban en cuenta toda la cabeza o la mitad de ella junto con la longitud de la cauda, las células sin daño eran registradas como cometas con la longitud de la cauda igual al diámetro o al radio del núcleo respectivamente, lo cual conduce a que las células intactas tengan un momento de la cauda. Ashby *et al.* (1995) proponen medir la longitud de la cauda a partir del límite posterior del núcleo y el momento de la cauda como el producto de la longitud de la cauda por el porcentaje de ADN en la misma.

Desde que apareció el concepto de momento de la cauda, se han desarrollado otras variantes del ensayo cometa, como son el “momento del cometa” y la “inercia de la cauda”,

estos sistemas refinados han provisto nuevas vías para observar el daño al ADN, debido a que estas variaciones usualmente tienen una aplicación específica, no ha sido ampliamente implantadas. El momento de la cauda queda entonces como norma o estándar para los laboratorios que emplean un equipo de imágenes por computadora en su análisis del ensayo cometa (Hellman *et al.* 1995).

Para evaluar el daño al ADN por medio del ensayo cometa se usan varios parámetros, entre los que se encuentran 1) determinación del porcentaje de células con cometas, 2) los cometas son usualmente clasificados en cinco categorías, en el nivel 0 no hay daño y en 4 están las células con el máximo daño, 3) el uso de un sistema de análisis de imagen que determina longitud de la cauda (frecuencia de rompimientos de la cadena) y el momento de la cauda, los tres pueden ser usados en combinación o por separado para describir la magnitud del efecto genotóxico al ADN (Angelis *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000, Faust *et al.* 2004)

### **Estudios de Reparación del ADN**

Debido a sus características, el Ensayo Cometa ha sido utilizado para evaluar la capacidad de la célula eucariótica para reparar diferentes tipos de daño del ADN, incluyendo rompimientos de cadena doble y cadena sencilla, así como bases dañadas (Rojas *et al.* 1999a)

Se ha visto que los rompimientos de cadena sencilla y de cadena doble inducidos por la radiación ionizante son eficientemente reparados en células normales, en donde el 50% del daño es reparado en los primeros 15 minutos y la reparación completa ocurre dentro de las primeras 2 horas postratamiento. Este rango de reparación ha sido también demostrado en linfocitos humanos irradiados (Singh *et al.* 1990).

Así mismo, para investigar si la inducción de daño al ADN y su reparación difiere entre cultivos de linfocitos de diferentes donadores Andersson *et al.* (2007) midieron el daño al ADN inducido por peróxido de hidrogeno. Encontraron que el daño se incremento significativamente en todos los cultivos después de 10 minutos de la exposición a peróxido y posteriormente hubo una disminución de este daño en todos los cultivos después de 30 minutos de permitir la reparación. Contrastando lo anterior Rojas *et al.* (1996) encontró un retardo importante de la reparación del DNA en linfocitos expuestos a pentóxido de vanadio en uno de los 4 donadores sanos, lo que implicaría problemas con este sistema en este individuo.

### **Genotoxicidad del Vanadio**

La evaluación de la genotoxicidad del vanadio ha tomado una mayor importancia ya que se han observado efectos adversos en concentraciones micromolares de estos compuestos sobre la integridad y la segregación de los cromosomas en sistemas *in vitro* (Ramírez *et al.* 1997, Ivancsits *et al.* 2002, Leopardi *et al.* 2005). Esos descubrimientos han sido confirmados en estudios *in vivo*, siguiendo la administración intraperitoneal o intragástrica en ratones, a altas dosis de vanadio en su forma pentavalente y tetravalente (IPCS 2001, Leopardi *et al.* 2005, Villani *et al.* 2007)

La producción de las especies reactivas de oxígeno y radicales libres, dañando a las células y al ADN, se ha propuesto como el principal mecanismo de genotoxicidad de los compuestos de vanadio. La reducción del  $V^{+5}$  a  $V^{+4}$  dentro de los núcleos lleva a la formación del anión superóxido  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  la cual, en presencia de  $V^{+4}$  genera el radical hidróxilo  $OH^\cdot$  (Zhang *et al.* 2001, Capella *et al.* 2002). La oxidación de las bases de ADN, rompimientos de cadena sencilla y la inhibición de la polimerización de la tubulina pueden ser identificados como eventos genéticos primarios para el ataque de tales especies reactivas (Boonstra y Post 2004).

Los efectos genotóxicos han sido evaluados en diversos órganos mediante el ensayo cometa y los resultados muestran un incremento de la longitud de los cometas en esplenocitos, en células de médula ósea, en testículo de ratón, así como incrementos significativos de micronúcleos en células de la médula ósea y en reticulocitos. También se ha determinado la concentración de vanadio contenida en hígado, riñón, bazo, hueso, estómago, intestino delgado y testículo, lo cual no mostró resultados significativos en el peso de cada órgano, ni en el peso corporal al final del tratamiento (Leopardi *et al.* 2005, Villani *et al.* 2007).

En un estudio reciente Attia *et al.* (2005), encontró que el ortovanadato, en una sola administración no produjo retraso en la meiosis, mientras que en los espermatozoides las hiperploidias se incrementaron significativamente.

### **Toxicidad Reproductiva del Vanadio**

La toxicidad reproductiva puede ser definida como el estudio de la producción de efectos adversos en el sistema reproductivo como resultado de la exposición a agentes ambientales, siendo manifestaciones de toxicidad: las alteraciones en el comportamiento sexual, la reducción de la fertilidad, las interrupciones del embarazo y la modificación de funciones que dependen de la integridad del proceso reproductivo (Ciganda 2000).

Los efectos tóxicos del vanadio en el sistema reproductor son de especial interés debido a que estos sistemas están involucrados en la formación de gametos, así como en el desarrollo de los mismos, y por esto tales efectos pueden afectar a las siguientes generaciones; algunos reportes describen el potencial toxicológico del vanadio en el sistema reproductor de los machos, en los cuales se ha observado que compuestos como el metavanadato de sodio y amonio, así como el pentóxido y tetraóxido de vanadio, producen un decremento en el peso testicular y alteraciones en la espermatogénesis tales como reducción en los conteos espermáticos, alteraciones morfológicas en la cabeza de los espermatozoides y disminución de la motilidad de los mismos; así como degeneración de las

células, células apoptóticas en la periferia de los túbulos seminíferos, rompimiento de los túbulos, así como la pérdida de la maduración y elongación de espermatidas (Altamirano *et al.* 1996, D’Cruz y Uckun 2000, Aragón y Altamirano 2001, Aragón *et al.* 2005, Chandra *et al.* 2007).

Además estos compuestos, disminuyen la fertilidad y fecundidad, ya que provocan una disminución en el número de implantaciones, así como un incremento en la frecuencia de reabsorciones y de fetos con bajo peso en hembras preñadas por machos expuestos a este metal (Domingo *et al.* 1986, Llobet *et al.* 1993, Altamirano-Lozano *et al.* 1996, Aragón y Altamirano 2001, IPCS 2001, Morgan y El-Tawil 2003, Aragón *et al.* 2005).

### **Espermatozoide**

El espermatozoide o gameto masculino es una célula diferenciada producto del proceso de espermatogénesis que ocurre en los túbulos seminíferos (Curtis y Barnes 1996, Merchant 1991).

Los espermatozoides están compuestos por la cabeza, cuello y la cola o flagelo (figura 2)

La cabeza está constituida por:

1. El acrosoma: Se origina a partir del aparato de Golgi de la espermatida, contiene enzimas hidrolíticas necesarias durante la penetración de la corona radiada y la zona pelúcida del ovocito por parte del espermatozoide.

2. El núcleo: Contiene el ADN condensado asociado con proteínas nucleares llamadas protaminas. El complejo protamina-ADN es estabilizado por puentes disulfuro entre las protaminas. El núcleo se encuentra recubierto por el capuchón cefálico acrosómico.

3. El citoesqueleto: Se encuentra en el espacio que hay entre el acrosoma y la membrana plasmática. Tiene una función estructural, ya que define la forma de la cabeza, y otra funcional que ayuda a la penetración del espermatozoide en el óvulo durante la fertilización (Geneser 2000, Ross y *et al.* 2004).

El cuello es muy corto y se fija a la placa basal. Contiene 9 columnas segmentadas de las cuales se originan las fibras densas externas, detrás de la placa basal se encuentra el centriolo proximal.

La cola está formada por pieza intermedia, principal y terminal.

1. La pieza intermedia: Contiene dos microtúbulos centrales rodeados por nueve pares de túbulos periféricos formados por tubulina y actina. A esta estructura se le denomina axonema o complejo axonémico. Nueve fibras gruesas que se unen a las columnas segmentadas, estas fibras gruesas acompañan los túmulos dobles del complejo axonémico. Mitocondrias dispuestas de forma helicoidal, alrededor de las fibras densas externas y del complejo axonémico, las cuales proveen la energía para el movimiento de la cola.

2. La pieza principal: contiene la vaina fibrosa por fuera de las fibras gruesas y del complejo axonémico.

3. Pieza terminal: Contiene el complejo axonémico (Geneser 2000, Ross y *et al.* 2004).

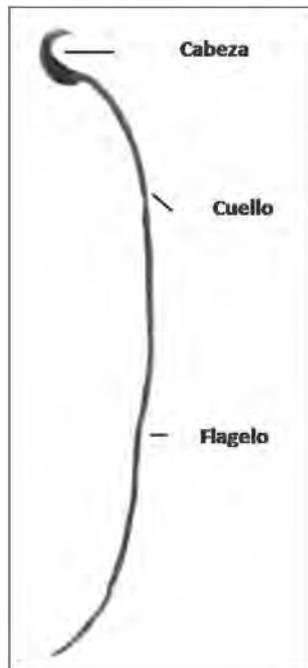


Figura 2. Estructura del espermatozoide de ratón

## Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso que se lleva a cabo en los túbulos seminíferos del testículo y consta de una serie de etapas de división y diferenciación celular, cuya duración es dependiente de la especie; en el humano es de 74 días, en la rata es de 53 días y en el ratón es de 35 días (Johnson y *et al.* 1997).

Durante este proceso se llevan a cabo una serie de divisiones mitóticas de las espermatogonias seguidas de dos divisiones meióticas de los espermatocitos y cambios morfológicos de las espermátidas que dan origen a los espermatozoides. Este proceso inicia en la pubertad, se mantiene durante toda la vida, y disminuye durante la senectud. (Geneser 2000, Ross y *et. al.* 2004) (Figura 3).

La organización de los diferentes tipos celulares que comprenden la espermatogénesis en los túbulos seminíferos se le conoce como ciclo del epitelio seminífero.

Este para su estudio se ha sido dividido en catorce etapas o asociaciones, que se identifican con números romanos (I hasta el XIV).

A cada etapa o asociación se le clasifica tomando en cuenta la estructura y morfología del núcleo de la célula germinal. En las etapas I a la VIII se identifican espermatogonias, espermatocitos, espermatides redondas y espermatozoides. En las etapas IX a la XIV se observan espermatocitos y espermatides alargadas en diferentes estadios de desarrollo (Mendoza 2007).

Este proceso se divide en tres fases (Pineau *et al.* 1999)

1. La fase proliferativa o mitótica en la que las espermatogonias son capaces de reponer su propia reserva y experimentar una serie de divisiones mitóticas. Las espermatogonias tienen un doble fin, producir espermatocitos primarios y mantener el número de espermatogonias.
2. La fase meiótica involucra a los espermatocitos diploides los cuales sufren dos divisiones consecutivas para producir espermátidas haploides, y
- 3, La espermiogénesis corresponde a la metamorfosis de las espermátidas a espermatozoides (Bizarro 2002).

## **Espermatogonia**

La espermatogénesis inicia con las espermatogonias tipo A que son células diploides que se apoyan en la membrana basal de los túbulos seminíferos, que proliferan por divisiones mitóticas. Las espermatogonias tipo A tiene 4 divisiones mitóticas consecutivas  $A_1, A_2, A_3, A_4$ . La espermatogonia A al dividirse mitóticamente da origen a la espermatogonia intermedia, que al dividirse da origen a la espermatogonia tipo B (Curtis y Barnes 1996, Geneser 2000, Velásquez 2008, Ross *et. al.* 2004) (Figura 3).

## **Espermatocitos**

Las espermatogonias tipo B se diferencian por medio de una división mitótica para formar los espermatocitos primarios, que son células con núcleo esférico y tiene las características de las espermatogonias de tipo B. Los espermatocitos primarios duplican su ADN poco después de formarse y antes de que inicie la meiosis (preleptoteno). En este tipo celular se inicia la primera división meiótica o reduccional. Como resultado de esta primera división se forman dos espermatocitos secundarios. En los espermatocitos secundarios se inicia la segunda división meiótica y se forman dos espermatidas redondas por cada espermatocito secundario (haploides) (Curtis y Barnes 1996; Velásquez 2008).

## **Espermiogénesis**

La transformación de la espermatida en espermatozoide se denomina espermiogénesis. En esta etapa, el material nuclear se compacta y forma la cabeza del espermatozoide; los centríolos se reorganizan e inician el armado de nueve dobletes microtubulares periféricos y los dos túbulos centrales que dan origen al axonema de la cola del espermatozoide, que en conjunto constituyen el flagelo.

Alrededor de la envoltura nuclear se forma el granulo acrosómico, a partir del aparato de Golgi, este granulo posteriormente se transforma en el acrosoma, que rodea la parte anterior de la cabeza del espermatozoide. En la pieza media se reorganizan las mitocondrias; finalmente se elimina la mayor parte del citoplasma que es fagocitado por las células de Sertoli (Geneser 2000, Ross *et. al.* 2004).

Los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo seminífero y transportados al epidídimo donde maduran estructural y funcionalmente; proceso conocido como capacitación; del epidídimo se van a los conductos deferentes donde se almacenan la mayoría de ellos. Estos conductos desembocan en los conductos excretores de la vesícula seminal.

El conducto deferente de cada testículo entra en la próstata y se unen en la uretra que se prolonga internamente por el pene (Curtis y Barnes 1996, Ross et. al. 2004, Geneser 2000, Velásquez 2008).

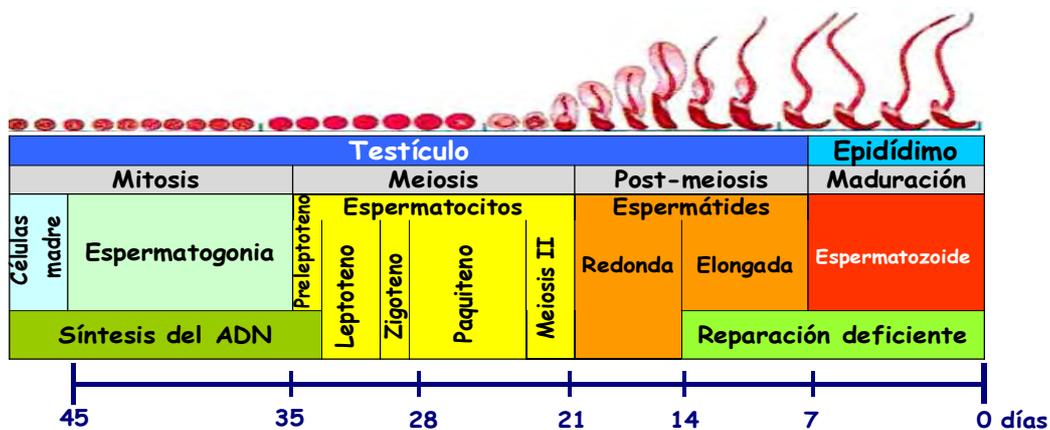


Figura 3. Proceso de espermatogénesis en ratón (Marchetti y Wyrobek 2008)

### Condensación de la cromatina del espermatozoide

La condensación de la cromatina espermática es un evento importante que ocurre durante la espermiogénesis; la estructura consiste de ADN y proteínas heterogéneas. Su importancia radica en proteger al ADN espermático durante el transporte del genoma paterno a través del tracto reproductivo del macho y de la hembra (Holstein et al. 2003, Uriostegui 2007).

Este proceso inicia cuando las espermátidas están en su etapa de alargamiento y las histonas son removidas y reemplazadas, por proteínas nucleares denominadas protaminas; adicionalmente en la maduración epididimal se forman puentes disulfuro, haciendo al ADN

unas 6 veces más compacto con un volumen 40 veces menor que el de una célula somática; este empaquetamiento le permite al núcleo espermático tener una estabilidad adicional necesaria para asegurar la integridad del material genético (Uriostegui 2007, Gil et al. 2007).

Se ha demostrado que la cromatina de las células germinales pueden ser blanco de algunos contaminantes ambientales y laborales como el vanadio (Sega *et al.* 1976, Urióstegui 2007).

Se ha descrito que la alteración en la cromatina espermática puede resultar de la interacción de diversos compuestos con el ADN. Los estadios de espermatida tardía y espermatozoide son etapas sensibles al efecto genotóxico causado por agentes ambientales. Esta sensibilidad se debe, por una parte, a la falta de capacidad de reparación del ADN en estos estadios (figura 3) (Urióstegui 2007).

## JUSTIFICACIÓN

Considerable atención ha traído en recientes años la evaluación de la genotoxicidad de los compuestos de vanadio. Los efectos adversos de los compuestos pentavalentes del vanadio sobre la integridad y segregación de los cromosomas principalmente en células somáticas ha dado como resultados la inducción de micronúcleos, rompimientos de la cadena de ADN, intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y aberraciones cromosómicas en diferentes sistemas *in vivo* e *in vitro*.

Sin embargo hasta ahora hace falta información acerca de la recuperación del daño causado por metales como el pentóxido de vanadio, por lo que en este trabajo se evaluó si hay una reparación y reversibilidad del daño causado por el  $V_2O_5$  al analizar la morfología espermática, así como las lesiones al ADN en los espermatozoides y el daño al ADN en las células sanguíneas con respecto al tiempo de recuperación mediante la técnica de electroforesis unicelular.



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.

## **HIPÓTESIS**

La exposición de ratones macho de la cepa CD-1 a pentóxido de vanadio a una dosis de  $8.5 \mu\text{g/g}$  de peso, durante 60 días, cada tercer día, causa alteraciones morfológicas en los espermatozoides y daño al ADN en diferentes tipos celulares, sin embargo, si eliminamos la fuente de exposición y dejamos recuperar a los animales 1, 2, 3 ó 4 semanas, el daño observado disminuirá con respecto al tiempo.



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.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto sobre la morfología espermática, así como lesiones en el ADN en células espermáticas y sanguíneas de ratones machos de la cepa CD-1 expuestos a pentóxido de vanadio, mediante el ensayo cometa, así como la reparación del daño después del tratamiento.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los efectos del pentóxido de vanadio en la morfología espermática en ratones macho CD-1, aplicado a una dosis de 8.5  $\mu\text{g/g}$  de peso vía intraperitoneal por 60 días, cada tercer día, y a diferentes tiempos de recuperación después del último tratamiento (0, 1, 2, 3, 4 semanas al término).
- Estimar los rompimientos de cadena sencilla inducidos en el ADN en células espermáticas y sanguíneas de ratones machos de la cepa CD-1, a distintos tiempos al término del tratamiento.
- A partir del análisis de los resultados, determinar si hay una reparación del daño causado por el pentóxido de vanadio en la morfología espermática y lesiones al ADN tanto en los espermatozoides como en las células sanguíneas con respecto al tiempo de recuperación.



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.

## MÉTODO

### Animales

Para este estudio, se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 de 2 meses de edad y de 40 gramos de peso. Durante el experimento los ratones se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad 12:12 y alimentación *ad libitum*. Se estableció 1 grupo de 24 ratones expuestos a pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) a una concentración de  $8.5 \mu\text{g/g}$  de peso corporal por 60 días y un grupo control de 5 animales.

### Tratamiento

El pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ , 99.6% de pureza, Aldrich Chemical Co.) se preparó en solución salina y fue inyectado intraperitonealmente (ip) en un volumen apropiado para obtener una dosis final de  $8.5 \mu\text{g/g}$  de peso corporal.

### Grupos

24 machos de la cepa CD-1 fueron inyectados ip con el compuesto de  $V_2O_5$  cada 3er día durante 60 días. Grupos de 5 animales fueron sacrificados cada 7 días después del término del tratamiento.

### Electroforesis unicelular en gel

Grupos de 5 animales fueron sacrificados a las 24 horas de la última exposición y cada siete días (0, 1, 2, 3 y 4 semanas) postratamiento por dislocación cervical.

A cada animal se le removieron los conductos deferentes a los cuales se les realizó un exprimido para extraer los espermatozoides que se colocaron en  $100 \mu\text{l}$  de solución salina balanceada (PBS) a  $37^\circ\text{C}$ . De la solución anterior se tomaron  $40 \mu\text{l}$  y se mezclaron en un tubo eppendorf de 1ml con  $75 \mu\text{l}$  de agarosa de bajo punto de fusión 0.5%.



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.

La metodología del ensayo cometa que se utilizó fue desarrollada por alumnos del grupo 2801 durante el curso del octavo y noveno semestre en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Reproductiva (UNIGEN) y se realizó como se describe a continuación:

Los 75  $\mu$ l de la muestra de espermatozoides puestos en agarosa de bajo punto de fusión se colocaron en la superficie de un portaobjetos previamente tratado con agarosa de punto de fusión normal 1%. Una vez solidificada la segunda capa, se aplicó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) y se cubrió con un cubreobjetos; las preparaciones se colocaron sobre una placa de hielo hasta que solidificó nuevamente el gel.

Una vez removido el cubreobjetos, los portaobjetos fueron colocados en solución lisis que contenía (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10mM, DTT 4mM pH10 y 5% Tritón, en donde permanecieron por 24 horas a temperatura ambiente (22-23°C). Terminado este tiempo las preparaciones se mantuvieron por 2 horas y media en la solución lisis anterior más 75  $\mu$ l de proteinasa K 10.5  $\mu$ g/ml (Roche Molecular Biochemicals, Lewes, UK) a 37°C. Posteriormente las preparaciones se colocaron en una cámara de electroforesis con una solución alcalina (NaOH 10N, EDTA 200mM, pH 13) durante 10 minutos antes de empezar la electroforesis la cual posteriormente se realizó por 5 minutos a 25 V y 300 mA. Posteriormente los geles se neutralizaron en una solución de TRIS (0.4 M, ph 7.5) por 5 minutos y finalmente se deshidrataron en alcohol al 70% y al 100% por 5 minutos cada uno y se dejaron secar al aire para su posterior evaluación.

Para la evaluación en células sanguíneas; se extrajo sangre del corazón, por punción, con una jeringa previamente heparinizada; se tomaron 10  $\mu$ l de células y se resuspendieron en gel y se colocaron en la superficie de un portaobjetos previamente tratado con agarosa de punto de fusión normal 1%.

Una vez solidificada la segunda capa de agarosa, se aplicó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) y se colocó un cubreobjetos. Las preparaciones se colocaron sobre una placa de hielo hasta que solidificó nuevamente el gel.

Las preparaciones se colocaron en una solución lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100mM, Tris 10mM, pH 10 y 1% Tritón) durante 1 hora a 4°C y finalizado este tiempo se llevaron las placas a la cámara de electroforesis con una solución alcalina (NaOH 10N, EDTA 200mM, pH 13) donde permanecieron por 20 minutos para permitir el desenrollamiento del ADN. La electroforesis fue por 20 minutos a 25 V y 300 mA, después las preparaciones se colocaron en el buffer de neutralización (Tris 0.4 M, pH 7.5) 3 veces durante 5 minutos y deshidratadas por 5 minutos en etanol al 70% y al 100%.

### **Análisis del daño al ADN**

En el momento del análisis a cada uno de los geles se le adiciono 75  $\mu$ l de bromuro de etidio a una concentración de 20  $\mu$ g/ml, se colocó sobre el gel un cubreobjetos y con ayuda de un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro para excitación de luz entre 450-490 nm (filtro G-2A) fueron evaluadas las células de manera individual. Se tomaron en cuenta los núcleos de las células dañadas o con estela que toman la apariencia de un cometa, los núcleos intactos derivados de las células sin daño y el ADN difuso resultado de células con daño severo. Con una escala ocular, se midió la estela del cometa como la longitud de la migración del ADN, de la parte proximal al núcleo a la más distal. La migración se observó a 400 aumentos y se midieron 100 núcleos; los datos fueron transformados a micrómetros ( $\mu$ m).

## **Evaluación Espermática**

Para evaluar la morfología espermática fue usado el procedimiento y criterio de Wyrobek y Bruce (1975, 1978). De cada residuo de la suspensión original de espermatozoides se preparó un portaobjetos con la muestra, se dejaron secar al aire y se tiñieron con Giemsa (1:40 en agua), para cada muestra se examinaron 500 espermatozoides, a 1000 aumentos, los espermatozoides fueron marcados como normal o anormal y los datos fueron reportados como porcentaje de espermatozoides anormales.

## **Análisis estadístico**

La media, errores estándar y las desviaciones fueron calculados. El nivel de significancia entre los grupos tratados y el control fueron determinados con la prueba t-Student.

## RESULTADOS

### Ensayo Cometa

Los resultados del daño al ADN evaluado por el ensayo cometa en células de sangre del corazón y de espermatozoides de ratones tratados con 8.5  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal de pentóxido de vanadio por un periodo de 60 días, se muestra en el cuadro 3 y en las figuras 9 a 12.

En el cuadro 3 se muestra la longitud de la migración del daño al ADN en  $\mu\text{m}$ , representados por su media y su desviación estándar encontrado en células sanguíneas, en donde se puede observar un incremento en el grupo tratado, el cual resulta estadísticamente significativo con respecto al grupo testigo con una  $p < 0.05$ .

**Cuadro 3. Longitud promedio en  $\mu\text{m}$  de cometas en células sanguíneas en cada una de las semanas postratamiento**

Grupos	Migración media $\pm$ d. e.
Testigo	13.4 $\pm$ 12.52
Semana 0	26.94 $\pm$ 5.57*
Semana 1	41.66 $\pm$ 23.71*
Semana 2	29.16 $\pm$ 0*
Semana 3	17.16 $\pm$ 2.77
Semana 4	26.80 $\pm$ 1.69*

\*Significativos respecto al testigo  $p < 0.05$ .

A su vez, en la figura 9 se observa que el mayor incremento en la media de la longitud del cometa en las células sanguíneas fue en la semana 1, aunque en las semanas posteriores la longitud promedio no disminuyó significativamente comparado con el testigo, sin embargo cabe mencionar que el número de células con daño sí disminuyó considerablemente notando que en la semana 1 y 2 el número de células que presentaron cometa fue alto de 114 y 217 respectivamente; en las semanas 3 y 4 fue disminuyendo el



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.

número llegando a 14 y 9 respectivamente. Por lo tanto, si hubo una recuperación y posible reparación del daño en células sanguíneas.

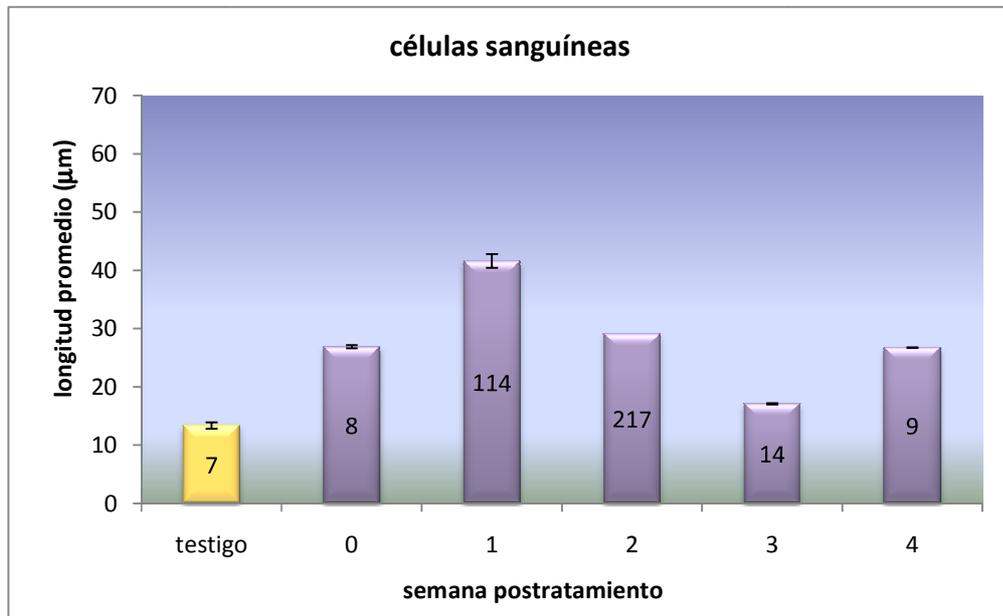


Figura 9. Migración promedio del ADN ( $\pm$ error estándar) en cada tiempo después de la exposición, en células sanguíneas. Dentro de la columna se encuentra el número de células que presentaron cometa

En el cuadro 4 se muestra el porcentaje de cometas obtenidos en cada tiempo después del tratamiento. Los resultados indican que en las muestras de los grupos tratados el porcentaje más alto fue de 54.25% el cual ocurrió en la semana 2, lo cual resulto estadísticamente significativo con una  $p < 0.05$  comparado con el testigo mediante la prueba t-Student. Este porcentaje se redujo a 3.5% una semana más tarde y continuo disminuyendo hasta 2.25% en la última semana, siendo significativo respecto al testigo.

Cuadro 4. Porcentaje de cometas obtenidos en cada tiempo después del tratamiento		
	Con cometa (%)	Sin cometa (%)
<b>Tratados</b>		
Semana 0	2	98
Semana 1	28.5	71.5
Semana 2	54.25	45.75
Semana 3	3.5	96.5
Semana 4	2.25	97.78
<b>Testigo</b>		
Semana 0	2	98
Semana 1	3	97
Semana 2	2	98
Semana 3	0	100
Semana 4	0	100

En la figura 10 se aprecia el incremento en el porcentaje promedio de cometas que se observó en la semana 1 y 2 después del tratamiento y en las semanas posteriores (3 y 4) donde se puede apreciar una disminución en el porcentaje de cometas. Notando una reparación casi total en células sanguíneas.

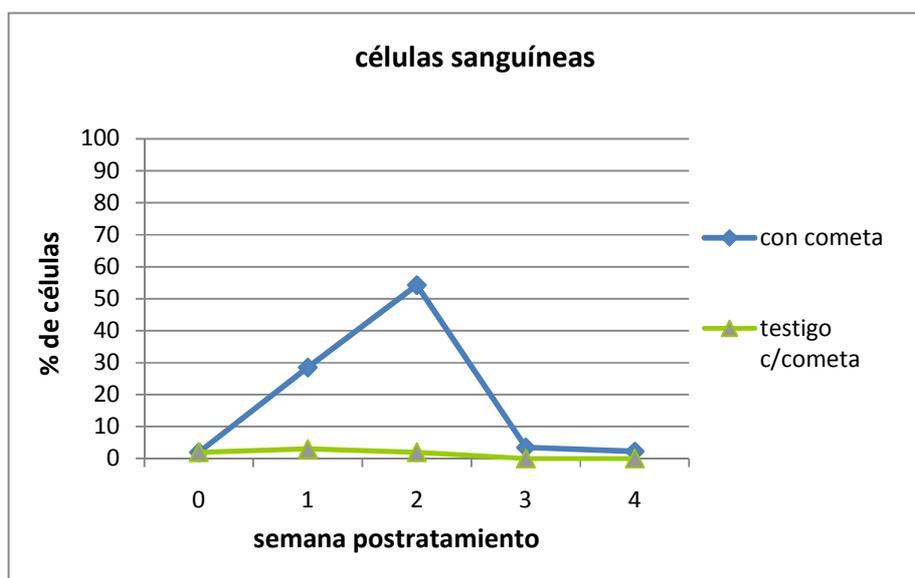


Figura 10. Incremento en el porcentaje de cometas producidos en células sanguíneas de ratón a diferentes tiempos después de la exposición a pentóxido de vanadio.

## Espermatozoides

Los resultados obtenidos de la longitud promedio en espermatozoides se muestran en el cuadro 5.

**Cuadro 5. Longitud promedio en  $\mu\text{m}$  de cometas en espermatozoides en cada una de las semanas postratamiento**

Grupos	Migración media $\pm$ d. e.
Testigo	31.51 $\pm$ 9.27
Semana 0	46.12 $\pm$ 4.91*
Semana 1	35.41 $\pm$ 1.33*
Semana 2	35.07 $\pm$ 4.03*
Semana 3	35.28 $\pm$ 6.44*
Semana 4	38.30 $\pm$ 2.48*

\*Significativos con respecto al testigo,  $p < 0.05$  Prueba t-Student.

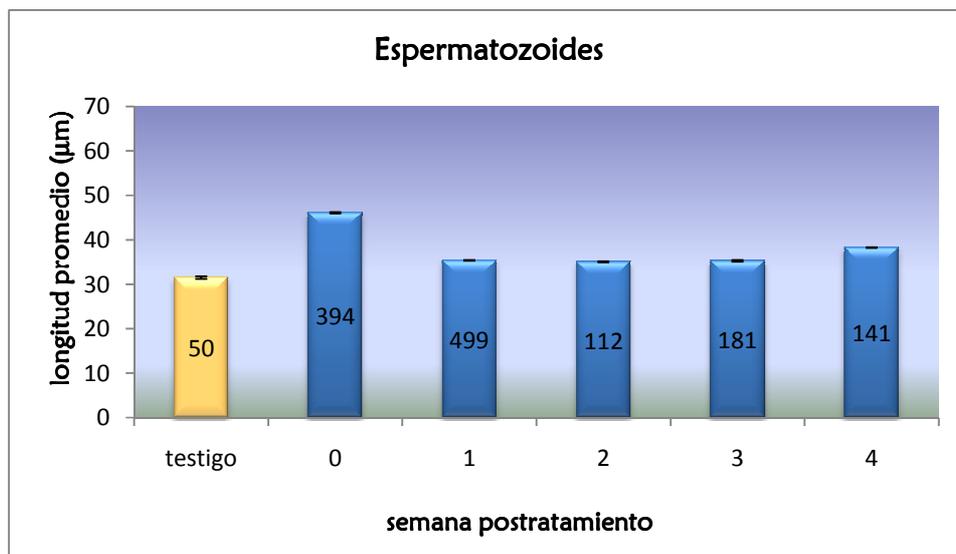


Figura 11. Migración promedio del ADN ( $\pm$ error estándar) en cada tiempo después de la exposición, en espermatozoides de ratón. Dentro de la columna se encuentra el número de células que presentaron cometa.

En el cuadro 6 se aprecian los porcentajes de los cometas obtenidos en cada semana postratamiento. En el grupo tratado se puede apreciar que en la semana 0 y 1 después de la exposición el porcentaje es más alto que en las siguientes semanas, donde los porcentajes disminuyen siendo los valores 9.30, 15.08 y 12.5% para las semanas 2, 3 y 4 respectivamente.

**Cuadro 6. Porcentaje de espermatozoides que presentaron cometa a diferentes tiempos postratamiento.**

Grupos	Con cometa (%)	Sin cometa (%)
<b>Tratados</b>		
Semana 0	49.25	56.37
Semana 1	62.37	37.62
Semana 2	9.30	90.60
Semana 3	15.08	84.91
Semana 4	12.58	87.41
<b>Testigo</b>		
Semana 0	5.00	95.00
Semana 1	8.5	91.50
Semana 2	9.00	91.00
Semana 3	1.00	99.00
Semana 4	1.50	98.50

En la figura 12 se aprecia el incremento en el porcentaje promedio de cometas que se observo al tiempo 0 y la semana 1 después del tratamiento y en las semanas posteriores 2, 3 y 4 se puede apreciar una disminución en el porcentaje de cometas. Observando la recuperación del daño ocasionado por el pentóxido de vanadio.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

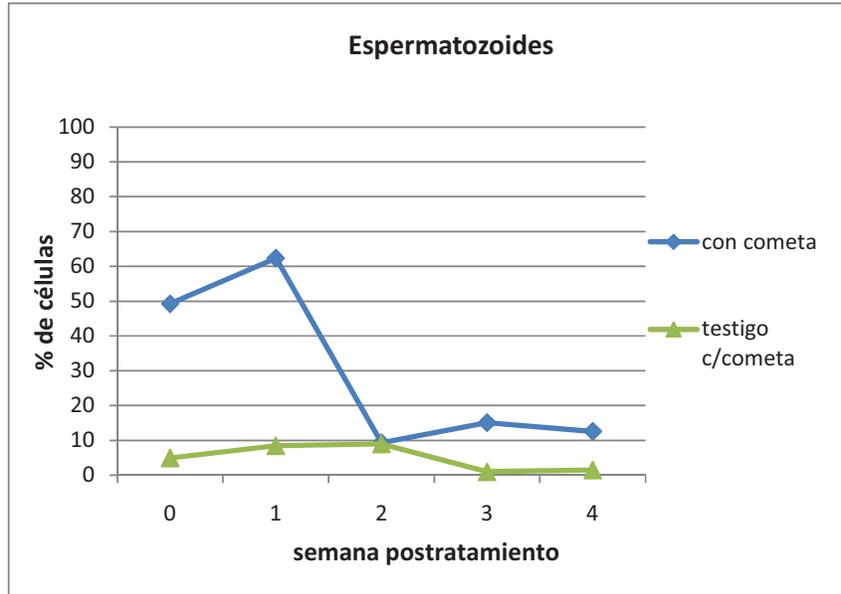


Figura 12. Incremento en el porcentaje de cometas producidos en espermatozoides de ratón a diferentes tiempos después de la exposición a pentóxido de vanadio.

## Morfología Espermática

En la cuadro 7 se observa la frecuencia de anomalías espermáticas encontradas a lo largo de las 4 semanas de recuperación.

**Cuadro 7. Frecuencia de anomalías espermáticas totales**

Semana	0	1	2	3	4	Testigo
<b>Gancho inusual</b>	146	148	204	178	506	109
<b>Amorfos</b>	146	238	115	265	271	71
<b>Banana</b>	127	142	76	113	252	36
<b>Enrollado sobre sí</b>	14	4	11	2	7	5
<b>Doble flagelo</b>	2	5	0	5	1	1
<b>macrocéfalo</b>	8	0	16	34	27	3
<b>microcéfalo</b>	2	0	19	3	28	6
<b>Parte inicial enrollada</b>	5	3	9	5	6	2
<b>Parte final enrollada</b>	13	3	15	10	5	5
<b>otros</b>	24	26	67	15	41	24

En el cuadro 7 se muestra la persistencia del daño al tiempo 0 y en algunos casos el número de espermatozoides anormales aumenta con respecto al tiempo de recuperación como por ejemplo la forma de gancho inusual en donde se observa que en el tiempo 0 la cantidad de espermatozoides con esta característica es de 146 comparado con 506 espermatozoides con gancho inusual de la semana 4; así mismo los espermatozoides en forma de banana al tiempo 0 fue de 127 y en la semana 4 se encontraron 252 células con dicha característica.

### Anormalidades Espermáticas Observadas

Un espermatozoide típico del grupo control, con el gancho característico y una sola cola se muestra en la figura 13. Las anomalías espermiáticas inducidas por el pentóxido de vanadio fueron, de acuerdo con Wyrobek y Bruce (1975, 1978): el gancho inusual (figura 14), la cabeza en forma de banana (figura 15), amorfo (figura 16), enrollado sobre sí (figura 17).



Figura 13. Espermatozoide normal



Figura 14. Gancho inusual



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.

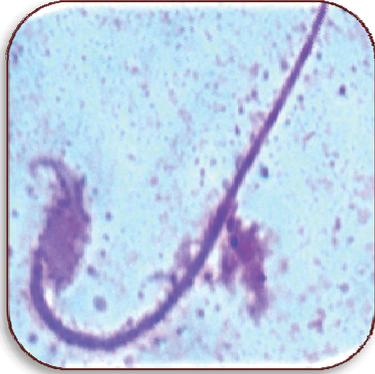


Figura 15. Cabeza en forma de banana

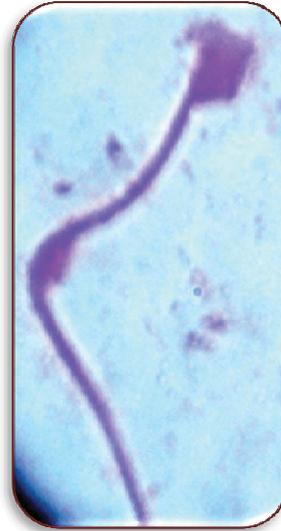


Figura 16. Amorfo



Figura 17. Enrollado sobre



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.

## Discusión

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

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó al pentóxido de vanadio como “un posible carcinógeno para humanos” (Grupo 2B) (IARC 2006), sin embargo aún así son relativamente pocos los estudios que se han realizado para evaluar la acción genotóxica de todos los compuestos de vanadio en relación a sus diferentes estados de oxidación. Es importante mencionar que muchos de ellos son experimentos *in vitro* (Ivancsits 2002, Kleinsasser *et al.* 2003, IARC 2006).

De los compuestos que más se han estudiado desde el punto de vista genotóxico está el  $V_2O_5$ , y los datos encontrados muestran que induce micronúcleos, rompimientos de cadena sencilla de ADN, intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y aberraciones cromosómicas en diferentes sistemas (Roldán y Altamirano 1991, Migliore *et al.* 1993 y 1995, Leopardi *et al.* 2005, Attia *et al.* 2005, Villani *et al.* 2007, IARC 2006). Además se sabe que en fibroblastos humanos, genera rompimientos de ADN, segregación errónea en los cromosomas y la co-exposición de las células a otros agentes genotóxicos pueden resultar en un daño persistente en el ADN (Ivancsits *et al.* 2002, Leopardi *et al.* 2005).



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.

Los efectos reprotóxicos de los compuestos de vanadio también se han estudiando, observando a este respecto que producen una disminución en el peso testicular y alteraciones en la espermatogénesis tales como reducción en los conteos espermáticos, alteraciones morfológicas en la cabeza de los espermatozoides y una disminución de la motilidad de los mismos, degeneración de las células testiculares, células apoptóticas en la periferia de los túbulos seminíferos, rompimiento de los túbulos, así como la pérdida de la maduración y elongación de espermátidas. (Altamirano *et al.* 1996, D'Cruz y Uckun 2000, Aragón y Altamirano 2001, Aragón *et al.* 2005, Chandra *et al.* 2007).

Por otro lado estos compuestos también disminuyen la fertilidad y la fecundidad, ya que provocan una disminución en el número de implantaciones, así como un incremento en la frecuencia de reabsorciones y de fetos con bajo peso en hembras preñadas por machos expuestos a este metal (Domingo *et al.* 1986, Llobet *et al.* 1993, Altamirano-Lozano *et al.* 1996, Aragón y Altamirano 2001, IPCS 2001, Morgan y El-Tawil 2003, Aragón *et al.* 2005)

Una de las ventajas que tienen todos los organismos es la capacidad de contrarrestar el daño producido por las exposiciones a los xenobióticos. Estos mecanismos de desintoxicación incluyen a los sistemas enzimáticos naturales como los citocromos, y en particular el P450, la glutatión S-transferasa, los transportadores dependientes de ATP y todo el sistema antioxidante (superoxido dismutasas, catalasas, glutatión peroxidadas, etc) (Burdon 1999, Guengerich 2000, Strange 2000, Valko 2006) y los sistemas de defensa no enzimáticos como la vitamina E, C y el Glutatión entre otros (Burdon 1999, Donnelly *et al.* 1999). Sin embargo cuando el daño producido por los compuestos involucra al ADN o a las moléculas que están asociadas al sistema genético del organismo entran en funcionamiento los llamados mecanismos de reparación del ADN (Price 1993, Collins 2004).

La capacidad de reparación del ADN ofrece una protección contra carcinógenos y agentes genotóxicos y una falla de esta capacidad resulta en una gran susceptibilidad a mutaciones y por lo tanto una mayor inestabilidad genética.

La mayoría de los daños al ADN se corrigen mediante los mecanismos de reparación, estos incluyen la reparación de los errores de apareamiento, la reparación directa, la reparación por escisión de bases y la reparación por escisión de nucleótidos. Aunque los detalles de los diferentes mecanismos varían, la mayoría requiere dos cadenas de ADN y muestran cierta superposición en los tipos de daño reparado. La reparación de los errores de apareamiento corrigen errores que surgen durante la replicación, la reparación directa vuelve a cambiar los nucleótidos alterados a su condición original, mientras que los mecanismos por escisión de bases o de nucleótidos reemplazan los nucleótidos que rodean al segmento de ADN dañado. Esas rutas de reparación del ADN constituyen una defensa crucial contra citotoxicidad, mutagenesis y carcinogénesis inducidas por agentes que dañan el ADN (Braithwaite *et al.* 1999).

El ensayo cometa es una técnica que provee información sobre la inducción de rupturas de cadenas sencillas o dobles en el ADN, muy sensible por ser capaz de detectar 1 rompimiento de cadena de DNA por cada 10 daltones, y puede ser aplicada en una gran variedad de tejidos animales y vegetales (Rivas 1999).

Otra de las aplicaciones de la técnica del ensayo cometa es que permite estudiar la cinética de reparación del daño inducido al ADN (Mc Kelvey *et al.* 1993, Rojas *et al.* 1999a, Speit y Hartmann 2006). Por ejemplo, en algunos casos, los mecanismos de reparación se han evaluado mediante los rompimientos de cadena sencilla y de cadena doble inducidos por la radiación ionizante, los cuales son eficientemente reparados en células normales. 50% del daño es reparado en los primeros 15 minutos y la reparación completa ocurre dentro de las primeras 2 horas postratamiento. Este rango de reparación ha sido también demostrado en linfocitos humanos irradiados (Singh *et al.* 1990).

El pentóxido de vanadio ha sido reportado como agente genotóxico que genera rompimientos de la cadena de ADN pero aún no se ha determinado si estos rompimientos que genera su exposición pueden ser reparados hasta llegar a un nivel de control. En el presente trabajo se realizó el ensayo cometa en células sanguíneas y en espermatozoides de ratón para estimar los rompimientos de cadena sencilla inducidos por este compuesto y evaluarlos a distintos tiempos posteriores al término del tratamiento (0, 1, 2, 3 y 4 semanas), para poder determinar si el daño persiste o hay una posible reparación o reversión de las rupturas de cadenas en el ADN de los 2 tipos celulares, además de estudiar si las alteraciones en la morfología espermática producidas por este compuesto variaban con respecto al tiempo de recuperación.

Altamirano-Lozano y colaboradores (1999) realizaron estudios para evaluar el potencial genotóxico del pentóxido de vanadio en 6 diferentes órganos (hígado, riñón, pulmón, bazo, corazón y médula ósea) usando la técnica de Electroforesis Unicelular alcalina. Administraron vía intraperitoneal, pentóxido de vanadio en diferentes dosis (2 mg/g, 11.5 mg/g y 5.75 mg/g) y a las 24 horas los animales fueron sacrificados. En todos los tejidos y órganos evaluados (excepto en la médula ósea) se encontró incremento en el número de células que presentan daño.

Han encontrado en linfocitos y leucocitos que a bajas concentraciones ( $>5 \mu\text{M}$ ), se observan rompimientos de cadena sencilla en el ADN (Ivancsits y colaboradores 2002, Rojas-Lemus 2006). Por otra parte encontraron que en fibroblastos, al combinar la exposición de vanadato  $0.5 \mu\text{M}/\text{UV } 4.8 \text{ kJ/m}^2$  y vanadato  $0.5 \mu\text{M}/\text{bleomicina } 1\mu\text{g/ml}$  se presentaban rompimientos de cadena doble en ADN, mientras que Kleinsasser y colaboradores (2003), observaron que la exposición con pentóxido de vanadio en linfocitos, genera rompimientos de cadena sencilla en ADN, mientras que en células epiteliales humanas y de la mucosa nasal no presentaron sensibilidad.

Los resultados anteriores coinciden con los datos que encontramos en el presente trabajo, en los cuales se muestra un aumento significativo del número de células dañadas en la semana 1 y 2, en las que encontramos 114 y 217 cometas con respecto a la semana 0 (24 horas postratamiento) donde solo hubo 8 cometas. Lo que nos indica que el pentóxido de vanadio induce rompimientos en la cadena de ADN, que pueden ser detectados mediante este ensayo, no solo inmediatamente después de la exposición sino también a largo plazo.

En lo que respecta a la reversión del daño en las células sanguíneas los resultados observados mostraron una disminución significativa en el número de células que presentaron cometa en las últimas 2 semanas de recuperación (tercera y cuarta semana), así como una disminución del porcentaje total de las células que presentaron cometa. Se observó que aunque en la primera semana la longitud de los cometas fue mayor y conforme pasó el tiempo disminuyó pero no de manera significativa, el porcentaje de células que presentaron daño sí disminuyó considerablemente notando que en la semana 1 y 2 fue de 28.5% y 54.2% respectivamente; en las semanas 3 y 4 disminuyó llegando a 3.5% y 2.25% respectivamente, siendo significativo respecto al testigo. Estos resultados evidencian la acción de un mecanismo de reparación de las rupturas de cadena sencilla del ADN.

Trabajos anteriores concuerdan con los resultados obtenidos aquí, en cuanto a la existencia de una reparación del daño causado por algún agente genotóxico. Aunque en la mayoría de los trabajos reportados la reparación total se ha establecido en linfocitos en las 2 primeras horas, posteriores al tratamiento (Singh *et al.* 1990), en este caso encontramos células con daño aún después de 4 semanas de haber terminado el tratamiento.

Relacionado a la presencia del daño en la cuarta semana Giovanetti y colaboradores (2008) evaluaron la persistencia del daño genético en muestras de sangre periférica de ratones de la cepa CBA/J tratados con rayos x a concentraciones de 0.1 o 1 Gy. Se tomaron las muestras tanto de los grupos tratados como las del control después de 30 min, 24 hrs, 7 días, 1, 3 y 6 meses posteriores a la exposición y se analizaron mediante el ensayo cometa. En ratones expuestos a 1Gy el daño inicial fue alto y decreció conforme transcurrió el tiempo experimental, mientras que el grupo expuesto a 0.1 Gy al principio mostró un daño bajo persistente, sin embargo fue incrementando lentamente a los diferentes tiempos del experimento. Los ratones expuestos a una dosis de 0.1 Gy mostraron una sensibilidad a la radiación *in vitro* dependiente del tiempo. Seis meses después de la radiación, el porcentaje de células apoptóticas observadas en ratones irradiados a 0.1Gy fue significativamente más alta comparada con el grupo control y con los ratones expuestos a 1 Gy. Los resultados demostraron que la exposición a bajas dosis de rayos x puede inducir daño a largo plazo. Aunque este autor trabajó con radiación, ésta también causa daño a nivel del ADN y se puede utilizar como comparativo del presente trabajo debido a los tiempos de evaluación en donde también encontraron células dañadas aún después de 6 meses, lo que podría tomarse como referencia al momento de evaluar otros agentes genotóxicos. La persistencia del daño genético podría tener implicaciones relevantes para la estimación de riesgo a bajas dosis.

La presencia de células dañadas aún en la cuarta semana, se puede explicar considerando las poblaciones celulares más sensible y/o más dañadas en sus funciones para la reparación (Wuttke *et al.* 1993). Algunos autores han reportado cierta diferencia en la capacidad de reparación entre linfocitos, granulocitos y leucocitos de diversos donadores (Lankinen *et al.* 1996, Rojas *et al.* 1996, Papplert *et al.* 1995, Andersson *et al.* 2007). Es factible que esta variación represente cambios reales de célula a célula en la producción y reparación de lesiones en el ADN. No obstante, en las poblaciones humanas existen otros factores que pueden afectar la capacidad de reparación, tales como la edad, el estado de salud, los hábitos nocivos de fumar y tomar alcohol y las condiciones fisiológicas en general (Singh *et al.* 1990, Fairbairn *et al.* 1995).

Una aplicación importante de este tipo de estudios de la reparación de los rompimientos de la cadena de ADN es la capacidad para reconocer individuos con una reparación alterada. Rojas y colaboradores en 1996 expusieron linfocitos de manera *in vitro* de 4 donadores sanos a pentóxido de vanadio a concentraciones de 3000, 30 y 0.3  $\mu\text{M}$ . Evaluaron mediante el ensayo cometa la cinética de reparación del daño a dos diferentes tiempos de recuperación 45 y 90 minutos después del tratamiento, encontrando así un retardo importante de la reparación en uno de los 4 donadores, mientras que en los otros donadores a los 45 minutos después del tratamiento se había eliminado casi el 80% del daño y a los 90 minutos la migración del ADN había regresado a los valores del control, en dicho individuo no ocurrió así.

En el caso de los espermatozoides se observó un comportamiento similar al de las células sanguíneas, aunque se tuvo un mayor número de células dañadas: se pudo apreciar en la semana 0 y 1 un porcentaje más alto que en las semanas posteriores, en las cuales los porcentajes disminuyeron siendo los valores 9.30% en la semana 2, 15.08% (semana 3) y 12.5% (semana 4), por lo que se observa una disminución del daño inducido por el pentóxido de vanadio, pero sin llegar a los valores del grupo testigo.

Anteriormente ya se habían evaluado los efectos del pentóxido de vanadio en el sistema reproductor. Altamirano-Lozano *et al.* (1996) analizó sus efectos administrando a ratones de la cepa CD-1 a una dosis de 8.5 $\mu\text{g/g}$ , durante 60 días, y evaluaron los efectos en las funciones reproductivas y en el ADN testicular cada 10 días después de haber comenzado el tratamiento, este último expresado en la migración del ADN mediante el ensayo cometa. Lo que obtuvieron fue que en la mayoría de las células testiculares de los animales tratados hubo un mayor daño al ADN que en los animales control.

Por otro lado y utilizando el mismo ensayo cometa, se evaluó el daño genético en células testiculares de ratones CD-1, 24 horas después de ser inyectado pentóxido de vanadio vía intraperitoneal en dosis de 5.74, 11.5 ó 23  $\mu\text{g/kg}$  de peso.

En este caso se observó un incremento significativo en la migración del ADN de dichas células (Altamirano-Lozano *et al.* 1999). Estos datos reportados nos permiten confirmar que los efectos del pentóxido de vanadio también son detectados en el sistema reproductor.

La persistencia del daño en espermatozoides ha sido corroborada por otros trabajos en donde se define a la fase postmeiótica de la espermatogénesis (espermiogénesis) más sensible a los efectos genéticos de los mutágenos ambientales debido a que las células germinales forman espermias maduros que progresivamente pierden la capacidad de reparar el daño al ADN. La capacidad diferencial de reparación del ADN de las células germinales postmeioticas tienen un mayor impacto en el riesgo de transmitir daño heredable paterno y sugiere que las exposiciones crónicas pueden ocurrir en las semanas previas a la fecundación debido a factores ocupacionales o al estilo de vida (por ejemplo, el fumar) los cuales pueden llevar a la acumulación de alteraciones genéticas en los espermatozoides y provocar aberraciones cromosómicas hereditarias (Inoue *et al.* 1993, Haines *et al.* 2001, Haines *et al.* 2002, Cordelli *et al.* 2003, Marchetti y Wyrobek 2008).

Inoue *et al.* (1993). Encontró que la frecuencia de rompimientos de cadena sencilla de ADN en células germinales de ratón después de la exposición a metil metano sulfonato (MMS) fue más alta en espermatozoides que en espermatocitos o espermatogonias. Esta diferencia fue atribuida a las distintas capacidades de reparación del ADN. Las espermatidas tardías y los espermatozoides inmaduros fueron más sensibles al MMS presentando mayores rompimientos de la cadena de ADN, así como mayor cantidad de aberraciones cromosómicas en los óvulos fecundados por los machos tratados. El almacenamiento de los espermatozoides en el tracto reproductivo parece aumentar la producción de rompimientos de cadena sencilla.

Haines y colaboradores (2001, 2002) analizaron los espermatozoides del vaso deferente 45 días después de que irradiaron los testículos con rayos-X (4Gy) o por el isótopo de Indio-114m. Utilizaron una versión alcalina del ensayo cometa y encontraron un incremento significativo en la migración de ADN para ambos tipos de irradiación comparados con los controles. Sus resultados sugieren que el daño al ADN causado en células espermátogénicas puede ser detectado 45 días después en los espermatozoides. Las espermatidas, espermátocitos, espermátogonias diferenciadas y células madre de las espermátogonias también fueron irradiadas, el mayor daño al ADN ocurrió en espermátogonias diferenciadas. Después de 120 días al término del tratamiento observaron una persistencia del daño al ADN en células madre de las espermátogonias (Haines *et al.* 2002). Un año más tarde Cordelli y colaboradores (2003) analizaron mediante el ensayo cometa las lesiones en células testiculares y en espermatozoides los días 14, 45 y 100 después de ser irradiados los testículos con rayos X. Mostraron que 14 días después de la irradiación había un aumento dosis-dependiente del daño al ADN en células testiculares, mientras que las células espermáticas maduras no se vieron afectadas. Por otro lado, tuvieron un aumento en los rompimientos de la cadena de ADN en los espermatozoides 45 días después del tratamiento. El daño al ADN regresó a los niveles pre-radiación a los 100 días después de la exposición. En general los resultados mostraron que el daño al ADN inducido en células germinales pre-meióticas es detectable en espermátocitos primarios y permanece en espermatozoides maduros.

Marchetti y Wyrobek 2008. Usaron una combinación de exposición única o fraccionada a diepoxibutano (DEB), un componente del humo de tabaco, para investigar las diferencias en la eficiencia de reparación del ADN en espermatidas jóvenes (21-15 días antes de la fertilización (dbf)), espermatidas tardías (14-8 dbf) y en espermatozoides (7-1 dbf) durante las 3 semanas de la espermiogénesis, y para ver si la acumulación del DEB inducía daño heredable en el cigoto. El análisis de Aberraciones cromosómicas en la primera metafase del cigoto muestra que las espermatidas tardías y los espermatozoides son incapaces de reparar el daño al ADN inducido por el DEB, encontrando un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en el cigoto.

La comparación entre la exposición única y fraccionada sugiere que hay una reparación de ADN deficiente durante la fase final de la espermiogénesis y por lo tanto hay una acumulación de daño en el ADN del espermatozoide.

Todos los resultados mencionados anteriormente concuerdan con lo que obtuvimos en este trabajo, en donde nosotros no sólo detectamos daño a las 24 horas (semana 0) posteriores al tratamiento sino que este daño es detectado aún después de cuatro semanas donde se permitió la recuperación de las células. Mientras que algunos reportan la recuperación del daño a niveles el control 100 días después de la exposición (Cordelli *et al.* 2003) otros aún después de 120 días reconocen daño tanto en células germinales (espermátida, espermatogonia) como en espermatozoides (Haines *et al.* 2002), lo que es atribuido al compuesto, pero sobre todo a la acumulación del daño y a la pérdida de la capacidad de reparación conforme transcurre el proceso de espermatogénesis.

Aunado a lo anterior se ha reportado que el vanadio incrementa la frecuencia de anomalías morfológicas en los espermatozoides (Altamirano *et al.* 1996, Aragón y Altamirano 2001). En este trabajo se evaluaron estas alteraciones para evaluar si también disminuía su frecuencia de maneras similar al daño al ADN. Las anomalías espermáticas que con mayor frecuencia se presentaron fueron la forma de gancho inusual, amorfos y la forma de banana (Wyrobek y Bruce 1975, 1978) las cuales se fueron incrementando a lo largo de las 4 semanas en las que se permitió la recuperación de los espermatozoides.

Contrario a la disminución que se esperaba hubo un incremento posiblemente relacionado con el daño presentado mediante el ensayo cometa, el cual es un indicador de daño genotóxico el cual puede ser responsable del incremento en el porcentaje de formas anormales en la cabeza del espermatozoide (Aragón y Altamirano 2001).

Todos los tipos de anomalías encontradas resultaron significativas con respecto al grupo control, lo que sugiere que los efectos tóxicos del vanadio persisten sobre todo en los testículos y que las anomalías en la morfología espermática podrían ser consecuencia de mutaciones génicas.

En investigaciones realizadas anteriormente con vanadio se ha confirmado que sus compuestos producen gran cantidad de daño reproductivo, pero sobre todo en la morfología espermática, Aragón y Altamirano (2001) demostraron que las sales de vanadio inducen reducción en los conteos espermáticos e incrementan la frecuencia de anomalías en el espermatozoide *in vivo*. De acuerdo a otro estudio realizado por los mismos autores, con tetraóxido de vanadio, encontraron anomalías en los espermatozoides, degeneración de las células y rompimiento del epitelio de los túbulos seminíferos.

En un estudio realizado por D'Cruz y Uckun (2000) se trataron a ratones machos con 4 compuestos de vanadoceno vía intratesticular a una dosis de 7.5 µg/kg/testicular por 28 días. La pérdida de células germinales se determinó por conteo espermático en epidídimo, peso testicular y evaluación histológica de los testículos. De acuerdo a esto, disminuyó el conteo espermático y hubo una reducción del peso de los testículos. El examen histopatológico reveló atrofia en los tubos seminíferos, inhibición de la espermatogénesis, y la pérdida de la maduración y elongación de espermátidas.

Chandra *et al.* (2007) investigaron la posible implicación del estrés oxidativo para inducir el deterioro de las funciones testiculares en ratas adultas, cuando se les administró metavanadato de sodio (NaVO<sub>3</sub>), intraperitonealmente, a dosis de 0.2, 0.4 ó 0.6 µg/kg de peso corporal diariamente por 13 días y un grupo más a la concentración de 18µg/kg (LD<sub>50</sub>) durante 26 días, los resultados *in vivo* e *in vitro* demostraron que hubo un incremento significativo en la peroxidación lipídica, una disminución del conteo espermático, así como del nivel de testosterona.

El examen histopatológico reveló la inhibición de la espermatogénesis y la pérdida de maduración y elongación de espermátidas junto con un incremento en el porcentaje de espermatozoides anormales.

El tratamiento con vanadio no sólo afecta la espermatogénesis sino también la fertilidad y el éxito de la fecundación, cuando ratas machos y hembras maduras fueron expuestas a 200 ppm de metavanadato de amonio en el agua y los machos fueron expuestos 60 días y las hembras durante 14 días durante el apareamiento, preñez, gestación y lactancia, en los machos el peso de epidídimo, testículos, próstata y vesículas seminales disminuyó significativamente comparado con el grupo control. Así mismo la fertilidad en ambos grupos se vio afectada, sin embargo, en los machos se tuvo un efecto supresivo más pronunciado. El número de sitios de implantación y de fetos viables se redujeron significativamente, aumentó el número de fetos muertos y de reabsorciones (Morgan y El-Tawil 2003).

La presencia de espermias anormales indica que el proceso de espermatogénesis se vio afectado; así como algunos factores genéticos y elementos del citoesqueleto que juegan un rol en la morfogénesis de la cabeza del espermatozoide. Dado que el vanadio (IV) y (V) inhiben la polimerización de los microtúbulos, la acumulación de vanadio en las células germinales epiteliales podrían afectar a estructuras que proporcionan la fuerza mecánica durante la morfogénesis del núcleo del espermatozoide (Aragón y Altamirano 2001, Chandra *et al.* 2007).

Algunos autores también sugieren que debido a que el tratamiento con vanadio causa alteraciones en el ADN testicular, ya sea interfiriendo en la integridad del mismo ADN y/o con la expresión del genoma (mutaciones), la diferenciación del espermatozoide durante la espermatogénesis se ve alterada, resultando en la inducción de anomalías espermáticas (Altamirano *et al.* 1996, Wyrobek y Bruce 1975).

La diferencia en los resultados obtenidos entre células sanguíneas y espermatozoides en la recuperación del daño genético se debe principalmente a la diferencia en cuanto a la sensibilidad de cada tipo celular al pentóxido de vanadio. Además en estudios actuales se ha determinado que el testículo es uno de los órganos en donde el vanadio se acumula esta acumulación podría estar generando daños en las diferentes poblaciones de células germinales detectables a largo plazo (Aragón y Altamirano 2001, IPCS 2001, Evangelou 2002, Rodríguez y Altamirano 2006, Chandra *et al.* 2007).

## CONCLUSIONES

- El Ensayo Cometa es un método muy sensible para la evaluación de daño al ADN en células individuales y puede ser utilizado además ampliamente para determinar la reparación de las lesiones del ADN ocasionadas por agentes genotóxicos (mutágenos) en función del tiempo (por ejemplo: Una reducción en la migración del ADN).
- Los tipos celulares analizados presentaron diferente sensibilidad al vanadio, siendo los espermatozoides los más susceptibles, por lo que las características particulares de cada tipo celular influyen en el efecto del tóxico y en la rápida eliminación del daño.
- La recuperación del daño al ADN tanto en células sanguíneas como en espermatozoides después de permitir un tiempo de recuperación de 4 semanas se vio incrementada, por lo que se puede sugerir que los mecanismos de reparación son funcionales.
- Los efectos tóxicos del vanadio llegan a ser persistentes lo cual puede deberse al balance entre la cantidad del compuesto presente y la capacidad de cada órgano para reparar el daño.



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.

- El tratamiento con pentóxido de vanadio puede causar alteraciones en el ADN testicular, ya sea interfiriendo en la integridad del mismo ADN y/o con la expresión del genoma (mutaciones), observándose que la espermatogénesis se ve alterada, resultando en la inducción de anormalidades espermáticas.
- Este trabajo contribuye al conocimiento actual sobre el potencial genotóxico y reprotóxico de este metal, el cual es uno de los contaminantes principales en atmósferas muy contaminadas como la de la ciudad de México.

## REFERENCIAS

Alessio L., Marinoni M. y Dell' Orto A. (1988). Biological monitoring of vanadium. En: Biological monitoring of toxic metals. (W. T. Clarkson, L. Friberg, F. Nordberg y R. Sanger, Eds.) Plenum Press, Nueva York, pp. 427-436.

Altamirano-Lozano M., Álvarez Barrera L., Basurto-Alcántara F., Valverde M., Rojas E. (1996). Reprotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* 16: 7-17.

Altamirano-Lozano M., Valverde M., Álvarez-Barrera L., Molina B., Rojas E. (1999). Genotoxic studies of vanadium pentoxide ( $V_2O_5$ ) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* 19: 243-255.

Andersson M.P., Stenqvist y Hellman B. (2007). Interindividual differences in initial DNA repair capacity when evaluating  $H_2O_2$ -induced DNA damage in extended-term cultures of human lymphocytes using the comet assay. *Cell Biol. Toxicol.* 23: 401–411.

Angelis K., Dusinská M. y Collins A. (1999). Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis* 20: 2133-2138.

Aragón M. A. y Altamirano-Lozano M. (2001). Sperm and testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Reprod. Toxicol.* 15: 145–151.

Aragón M.A., Ayala M.E., Fortoul T.I., Bizarro P. y Altamirano-Lozano M. (2005). Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. *Reprod. Toxicol.* 20: 127–134.

Ashby J., Tinwell H., Lefevre P. A., Browne M. A. (1995). The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* 10: 85-90.

Attia S. M., Badary O.A., Hamada F.M., Hrabé de Angelis M. y Adler I.D. (2005). Orthovanadate increased the frequency of aneuploid mouse sperm without micronucleus induction in mouse bone marrow erythrocytes at the same dose level. *Mutat. Res.* 583: 158–167.

Avila-Costa M. R., Colín-Barenque I., Zepeda R. A., Antuna B. S., Saldivar O. L., Espejel M. G., Mussali G. P., Avila-Casao M. C., Reyes O. A., Anaya M. V. y Fortoul T. I. (2005). Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation: A mice experimental model. *Neurosci. Lett.* 381: 21-25.

Baran E.J. (2000). Journal of Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems. *Inorg. Chem.* 39: 1–10.



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.

Barceloux G.D. (1999). Vanadium. *Clinical Toxicology*. 37: 265-278.

Baroch E. F. (1983). Vanadium and vanadium alloys. En: *Encyclopedia of chemical technology*. Wiley, Nueva York, pp. 673-710.

Basak R., Saha B. K. y Chatterjee M. (2000). Inhibition of diethylnitrosamine-induced rat liver chromosomal aberrations and DNA-strand breaks by synergistic supplementation of vanadium and 1K, 25-dihydroxyvitamin D3. *Biochim. Biophys. Acta*. 1502: 273-282.

Bizarro M.P. (2002). Alteraciones ultra estructurales en testículo por inhalación de acetato de plomo y cloruro de cadmio. Modelo experimental en ratón. TESIS MAESTRIA. Facultad de Ciencias. UNAM

Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res*. 543: 251–272.

Bonassi S. y Au W. W. (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat. Res*. 511: 73–86.

Boonstra J. y Post J.A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337: 1–13.

Bowden R., Buckwalter M., McBride J., Johnson D., Murray B., y O´Neill K. (2003). Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the comet assay. *Mutat. Res*. 537: 1-9.

Braithwaite E., Wu X. y Wang Z. (1999). Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. *Mutat. Res*. 424: 207–219.

Budavari S., O´Neil M. J., Smith A., Heckelman P. E. y Kinneary J. F. (1996). *The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. Edición 12. Whiehouse Station, Merck, Nueva Jersey.

Burdon R. H. (1999). *Genes and the Environment*. Edit. Taylor y Francis. U. S.A. pp. 243.

Cantley L. C. y Phillips A. (1979). The fate of cytoplasmic vanadium. *J. Biol. Chem*. 254: 1781-1784.

Capella L.S., Gefe M.R., Silva E.F., Affonso-Mitidieri O., Lopes A.G., Rumjanek V.M. y Capella A.M.(2002). Mechanism of vanadate-induced toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Arch. Biochem. Biophys*. 406: 65–72.

Carson B. L., Ellis H. V. y McCann J. L. (1987). Toxicology and biological monitoring of metals in humans. Lewis Publishers, Nueva York, pp. 276-289.

Chandra A. K., Ghosh R., Chatterjee A. y Mahitosh. (2007). Effects of vanadate on male rat reproductive tract histology, oxidative stress markers and androgenic enzyme activities. *J. Inorg. Biochem.* 101: 944–956.

Choi J. H., Kim J. S., Kim Y. C., Kim Y. S., Chung N. H. y Cho M. H. (2004). Comparative study of PM 2.5- and PM10-induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J. Vet. Sci.* 5: 11-18.

Ciganda C. (2000). Riesgo químico y daño reproductivo relacionado a la exposición laboral con plaguicidas. *Ofl.* 175-179.

Collins A. (2002). The comet assay, principles, applications and limitations. En: *Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols.* Vol. 203: 163-167. Human Press Inc. Totowa, Nueva Jersey.

Collins A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotech.* 26: 249-261.

Cordelli E., Fresegna A. M., Leter G., Eleuteri P., Spano M. y Villani P. (2003). Evaluation of DNA Damage in Different Stages of Mouse Spermatogenesis after Testicular X Irradiation. *Radiat. Res.* 160: 443–451.

Crans D. C., Bunch R.L. y Theisen L. A. (1989). Interaction of trace levels of vanadium (IV) and vanadium (V) in biological systems. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 7597-7607.

Crans D. C., Willging E. M. y Butler S. R. (1990). Vanadate tetramer as the inhibiting species in enzyme reactions *in vitro* and *in vivo*. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 427-432.

Crans D. C., Smees J.J., Gaidamauskas E., Yang L. (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem. Rev.* 104: 849-902.

Cuenca P. y Ramírez V. (2004). Mutagénesis ambiental y el uso de biomarcadores para predecir el riesgo de cáncer. *Rev. Biol. Trop.* 52 (3): 585-590.

Curtis, H. y Barnes N. (1996). La reproducción. En: *Invitación a la Biología.* H. Curtis, N. Barnes (Edits). Editorial Panamericana. Quinta edición. Madrid, España. 665-673.

Danadevi K., Rozati R., Saleha Banu B. y Grover P. (2004). *In vivo* genotoxic effect of nickel chloride in mice leukocytes using comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 42: 751-757.

D'Cruz O. J. y Uckun F. M. (2000). Vanadocene-mediated *in vivo* male germ cell apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 166: 186–195.

Domingo J.L., Paternain J.L., Llobet J.M. y Corbella J. (1986). Effects of vanadium on reproduction, gestation, parturition and lactation in rats upon oral administration. *Life Sci.* 819–24.

Donnelly E. T., Mc Clure N. y Lewis E. M. (1999). The effect of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis.* 14(5): 505-511.

EFSA. European Food Safety Authority. (2004). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission Related to the Tolerable Upper Intake Level of Vanadium. *EFSA J.* 33: 1-22.

Elinder, C. G., Gerhardson L. y Oberdoerster G. (1988). Biological monitoring of toxic metal-overview. En: *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Eds. Clarkson W. T., Friberg L., Nordberg F. y Sanger R. Plenum Press. NY. USA. pp 1-72.

Englert N. (2004). Fine particles and human health- a review of epidemiological studies. *Toxicol. Lett.* 149: 235-242.

Ergene S., Çelik A., Çavaş T. y Kaya F. (2007). Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environ. Int.* 33: 877–885.

Evangelou A. M. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42(3): 249-265.

Fairbairn D., Olive P. y O'Neill K. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339: 37-59.

Faust F., Kassie F., Knasmüller S., Boedecker R., Mann M. y Mersch-Sundermann V. (2004). The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 566: 209-229.

Fernandez A., Wendt J. O. L., Wolski N., Hein K.R. G., Wang S. y Witten M. L. (2003). Inhalation health effects of fine particles from the co-combustion of coal and refuse derived fuel. *Chemosphere.* 51:1129-1137.

Ferré-Huguet N., Schuhmacher M., Llobet J. M. y Domingo J. L. (2007). Diseño de un software para evaluar los riesgos de la exposición ambiental a través del agua, suelos y aire. *Metales Pesados y salud. MAPFRE.* 108.

Fortoul T.I., Quan-Torres A., Sanchez I., Lopez I. E., Bizarro P., Mendoza M.L., Osorio L.S., Espejel-Maya G., Avila-Casado M. del C., Avila-Costa M.R., Colin-Barenque L., Villanueva D. N. y Olaiz-Fernandez G. (2002). Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Arch. Environ. Health* 57: 446-449.

Fortoul T.I. Bizarro N. P., Acevedo-Nava S, Piñón Z. G., Rodríguez-Lara V., Colín B.L., Mussali G. P., Avila C. M.C, Ávila C. M. y Saldivar O. L. (2007) .Ultrastructural findings in murine seminiferous tubules as a consequence of subchronic vanadium pentoxide inhalation. *Reprod. Toxicol.* 23: 588–592.

French, R.J. y Jones J.H. (1993). Role of vanadium in nutrition: metabolism essentiality and dietary considerations. *Life Sci.* 52: 339-346.

Friberg L., Nordberg G.F. y Vouk V.B. (1986). *Handbook on the Toxicology of Metals*. Vol. II. Elsevier. Amsterdam.

Gándara R. M. C., Soares S. S., Martins H., Gutiérrez M. C. y Aureliano M. (2005). Vanadate oligomers: *In vivo* effects in hepatic vanadium accumulation and stress markers. *J. Inorg. Biochem.* 99: 1238-1244.

Geneser, F. (2000). Órganos de la reproducción. En: *Histología*. F. Geneser (Edit.). Editorial Panamericana, tercera edición, Argentina, 639-663.

Gil V. A. M., Cardona W. D. y Cadavid A. P. (2007). Muerte embrionaria temprana: ¿Tiene influencia el factor masculino? *Arch. Esp. Urol.* 60(9):1057-1068.

Giovanetti A., Deshpande T. y Basso E. (2008). Persistence of genetic damage in mice exposed to low dose of x rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 84(3):227-235.

Ghio A.J., Silbajoris R., Carson J. L. y Samet J. M. (2002). Biological effects of oil fly ash. *Environ. Health Perspect.* 110: 89-94.

Guachalla L., y Ascarrunz M. (2003). La Genética Toxicológica: Una ciencia en constante desarrollo. *BIOFARBO*.11: 75-82.

Guengerich F.P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 14(6): 612-622.

Gutiérrez M.E., Roubicek D.A., Cebrián-García M.E., De Vizcaya-Ruiz A., Sordo-Cedeño M. y Ostrosky-Wegman P. (2006). Effect of chemical composition on the induction DNA damage by airborne particulate matter. *Environ. Mol. Mutagen.* 47: 199-211.

Haines G.A., Hendry J.H., Daniel C.P. y Morris I.D. (2001). Increased levels of comet-detected spermatozoal DNA damage following in vivo isotopic-or X-irradiation of spermatogonia. *Mutat. Res.* 495: 21–32.

Haines G. A., Hendry J. H., Daniel C. P. y Morris I. D. (2002). Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular x-irradiation. *Biol. Reprod.* 67: 854–861.

Hartmann A., Plappert U., Poetter F. y Suter W. (2003). Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat. Res.* 536: 27–38.

Health Effects Institute (HEI) (2002). Understanding the health effects of components of the particulate matter mix: Progress and next steps. *HEI Perspectives*. En línea: <http://www.healtheffects.org>.

Heddle J.A., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., MacGregor J.T., Newell G.W., y Salomone M.F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gen-Tox Program. *Mutat. Res.* 123: 61-118.

Hellman B., Vaghef H. y Boström B. (1995). The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 336: 123-131.

Hinds W. (1982). *Aerosol technology. Properties, behaviour, and measurement of airborne particles.* John Wiley & Sons, EUA.

Hirao T. (2000). Redox reactions via vanadium-induced electron transfer. *J. Inorg. Biochem.* 80: 27-33.

Holstein A.F., Schulze W. y Davidoff M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 107-123.

Hu H. (2002). Human health and heavy metals exposure. En: *Life Support: The Environment and Human Health.* Michael McCally (ed). MIT press.

IAOH. (2007). Vanadium pentoxide inhalation. *Indian J. Occup. Environ. Med.* 11(3): 95-102

IARC. International Agency for Research on Cancer. (2006). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Cobalt in hard-metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide.* Lyon, Vol. 86.

Inoue M., Kurihara T., Yamashita M. y Tatsumi K. (1993). Effects of treatment with methyl methanesulfonate during meiotic and postmeiotic stages and maturation of spermatozoa in mice. *Mutat. Res., DNA Repair.* 294: 179-186.

Instituto Nacional de Ecología (INE) (2004). <http://www.ine.gob.mx>

IPCS. International Programme on Chemical Safety. (1988). Vanadium. environmental health criteria, World Health Organisation, Ginebra, No. 81.

IPCS. International Programme on Chemical Safety. (2001). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds, World Health Organisation, Ginebra, No. 29.

Ivancsits S., Pilger A., Diem E., Schaffer A. y Rüdiger H.W. (2002). Vanadate induces DNA breaks in cultured fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutat. Res.* 519: 25-35.

Jacono F. C., Stecca C., y Duverger M. (1992). Mutagenic activation of benzo( $\alpha$ )pyrene by human red blood cells. *Mutat. Res.* 268: 21-26.

Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68: 16.

Johnson L, Welsh TH y Wilker CE. (1997). Reproductive and endocrine toxicology. En: Glenn S, Charlene A, McQueen A, Gandolf J (Eds). *Comprehensive Toxicology*. Pergamon, New York, EU. pp 5-5.1

Kampa M., y Castanas E. (2007). Human Health Effects of air pollution. *Environ. Pollution* 20:1-6.

Katsouyanni K. (2003). Ambient air pollution and health. *British Medical Bulletin.* 68: 143-156.

Kleinsasser H., Dirschedl P., Staudenmaier R., Harreus U. y Wallner B. (2003). Genotoxic effects of vanadium pentóxido on human peripheral lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract. *Int. J. Environ. Health Res.* 373-379.

Kliesch U., Roupova I. y Alder D. (1982). Induction of chromosome damage in mouse bone marrow by benzo ( $\alpha$ ) pyrene. *Mutat. Res.* 102: 268-273.

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

Lagerkvist G., Nordberg G.F. y Vouk V. (1986). Vanadium. En: *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, Vol. II, pp. 638-663.

Lankinen M, Vilpo J. y Vilpo L (1996). UV and gamma-irradiation induced DNA single strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. *Mutat. Res.* 352: 31-38.

Latt A. S., Rhona R. S., Kenneth S. L., y Charles F. S. (1979). *In vitro* and *in vivo* analysis of sister chromatid exchange. *Pharmacol. Rev.* 30: 501-533.

Lee M., Kwon J., Chung M. (2003). Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. *Mutat Res.* 541: 9-19.

Leonard S. S. y Bower J.J., Shi Xianglin. (2004). Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Mol. Cell. Biochem.* 255: 3-10.

Leopardi P., Villani P., Cordelli E., Siniscalchi E., Veschetti E. y Crebelli R. (2005). Assessment of the *in vivo* genotoxicity of vanadate: analysis of micronuclei and DNA damage induced in mice by oral exposure. *Toxicol. Lett.* 158: 39-49.

Lewin B. (2000). *Genes VII*. Oxford University Press. Oxford, UK.

Lippmann M. (1989). Size-selective health hazard sampling. En: Hering S.V. *Air Sampling Instruments for Evaluation of Atmospheric Contaminants*. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Seventh Edition, Ohio, USA., pp. 163-198.

Llobet J.M., Colomina M.T., Siruent J.J., Domingo J.L. y Corbella J. (1993). Reproductive toxicity evaluation of vanadium in male mice. *Toxicol.* 80: 199-206.

Marchetti F. y Wyrobek A. J. (2008). DNA repair decline during mouse spermiogenesis results in the accumulation of heritable DNA damage. *DNA Repair* 7: 572-581.

McKelvey V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool B.L., De Méo M.P. y Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat. Res.* 288: 47-63.

Mendoza G. J. (2007). Efecto de la lesión del núcleo dorsal del rafe en la etapa juvenil sobre el proceso de espermatogénesis y esteroidogénesis en la rata. Tesis licenciatura. Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Merchant H. (1991). Gametogénesis. En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. R. Domínguez (Edit.). UNAM y Porrúa, México, 11-29.

Migliore L., Bocciardi R., Macfi C. y Lo Jacono F. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res.* 319: 205-213.

Migliore L., Scarpato R. y Falco P. (1995). The use of fluorescence in situ hybridization with a B-satellite DNA probe for the detection of acrocentric chromosomes in vanadium induced micronuclei. *Cytogenet. Cell Genet.* 69: 215– 219.

Molina M.J. y Molina L.T. (2004). Megacities and atmospheric pollution. *J. Air. Wast. Manag. Assoc.* 54 (6): 644-680.

Morales R. P. (1988). El daño a la información genética y los intercambios entre cromátidas hermanas. *Ciencia y Desarrollo.* 81: 65-73.

Morales-Ramírez P., Mendiola M. T., Kelly T. V. y Rodríguez-Reyes R. (1994). Comparison of sister chromatid exchange induction in murine germinal and somatic cells by gamma radiation exposure *in vivo*. *Environ. Mol. Mutag.* 24: 89-95.

Morgan A.M. y El-Tawil S.O. (2003). Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. *Pharmacol. Res.* 47: 75–85.

Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A. y Chatterjee M. (2004). Vanadium-an element of atypical biological significance. *Toxicol. Lett.* 150: 135-143.

Nechay B. R. (1984). Mechanisms of action of vanadium. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24:501-524.

Nechay B. R., Nanninga L. B., y Nechay P.S. (1986). Vanadyl (IV) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxyl, and amino ligands; calculations of cellular vanadium species distribution. *Arch. Biochem. Biophys.* 251(1): 128-38.

Nelson D.L. y Cox M.M. (2004). *Lehninger principles of biochemistry.* Freeman W.H., 4ª, Nueva York.

Norppa H., Luomahaara S., Heikanen H., Roth S., Sorsa M. y Renzi L. (1993). Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. *Environ. Health Perspect.* 101 (3): 139–43.

Norppa H. y Falck G. (2003). What do micronuclei contain? *Mutagenesis.* 18: 221-233.

Nylander R. G. (1988). Mutagenicity testing of seminal fluid: seminal fluid increases the mutagenicity of the precursor mutagen benzo(α)pyrene in the presence of S9 mix. *Mutat. Res.* 208: 195-200.

Olive P. L., Banáth J. P. y Durand, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the comet assay. *Radiat. Res.* 122: 69–72.

Olive P. (2002). The comet assay, an overview of techniques. En: *Methods in Molecular Biology. In situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols*. Vol. 203, 163-177. Human Press Inc. Totowa, Nueva Jersey.

Ostling O. y Johanson K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123:291-298.

Painter, R.B.(1980). Replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* 70: 337-341.

Papplert U, Raddatz K., Roth S. y Fliedner T. (1995). DNA damage detection in man after radiation exposure. The comet assay: its possible application for human biomonitoring. *Stem Cell.* 13: 215-222.

Perry P., y Wolff S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature.* 251: 156-158.

Pineau, C., Dupaix, A. y Jégou, B. (1999). The co-culture of Sertoli cells and germ cells. applications in toxicology. *Toxicol. In Vitro* 13: 513-520.

Price A. (1993). The repair ionizing radiation-induced damage to DNA. *Cancer. Biol.* 4: 61-71.

Pyrzyńska K. y Wierzbicki T. (2004). Review Determination of vanadium species in environmental samples. *Talanta* 64: 823–829.

Ramirez P., Eastmond D.A., Lacleste J.P. y Ostrosky-Wegman P. (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 386: 291-298.

Rehder D. (1991). The bioinorganic chemistry of vanadium. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30: 148-167.

Rehder D. (1993). Structure and function of vanadium compounds in living organisms. *Biometals* 5: 3-12.

Riccardia C., Filippo P. D., Pomata D., Incoronato F., Basilio M. D., Papini P. M. y Spicaglia S. (2008). Characterization and distribution of petroleum hydrocarbons and heavy metals in groundwater from three Italian tank farms. *Sci. Total Environ.* 393: 50-63.

Rivas E. A. (1999). Evaluación del daño genotóxico en leucocitos de habitantes de la Ciudad de México, utilizando el ensayo de electroforesis unicelular. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

Rodríguez J.J. (2006). Estudio de los efectos inducidos *in vitro* por tres óxidos de vanadio a nivel celular y sobre el ADN. Tesis de Doctorado. UNAM. México

Rodríguez J.J y Altamirano M. A. (2006). Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Contam. Ambient.* 22: 173-189.

Rodríguez-Lara V. (2008). Alteraciones morfológicas del núcleo de linfocitos de ratones expuestos a la inhalación aguda, subaguda y crónica de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Participación de las láminas nucleares. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM

Rodríguez-Mercado J. J., Roldán Reyes E. y Altamirano-Lozano M. (2003). Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicol. Lett.* 144: 359-369.

Rojas E., Valverde M., Herrera L. A., Altamirano-Lozano M. y Ostrosky-Wegman P. (1996). Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 359: 77-84.

Rojas E., Herrera L.A., Poirier L. A. y Ostrosky-Wegman P. (1999). Are metals dietary carcinogens? *Mutat. Res.* 443: 157-181.

Rojas E., López M.C. y Valverde M. (1999a). Single cell electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatography B.* 722: 225-254.

Rojas-Lemus M. (2006). Pentóxido de vanadio y cloruro de manganeso: comparación de sus efectos genotóxicos en leucocitos: modelo murino de exposición por inhalación. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

Rojas-Lemus M, Piñón Z.G., Martínez P.M., Rodríguez L.V., Altamirano-Lozano M, Colín-Barenque L., Bizarro N.P. y Fortoul T.I. (2007). Comparación por género del efecto genotóxico del pentóxido de vanadio en un modelo murino de exposición por inhalación. *Act. Microsc.* 16: 331-332.

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

Ross, M. H., Gordon I.K y Wojciech P. (2004). Aparato genital masculino. En *Histología*. M. H. Ross, I. K. Gordon, P. Wojciech (Edits). Editorial Medica Panamericana, cuarta edición, Buenos Aires, Argentina, 685-714.

Sakurai H., Shimomura S., Fukuzawa K. y Ishizuk. (1980). Detection of oxovanadium (IV) and characterization of its ligand environment in subcellular fractions of the liver of rats treated with pentavalent vanadium (V). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 293-298.

Sakurai H., Nishida M, Koyama M. y Takada J. (1987). Occurrence of vanadium ion in serum albumins. *Biochim. Biophys. Acta.* 924(3): 562-563.

Sakurai H. (1994). Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environ. Health Perspect.* 102: 35-36.

Sanjeev N., Madhu K. y Srikante K. (2006) Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay. *Toxicology in vitro* 20:1168-1172

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. (2004). *The EFSA Journal.* 33: 1-22.

Sega G. A., Owens J.G. y Cumming R.B. (1976). Studies on DNA repair in early spermatid stages of male mice after *in vivo* treatment with methyl-ethyl-propyl- and isopropyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* 36: 193-212.

Semarnat. (2002). Instituto Nacional de Ecología, Dirección General De Investigación sobre la Contaminación Urbana, Regional y Global, México.

Seoane A. (1999). Aneuploidy induction by heavy metals: evaluation using cytogenetic technics in mammalian cells. *Analect. Vet.* 19: 30-39.

Sharma, A. y Talukder G. (1987). Effects of metal son chromosomes of higher organisms. *Environ. Mutag.* 9: 191-226.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice, R.R. y Schneider E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*175: 184-191.

Singh N.P., Danner D.B., Tice, R.R., Brant L. y Schneider E.L. (1990). DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.* 237: 123-130.

Sorensen M., Schins R. P. F., Hertel O. y Loft S. (2005). Transition metals in personal samples of PM2.5 and oxidative stress in human volunteers. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 1340-1343.

Speit G. y Hartmann A. (2002). The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol. DNA repair protocols: eukaryotic systems.* 113: 203-212.

Speit G. y Hartmann A. (2006). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 314: 275-286.

Singh N.P., Danner D.B., Tice R.R., Brant L. y Schneider E.L., (1990). DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.* **237**: 123-130.

Stokinger H.E. (1981). The metals. En: Patty's industrial hygiene and toxicology (G.D. Clayton y F.E. Clayton, Eds.) 3ª ed., Wiley, Nueva York, Vol. II. pp. 1493-1583.

Strange R. C., Jones P. W. y Fryer A. A. (2000). Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.* **112**: 357-363.

Tice R.R., Andrews P. W. y Singh N. P. (1990). The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci.* **53**: 291-301.

Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Rojas E., Ryu J.C. y Sasaki Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**: 206-221.

Tucker D., Auletta J. A., Cimino M. C., Dearfield K. L., Jacobson K. D., Tice R. R. y Carrano A. V. (1993). Sister chromatid exchange: second report of the gene. tox program. *Mutat. Res.* **297**: 101-180.

Tucker J. D. y Preston R. J. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* **365**: 147-159.

Udroiu I. (2007). Pruebas citogenéticas aplicadas al control de alimentos de origen animal. *Rev. Vet.* **18**: 62-64.

Urióstegui A. M. (2007). Daño oxidativo y rupturas en el ADN espermático por exposición a metil paratión. QBP. Maestra en Ciencias. IPN, Unidad Zacatenco.

USGS. U. S. Geological Survey. (2007). Mineral Commodity Summaries. Vanadium in may. 1-5.

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. y Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**: 1-40.

Vallejo M., Jáuregui-Renaud K., Hermsillo A.G., Márquez M. F. y Cárdenas M. (2002). Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica Mexicana.* **139**: 57-63.

Velásquez T.D. (2008). Análisis del efecto de la lesión química del núcleo medial del rafe en la etapa juvenil sobre las funciones del testículo de la rata. FES ZARAGOZA. UNAM. Tesis de Licenciatura.

Villani P., Cordelli E., Leopardi P., Siniscalchi E., Veschetti E., Fresegna A.M. y Crebelli R. (2007). Evaluation of genotoxicity of oral exposure to tetravalent vanadium *in vivo*. *Toxicol. Lett.* 170: 11–18.

Vinardell M. P. (2007). Alternatives to animal experimentation in toxicology: present situation. *Act. Bioeth.* 13 (1): 41-52.

WHO: World Health Organization. (1998). Vanadium. Environmental Health Criteria. Concise International Chemical Assessment. Geneva. No. 81.

WHO: World Health Organization. (2001). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. Concise International Chemical Assessment. Geneva. No. 29.

Wuttke K., Streffer C. y Muller W. (1993). Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 281: 181-188.

Wyrobek A.J. y Bruce W.R. (1975). Chemical Induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 4425-4429.

Wyrobek A.J. y Bruce W.R. (1978). The induction of sperm shape abnormalities in mice and humans. *Chem. Mutag.* 5: 257-285.

Zhang Z., Huang C., Li J., Leonard S.S., Lanciotti R., Butterworth L. y Shi X. (2001). Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 392: 311–320.

Zhong B. Z., Gu Z. W., Wallace W. E., Whong W. Z. y Ong T. (1994). Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.* 321: 35-42.