



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la reparación de
rompimientos del DNA causados
por inhalación de vanadio en
leucocitos de ratones.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

FLORES TINTOR KARLA ALEJANDRA



DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. MARCELA ROJAS LEMUS

Ciudad Universitaria, México 2014



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.

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 1 |
| Introducción | |
| 1. Contaminación atmosférica..... | 2 |
| 1.1. Contaminación atmosférica en la Ciudad de México..... | 2 |
| 1.2. Partículas suspendidas..... | 3 |
| 1.3. Partículas suspendidas y sus efectos sobre la salud..... | 4 |
| 1.4. Los metales como contaminantes ambientales..... | 5 |
| 2. Vanadio..... | 6 |
| 2.1. Fuentes de emisión..... | 6 |
| 2.2. Niveles de vanadio en el ambiente..... | 6 |
| 2.3. Usos..... | 7 |
| 2.4. Vías de exposición..... | 7 |
| 2.4.1. Vía oral..... | 8 |
| 2.4.2. Vía inhalada..... | 8 |
| 2.5. Toxicocinética..... | 8 |
| 2.6. Toxicodinámica..... | 9 |
| 2.7. Estrés oxidante y vanadio..... | 10 |
| 2.8. Efectos en la salud..... | 11 |
| 2.8.1. Personal ocupacionalmente expuesto: POE..... | 11 |
| 2.8.2. Modelos experimentales..... | 12 |
| 3. Vanadio y DNA..... | 14 |
| 4. Vanadio y reparación del DNA..... | 15 |
| 5. Consecuencias del daño al DNA..... | 15 |
| 6. Pruebas para detectar genotoxicidad..... | 16 |
| 6.1. Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa pH> 13)..... | 16 |
| 7. Testigos de efecto genotóxico..... | 17 |
| 7.1. Camptotecina..... | 17 |
| 7.2. Metil Metano Sulfonato..... | 17 |
| 7.3. Demecolcine..... | 18 |
| 8. Justificación..... | 19 |
| 9. Hipótesis..... | 19 |
| 10. Objetivos..... | 19 |
| 10.1. Objetivo general..... | 19 |
| 10.2. Objetivos particulares..... | 19 |
| 11. Método..... | 20 |
| 11.1. Protocolo de inhalación..... | 20 |
| 11.2. Testigos de efecto genotóxico..... | 20 |
| 11.3. Toma de muestras..... | 20 |
| 11.3.1. Viabilidad celular por fluorocromos..... | 20 |
| 11.3.2. Ensayo cometa pH>13..... | 21 |
| 12. Estrategias experimentales..... | 21 |
| 12.1. Viabilidad celular por fluorocromos..... | 21 |

| | |
|--|----|
| 12.2. Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa pH> 13)..... | 21 |
| 13. Análisis de resultados..... | 24 |
| 14. Análisis estadístico..... | 24 |
| 15. Resultados..... | 25 |
| 15.1. Viabilidad celular..... | 25 |
| 15.2. Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa pH> 13)..... | 25 |
| 15.2.1. Testigo..... | 25 |
| 15.2.2. Metil metano sulfonato..... | 26 |
| 15.2.3. Demecolcine..... | 26 |
| 15.2.4. Camptotecina..... | 27 |
| 15.2.5. Vanadio..... | 28 |
| 15.2.6. Vanadio + camptotecina..... | 28 |
| 15.3. Comparación entre grupos..... | 29 |
| 15.3.1. Testigo vs vanadio..... | 29 |
| 15.3.2. Vanadio vs camptotecina..... | 30 |
| 15.3.3. Vanadio vs demecolcine..... | 31 |
| 15.3.4. Vanadio vs metil metano sulfonato..... | 31 |
| 15.3.5. Vanadio vs metil metano sulfonato vs demecolcine..... | 32 |
| 15.3.6. Vanadio vs vanadio + camptotecina..... | 33 |
| 16. Resumen de resultados..... | 33 |
| 17. Discusión..... | 35 |
| 17.1. Viabilidad celular..... | 35 |
| 17.2. Índice de migración por grupos..... | 36 |
| 17.3 Comparación de las curvas..... | 38 |
| 18. Conclusiones..... | 39 |
| 19. Perspectivas..... | 40 |
| 20. Bibliografía..... | 41 |

Hoja de Datos del Jurado.

1. Datos de la alumna

| | |
|---|---|
| Apellido paterno | Flores |
| Apellido materno | Tintor |
| Nombre(s) | Karla Alejandra |
| Teléfono | 044 (55) 43547153 |
| Universidad Nacional Autónoma de México | Universidad Nacional Autónoma de México |
| Facultad de Ciencias | Facultad de Ciencias |
| Carrera | Biología |
| Número de cuenta | 30712791-6 |

2. Datos del tutor

| | |
|------------------|----------|
| Grado | M. en C. |
| Nombre(s) | Marcela |
| Apellido paterno | Rojas |
| Apellido materno | Lemus |

3. Datos del sinodal 1

| | |
|------------------|------------|
| Grado | Dra. |
| Nombre(s) | Sandra Luz |
| Apellido paterno | Gómez |
| Apellido materno | Arroyo |

4. Datos del sinodal 2

| | |
|------------------|---------------|
| Grado | Dr. |
| Nombre(s) | Mario Agustín |
| Apellido paterno | Altamirano |
| Apellido materno | Lozano |

5. Datos del sinodal 3

| | |
|------------------|---------------|
| Grado | Dra. |
| Nombre(s) | Teresa Imelda |
| Apellido paterno | Fortoul |
| Apellido materno | van der Goes |

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

Dra.
Laura
Colín
Barenque

7. Datos del trabajo escrito:

Título

Evaluación de la reparación de
rompimientos del DNA causados por la
inhalación de vanadio en leucocitos de
ratones.

Número de páginas

57

Año

2014

Dedicado a...

Mis padres Angel Flores Casales y Ana Cristina Tintor Ambrosio mis tutores de la vida y mis
máximos apoyos. ¡Los amo!

Mi hermano Alfredo “Porque un hermano es la forma en la que Dios te dice que no debes
caminar solo por la vida”

Mis amigos “Acude a tus amigos, aquellos que conocen lo que eres”
Los ratones que hicieron posible este trabajo.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, gracias por ser mi segunda casa durante casi 8 años, de todo corazón ¡Gracias!

A los miembros del Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM por el apoyo para la realización de esta tesis.

A la Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes por darme la oportunidad de formar parte del laboratorio y por su ayuda para que la realización y culminación de este trabajo.

A los biólogos Francisco Pazos Nájera y Armando Zepeda por todo el apoyo técnico que me brindaron en microscopía durante este proyecto.

Al Dr. Enrique Pinzón Estrada y al Dr. Ismael Torres Saldaña del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM por el apoyo en la obtención, cuidado y mantenimiento de los animales de investigación.

Al comité revisor de esta tesis:

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo.

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano.

M.en C. Marcela Rojas Lemus.

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes.

Dra Laura Colín Barenque.

Este proyecto fue apoyado por el PAPIIT-DGAPA IN209612

ABREVIATURAS

| Abreviatura | Nombre |
|-----------------|---|
| μm | Micrómetro. |
| Al | Aluminio. |
| ANOVA | Análisis de varianza. |
| AP | Apúrico/Apirimídico. |
| As | Arsénico. |
| BER | Reparación por escisión de bases. |
| BrEt | Bromuro de etidio. |
| Cd | Cadmio. |
| Co | Cobalto. |
| CO ₂ | Dióxido de carbono. |
| CPT | Camptotecina. |
| Cr | Cromo. |
| Cu | Cobre. |
| DM | Demecolcine. |
| DMSO | Dimetil sulfóxido. |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico. |
| ERO | Especies reactivas de oxígeno. |
| FDA | Diacetato de fluoresceína. |
| Fe | Hierro. |
| Hg | Mercurio. |
| IL | Interleucina. |
| IMg | Índice de migración. |
| K | Potasio. |
| MIP | Proteínas inflamatorias de macrófagos. |
| MMR | Reparación no acoplada. |
| MMS | Metil metano sulfonato. |
| Na | Sodio. |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NaOH | Hidróxido de sodio. |
| NER | Reparación por escisión de nucleótidos. |

| | |
|---------------------------------|---|
| NF | Factor nuclear. |
| Na ₃ VO ₄ | Ortovanadato de sodio. |
| NH ₄ VO ₃ | Metavanadato de amonio. |
| Ni | Níquel. |
| Pb | Plomo. |
| PBS | Buffer de fosfatos. |
| PM | Partículas suspendidas. |
| PM ₁₀ | Partículas suspendidas con diámetro menor de diez micrómetros. |
| PM _{2.5} | Partículas suspendidas con diámetro menor a dos punto cinco micrómetros |
| RL | Radial libre. |
| RNA | Ácido ribonucleico. |
| TNF | Factor de necrosis tumoral. |
| Topo I | Topoisomerasa I. |
| UV | Ultravioleta. |
| V | Vanadio. |
| V ₂ O ₅ | Pentóxido de vanadio. |
| XP | Xeroderma Pigmentosum. |
| ZMVM | Zona Metropolitana del Valle de México |
| Zn | Zinc. |

Resumen.

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) es una de las ciudades más grandes del mundo y actualmente una de las más contaminadas, esto debido al crecimiento de la población y la demanda de servicios, lo que contribuye a la emisión de contaminantes, principalmente por la quema de combustibles fósiles y sus derivados. Entre los componentes que forman parte de los contaminantes ambientales se encuentran las partículas suspendidas a las cuales pueden adosarse a su superficie metales como el vanadio.

El vanadio es un metal de transición que se encuentra en diferentes estados de oxidación, siendo la forma pentavalente la más tóxica y entre de los efectos adversos de este metal se encuentran la formación de especies reactivas de oxígeno que alteran la continuidad del DNA.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la cinética de la reparación de los rompimientos de cadena sencilla del DNA causados por inhalación de vanadio a una concentración de 0.02 M por 1 hora durante 3 días consecutivos en leucocitos de ratones macho de la cepa CD-1. Se utilizaron 30 ratones divididos en seis grupos experimentales: a) testigo, b) vanadio, c) camptotecina, d) metil metano sulfonato, e) demecolcine y f) vanadio + camptotecina.

A todos los individuos de cada grupo se le tomó una muestra de sangre entera periférica para la realización de la técnica de electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa pH > 13) y viabilidad celular por fluorocromos, en todos los casos la viabilidad celular fue mayor al 80%.

Los nucleoides obtenidos en el ensayo cometa fueron observados y clasificados dependiendo del nivel de daño dentro de una de cinco categorías, se calculó el índice de migración (IMg) de cada uno de los individuos y se realizó el análisis estadístico para evaluar las diferencias entre los grupos y con el grupo testigo con respecto a los distintos tiempos de muestreo.

Los resultados obtenidos mostraron que el vanadio no interfiere con los mecanismos de reparación de cadena sencilla del DNA. Sin embargo, tiene similitud en el comportamiento de la cinética de reparación con un agente aneugénico pero también es capaz de dañar al DNA como un agente clastógeno.

Introducción.

1. Contaminación atmosférica.

La contaminación atmosférica se define como la presencia de sustancias en el aire, en cantidades que pueden ser perjudiciales para la salud, afectar estructuras, materiales, ocasionar cambios en las condiciones meteorológicas o las climáticas y la degradación del ecosistema (Vallejo *et al.* 2003, Molina y Molina 2006).

Un contaminante atmosférico es cualquier sustancia de origen químico o biológico que al agregarse al aire puede modificar sus características naturales. Estos contaminantes atmosféricos pueden ser de origen natural, tales como los productos de la erosión y de los incendios forestales o de origen antropogénico. Los contaminantes de origen antropogénico, han existido desde que el ser humano aprendió a usar el fuego, y se han incrementado rápidamente debido a la industrialización y la urbanización. Las emisiones de origen antropogénico se categorizan dentro de cuatro grupos: tráfico vehicular, industrias, plantas generadoras de energía y combustibles domésticos (Mayer 1999, Katsouyanni 2003, Vallejo *et al.* 2003, Molina y Molina 2004, INE 2012).

Los contaminantes atmosféricos se clasifican por su origen en:

Contaminantes primarios. Éstos se encuentran en la atmósfera tal y como fueron emitidos por procesos naturales o por actividades del ser humano, por ejemplo: plomo, monóxido de carbono, óxidos de azufre, óxido de nitrógeno, hidrocarburos y partículas suspendidas (Vallejo *et al.* 2003, INE 2012).

Contaminantes secundarios. Son originados en el aire por la interacción química o fotoquímica entre dos o más contaminantes primarios o por reacciones de los componentes naturales de la atmósfera, por ejemplo: ozono, sulfatos, nitratos, ácido sulfúrico y peroxiacetil nitrato (INE 2012).

1.1. Contaminación atmosférica en la Ciudad de México.

La Ciudad de México o Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) comprende al Distrito Federal y a 59 municipios del Estado de México (INE 2012). La ZMVM es una cuenca hidrológica, situada a 2, 240 m de altura sobre el nivel del mar en su parte central, con una extensión territorial de 1,200 km². Se encuentra confinada por el este, sur y oeste por montañas con una altura promedio de 1000 msnm, las más altas son la Sierra del Ajusco y los volcanes Popocatepetl e Ixtaccíhuatl. Debido a estas características, la concentración de oxígeno se encuentra disminuida (-23%) en relación con la del nivel del

mar, lo que aumenta la concentración de monóxido de carbono e hidrocarburos. Aunado a que las radiaciones solares intensas facilitan las reacciones fotoquímicas en la atmósfera y esto provoca que los contaminantes primarios se transformen en contaminantes secundarios tales como ozono y otros oxidantes. Por otro lado, la dirección de los vientos predominantes (de noreste a suroeste) hace que la mayor concentración de contaminantes esté en la zona sur de la ciudad, en donde la Sierra del Ajusco obstaculiza su disipación (Vallejo *et al.* 2003, Molina y Molina 2004, Roubicek *et al.* 2007).

La ZMVM es una *megaciudad*, es decir, un área metropolitana con más de 10 millones de habitantes (Molina y Molina 2004) y es considerada como una de las ciudades con más problemas de contaminación en México y quizás en el mundo (Bravo *et al.* 1991). Debido al acelerado crecimiento de la población y, por lo tanto, de los de servicios, existe una enorme demanda de energía y transporte lo que ha generado importantes consecuencias en la atmósfera de la Tierra (Roubicek *et al.* 2007). El inventario de emisiones de la ZMVM reporta que las emisiones anuales de contaminantes son mayores a los 3 millones de toneladas, de los cuales del 52 al 85 % proviene de los vehículos (2.7 millones), del 10 al 27 % de las industrias (35 000) y los servicios; el 5 % de otras fuentes como los suelos y la vegetación (Rivero-Rosas *et al.* 1997, Amador-Muñoz *et al.* 2001, Molina y Molina 2006).

Con el fin de medir la calidad del aire y contribuir al bienestar de la población, se han identificado ciertos contaminantes como altamente nocivos para la salud de los seres humanos y se les ha denominado *contaminantes criterio* que incluyen a los hidrocarburos, el monóxido de carbono, los óxidos de azufre, los óxidos de nitrógeno, el ozono y a las partículas suspendidas (PM₁₀ y PM_{2.5}) (SMA 2010, INE 2012).

1.2. Partículas suspendidas.

Las partículas suspendidas (PS) son una mezcla compleja de materiales sólidos y líquidos o ambos, que contienen sustancias orgánicas e inorgánicas. Generalmente, están constituidas de un núcleo de carbón inerte cubierto por moléculas contaminantes que se adsorben a su superficie. Entre los contaminantes que se adsorben se encuentran los metales, sales, compuestos de azufre, pequeños componentes orgánicos y materiales traza (Roubicek *et al.* 2007). Estas partículas pueden variar significativamente en tamaño, forma y composición; son capaces de interferir con uno o más mecanismos de defensa del aparato respiratorio. Actúan como vehículo de sustancias tóxicas que se adosan a la superficie de las partículas. En este grupo además se incluyen sustancias que se desprenden al ambiente como el polvo

proveniente de suelos erosionados y caminos sin asfaltar o que se forman en la atmósfera por reacciones químicas o fotoquímicas, en las que intervienen gases y compuestos orgánicos. Se consideran como partículas inhalables a las que tienen un diámetro igual o menor a 10 μm (Vallejo *et al.* 2003) y se clasifican en (INE 2012):

Partículas gruesas con un diámetro aerodinámico menor a 10 μm (PM_{10}) pueden entrar directamente al aparato respiratorio y depositarse en diferentes regiones. Están compuestas principalmente de sílice, titanio, aluminio, sodio, hierro y cloruros (Vallejo *et al.* 2003; INE 2012). Sus emisiones son generadas principalmente por la intensa actividad vehicular, fuentes móviles y de la actividad industrial (INE 2012).

Partículas finas con un diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$), permanecen más tiempo en el aire y se transportan a mayores distancias que las PM_{10} , debido a esto tienen más impacto en la salud, ya que estas partículas pueden penetrar hasta los alveolos pulmonares en donde se depositan. Son originadas por las fuentes móviles, la producción de materiales de construcción, la fundición y el moldeado de productos metálicos, así como la generación de energía eléctrica. Están compuestas por productos derivados de la combustión, particularmente diesel e incluyen carbón, dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno, plomo y vanadio (SMA 2010, INE 2012).

Partículas ultrafinas son aquellas que tienen un diámetro aerodinámico menor de 1 μm , están compuestas por los productos de quemas agrícolas y forestales y por la combustión de gasolina y diesel. Sin embargo permanecen aisladas en la atmósfera durante periodos de tiempo corto ya que tienden a unirse a partículas de mayor tamaño (Vallejo *et al.* 2003, INE 2012).

1.3. Partículas suspendidas y sus efectos sobre la salud.

Los efectos en la salud de las PS dependen de su tamaño y de su composición química (Machado *et al.* 2008). Los estudios experimentales apuntan a que el mayor impacto en la salud proviene de las partículas con un núcleo de carbón elemental al que se adosan diferentes sustancias como compuestos orgánicos, especialmente hidrocarburos aromáticos policíclicos, sulfatos, nitritos y determinados metales como arsénico (As), cadmio (Cd), hierro(Fe), zinc (Zn), cromo (Cr), cobre(Cu), aluminio (Al), níquel (Ni), plomo (Pb) y vanadio (V) (Machado *et al.* 2008).

La contaminación por PS se asocia con problemas en la salud como el asma, el aumento de los síntomas de enfermedades respiratorias, como tos, respiración difícil y dolorosa,

bronquitis crónica y reducción de la función pulmonar (Ferrer-Carbonell y Escalante Semerena 2009, SMA 2010). Además, se observa mayor impacto sobre grupos vulnerables como lo es la población infantil y los adultos mayores. En los niños menores de un año se afecta el desarrollo pulmonar y se incrementa el riesgo de sufrir muerte respiratoria; en los adultos mayores se asocia con el aumento de muertes por enfermedades respiratorias, complicaciones cardiovasculares y cáncer de pulmón (WHO 2005, González-Villalva *et al.* 2006, Gutiérrez-Castillo *et al.* 2006, Ferrer-Carbonell y Escalante Semerena 2009).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, más de dos millones anuales de muertes prematuras se atribuyen a los efectos de la contaminación atmosférica; y la ZMVM es una de las ciudades que padece de manera más intensa el deterioro de la calidad del aire (Gutiérrez-Castillo *et al.* 2005, Ferrer-Carbonell y Escalante Semerena 2009)

Según la Organización Panamericana de la Salud, los efectos de la contaminación se asocian principalmente con los provenientes de la quema de combustibles fósiles, es decir, las fuentes móviles son las principales responsables y por lo tanto del deterioro de la calidad del aire, lo cual está estrechamente relacionado con el crecimiento y la antigüedad de la flota vehicular y la calidad de los combustibles (WHO 2005, Ferrer-Carbonell y Escalante Semerena 2009). En la ZMVM este problema se ha agravado por las condiciones climáticas y topográficas (Ferrer-Carbonell y Escalante Semerena 2009).

1.4. Los metales como contaminantes ambientales.

Los metales son los principales agentes inorgánicos que se unen a las partículas suspendidas y pueden generar diversos efectos en la salud dependiendo del metal en particular, debido a que cada uno tiene un mecanismo de acción y un lugar de acumulación diferente. (IARC 2006, Eróstegui Revilla 2009).

Éstos se encuentran de forma natural en la corteza terrestre, sin embargo pueden convertirse en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera debido a las actividades humanas. En general, esto ocurre en procesos como la extracción de minerales, el refinamiento de productos mineros o por la liberación al ambiente de efluentes industriales y emisiones vehiculares (INE 2012).

Los metales que se consideran con mayor frecuencia como contaminantes son el cobalto (Co), Fe, Pb, Mercurio (Hg), Cd y V, debido a que tienen diversos efectos y son elementos que pueden incrementar la lista de compuestos carcinogénicos y genotóxicos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006, INE 2012).

2. Vanadio.

El vanadio se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre, en cantidades similares al zinc y al níquel (Byerrum 1991). Es un metal color grisáceo, ubicado en la tabla periódica como el primer elemento de transición del grupo VB, tiene como número atómico 23, su configuración electrónica es $[\text{Ar}] 4s^2 3d^3$ y su peso atómico es 50.95. Se halla en la naturaleza en estados de oxidación de -1 a +5. Sus valencias más comunes son +3,+4 y +5, la forma más estable en la naturaleza es el vanadil (VO^{2+}) (Rodríguez Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

El vanadio se localiza en los petróleos crudos como elemento traza, formando parte del complejo orgánico-metálico. La cantidad en la que se halla en el crudo depende de la fuente de extracción (Fortoul *et al.* 2011). Dentro de los petróleos que tienen mayor concentración de vanadio en el mundo se encuentran los de la nación árabe, el occidente de Venezuela y los petróleos de la región maya de México (Fortoul *et al.* 2002).

Este metal está ampliamente distribuido en el ambiente, ya que se adsorbe a la superficie de las PS. La forma más común de emisión del vanadio como contaminante atmosférico es en forma de óxido, que resulta de la quema de combustibles fósiles como el petróleo, carbón y aceites pesados (Fortoul *et al.* 2002, IARC 2006, Gummow 2011).

2.1. Fuentes de emisión.

Las principales fuentes de emisión atmosférica de vanadio son:

- Naturales, como el polvo continental, las emisiones volcánicas, los incendios forestales y los aerosoles marinos (Barceloux 1999, Gummow 2011).
- Antropogénicas, como actividades en la industria metalúrgica y la quema de combustibles fósiles (Barceloux 1999, Rodríguez Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

2.2. Niveles de vanadio en el ambiente.

Se ha estimado que cerca de 110, 000 toneladas de V es liberado a la atmosfera anualmente (Mukherjee *et al.* 2013). De estas emisiones se estima que el 91% es producto de la actividad industrial, de la combustión del petróleo y sus derivados, del carbón y el resto, es derivado de la erosión del suelo, las emisiones volcánicas y los incendios forestales. Los niveles en el ambiente dependen de las condiciones climáticas, la posición geográfica y

condiciones de urbanización, entre otras variables (Rodríguez Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Las concentraciones de vanadio en la atmósfera dependen del área en donde ésta se mida, en zonas como el Ártico se ha registrado un rango promedio de 0.0006-0.0024 ng/m³, en zonas rurales del noroeste de Canadá y Puerto Rico el rango promedio es de 0.2-1.9 ng/m³ (IARC 2006).

En zonas urbanas, como la ZMVM se detectaron altas concentraciones de PS en las que se encontró la presencia de V en cuatro puntos de la ciudad (durante el 2002 y 2003). Se estima que este metal alcanza valores de 0.114 µg/m³ en PM₁₀ y 0.093 µg/m³ en las PM_{2.5} (Gutiérrez-Castillo *et al.* 2006, Rodríguez Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

De manera indirecta, se sabe que las concentraciones de vanadio en la atmósfera en la ZMVM han aumentado de manera significativa; Fortoul y colaboradores (2002) realizaron un estudio en el que se observó mayor presencia de vanadio en tejido pulmonar de habitantes de la década de los 90's comparados con muestras de residentes de los 60's.

2.3. Usos.

Los usos del vanadio incluyen la obtención de aleaciones para la manufactura de acero, se emplea como catalizador en la producción de ácido sulfúrico, en la elaboración de semiconductores y vidrio, en los reveladores fotográficos, en los agentes de color y en la fabricación de pigmentos amarillos para cerámica y en colorantes para cinematografía (Barceloux 1999, Rodríguez Mercado y Altamirano-Lozano 2006). La adición de compuestos de vanadio provee dureza, maleabilidad y resistencia a los metales-carbones; las aleaciones no férricas que contienen vanadio son usadas en la fabricación de aviones, en la tecnología espacial e industria energética nuclear (Barceloux 1999). En la industria agrícola es un componente de fungicidas e insecticidas y como micronutriente en fertilizantes (Rodríguez Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Algunos compuestos de vanadio se han utilizado para tratamiento de la anemia, diabetes, tuberculosis y sífilis (Fortoul *et al.* 2002), así como también en suplementos alimenticios para atletas (Aragón *et al.* 2005).

2.4. Vías de exposición.

Las principales vías de exposición a este metal son a través de la inhalación e ingesta, siendo la primera la más tóxica. La toxicidad depende de una variedad de factores como la solubilidad del compuesto, la ruta de administración, la dosis, la vía, el tiempo de exposición y de la capacidad de las enzimas encargados de desintoxicar al organismo (Barceloux 1999, Fortoul *et al.* 2002, 2011).

2.4.1. Vía oral.

El vanadio se encuentra en alimentos en los estados de oxidación III y IV (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006). Por esta vía se absorbe aproximadamente el 10 % de vanadio que ingresa por el tracto gastrointestinal (Mukherjee *et al.* 2004, IARC 2006).

Agua.

Se le encuentra disuelto en forma pentavalente, en agua dulce se han reportado concentraciones de 0.1 µg/L, mientras que en cuerpos de agua cercanos a plantas metalúrgicas y zonas industriales, se han reportado concentraciones de 220 µg/L (IARC 2006). En el agua para beber se han descrito valores promedio de 4.3 µg/L (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Alimentos.

Varios alimentos contienen bajas concentraciones de vanadio (<1 ng/g) entre éstos se encuentran diversos cereales, peces, frutas y verduras frescas. Los alimentos ricos en vanadio incluyen hongos, mariscos, eneldo, perejil, pimienta negra, carne y tabaco para fumar (Mukherjee *et al.* 2004, Rodríguez-Mercado y Altamirano Lozano 2006).

2.4.2. Vía inhalada.

El vanadio generado por la combustión de productos derivados del petróleo (quema de combustibles fósiles) es inhalado cuando se adhiere a las partículas suspendidas (Fortoul *et al.* 2011). Los pulmones son el principal sitio de entrada en los casos de exposición a la contaminación atmosférica, el porcentaje de vanadio que se absorbe por esta vía es del 25 al 100 %. Una vez que entra al sistema circulatorio, se transporta a los tejidos del cuerpo por el torrente sanguíneo. La vía inhalada es la ruta de exposición que produce toxicidad inmediata (Barceloux 1999, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006, Gummow 2011).

2.5. Toxicocinética.

Los estados de oxidación fisiológicamente relevantes del vanadio son +3, +4 y +5 (Gummow 2011). Una vez absorbido, es transportado en el plasma (en un tiempo medio aproximado de 1 hora) por la albúmina (vanadil) y por la transferrina (vanadato). El V (V) entra en la célula por mecanismos de transporte aniónico, principalmente por los canales de fosfato (Heinz *et al.* 1982, Rodríguez-Mercado *et al.* 2002, Cooper 2010) y una vez dentro de la célula es reducido de [V (V)] a [V (IV)] (Rodríguez-Mercado *et al.* 2002) por reductores biológicos, principalmente por el glutatión intracelular y el ácido ascórbico (Evangelou 2002, Rodríguez-Mercado *et al.* 2002).

La similitud química del vanadio con el fosfato explica su efecto en las reacciones de fosforilación en el organismo (Fortoul *et al.* 2002, Mukherjee *et al.* 2004).

Los órganos en que lo acumulan son el hígado, los riñones, el hueso y el bazo, mientras que los pulmones y los testículos lo concentran en menor cantidad; también es detectado en el corazón, la tiroides, el cerebro, el músculo esquelético, la médula ósea y el tejido adiposo. Los órganos que no lo remueven con facilidad son el hueso, los músculos y los pulmones, en los cuales permanece por tiempo prolongado (Fortoul *et al.* 2002, Rodríguez- Mercado *et al.* 2002)

La mayor parte del vanadio absorbido es rápidamente desechado principalmente en la orina, con una vida-media de 15 a 40 horas. El resto se elimina en las heces; la bilis es probablemente la vía de excreción menos importante. (Rodríguez- Mercado *et al.* 2002, Cooper *et al.* 2007). La cinética de la eliminación por la orina sigue un comportamiento bifásico, en las primeras 20 horas se excreta la mayor cantidad y en los siguientes 40 a 50 días la otra parte (Rodríguez- Mercado *et al.* 2002).

2.6. Toxicodinámica.

El vanadio es capaz de modificar la actividad de numerosas enzimas, como la (Na⁺, K⁺)-ATPasa, la tirosina cinasa, fosfatasas, colinesterasa, (Ca²⁺, Mg²⁺) –ATPasa y (H⁺, K⁺)-ATPasa; así como también regular la actividad de ciertos oncogenes y actuar como insulinoimético (Léonard y Gerber 1994, Stemmler y Burrows 2001, Gummow 2011). También puede inhibir o estimular la actividad de diversas enzimas del DNA y RNA (polimerasas) induciendo diversos efectos genotóxicos y mutagénicos (Zhong *et al.* 1994, Valko *et al.* 2005). Además incrementa los niveles de proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP), de NF-κB, induce la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF-α), de

la interleucina- 8 (IL-8) y el activador de proteínas-1 (Zhong *et al.* 1994, Mukherjee *et al.* 2004)

La acción del vanadio se asocia con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como radicales libres hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) generadas por reacciones de tipo Fenton durante la reducción de V(V) a V(IV) por la NADPH, lo que induce incremento de ROS, estrés oxidante y apoptosis (Capella *et al.* 2002, Møller *et al.* 2008).

2.7. Estrés oxidante y Vanadio.

El principal mecanismo de acción del vanadio es a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la activación de las MAP cinasas que pueden fosforilar diversas enzimas tal como la ERK 1/2, resultando en la activación de diversas vías de señalización (Fortoul *et al.* 2011) y radicales libres hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que dan inicio a la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Ávila-Costa *et al.* 2004).

Se considera un radical libre (RL) o especie reactiva de oxígeno (ROS) a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y que son fácilmente convertidos en radicales. En su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, lo que le da una configuración inestable. Estos radicales derivados del oxígeno representan la clase más importante de especies generadas en los sistemas biológicos. Las ROS son agentes tóxicos y generadores de patologías debido a que constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radicales des-ionizantes. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes produce efectos tóxicos y la producción de RL es un fenómeno implicado en el envejecimiento y en la carcinogénesis (Avello y Suwalsky 2006, Valko *et al.* 2006, Mayor-Oxilia 2010).

Las biomoléculas sufren las consecuencias del estrés oxidante, y el DNA es uno de los principales blancos. El daño al material genético representa la primera etapa involucrada en la mutagénesis, en la carcinogénesis y en el envejecimiento (Risom *et al.* 2005, Mayor-Oxilia 2010, Manke *et al.* 2013).

Los RL causan daño al DNA; pueden formar aductos, rupturas de cadena sencilla, modificación de bases nitrogenadas, formación de sitios apúricos y apirimídicos (sitios AP), entrecruzamientos DNA-proteínas, sitios álcali-lábiles y con menor frecuencia, ruptura de cadena doble. Los efectos genotóxicos pueden ser causados por la interacción directa de los xenobióticos (como el vanadio) con el material genético o de manera secundaria por el

estrés oxidante o por la inhibición de los mecanismos de reparación (Risom *et al.* 2005, Metha *et al.* 2008, Manke *et al.* 2013, Smith *et al.* 2013).

Sin embargo, la célula cuenta con diversos mecanismos de reparación celular, los cuales son esenciales para el mantenimiento de las funciones celulares adecuadas (Pollard *et al.* 2010). Estos mecanismos de reparación cuentan con cuatro pasos principales que son la *detección*, en donde se reconoce la sección del DNA dañada; *escisión*, en donde son removidos los nucleótidos dañados por medio de un set de enzimas (p. e glicosilasa); *polimerización*, siendo la DNA polimerasa la encargada de agregar y reemplazar los nucleótidos dañados y *ligación*, en donde la DNA ligasa une los cortes en el esqueleto azúcar-fosfato (Pollard *et al.* 2010).

Entre los mecanismos de reparación del DNA de cadena sencilla se encuentran:

Reparación por escisión de bases (BER). La vía principal encargada de corregir el daño ocasionado por el metabolismo celular, ERO, metilación, desaminación e hidroxilación (Metha *et al.* 2008); esta vía remueve pequeñas lesiones en el DNA (de una a seis bases dañadas) (Seo *et al.* 2002, Pollard *et al.* 2010)

Reparación por escisión de nucleótidos (NER). Es la mayor vía de reparación del DNA en las células humanas y corrige daños inducidos por fuentes endógenas o exógenas (Risom *et al.* 2005); esta vía remueve grandes lesiones del DNA (de 21 a 30 bases) (Seo *et al.* 2002, Pollard *et al.* 2010).

Reparación no acoplada (MMR). Corrige bases recién insertadas que no se encuentran acopladas apropiadamente (Snustad *et al.* 2006)

2.8. Efectos en la salud.

Son numerosas las patologías que han sido asociadas a los efectos del vanadio, siendo la forma pentavalente la más tóxica (Barcelox 1999).

2.8.1. Personal Ocupacionalmente Expuesto: POE.

En la Tabla 1 se enlistan algunos de los efectos en la salud que se han reportado como consecuencia de la exposición a vanadio:

Tabla 1. Consecuencias de la exposición a vanadio en POE.

| Sistema u órgano | Efectos | Referencia |
|-------------------------|--|--------------------------|
| Sistema Nervioso | Trastornos en habilidades visuo-espacial y atención. | Barth <i>et al.</i> 2002 |

Continuación Tabla 1.

| Sistema u órgano | Efectos | Referencia |
|--------------------------------|---|--------------------------------|
| Sistema cardio-vascular | Anemia y leucopenia, asociadas a la interferencia en la eritropoyesis. Cambios en el ritmo cardiaco. | Evangelou 2002 Cooper 2007. |
| Sistema reproductor | Daño a la espermatogénesis. Necrosis en espermatogonias, espermatoцитos y células de Sertoli. Cambios en los microtúbulos. Daño en la movilidad espermática. | Evangelou 2002 Cooper 2007 |
| Sistema respiratorio | Daño en las vías aéreas bronquiolares. Tos persistente Disminución del aliento, contracción del pecho e inflamación pseudo-asmática. | Cooper 2007 |
| Hígado | Hepatotoxicidad debido al estímulo de la secreción de citocinas y quimiocinas. Micro-hemorragias. Degeneración granular de los hepatocitos. | Cooper 2007 |
| Riñón | Aberraciones en la función renal y micro-hemorragias corticomedulares. | Cooper 2007 |
| Otros | Dolor de cabeza, dermatitis, disminución del aliento, debilidad, anorexia, fiebre, conjuntivitis, aumento en la peristalsis, vómito y diarrea. | Barceloux 1999 Cooper 2007 |
| Genotoxicidad | ↑ Micronúcleos ↑ Puentes nucleoplásmicos (cromosomas dicéntricos) ↑ Brotes nucleares (amplificación génica) ↑ Oxidación de las bases ↑ Afecta la cinética de reparación | Ehrlich <i>et al.</i> 2008 |

↑ Aumento, ↓ Disminución

2.8.2. Modelos experimentales.

Los resultados obtenidos con modelos experimentales, especialmente en modelo murino, muestran las consecuencias de la exposición a vanadio, algunas de las cuales se enlistan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Consecuencias de la exposición a vanadio en modelos experimentales.

| Sistema u órgano | Efectos | Referencia |
|-------------------------|--|--------------------------------------|
| Sistema Nervioso | Alteraciones funcionales, citológicas y ultra-estructurales en bulbo olfatorio, corteza motora, hipocampo y <i>sustancia nigra</i> . | Avila-Costa <i>et al.</i> 2004, 2005 |

Continuación Tabla 2.

| Sistema u órgano | Efectos | Referencia |
|-------------------------------|---|--|
| Sistema Nervioso | <p>↓ Densidad y pérdida de espinas dendríticas. <i>En barrera hemato-encefálica:</i> ↓ Cilios y de las uniones de las células endodiales del cuarto ventrículo cerebral. Alteración en la generación de neuronas dopaminérgicas. Desprendimiento del epitelio endodial.</p> | <p>Avila-Costa <i>et al.</i> 2004, 2005 Fortoul <i>et al.</i> 2011</p> |
| Sistema cardiovascular | <p>↓ Número de plaquetas Producción de megaplaquetas Iniciación de eventos trombo-embólicos. ↓ Hemoglobina ↑ Leucocitos, neutrófilos y linfocitos. ↑ Tamaño y número de megacariocitos. Cambios morfológicos en eritrocitos</p> | <p>González-Villalva <i>et al.</i> 2006, 2009</p> |
| Sistema reproductor | <p>Alteración en los testículos, necrosis en espermatogonias, espermatocitos, células de Sertoli. ↓ Espermatogénesis, movilidad espermática, conteo espermático. ↑ Anormalidades morfológicas y daño al citoesqueleto. Alteraciones en el desarrollo embrionario fetal.</p> | <p>Ciranni <i>et al.</i> 1995 Rodríguez Mercado y Altamirano-Lozano 2006. Fortoul <i>et al.</i> 2007, 2011</p> |
| Sistema respiratorio | <p>↑ Citocinas (IL-6 y TNF-α) en epitelio bronquio-alveolar. Cambios en las células bronquiolares no-ciliadas y células ciliadas. Función pulmonar anormal. ↑ Inflamación e hiperplasia epitelial.</p> | <p>Fortoul <i>et al.</i> 2011</p> |
| Sistema inmunológico | <p>Cambios en la corteza y médula del timo. Esplenomegalia ↑ Número y tamaño de megacariocitos. Alargamiento de la pulpa blanca. Cambios nucleares en linfocitos de timo.</p> | <p>Fortoul <i>et al.</i> 2011</p> |
| Hígado | <p>↑ Peroxidación lipídica. Destrucción oxidante de los ácidos grasos poli-insaturados y filtrado inflamatorio.</p> | <p>Fortoul <i>et al.</i> 2011</p> |
| Riñón | <p>↓ Diuresis (ratas y gatos). ↓ Filtrado glomerular.</p> | <p>Evangelou 2002</p> |
| Otros efectos | <p>↓ Esmalte dental. Afecta la histodiferenciación.</p> | <p>Fortoul <i>et al.</i> 2011</p> |

↑ Aumento, ↓ Disminución

3. Vanadio y DNA.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, enlista al pentóxido de vanadio como un posible carcinogénico para humanos (grupo 2A) con base en la limitada evidencia de su potencial para causar cáncer (IARC 2006, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Los estudios con modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, indican que los compuestos de vanadio tienen potencial tóxico, mutagénico y genotóxico (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006). Algunos de los estudios concernientes a los efectos genotóxicos del vanadio se citan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Efectos genotóxicos del vanadio.

| Sistema u órgano | Vía y compuesto | Efecto | Referencia |
|--|--|--|--------------------------------------|
| Cultivo de linfocitos humanos | <i>In vitro</i> V ₂ O ₅ | ↑ Células poliploides y asociaciones satelitales. ↓ Índice mitótico. | Roldán y Altamirano-Lozano 1990 |
| Células del fibroblasto de pulmón de criceto chino (V79) | <i>In vitro</i> V ₂ O ₅ | ↑ Aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales. ↓ Índice mitótico. | Zhong <i>et al.</i> 1994 |
| Ratón CD-1 Médula ósea | Vía oral NH ₄ VO ₃ Na ₃ VO ₄ | ↑ Aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales. ↑ Micronúcleos. | Ciranni <i>et al.</i> 1995 |
| Células testiculares | Vía intraperitoneal V ₂ O ₅ | ↑ Rompimiento de cadena sencilla. | Altamirano-Lozano <i>et al.</i> 1996 |
| Cultivo de linfocitos humanos. | <i>In vitro</i> V ₂ O ₅ | ↑ Rompimientos de cadena sencilla. Citostático y citotóxico. | Rojas <i>et al.</i> 1996 |
| Hígado, pulmón, bazo, corazón, riñón y médula ósea. | Vía intraperitoneal V ₂ O ₅ | ↑ Rompimientos de cadena sencilla | Altamirano-Lozano <i>et al.</i> 1999 |
| Leucocitos humanos de sangre periférica. | <i>In vitro</i> V ₂ O ₄ | ↑ Rompimiento de cadena sencilla. Aberraciones cromosómicas. | Rodríguez-Mercado <i>et al.</i> 2003 |
| Ratón CD-1 Leucocitos | Vía inhalada V ₂ O ₅ | Micronúcleos y rompimientos de cadena sencilla. | Fortoul <i>et al.</i> 2011 |
| Ratón CD-1 Leucocitos | Vía inhalada V ₂ O ₅ | ↑ Micronúcleos | Rojas-Lemus <i>et al.</i> 2014. |

↑ Aumento, ↓ Disminución

Sin embargo, la información relacionada con el potencial genotóxico y carcinogénico del V_2O_5 es controversial (Zhong *et al.* 1999, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

4. Vanadio y reparación del DNA.

Rojas y colaboradores (1996) observaron en un modelo *in vitro* la cinética de la reparación del DNA, en linfocitos humanos, en dos tiempos de recuperación posteriores a los tratamientos con V_2O_5 (45 y 90 minutos) hallaron que a partir del primer tiempo de recuperación se reparó cerca del 80% de los rompimientos de cadena sencilla y a los 90 minutos, la migración del DNA tenía valores similares a los del testigo.

Rodríguez Mercado y colaboradores (2011) en un modelo *in vitro* de reparación del DNA en cultivos celulares de leucocitos expuestos a diferentes sales de vanadio: trióxido de vanadio (III), pentóxido de vanadio (V) y tetraóxido de vanadio (IV). Encontraron que el trióxido de vanadio (III) y el pentóxido de vanadio inducen incremento del porcentaje de células con daño a las 2, 4 ó 6 horas de exposición y el tetraóxido de vanadio a las 4 horas de exposición. En cuanto al tipo de daño, el trióxido y pentóxido de vanadio causan rompimiento de cadena sencilla mientras que el tetraóxido de vanadio provoca rompimiento de cadena doble. Estos autores indican que las células son capaces de reparar el DNA dañado después de 90 minutos con trióxido de vanadio (III) y pentóxido de vanadio (V) y pueden regresar a valores similares como el testigo. Mientras que las células tratadas con tetraóxido de vanadio (IV) son capaces de restaurar el daño en 120 minutos (Rodríguez- Mercado *et al.* 2011).

No obstante, se ha observado que algunos metales y aldehídos pueden inhibir la vía NER y contribuir a procesos carcinogénicos (Metha *et al.* 2008).

5. Consecuencias del daño al DNA.

La reducción de la capacidad de reparación es un importante mecanismo de los carcinógenos y los pro-carcinógenos para causar mutaciones y subsecuentemente cáncer (Metha *et al.* 2008).

Entre los efectos generados por el daño en los mecanismos de reparación se incluyen defectos genéticos como xeroderma pigmentosum (XP), como resultado de mutaciones en genes codificantes en la vía de NER; enfermedades neurodegenerativas, deficiencias neurosensoriales, discapacidad mental, bulbar, extrapiramidal, corea y ataxia (desórdenes cerebelares) y trastornos del habla (Smith *et al.* 2013).

Incluso se ha observado que en individuos con defectos genéticos en los genes de reparación tal como es xeroderma pigmentosum (XP), están predispuestos a tener mayor incidencia de cáncer en piel y duplicar el riesgo de padecer cáncer en órganos internos (Metha *et al.* 2008).

6. Pruebas para detectar genotoxicidad.

Los seres humanos están expuestos a una amplia variedad de agentes que son potencialmente peligrosos para el DNA. Existen diferentes técnicas para detectar el daño al material genético, entre ellas se encuentran:

- *Ensayo de micronúcleos.* Detecta la pérdida de material genético debido a procesos aneugénicos o clastogénicos (Zalacain *et al.* 2005).
- *Intercambio de cromátidas hermanas.* Se basa en el material genético roto y unido entre cromátidas en el mismo locus (Mussali-Galante *et al.* 2005).
- *Ensayo Cometa.* Es una prueba dependiente de pH en donde el DNA es desnaturalizado y sometido a electroforesis para analizar el daño al material genético, identificado como rompimientos en las hebras de DNA (Collins *et al.* 1997, Tice *et al.* 2000).

6.1. Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa pH>13).

Entre las pruebas más utilizadas para detectar actividad genotóxica, se encuentra la electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa. Esta técnica, ha sido propuesta como un método sensible para la detección de daño y reparación del DNA (Altamirano-Lozano *et al.* 1996, Tice *et al.* 2000, Mussali-Galante *et al.* 2005).

Dentro de las ventajas de este ensayo se encuentran: la aplicación en una gran variedad de células eucariontes, la alta sensibilidad para detectar bajos niveles de daño (de 50 a 15 000 rompimientos por célula), la requisición de una pequeña cantidad de muestra (de 10 000 a 50 000 células), es una técnica no invasiva, es de fácil y rápida realización, se puede aplicar en muestras frescas o congeladas, y el daño puede ser detectado en células ciclantes y no ciclantes (Tice *et al.* 2000, Olive y Banáth 2006).

Esta prueba consiste en embeber células en geles de agarosa, lisarlas en una solución rica en detergentes y, posteriormente, el DNA liberado es sometido a electroforesis bajo condiciones alcalinas (pH >13), neutralizado y teñido con fluorocromos. La apariencia final

asemeja a un cometa: la cabeza formada por el DNA intacto y la cola por los fragmentos (Mussali-Galante *et al.* 2005).

Esta técnica, de acuerdo con la variante que se utilice, detecta rompimientos de cadena sencilla y doble, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos DNA-DNA/ DNA-proteínas y sitios retardados de reparación (Tice *et al.* 2000, Mussali-Galante *et al.* 2005).

7. Testigos de efecto genotóxico.

Son los fármacos probados durante este trabajo con diferentes mecanismos de acción para comparar la cinética de reparación y comportamiento del vanadio.

7.1. Camptotecina.

La **Camptotecina (CPT)** es un alcaloide pentacíclico aislado de la planta china *Camptotheca acuminata*, presenta actividad antitumoral debido a su habilidad de estabilizar el complejo covalente DNA-Topoisomerasa I. La topoisomerasa I (Topo I) eucarionte tiene un rol en procesos biológicos fundamentales como la relajación del enrollamiento del DNA durante la transcripción, la replicación y la reparación de esta biomolécula (Rivory y Robert 1995, Morham *et al.* 1996; Natelson *et al.* 1996, Pizzolato y Saltz 2003, Attia *et al.* 2009).

La CPT interfiere con el complejo formado por DNA-Topo I, interactuando con la topoisomerasa I y obstruyendo la religación del DNA, de esta manera convierte a esta enzima en un veneno celular capaz de fragmentar al DNA, generar muerte celular por apoptosis, intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas. Siendo su acción más evidente durante la fase S del ciclo celular (Rivory y Robert 1995, Natelson *et al.* 1996, Du 2003, Thomas *et al.* 2004, Attia *et al.* 2009, Lee *et al.* 2012).

La principal vía de excreción de la CPT es a través de las heces (23.6-59.9%), después de 48-72 horas post-administración *in vitro* (Kaneda *et al.* 1990, Kaneda y Yokokura 1990, Rivory y Robert 1995).

7.2. Metil Metano Sulfonato.

El **metil metano sulfonato (MMS)** es un agente alquilante debido a que reacciona directamente con los ácidos nucleicos (DNA y RNA) en diferentes modelos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Se distribuye rápidamente a través del cuerpo, su presencia en la sangre se encuentra 2 horas después de haber sido administrado por vía intraperitoneal (Fedorcsák y Ehrenberg 1966, IARC 1987, Díaz- Barriga *et al.* 1999, Chang *et al.* 2002, Speit y Schütz 2008).

El MMS es capaz de modificar la guanina a 7-metilguanina y la adenina a 3-metil-adenina y causa el desapareamiento de bases, además de generar aductos en el DNA (Lundin *et al.* 2005). Estos daños son reparados por la vía de la reparación por escisión de bases (BER), (Sugiyama *et al.* 1992, Fedorcsák y Ehrenberg. 1966, Seo *et al.* 2002)

El MMS es excretado como CO₂ a partir de las 30-48 horas (Díaz Barriga *et al.* 1999, Schwartz y Kmiec 2005).

7.3. Demecolcine.

El **Demecolcine (DM)** es un derivado menos tóxico de la colchicina (Rieder y Palazzo 1992). Al igual que ésta inhibe la polimerización de la tubulina de los microtúbulos, que son la principal proteína que compone a los microtúbulos que son cruciales para regular diversas actividades como migración celular, división y polarización. Actúa como un agente aneugénico (Ramírez *et al.* 1997, Niel y Scherrmann 2006, Wang *et al.* 2009).

El demecolcine se une a la tubulina ó S y detiene la elongación de los microtúbulos lo que inhibe la formación del huso mitótico y evita la migración de los cromosomas hacia los polos. Este arresto mitótico bloquea a las células durante la metafase y causa aneuploidías (Williams 1968, Hennig *et al.* 1988).

Cuando el demecolcine es administrado por vía oral es absorbido a nivel del duodeno e íleon y excretado principalmente por medio de la bilis (Chappey y Scherrmann 1995, Niel y Scherrmann 2006).

Sin embargo se ha observado que una vez excretado el demecolcine, hace a las células más sensibles a la radiación UV, inhibe el re-ligamiento en la vía NER, afecta la acción de la ligasa I, perturba el ciclo celular e inhibe la replicación del DNA permitiendo el incremento en la migración del DNA observado a través del ensayo cometa (Hsun *et al.* 2005, Günter y Schütz 2008).

8. Justificación.

Debido a las características geográficas de la ZMVM, para sus habitantes es continua y prolongada la exposición a contaminantes que se emiten principalmente por fuentes antropogénicas. Entre los contaminantes más importantes que se encuentran en esta ciudad, están las PS a las que se adosan metales como el vanadio, cuyas concentraciones han aumentado en las últimas décadas, aunadas a que la inhalación es la forma por la que se absorben mayores cantidades de este metal.

La evidencia indica que el vanadio es capaz de causar daño al material genético, lo que cobra importancia debido a que puede generar inestabilidad cromosómica, la cual está estrechamente relacionada con procesos carcinogénicos. Sin embargo, el daño al material genético causado por vanadio puede ser reparado, mal reparado o no reparado y debido a la nula existencia de estudios *in vivo* es importante conocer el efecto que ejerce sobre los mecanismos de reparación de cadena sencilla del DNA en este modelo.

9. Hipótesis.

Si el vanadio es capaz de alterar o modificar los mecanismos de reparación de cadena sencilla del DNA, entonces habrá aumento en la longitud de la cola de los cometas que perdurará a través del tiempo en los leucocitos de sangre periférica de ratones macho expuestos por vía inhalada.

10. Objetivos.

10.1. Objetivo general.

Evaluar la cinética de reparación de los rompimientos de cadena sencilla del DNA causados por la inhalación de vanadio en leucocitos de ratones macho de la cepa CD-1 mediante el ensayo cometa.

10.2. Objetivos particulares.

- En leucocitos de sangre periférica de ratones macho de la cepa CD1:
 1. Evaluar el efecto citotóxico de los grupos experimentales a las 0, 48, 144 y 240 h, mediante viabilidad celular por fluorocromos.
 2. Realizar las curvas de tiempo-migración del DNA de los grupos experimentales desde las 0 hasta las 320 h, empleando el ensayo cometa.
 3. Comparar la curva del grupo vanadio contra los grupos controles de efecto genotóxico.

11. Método.

Grupos experimentales

Se utilizaron 30 ratones macho de la cepa CD-1 con un peso de 30-35 g de peso y 60 días de edad. Los 30 ratones se mantuvieron en un fotoperiodo 12:12 (L: O) con alimento *Rodent Laboratory Chow* y agua *ad libitum*. Se dividieron en 6 grupos de 5 ratones cada uno:

11.1. Protocolo de inhalación.

Los ratones se colocaron en una caja de acrílico transparente de 45 cm X 21 cm X 35 cm con un volumen total de 3.3 L conectado a un ultranebulizador UltraNeb[®] 99 con flujo continuo de 10 L/min de la solución de V₂O₅ (0.02 M). Los ratones inhalaban 1 hora, tres días consecutivos.

11.2. Testigos de efecto genotóxico.

Demecolcine. La dosis de 5 ml/kg se estableció con base en el artículo de Scheneide *et al.* (1995) que utilizó una dosis de 20 ml/kg para inducir aneuploidías.

Metil Metano Sulfonato. A este grupo se le administró por vía i.p. una dosis única de 40 mg/kg, como lo reportado por Díaz-Barriga *et al.* (1999) para estudios genotóxicos con este fármaco.

Camptotecina. A este grupo se le administró por vía i.p. una única dosis 4 mg/kg, que es la reportada por Attia *et al.* (2009) para causar daño al DNA sin comprometer la viabilidad celular (Figura 4).

11.3. Toma de muestras.

11.3.1. Viabilidad celular por fluorocromos.

De cada uno de los individuos de todos los grupos, se tomó una muestra de 2 µL de sangre entera por corte de la vena caudal al tiempo cero (0 h), a las 48, 144 y 240 horas post-exposición/administración

11.3.2. Ensayo cometa pH>13.

De igual manera que las muestras para viabilidad celular por fluorocromos, de todos los individuos se obtuvieron 5 µL de sangre al tiempo cero (0 h), a las 24, 48, 72, 144, 192, 240 y 312 horas post-exposición o administración.

12. Estrategias experimentales.

12.1. Viabilidad celular por fluorocromos.

La técnica de viabilidad celular por fluorocromos se llevó a cabo de acuerdo con Strauss (1991):

Se utilizó 0.01 g de diacetato de fluoresceína (FDA) disuelto en 2 mL de acetona, 0.01 g de bromuro de etidio (Br Et) disuelto en 5 mL de amortiguador de fosfatos (PBS). Antes de utilizarse, se mezclaron 100 μ L de la solución de Br-Et, 15 μ L de la solución de FDA con 2.4 mL de PBS.

La muestra de sangre entera se mezcló con la solución de fluorocromos (FDA-PBS-Br Et) en proporción 1:1. Las muestras se observaron inmediatamente con microscopía de epifluorescencia. De un total de 100 células por muestra, se cuantificó el número de células muertas (fluorescencia roja) y de las células vivas (fluorescencia verde) (Figura 1).

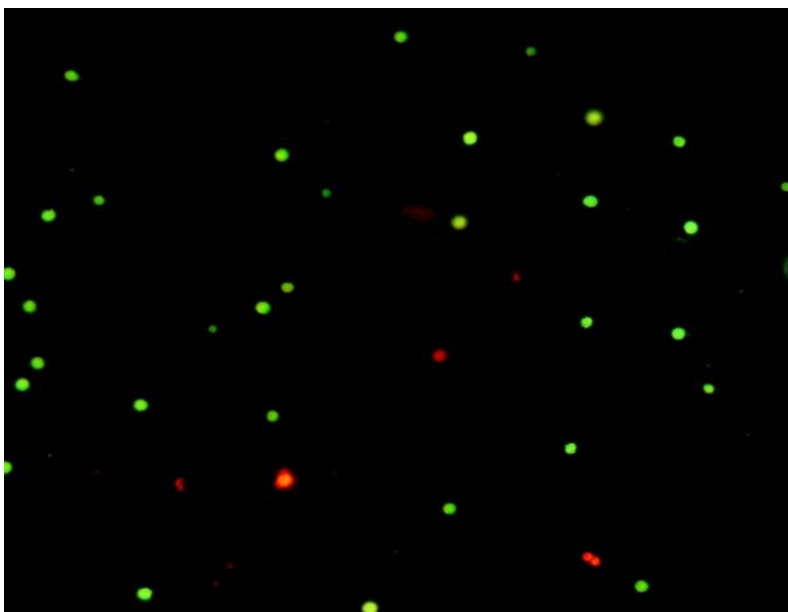


Figura 1. Células observadas con la técnica de viabilidad celular por fluorocromos con microscopio de epifluorescencia, 20X. Los puntos verdes corresponden a células vivas y los rojos a células muertas.

12.2. Electroforesis unicelular alcalina (Ensayo cometa pH > 13)

La técnica se llevó de acuerdo a Singh *et al.* (1988) para detectar los rompimientos de cadena sencilla en el DNA. Cada una de las muestras se realizó por duplicado.

De cada ratón se tomó una muestra de sangre entera de 5 μ L y esta se mezcló con 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% con una temperatura aproximada de 36.5-38 °C y fueron colocados en laminillas que previamente se les preparó con una capa de agarosa regular al 0.5%. Esta muestra se extendió con ayuda de un cubreobjetos

completamente limpio para no dañar la muestra. Se colocaron las laminillas en hielo durante 5 minutos para permitir la solidificación de la segunda capa de agarosa y así permitir retirar el cubreobjetos sin riesgo de maltratar la muestra y así colocar una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% la cual se extendió de nueva cuenta con el cubreobjetos y se le colocó de nueva cuenta en hielo para la solidificación de la tercera capa de agarosa y retirar el cubreobjetos.

Una vez solidificada las capas de agarosa, se colocaron las laminillas en una solución de lisis compuesta de NaCl 2.5M, Tris 0.01M, EDTA Na₂ 0.1 M, Tritón X-100 (1%) y DMSO (10%). Se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 4 °C en condiciones de total oscuridad durante 36 horas.

Para la realización de la electroforesis horizontal, las muestras fueron colocadas en un amortiguador de desenrollamiento y corrida compuesto por NaOH 0.3M y EDTA Na₂ 0.001M revisando que el pH de los amortiguadores para desenrollar el DNA fuera igual o mayor a 13. Se les dejó por 20 minutos en los amortiguadores para desenrollar el DNA y transcurrido el tiempo se les sometió a una corriente de 300mA y 25V durante 20 minutos. Todo lo anterior en condiciones de oscuridad.

Posterior a los 20 minutos de electroforesis, las muestras se neutralizaron con una solución de neutralización compuesta por TRIS 0.4 M con un pH igual a 7.5 durante 15 minutos.

Para la fijación se utilizó etanol absoluto por 10 minutos y se les dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez fijadas, las muestras se observaron con un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS B201 BH-2. Para visualizar los cometas se utilizó 1 mg de Br Et 0.02M disuelto en 5 mL de agua destilada (Solución Stock) de esta solución se tomó 1 mL y se disolvió en 9 mL de agua destilada (solución de rutina). De la solución de rutina se tomaron 35 µL que se colocaron sobre la muestra a la cual se le aplicó posteriormente un cubreobjetos.

Para el registro de cometas se tomaron al azar el conteo de 300 células por laminilla del individuo por cada una de las horas de muestreo realizadas y se midió la migración, después se clasificó dentro una de las cinco categorías propuesta por Rodríguez- Mercado *et al.* (2011) de acuerdo al valor del radio del núcleo. En donde: $r = \text{medida de la cola (LCo)} / \text{medida de la cabeza (LCa)}$ (Figura 2.).

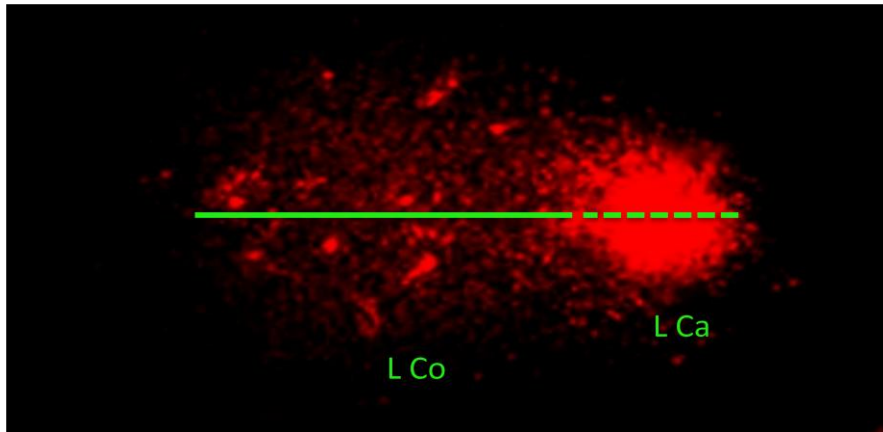


Figura 2. Cometa observado con microscopio de epifluorescencia (40x). En donde LCa es la cabeza del cometa formada por DNA intacto y LCo la cola formada por DNA desfragmentado.

Y se clasificaron en (Figura 3):

- (A) → núcleo intacto, no hay daño al DNA.
- (B) $r \leq 1$ → daño bajo al DNA.
- (C) $1 < r \leq 2$ → daño moderado del DNA
- (D) $r > 2$ → daño severo del DNA
- (E) → en donde las células son virtualmente todo el DNA migrado, lo que se considera un daño total del material genético o también conocido como “nubes”.

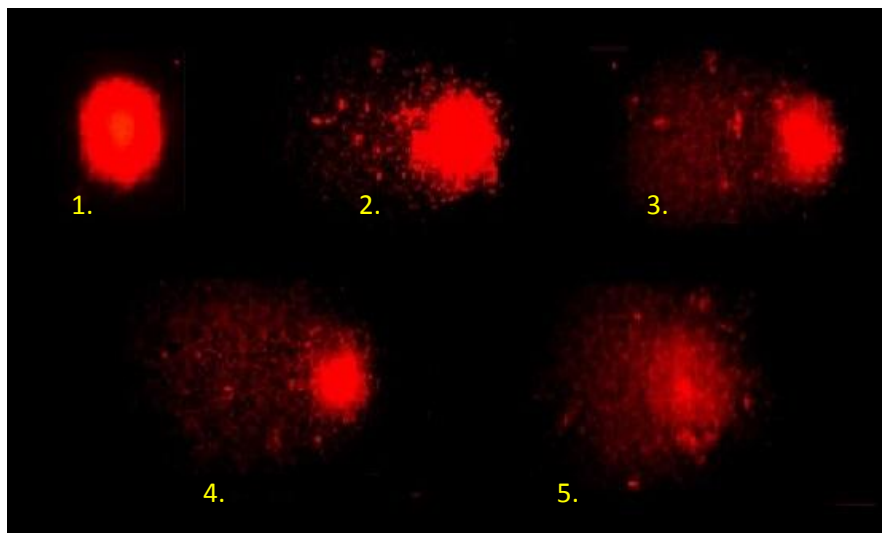


Figura 3. Cometas observados con microscopio de epifluorescencia (40x). En donde: 1. sin daño; 2. daño bajo; 3. daño moderado; 4. daño alto y 5. Daño severo.

13. Análisis de resultados.

Para el análisis de resultados se calculó el Índice de migración (IMg) de cada uno de los individuos de acuerdo con la fórmula propuesta por Rodríguez-Mercado *et al.* (2011):

$$\text{IMg} = [(A)1 + (B)2 + (C)3 + (D)4 + (E)5] / \text{Total de células analizadas (\%)}$$

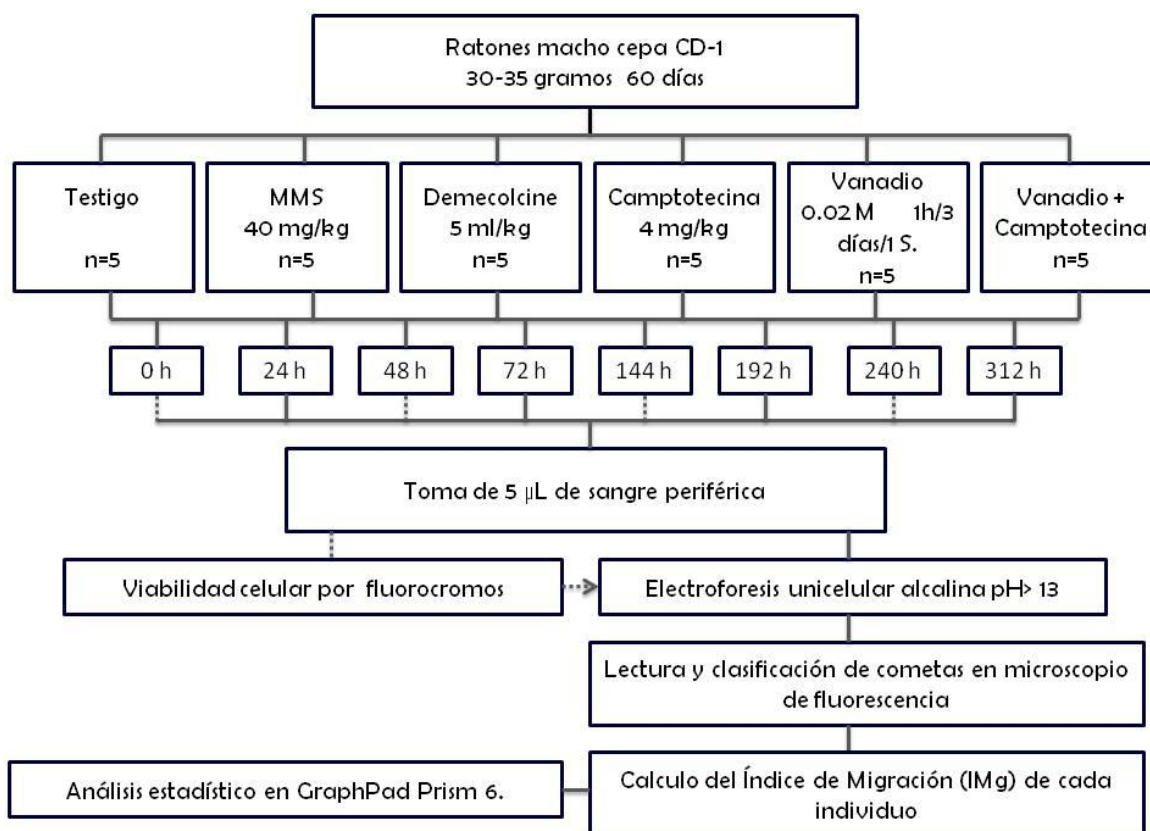


Figura 4. Representación esquemática del método.

14. Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos se procesaron con el programa GraphPad Prism 6 y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba post hoc Dunnett para evaluar la diferencia entre los grupos tratados y el grupo testigo con respecto a los diferentes tiempos de muestreo. Para evaluar las diferencias entre dos grupos por cada tiempo, se utilizó la prueba t de Student pareada (dos colas). Las diferencias se consideraron como significativas cuando el valor de P fue ≤ 0.05 .

15. Resultados.

15.1. Viabilidad celular.

En la **Tabla 4** se observa que en todos los grupos el porcentaje de viabilidad celular fue mayor al 81%. Este porcentaje es acorde con el requerido para realizar electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa pH>13) (Tice *et al.* 2000).

Tabla 4. Porcentaje de viabilidad celular de los distintos grupos experimentales muestreados a diferentes tiempos

| Horas | Testigo | MMS | DM | CPT | V | V + CPT |
|-------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| 0 h | 98.0±1.0 | 94.0±1.5 | 93.0±1.0* | 92.3±1.5* | 95.8±1.3 | 98.8±0.3 |
| 48 h | 90.8±0.5 | 85.7±0.8* | 88.7±4.9 | 87.0±1.0* | 95.0±1.5* | 86.5±3.5 |
| 144 h | 91.7±1.5 | 90.3±0.8 | 89.7±0.9 | 84.7±0.9* | 88.5±2.6 | 81.8±4.9 |
| 240 h | 94.3±1.7 | 88.3±0.8* | 93.7±1.8 | 93.3±0.7 | 97.0±2.0 | 91.3±4.2 |

* $P < 0.05$ (prueba t de Student) contra el grupo testigo del mismo tiempo de muestreo. MMS: Metil metano sulfonato, DM: demecolcine, CPT: camptotecina y V: vanadio.

15.2. Electroforesis unicelular alcalina (Ensayo Cometa pH>13).

15.2.1. Testigo.

En el grupo testigo, no se observó diferencia significativa en el índice de migración del DNA entre el tiempo cero y el resto del tiempo experimental, excepto a las 72 h (Figura 5).

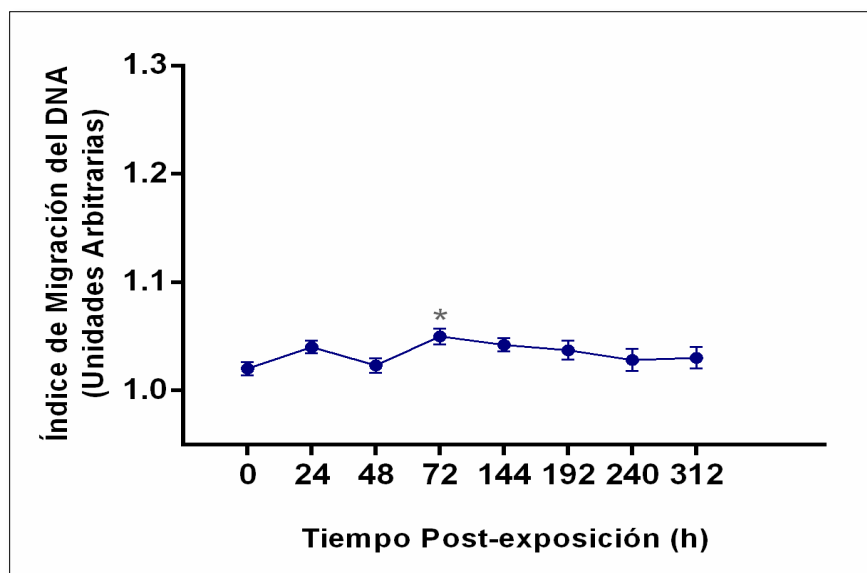


Figura 5. Índice de migración del DNA en leucocitos de ratones del grupo Testigo. * $P < 0.05$, tiempo cero vs tiempo post-exposición, ANOVA *post Hoc* Dunnett.

15.2.2. Metilmetano Sulfonato: MMS.

Los ratones a los que se les administró este fármaco, mostraron aumento significativo en el índice de migración del DNA a partir de las 24 y hasta las 192 horas post-exposición. A las 240 y 312 h no se observó diferencia significativa con respecto al tiempo cero (Figura 6).

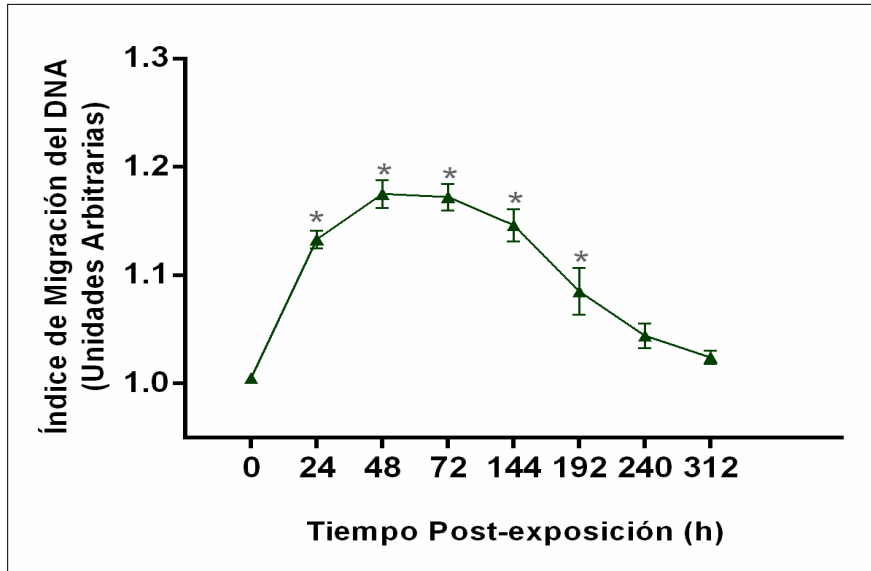


Figura 6. Índice de migración del DNA en leucocitos de ratones del grupo MMS. * $P < 0.05$, tiempo cero vs tiempo post-exposición, ANOVA *post Hoc* Dunnett.

15.2.3. Demecolcine.

Los ratones a los que se les administró este fármaco, mostraron aumento significativo en el índice de migración del DNA sólo a partir de las 144 y hasta las 240 h post-administración con respecto al tiempo cero (Figura 7).

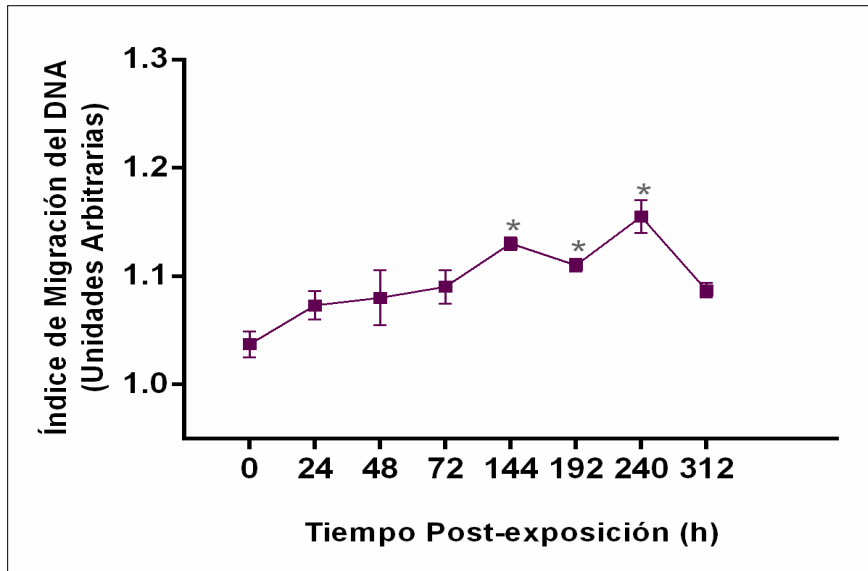


Figura 7. Índice de migración del DNA en leucocitos de ratones del grupo Demecolcine (DM). * $P < 0.05$, tiempo cero vs tiempo post-exposición, ANOVA *post Hoc* Dunnett.

15.2.4. Camptotecina.

Los ratones a los que se les administró este fármaco, mostraron aumento significativo en el índice de migración del DNA a partir de las 24 y hasta las 144 h; el pico máximo de daño se presentó a las 72 h post-exposición. A las 312 horas se observó la disminución significativa en la migración del DNA de las células evaluadas (Figura 8).

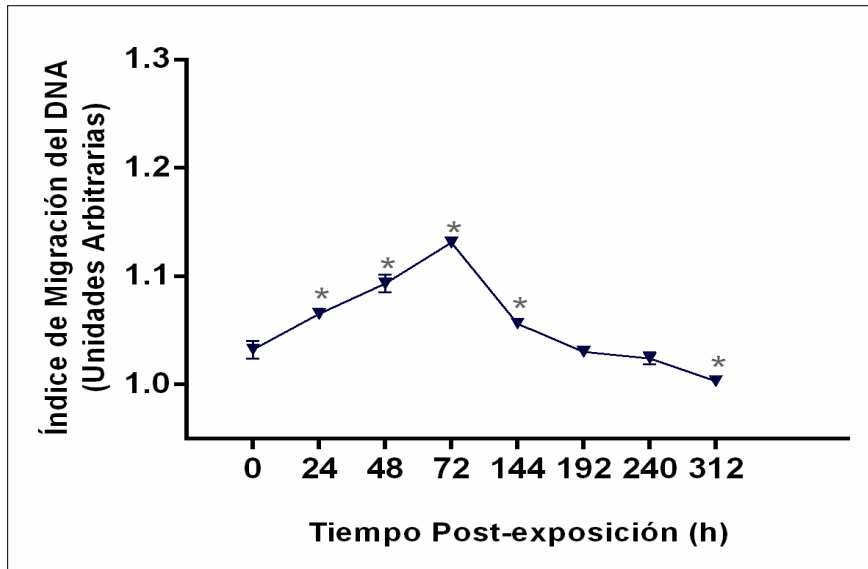


Figura 8. Índice de migración del DNA en leucocitos de ratones del grupo CPT. * $P < 0.05$, tiempo cero vs tiempo post-exposición, ANOVA *post Hoc* Dunnett.

15.2.5. Vanadio.

Los ratones que inhalaron este compuesto mostraron aumento significativo en el índice de migración del DNA a partir de las 24 y hasta las 240 horas post-exposición (Figura 9).

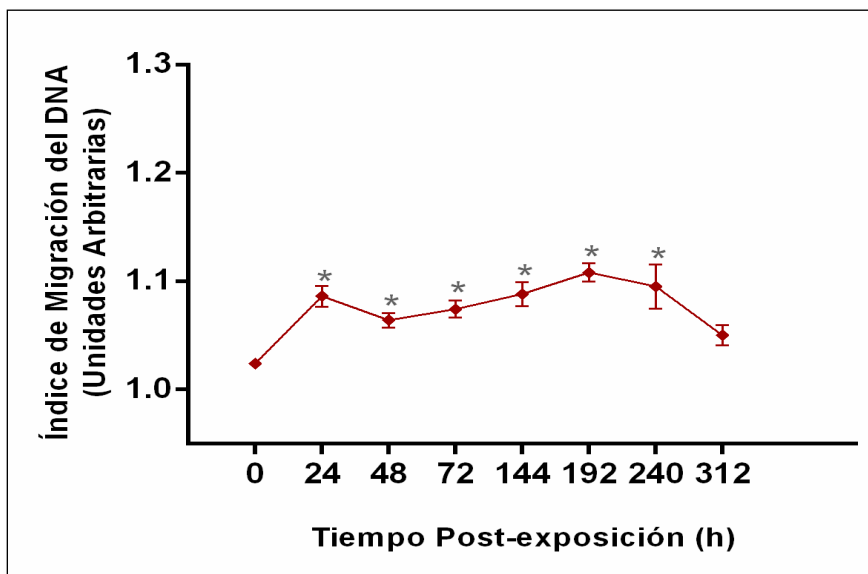


Figura 9. Índice de migración del DNA en leucocitos de ratones del grupo V. * $P < 0.05$, tiempo cero vs tiempo post-exposición, ANOVA *post Hoc* Dunnett.

15.2.6. Vanadio + Camptotecina.

Los ratones a los que se les administró ambos compuestos, mostraron aumento significativo y progresivo de la migración del DNA a partir de las 72 h y hasta el final del tiempo de muestreo. El máximo valor del índice de migración se observó a las 240 h post-exposición (Figura 10).

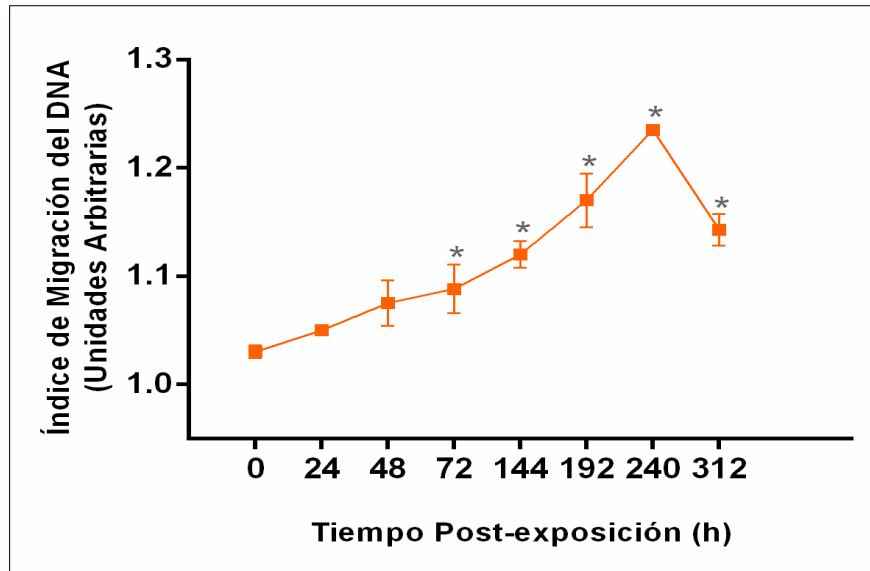


Figura 10. Índice de migración del DNA en leucocitos de ratones del grupo Vanadio + Camptotecina (V+CPT). * $P < 0.05$, tiempo cero vs tiempo post-exposición, ANOVA *post Hoc* Dunnett.

Tabla 5. Tabla comparativa entre los IMg de los diferentes grupos experimentales.

| Hrs. | Testigo | V | DM | MMS | CPT | V+CPT |
|------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 0 | 1.020±0.0059 | 1.024±0.0046 | 1.037±0.0120 | 1.005±0.0035 | 1.032±0.0083 | 1.030±0.0058 |
| 24 | 1.040±0.0058 | 1.086±0.0096* | 1.073±0.0133 | 1.133±0.0081* | 1.065±0.0043* | 1.050±0.0041 |
| 48 | 1.023±0.0066* | 1.064±0.0067* | 1.080±0.0252 | 1.175±0.0127* | 1.093±0.0081* | 1.075±0.0210 |
| 72 | 1.050±0.0073 | 1.074±0.0079* | 1.090±0.0153 | 1.172±0.0121* | 1.131±0.0043* | 1.088±0.0225* |
| 144 | 1.042±0.0060* | 1.088±0.0111* | 1.130±0.0057* | 1.146±0.0148* | 1.056±0.0022* | 1.120±0.0123* |
| 192 | 1.037±0.0088* | 1.108±0.0085* | 1.110±0.0057* | 1.085±0.0215* | 1.030±0.0034 | 1.170±0.0248* |
| 240 | 1.028±0.0101* | 1.095±0.0202* | 1.155±0.0150* | 1.044±0.0116 | 1.024±0.0054 | 1.235±0.0050* |
| 312 | 1.030±0.0100 | 1.050±0.0091 | 1.087±0.0067 | 1.024±0.0061 | 1.003±0.0013* | 1.143±0.0145* |

* $P < 0.05$, ANOVA, tiempo cero vs tiempo post-exposición, *post Hoc* Dunnett

15.3. Comparación entre grupos experimentales.

15.3.1. Testigo vs Vanadio.

Los ratones de estos tratamientos mostraron diferencia significativa en el índice de migración del DNA a partir de las 48 y hasta las 240 h, a excepción de las 72 h (Figura 11).

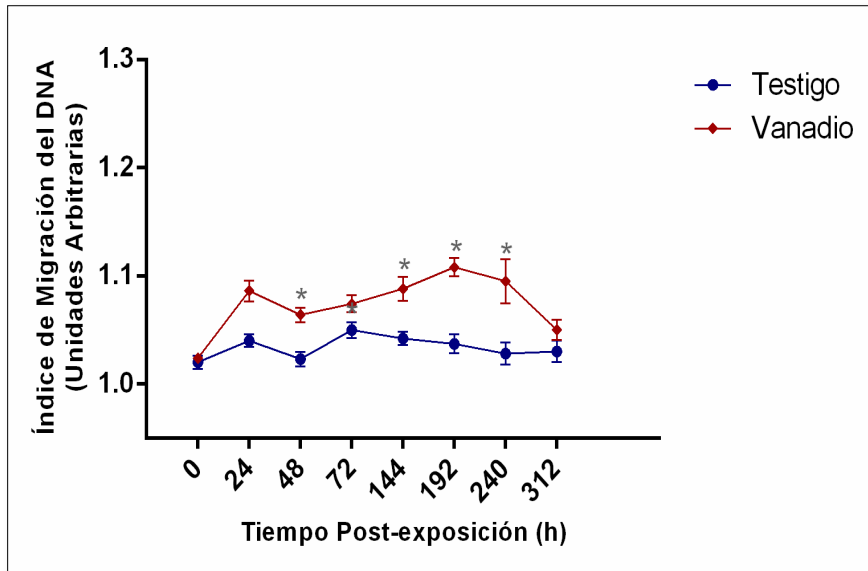


Figura 11. Comparación del índice de migración del DNA del grupo Testigo y Vanadio.
* $P < 0.05$ (prueba t de Student).

15.3.2. Vanadio vs Camptotecina.

Los ratones de estos tratamientos mostraron diferencia significativa en el índice de migración del DNA a partir de las 48 y hasta el final del tiempo de muestreo (Figura 12).

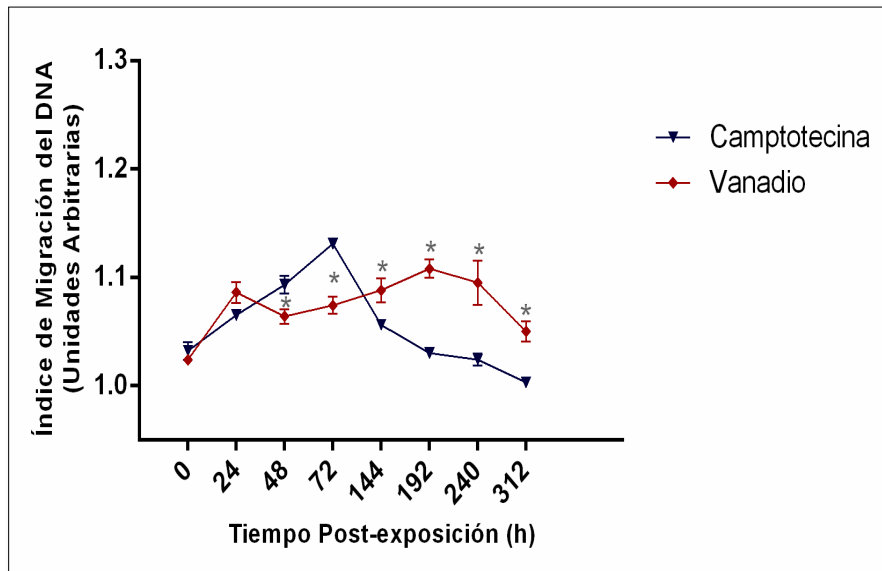


Figura 12. Comparación del índice de migración del DNA del grupo Vanadio y Camptotecina.
* $P < 0.05$ (prueba t de Student).

15.3.3. Vanadio vs Demecolcine.

Los ratones de estos tratamientos mostraron diferencia significativa en los índices de migración del DNA sólo a las 144 y 240 horas (Figura 13).

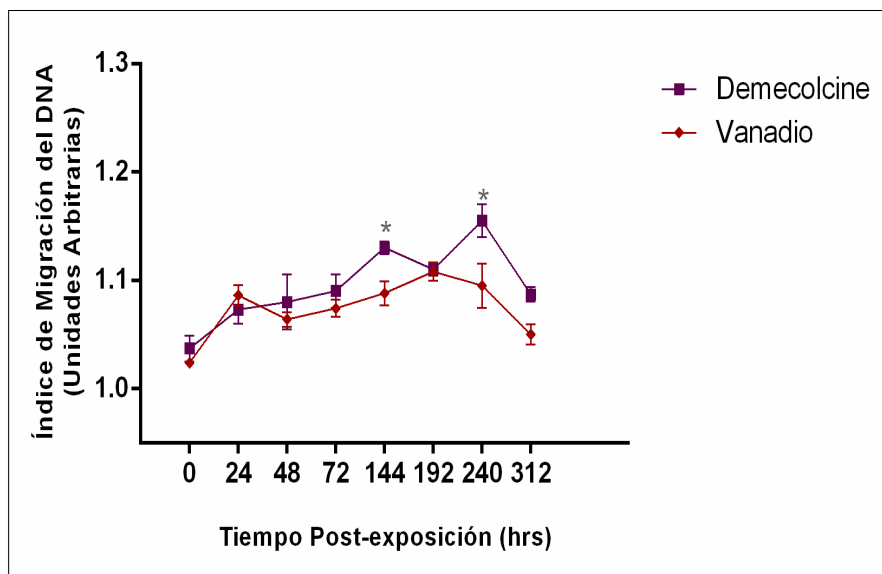


Figura 13. Comparación del índice de migración del DNA del grupo Vanadio y Demecolcine.* $P < 0.05$ (prueba t de Student).

15.3.4. Vanadio vs MMS.

Los ratones de estos tratamientos mostraron diferencia significativa en sus índices de migración del DNA a partir de las 24 h y hasta el final del tiempo de muestro, a excepción de las 192 h (Figura 14).

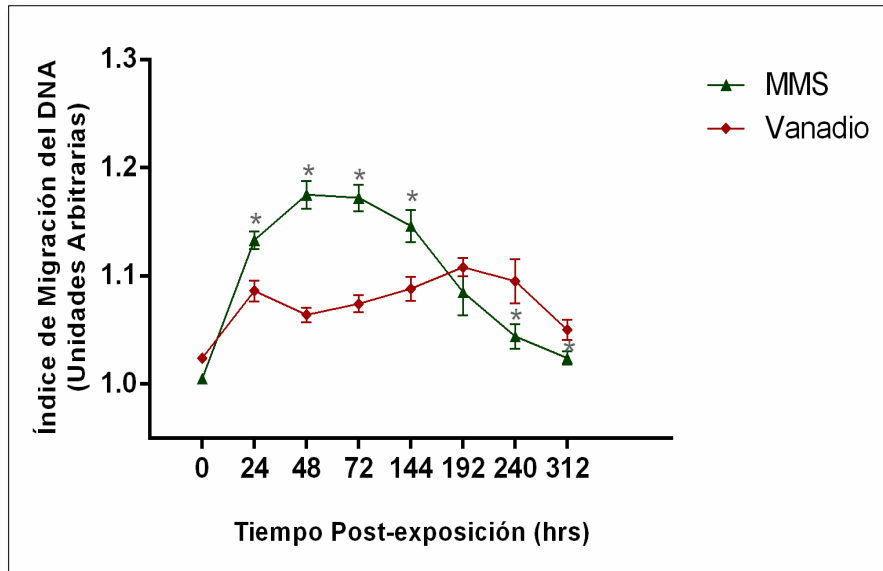


Figura 14. Comparación del índice de migración del DNA del grupo Vanadio y MMS.
* $P < 0.05$ (prueba t de Student).

15.3.5. Vanadio vs MMS vs Demecolcine.

En las curvas de comportamiento de los ratones de los grupos experimentales MMS, vanadio y demecolcine, se observó que el grupo vanadio presenta mayor diferencia estadística con el grupo MMS a partir de las 24 y hasta las 312 h, excepto a las 192 h. No obstante, presenta menor diferencia estadística con el grupo demecolcine, por lo que presenta mayor similitud con este grupo (Figura 15).

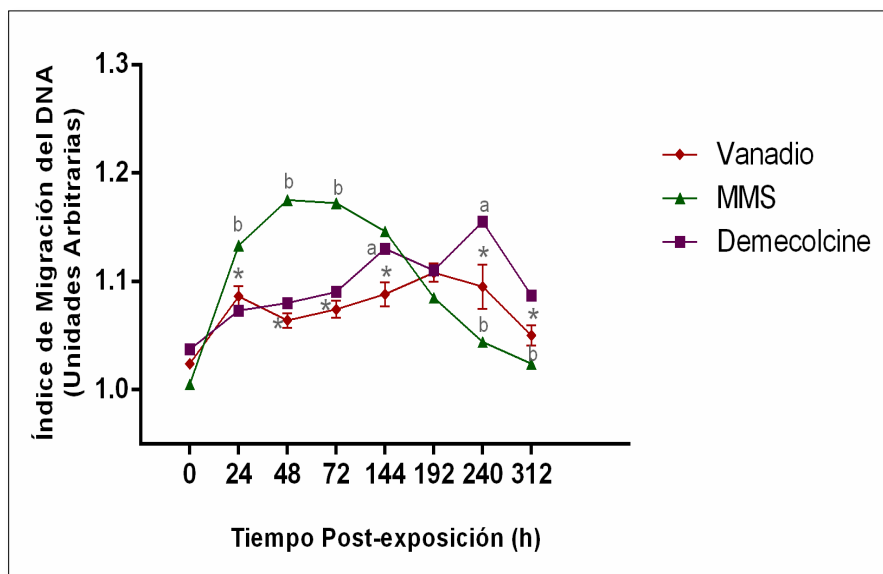


Figura 15. Comparación del índice de migración del DNA del grupo Vanadio, MMS y Demecolcine.
*V vs MMS ^aDemecolcine vs V, ^bMMS vs Demecolcine, * $P < 0.05$, ANOVA *post Hoc* Dunnett.

15.3.6. Vanadio vs Vanadio+CPT.

Los ratones de estos tratamientos mostraron diferencias significativas a partir de las 24 y hasta el final del tiempo de muestreo, excepto a las 48 h; el pico máximo de daño se observó a las 240 h (Figura 16).

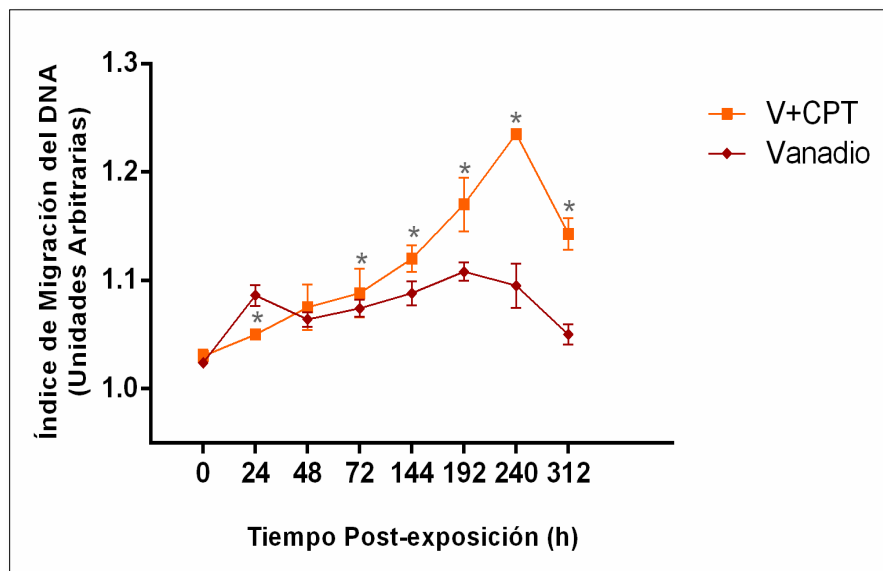


Figura 16. Comparación del índice de migración del DNA del grupo Vanadio y V+CPT
* $P < 0.05$ (prueba t de Student).

16. Resumen de resultados

- Viabilidad Celular
 - En la viabilidad celular se observó que el vanadio no causa efectos citotóxicos y los fármacos utilizados como testigos de efecto genotóxico presentan baja actividad citotóxica. Sin embargo, en todos los grupos se observó que la viabilidad celular fue mayor al 80 %.
- Índice de migración por grupos
 - a. Testigo: no se observó aumento en los rompimientos de DNA.
 - b. MMS: a partir de las 24 y hasta las 192 h se presentan rompimientos.
 - c. DM: a partir de las 144 y hasta las 240 h se presentan rompimientos.
 - d. CPT: a partir de las 24 y hasta las 144 h se presentan rompimientos. A las 312 h se observa disminución con respecto al tiempo cero.
 - e. V: a partir de las 24 hasta las 240 h se presentan rompimientos.

- f. V+CPT: a partir de las 72 y hasta las 312 h se presentan rompimientos.

- Comparación de las curvas
 - a. T vs V: a partir de las 48 y hasta las 240 h el grupo V presenta rompimientos.
 - b. V vs CPT: a las 48 y 72 h el grupo V presenta menos rompimientos que el grupo CPT. A partir de las 144 y hasta las 312 h presenta más rompimientos.
 - c. V vs DM: Sólo en dos tiempos (144 y 240 h) el grupo DM presenta más rompimientos que el grupo V.
 - d. V vs MMS: Sólo en dos tiempos (T0 y 192 h) no se observa diferencia entre estos grupos.
 - e. V vs MMS vs DM: La cinética de las curvas muestra que el grupo V se comporta similar al grupo DM.
 - f. V vs V+CPT: La curva V+CTP muestra mayor índice de migración a partir de las 72 y hasta las 312 h.

17. Discusión.

17.1 Viabilidad celular.

¿Por qué es importante tener una viabilidad mínima del 80%?

De acuerdo con los lineamientos establecidos por Tice *et al.* (2000), los cuales indican que para realizar ensayo cometa en modelos *in vivo*, es requerido un porcentaje mínimo del 80 % de viabilidad celular. Con este porcentaje, se consideran válidos los resultados, ya que los rompimientos que se observen no serán debidos a la muerte celular.

Todos los grupos experimentales de este trabajo, presentaron el porcentaje mínimo requerido de células viables, lo que hizo posible realizar el ensayo cometa sin interpretación errónea de los resultados.

¿Por qué el vanadio no es citotóxico?

La literatura indica que las lesiones provocadas por vanadio en el DNA son reparables y por ello se puede explicar el porqué no se observa un efecto contundente en las células y puede ser un mutágeno débil que produce efecto citotóxico (Migliore *et al.* 1993, Léonard y Gerber 1994)

Otros autores que coincidan con los resultados.

Los resultados del presente trabajo con respecto a los rompimientos de cadena sencilla del DNA causados por la exposición a vanadio coinciden con los observados por Roldán y Altamirano (1990), Migliore *et al.* (1993) y Rojas *et al.* (1996) en cultivos linfocitos humanos. Altamirano-Lozano *et al.* (1999), Rodríguez-Mercado *et al.* (2003), Fortoul *et al.* (2011) en células de sangre periférica.

Todos ellos observaron baja actividad citotóxica con diversos compuestos de vanadio.

¿Por qué el MMS, DM y CPT tienen baja actividad citotóxica?

Cada uno de estos fármacos tiene mecanismos de acción citotóxicos diferentes sobre las células.

El MMS causa muerte celular debido a que daña a las membranas celulares (Smith y Grisham 1983).

La CPT causa citotoxicidad porque inhibe la síntesis de DNA y RNA, causando fragmentación reparable del material genético (Hsiang *et al.* 1989, Rivory y Robert 1995, Potmesil *et al.* 2006).

El DM presenta actividad citotóxica al inducir apoptosis al alterar la morfología celular (Tseng *et al.* 2010).

17.2. Índice de migración por grupos.

Testigo

En general, no se observó aumento en el I_{Mg} durante el tiempo experimental, excepto a las 72 h. Lo anterior puede explicarse debido a que la manipulación continua y la obtención de muestras generan estrés en los ratones (Avello y Suwalsky 2006).

¿Por qué el MMS causa rompimientos durante 5 de los 8 tiempos de muestreo?

Porque el MMS es una sustancia con acción directa sobre el material genético. En los resultados obtenidos se observa daño y debido a su mecanismo de acción es capaz de fragmentar al DNA a través de la alquilación de los nucleótidos y metilación de las bases púricas guanina y adenina a 7-metilguanina y 3-metiladenina. Sin embargo, este daño no permanece debido a que los mecanismos de reparación pueden corregirlo en el genoma (Lundin *et al.* 2005, Speit y Schütz 2008).

¿Por qué DM generó rompimientos a las 144, 192 y 240 h?

El DM es un reconocido agente aneugénico. No actúa directamente sobre la molécula de DNA, si no sobre el aparato mitótico. Sin embargo, en los resultados obtenidos en esta investigación, se observó que generó rompimientos de cadena sencilla después de 144 h de haber sido administrado. El DM es una sustancia que una vez metabolizada, es capaz de sensibilizar a las células a factores exógenos y endógenos que dañan al DNA, como lo es la radiación UV, así como también afectar enzimas implicadas en procesos celulares tales como la replicación, la transcripción y la reparación del DNA (p. e. ligasa y polimerasa) y por ende, acumular rompimientos en el DNA (Hsun *et al.* 2005; Günter y Schütz 2008).

¿Por qué CPT genera rompimientos?

La camptotecina es una sustancia que causa daño al material genético, es un agente clastógeno con acción indirecta (Daza *et al.* 2002). Este fármaco interactúa e inhibe al

complejo DNA-topoisomerasa I (Rivory y Robert 1995, Morham *et al.* 1996, Du 2003, Thomas *et al.* 2004, Attia *et al.* 2009), evitando la religación del DNA y la reparación del daño generado durante procesos celulares tales como la transcripción y los causados por factores exógenos que modifican la continuidad del material genético. Estos efectos pueden provocar arresto del ciclo celular y/o muerte celular por apoptosis (Morham *et al.* 1996, Du 2003, Attia *et al.* 2009).

¿Por qué disminuyen a las 312h?

Debido a que mientras la CPT se encuentra unida al complejo DNA-topo I, en la célula se podría acumular la proteína p53 que está involucrada en la activación de los mecanismos de reparación de cadena sencilla, entonces cuando este fármaco se disocia del complejo (en un tiempo aproximado de 48 a 72 horas) (Kaneda y Yokokura 1990; Kaneda *et al.* 1990), la excesiva cantidad de p53 sobreactiva e indica a la célula que sus capacidades de reparación se encuentran excedidas (Jaks *et al.* 2001), es por ello que hay menor daño a las 312 h comparado con el tiempo cero.

¿Por qué el V genera rompimientos?

Uno de los principales mecanismos de acción de los metales en general y del vanadio en particular, es la generación de estrés oxidante (Fortoul *et al.* 2011). Estos radicales libres interactúan con el DNA formando rompimientos de cadena sencilla, aductos, modificando a las bases nitrogenadas, formando sitios AP, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos DNA-proteínas y con menor frecuencia rompimiento de cadena doble (Risom *et al.* 2005, Metha *et al.* 2008, Manke *et al.* 2013, Smith *et al.* 2013).

La generación de rompimientos de cadena sencilla del DNA ha sido reportada por Altamirano-Lozano *et al.* (1996), Fortoul *et al.* (2011) quienes observaron este efecto genotóxico en leucocitos de ratones CD-1, así mismo Rojas *et al.* (1996) y Rodríguez-Mercado (2003, 2011) lo observaron en linfocitos humanos.

¿Por qué el V más la CPT genera rompimientos?

Debido a la contribución de ambos compuestos que exceden las expectativas por el efecto sinérgico (Pérez-Pérez *et al.* 2009). El vanadio es un metal capaz de generar ROS por medio de la reacción Fenton, siendo el DNA uno de los principales blancos causando ruptura de cadena sencilla, modificación de las bases, sitios AP, entre otros (Risom *et al.* 2005,

Møller *et al.* 2008, Manke *et al.* 2013). Mientras que la CPT es un alcaloide que interfiere con el complejo DNA-topo I que obstruye la religación del DNA y por ello es capaz de fragmentarlo o generar la muerte celular por apoptosis, intercambio de cromátidas hermanas, entre otros (Rivory y Robert 1995, Natelson *et al.* 1996, Du 2003, Thomas *et al.* 2004, Attia *et al.* 2009, Lee *et al.* 2012)

17.3. Comparación de las curvas

¿Por qué el vanadio no se comporta como la CPT?

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que la cinética de reparación de rompimientos causados por V es distinta a la cinética de reparación de la CPT, debido a que el V no interfiere con la topoisomerasa I (como la CPT), por lo tanto no interfiere con la vía de reparación por escisión de bases (BER), que es el principal mecanismo mediante el cual se reparan los rompimientos de cadena sencilla causados por radicales libres (Ludin *et al.* 2005).

¿Por qué el vanadio se comporta como el DM?

Es posible que el vanadio comparta mecanismo de acción con agentes antitubulina (Smith 1983). Léonard y Gerber (1994) observaron que el vanadio actúa en la célula interfiriendo con enzimas involucradas en la formación del huso, inhibiendo la polimerización de los microtúbulos e interfiriendo con la distribución de los cromosomas durante la mitosis.

¿El vanadio es aneugénico o es clastógeno?

En un modelo sub-agudo se comporta como ambos, como un aneugénico basado en la similitud del comportamiento de la cinética de la reparación y como clastógeno debido a que aumenta la generación de rompimientos de cadena sencilla a partir de las 24 horas por la generación de ROS.

Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Ciranni y colaboradores (1995) en un modelo agudo observaron que el vanadio causa aberraciones cromosómicas numéricas (origen aneugénico) y estructurales (origen clastogénico) así como mayor frecuencia de micronúcleos.

Migliore *et al.* (1993) en un modelo agudo observaron que diversos compuestos de vanadio incrementan las aberraciones numéricas y micronúcleos, todos éstos relacionados con

disfunción del huso mitótico y por los compuestos de vanadio parecen ser más aneugénico que clastogénico.

Zhong *et al.* (1994) en un modelo agudo observaron que el V_2O_5 aumenta el número de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales así como que también disminuye el índice mitótico.

Rodríguez-Mercado (2003) en un modelo agudo observó que el vanadio induce aberraciones cromosómicas.

¿Por qué el vanadio no se comporta como MMS?

Ambos compuestos tienen blancos diferentes en cuanto al mecanismo de acción, el vanadio en un modelo a corto plazo se comporta como un agente aneugénico, es decir que daña al aparato mitótico interfiriendo con enzimas relacionadas en la formación del huso (Léonard y Gerber 1994) o evitar la polimerización de los microtúbulos por el bloqueo de la proteína tubulina y la despolimerización de los mismos (Ramírez *et al.* 1997), a pesar de su capacidad de causar ruptura en el DNA como consecuencia del metabolismo del DM.

En cambio, el MMS genera ruptura del material genético al actuar de manera directa sobre éste al metilar las bases púricas (Lundin *et al.* 2005)

¿Por qué el V solo no se comporta como el V y la CPT juntos?

Debido a que el vanadio no tiene interacción con la topoisomerasa I como la CPT, y debido a que el vanadio y la camptotecina tienen un efecto sinérgico en donde ambos compuestos exceden las expectativas de los compuestos por sí solos (Pérez-Pérez *et al.* 2009). Por lo que nuestros resultados muestran que el vanadio solo no interfiere con los mecanismos de reparación.

18. Conclusiones.

- La cinética del comportamiento de la reparación del vanadio en un modelo sub-agudo es como un aneugénico, sin embargo el vanadio también se comporta como un clastógeno porque daña al DNA por la generación de ROS que causan rompimientos de cadena sencilla.
- El vanadio no interfiere con los mecanismos de reparación de cadena sencilla del DNA.

- La reducción de la capacidad de reparación del daño al DNA es un importante mecanismo para que carcinógenos y pro-carcinógenos puedan causar mutaciones y subsecuentemente cáncer, por lo tanto es importante seguir investigando el potencial genotóxico y el efecto en los mecanismos de reparación del material genético debido a la constante exposición a metales en la atmosfera de manera crónica, especialmente el vanadio.

19. Perspectivas.

- Comparar por sexos el efecto del vanadio en los mecanismos de reparación y observar si los estrógenos de las hembras, presentan una respuesta diferencial.
- Ampliar las poblaciones celulares de diversos tejidos y observar la susceptibilidad al vanadio y el efecto en los mecanismos de reparación.
- Ampliar los tiempos de muestreo y observar el comportamiento los compuestos probados en las enzimas de reparación.

20. Bibliografía.

- Altamirano-Lozano M, Alvarez-Barrera L, Basurto-Alcántara F, Valverde M, Rojas E. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis*. 1996; 6: 7-17.
- Altamirano-Lozano M, Valverde M, Alvarez-Barrera L, Molina B, Rojas E. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis, carcinogénesis and mutagenesis*. 1999; 19: 243-255.
- Amador-Muñoz O, Delgado-Rodríguez A, Villalobos-Pietrini R, Munive-Colín Z, Ortiz-Martelo R, Díaz-González G et al. Partículas suspendidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el suroeste de la Ciudad de México. *Revista Internacional de contaminación ambiental*. 2001; 17: 193-204.
- Aragón MA, Ayala ME, Fortoul TI, Bizarro P, Altamirano-Lozano M. Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. *Reproductive toxicology*. 2005; 20: 127-134.
- Attia SM, Aleisa AM, Balheet SA, Al-Yahya AA, Al-Rejaje SS, Ashour AE, Al-Shabanah AO. Molecular cytogenetic evaluation of the mechanism of micronuclei formation induced by camptothecin, topotecan, and irinotecan. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2009; 50:145-151.
- Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. 2006; 494: 161-172.
- Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Zepeda-Rodríguez A, Antuna SB, Saldivar L, Espejel-Maya G et al. Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation. A mice experimental model. *Neuroscience letters*. 2005; 381: 21-25.
- Avila-Costa MR, Montiel Flores E, Colin-Barenque L, Ordoñez JL, Gutiérrez AL, Niño-Cabrera HG et al. Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocutochemical and cytological approach. *Neurochemical research*. 2004; 29: 1365-1369.
- Barceloux DG. Vanadium. *Clinical toxicology*. 1999; 37(2): 265-278.
- Brauer M, Avila-Casado C, Fortoul TI, Vedal S, Stevens B, Churg A. air pollution and retained particles in the lung. *Environmental health perspectives*. 2001; 109: 1039-1043.
- Bravo HA, Roy-Ocotla GR, Sánchez PA, Torres RJ. Contaminación atmosférica por ozono en la zona metropolitana de la Ciudad de México: evolución histórica y perspectivas. *Rev Coord Gral Estad Postrad* 1991; 23: 39-48.
- Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *THE LANCET*. 2002; 360: 1233-1242.
- Byerrum RU. 1991. Vanadium en Metals and their compounds in the environment.
- Capella LS, Gefé MR, Silva EF, Affonso-Mitidieri O, Lopes AG, Rumjanek VM, Capella MAM. Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2002; 406: 65-72.

- Chang M, Bellaoui M, Boone C, Brown GW. A genome-wide screen for methyl methanesulfonate- sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *PNAS*. 2002; 99 (26): 16934-16939.
- Chappey O, Scherrmann JM. La colchicine: données récentes sur sa pharmacocinétique et sa pharmacologie clinique. *La revue de médecine interne*. 1995; 10; 782-789.
- Ciranni R, Antonetti M, Migliore L. Vanadium salts induce cytogenetic effects in vivo treated mice. *Mutation research*. 1997; 343: 53-60.
- Colín-Barenque L, Martínez-Hernández MG, Baiza-Gutman LA, Avila-Costa MR, Ordóñez-Librado JL, Bizarro-Nevarés P *et al*. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in central nervous system and their modification after vanadium inhalation. *Journal of applied toxicology*. 2008; 28: 718-723.
- Collins AR, Dušinka M, Horváthová E, Munro E, Savio M, Štětina R. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured *in vitro* with comet assay. *Mutagenesis*. 2001; 16: 297-301.
- Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation research*. 2009; 681:24-32.
- Cooper RG. Vanadium pentoxide inhalation. *Indian journal of occupational and environmental medicine*. 2007; 11: 97-102.
- Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, Fernández JL, López-Fernández C, Gosálbez A, Gosálvez J. New application of the comet assay: chromosome-comet assay. *Journal of histochemistry & Cytochemistry*. 2011; 59: 665-660.
- Crans DC, Smee JJ, Gaidamauskas E, Yang L. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chemical reviews*. 2004; 104 (2): 849-902.
- Daza P, Torreblanca J, Moreno FJ. The comet assay differentiates efficiently and rapidly between genotoxins and cytotoxins in quiescent cells. *Cell biology international*. 2004; 28: 497-502.
- Díaz Barriga S, Madrigal-Bujaidar E, Márquez P. Inhibitory effect of nordihydroguaiaretic acid on the frequency of micronuclei induced by methyl methanesulfonate in vivo. *Mutation research*. 1999; 441: 53-58.
- Du W. Towards new anticancer drugs: a decade of advances in synthesis of camptothecins and related alkaloids. *Tetrahedron*. 2003; 59: 8649-8687.
- Ehrlich VA, Nersesyan AK, Hoelzl C, Ferik F, Bichler J, Valic E *et al*. Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: results of a multiple end point study. *Environmental Health Perspectives*. 2008; 116: 1689-1693.
- Eróstegui Revilla CP. Contaminación por metales pesados. *Revista científica ciencia médica. SCEM*. 2009; 12: 45-47.
- Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2002; 42: 249-265.

- Eynard AR, Vanlentich MA, Rovasio RA. Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares. 4 ed. Buenos Aires. Médica Panamericana, 2008: 19.
- Fedorcsák I, Ehrenberg L. Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta chemical scandinavica*.1966; 20: 107-112.
- Ferrer-Carbonell JA, Escalante Semerena RI. Contaminación atmosférica y efectos sobre la salud en la Zona Metropolitana del Valle de México. *Economía Informa*. 2009; 360: 22-39.
- Fortoul TI, Bizarro-Nevarés P, Acevedo-Nava S, Piñón-Zárate G, Rodríguez-Lara V, Colín-Barenque L et al. Ultrastructural findings in murine seminiferous tubules as a consequence of subchronic vanadium pentoxide inhalation. 2007; 23: 588-592.
- Fortoul TI, González-Villava A, Piñón-Zarate G, Rodríguez-Lara V, Montaña LF, Saldivar-Osorio L. Ultrastructural megakaryocyte modification after vanadium inhalation in spleen and bone marrow. *Journal of electron microscopy*.2009; 58: 375-380.
- Fortoul TI, Quan-Torres A, Sánchez I, López IE, Bizarro P, Mendoza ML et al. Vanadium in Ambient Air: Concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City Residents in the 1960s and 1990s. *Archives of environmental health: An International Journal*. 2002; 57:446-449.
- Fortoul TI, Rodríguez Lara V, Gonzalez Villalva A, Rojas Lemus M, Cano Gutierrez G, Ustarroz Cano M et al. Vanadium Inhalation in a mouse model for the understanding of air suspended particle system repercussion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011; 2011: 1-11
- Galaris D, Evangelou A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2002; 42: 93-103.
- Geyikoglu F, Turkez H. Boron compounds reduce vanadium tetraoxide genotoxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2008; 26: 342-347.
- González-Villalva A, Fortoul Ti, Avila-Costa MR, Piñón-Zarate G, Rodríguez-Lara V, Martínez-Levy G et al. Thrombocytosis induced in mice after subacute and subchronic V₂O₅ inhalation. *Toxicology and industrial health*. 2006; 22: 113-116.
- González-Villalva A, Rodríguez-Lara V, Montaña LF, Lima-Melo A, Ramírez G, Fortoul TI. Blood changes generated after vanadium inhalation. *Current topics in toxicology*. 2009; 6:31-38.
- Gummow, Bruce. *Vanadium: environmental pollution and health effects*. En: Nriagu, Jerome O. *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier.2011. p 628-636.
- Günter S, Schütz P. The effect of inhibited replication on DNA migration in the comet assay in relation to cytotoxicity and clastogenicity. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*. 2008; 655: 22-27.
- Gutiérrez- Castillo ME, Roubicek DA, Cebrián-García ME, De Vizcaya-Ruiz A, Sordo-Cedeño M, Ostrosky-Wegman P. Effect of chemical composition on the induction of

DNA damage by urban particulate matter. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2006; 47: 199-211.

- Heinz A, Rubinson KA, Grantham JJ, 1982. The transport and accumulation of oxovanadium compounds in human erythrocytes in vitro. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1982; 100 (4): 593-612
- Hennig UGG, Rudd NL, Hoar DI. Kinetochore immunofluorescence in micronuclei: a rapid method for the in situ detection of aneuploidy and chromosome breakage in human fibroblast. *Mutation research*. 1988; 203: 405-414.
- Hsun L, Chang TW, Tsai YC, Chu SF, Wu YY, Tzang BS *et al*. Colcemid inhibits the rejoining of the nucleotide excision repair of UVC-induced DNA damages in Chinese hamster ovary cells. *Mutation research*. 2005; 588: 118-128.
- IARC (1974). Methyl methanesulfonate. International Agency for Research on Cancer.
- IARC (2006). Vanadium pentoxide. International Agency for Research on Cancer.
- Instituto Nacional de Ecología (INE). Capítulo 4: Partículas suspendidas, 2012. Disponible en www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/517/cap4.pdf.
- Jaks V, Jöers A, Kristjuhan A, Maimets T. p53 protein accumulation in addition to the transactivation activity is required for p53-dependent cell cycle arrest after treatment of cells with camptothecin. *Oncogene*. 2001; 20: 1212-1219.
- Jomova K, Valko M. Advance in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011; 283:65-87.
- Kaneda N, Nagata H, Furuta T, Yokokura T. Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. *Cancer research*. 1990; 50: 1715-1720.
- Kaneda N, Yokokura T. Nonlinear pharmacokinetics of CPT-11 in rats. *Cancer research*. 1990; 50: 1721-1725.
- Katsouyanni K. Ambient air pollution and health. *British Medical Bulletin*. 2003; 68: 143-156.
- Lee WL, Shiao JY, Shyur LF. Taxol, camptothecin and beyond for cancer therapy. *Advances in botanical research*. 2012; 62: 134-178.
- Lee-Chen SF, Gurr JR, Lin IB, Jan KY. Arsenite enhances DNA double-strand breaks and cell killing of methyl methanesulfonate-treated cells by inhibiting the excision of alkali-labile sites. *Mutation research, DNA repair*. 1993; 294: 21-28.
- Léonard A, Gerber GB. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutation research*. 1994; 317: 81-88.
- Li H, Chang TW, Tsai YC, Chu SF, Wu YY, Tzang BS *et al*. Colcemid inhibits the rejoining of the nucleotide excision repair of UVC-induced DNA damages in Chinese hamster ovary cells. *Mutation research*. 2005; 588:118-128.
- Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman ASH, Helleday T. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but o

- detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*. 2005; 33 (12):3799-3811.
- Macara IG, McLeod GC, Kustin K. Isolation, properties and structural studies on compound from tunicate blood cells that may be involve in vanadium accumulation. *Biochemical Journal*. 1979; 181: 457-465.
 - Machado A, García N, García C, Acosta L, Córdova A, Linares M, Giraldoth D, Velásquez H. Contaminación por metales (Pb, Zn, Ni Y Cr) en aire, sedimentos viales y suelo en una zona de alto tráfico vehicular. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*. 2008; 24: 171-182.
 - Mage D, Ozolins G, Peterson P, Webster A, Orthofer R, Vandeweerd V, Gwynne M. Urban air pollution in megacities of the world. *Atmospheric environment*.1996; 30:681-686.
 - Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*. 2013; 2013:1-15.
 - Mayer H. Air pollution in cities. *Atmospheric environment*.1999; 33:4029-4037.
 - Mayor-Oxilia R. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Instituto de Medicina Tropical*. 2010; 2: 23-29.
 - Mehta M, Chen LC, Gordon T, Rom W, Tang M. Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutation research*. 2008; 657:116-121.
 - Migliore L, Bocciardi R, Macrì C, Lo Jacono F. Cytogenetic damage induced in humen lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus by florescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*. 1993; 319: 205-213.
 - Molina LT, Molina MJ. Air quality in the Mexico megacity. An integrated assessment. *Eure*. 2006; XXXII: 141-145.
 - Molina LT, Molina MJ. Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the air & waste management association*. 2004; 54 (6): 644-648.
 - Møller P, Folkmann JK, Forchhammer L, Bräuner EV, Danielsen PH, Risom L, Loft S. Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Letters*. 2008; 266:84-97.
 - Møller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2006; 98: 336-345.
 - Montiel-Dávalos A, Gonzalez-Villalva A, Rodríguez-Lara V, Montaña LF, Fortoul TI, López-Marure R. Vanadium pentoxide induces activation and death of endothelial cells. *Journal of applied toxicology*. 2011; 32: 26-33.
 - Morham SG, Kluckman KD, Voulomanos N, Smithies O. Target disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. *Molecular and cellular biology*.1996; 16: 6804-6809.
 - Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. Vanadium-an element of atypical biological significance, *Toxicology letters*. 2004; 150: 135-143.

- Mukherjee B, Halder S, Ghosh MK, Manasadeepa R. Vanadium ions and proteins, distribution, metabolism, and biological significance. *Encyclopedia of Metalloproteins*. 2013; 2306-2316.
- Mussali-Galante P, Avila-Costa MR, Piñón-Zarate G, Martínez-Levy G, Rodríguez-Lara V, Rojas-Lemus M, et al. DNA damage as an early biomarker of effect in human health. *Toxicology and industrial health*. 2005; 21: 155-166.
- Natelson EA, Giovanella CG, Verschraegen CF, Fehir KM, Ipolyi PD, Harris N, Stehlin JS. Phase I clinical and pharmacological studies of 20-(S)-camptothecin and 20-(S)-9-nitrocamptothecin as anticancer agents. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996; 803: 224-230.
- Niel E, Scherrmann JM. Colchicine today. *Joint bone spine*. 2006; 73: 672-678.
- Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*. 2006; 1:23-29.
- Pérez-Pérez JM, Candela H, Micol JL. Understanding synergy in genetic interactions. *Trends in genetics*. 2009; 25(8): 368-376.
- Pizzolato JF, Saltz LB. The camptothecins. *The lancet*. 2003; 361: 2235-2242.
- Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J, Johnson GT. Cell biology. 2da ed. Philadelphia. Elsevier. 2010
- Ramírez P, Eastmond DA, Lacleste JP, Ostrosky-Wegman P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation research*. 1997; 386: 291-298.
- Rehder D. Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorganic Chemistry Communications*. 2003; 6:604-617.
- Rieder CL, Palazzo RE. Colcemid and the mitotic cycle. *Journal of cell science*. 1992; 102: 387-392.
- Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation research*. 2005; 592:119-137.
- Rivero-Rosas H, Pfeifer GD, Lynam DR, Pedroza JL, Julián-Sánchez A, Canales O, Garfias J. Personal exposure to elements in Mexico City air. *The science of total environmental*. 1997; 198: 79-96.
- Rivory LP, Robert J. Molecular, cellular, and clinical aspects of the pharmacology of 20(S) camptothecin and its derivatives. *Pharmacology & therapeutics*. 1995; 68:269-296.
- Rodríguez-Mercado JJ, Roldán-Reyes E, Altamirano-Lozano MA. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells, *Toxicology letters*. 2003; 144: 359-369.
- Rodríguez-Mercado JJ, Altamirano-Lozano MA. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 2006; 22: 173- 189.

- Rodríguez-Mercado JJ, Mateos-Nava A, Altamirano-Lozano MA. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicology in vitro*. 2011; 25: 1996-2002.
- Rodríguez-Mercado JJ, Roldán-Reyes E, Altamirano-Lozano M. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology letters*. 2003; 144:359-369.
- Rojas E, Valverde M, Herrera LA, Altamirano-Lozano M, Ostrosky-Wegman P. Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutation research*. 1996; 359: 77-84.
- Rojas-Lemus M, Altamirano-Lozano M, Fortoul TI, Sex differences in blood genotoxic and cytotoxic effects as a consequence of vanadium inhalation: micronucleus assay evaluation. *Journal applied toxicology*. 2014; 34(3): 258-264.
- Roldán E, Altamirano-Lozano MA. Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellites association in human lymphocytes culture exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 245: 61-65.
- Roubicek DA, Gutiérrez-Castillo ME, Sordo M, Cebrián-García ME, Ostrosky-Wegman P. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutation Research*. 2007; 631: 9-15.
- Schneider BM, Würzler FE, Romagna F. Distinct area distribution differences of micronuclei induced by clastogenic and aneuploidogenic chemicals in the bone marrow of the CD-1 mouse. *Mutation research*. 1995; 334: 81-89.
- Schwartz TR, Kmiec EB. Using methyl methanesulfonate (MMS) to stimulate targeted gene repair activity in mammalian cells. *Gene therapy and molecular biology*. 2005; 19: 193-202.
- Secretaría del Medio Ambiente (SMA). Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM 2008. 2010
- Sega GA, Owens JG. Methylation of DNA and protamine by methyl methanesulfonate in the germ cells of male mice. *Mutation research*. 1983; 11: 227-244.
- Seo YR, Fishel ML, Amundson S, Kelley MR, Smith ML. Implication of p53 in base excision DNA repair: *in vivo* evidence. *Oncogene*. 2002; 21: 731-737.
- Smith JA, Park S, Krause JS, Banik NL. Oxidative stress, DNA damage, and telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Neurochemistry internacional*. 2013; 62: 764-775.
- Snustad PD., Simmons MJ. Principles of genetics. 4ta ed. John Wiley & Sons, inc. 281-283, 296.
- Speit G, Schütz P. The effect of inhibit replication on DNA migration in the comet assay in relation to cytotoxicity and clastogenicity. *Mutation research*. 2008; 655: 22-27.
- Stang A, Witte I. The ability of the high-throughput comet assay to measure the sensitivity of five cell lines toward methyl methanesulfonate, hydrogen peroxide, and

- pentachlorophenol. *Mutation research/ Genetic toxicology and environmental mutagenesis*. 2010; 701: 103-106.
- Stemmler AJ, Burrows CJ. Guanine versus deoxyribose damage in DNA oxidation mediated by vanadium (IV) and vanadium (V) complexes. *Journal of biological inorganic chemistry*. 2001; 6(1):100-106.
 - Strauss GH. Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests. *Mutation research*. 1991; 252: 1-15.
 - Sugiyama C, Miyamae Y, Kobayashi H, Fujino Y, Mori M, Ohara K. The micronucleus test of methyl methanesulfonate with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation research*. 1992; 278: 117-120.
 - Thomas CJ, Rahier NJ, Hecht SM. Camptothecin: current perspectives. *Bioorganic & Medicinal chemistry*. 2004; 12: 1585-1604.
 - Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H *et al*. Single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2000; 36: 206-221.
 - Tseng C-Y, Mane JY, Winter P, Johnsin L, Huzil T, Elzbieta I, Luduena RF, Tuszynski. Quantitative analysis of the effect of tubulin isotype expression on sensitivity of cancer cell lines to a set of novel colchicines derivatives. *Molecular cancer*. 2010; 9: 131,
 - Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal-chemistry*. 2005; 12: 1161-1208.
 - Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006; 160: 1-40.
 - Vallejo M, Jáuregui-Renaud K, Hermsillo AG, Márquez MF, Cárdenas M. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica de México*. 2003; 139: 57-63.
 - Wang L, Jiang H, Su L, Tang B, Li D, Li Z. Effects of colchicine or demecolcine on cytoplasmic protrusions and assisted enucleation of golden hamster oocytes. *Cell biology international*. 2009; 33: 1274-1279.
 - Weinheim, Germany: VCH, 1289-1297.
 - Williams JPG. Inhibition of embryonic deoxyribonucleic acid synthesis by colcemid. *European journal of pharmacology*. 1968; 3: 337-3340.
 - World Health Organization (WHO). Particulate matter air pollution: how it harms health. 2005.
 - Yeste-Velasco M, Alvira D, Sureda FX, Rimbau V, Forsby A, Pallàs M *et al*. DNA low-density array analysis of colchicine neurotoxicity in rat cerebellar granular neurons. *Neurotoxicology*. 2008; 29: 309-317.
 - Zhong BZ, Gu ZW, Wallace WE, Whong WZ, Ong T. Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutation research*. 1994; 321: 35-42.