



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CINÉTICA DE LA REPARACIÓN DE
ROMPIMIENTOS DE CADENA SENCILLA DE DNA
INDUCIDOS POR INHALACIÓN DE VANADIO EN
RATONES HEMBRA DE LA CEPA CD-1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JAVIER ANCONA TORRES



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARCELA ROJAS LEMUS**

Ciudad Universitaria, CDMX



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.

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito.

Título

Número de páginas

Año

1. Datos del alumno

Ancona
Torres
Javier
21 61 24 72
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309043126

2. Datos del tutor

Dra
Marcela
Rojas
Lemus

3. Datos del sinodal 1

Dra
Sandra Luz
Gómez
Arroyo

4. Datos del sinodal 2

Dr
Mario Agustín
Altamirano
Lozano

5. Datos del sinodal 3

Dra
Teresa Imelda
Fortoul
van der Goes

6. Datos del sinodal 4

M en C
Martha Patricia
Bizarro
Nevares

7. Datos del trabajo escrito

Cinética de la reparación de rompimientos de cadena sencilla de DNA inducidos por inhalación de vanadio en ratones hembra de la cepa CD-1

39 p

2016

Índice

1. Introducción.....	8
1.1. Contaminación atmosférica.....	8
1.1.2. Contaminación en la Ciudad de México.....	8
1.2. Partículas suspendidas: composición y efectos sobre la salud.....	9
1.3. Vanadio.....	10
1.3.1. Exposición y efectos sobre la salud.....	11
1.3.2. Vanadio y daño a las biomoléculas.....	13
1.3.3. Vanadio y genotoxicidad.....	13
1.4. Pruebas para detectar genotoxicidad.....	14
1.4.1. Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa pH>13).....	14
1.5. Testigos de efecto genotóxico.....	15
1.5.1. Camptotecina.....	15
1.5.2. Metil Metano Sulfonato.....	15
1.5.3. Demecolcine.....	16
1.6. Daño diferencial entre machos y hembras.....	16
2. Justificación.....	17
3. Objetivos.....	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos particulares.....	18
4. Método.....	18
4.1. Grupos experimentales.....	18
4.2. Citología Exfoliativa Vaginal.....	18
4.3. Administración de Fármacos.....	18
4.3.1. Administración de Anastrozol.....	18
4.4. Inhalación de Vanadio.....	19
4.5. Testigos de efecto genotóxico.....	19
4.6. Toma de muestras.....	19
4.7. Técnicas experimentales.....	19
4.7.1. Citología Exfoliativa Vaginal.....	19
4.7.2. Viabilidad celular por fluorocromos.....	21
4.7.3. Electroforesis unicelular alcalina.....	21
4.8. Análisis Estadístico.....	22
5. Resultados.....	23
5.1. Viabilidad celular.....	23
5.2. Ensayo Cometa.....	23
5.2.1. Testigo.....	23
5.2.2. Anastrozol.....	23
5.2.3. Metil Metano Sulfonato.....	24
5.2.4. Camptotecina.....	24
5.2.5. Demecolcine.....	25
5.2.6. Vanadio.....	25
5.2.7. Vanadio+Anastrozol.....	25
5.3. Comparación entre grupos experimentales.....	26

5.3.1. Testigo vs Anastrozol.....	26
5.3.2. Testigo vs Vanadio.....	26
5.3.3. Vanadio vs Vanadio+Anastrozol.....	26
5.3.4. Vanadio vs Metil metano sulfonato.....	27
5.3.5. Vanadio vs Demecolcine.....	27
5.3.6. Vanadio vs Camptotecina.....	27
6. Resumen de resultados.....	28
6.1. Testigo.....	28
6.2. Anastrozol.....	28
6.3. MMS.....	28
6.4. Camptotecina.....	28
6.5. Demecolcine.....	28
6.6. Vanadio.....	28
6.7. Vanadio+Anastrozol.....	28
6.8. Comparación de curvas.....	29
6.8.1. Testigo vs Anastrozol.....	29
6.8.2. Testigo vs Vanadio.....	29
6.8.3. Vanadio vs Vanadio+Anastrozol.....	29
6.8.4. Vanadio vs MMS.....	29
6.8.5. Vanadio vs Demecolcine.....	29
6.8.6. Vanadio vs Camptotecina.....	29
7. Discusión.....	30
8. Implicaciones del comportamiento.....	32
9. Conclusión.....	32
10. Objetivos a futuro.....	33
11. Bibliografía.....	33

AGRADECIMIENTOS

- A mi tutora:
 - Dra. Marcela Rojas Lemus

- Al comité revisor de esta tesis:
 - Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
 - Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
 - Dra. Marcela Rojas Lemus
 - Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
 - Dra. Martha Patricia Bizarro Nevaes

- Al Biól. Armando Zepeda Rodríguez y al Biól. Francisco Pasos Nájera, del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. Por su apoyo incondicional en la parte fotográfica.

- Al Dr. Enrique Pinzón Estrada y al Dr. Ismael Torres Saldaña, personal del bioterio de la Facultad de Medicina por su gran apoyo en la obtención, cuidado y manejo de los animales experimentales.

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

- 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.

Esta tesis está dedicada a

A mi madre por el apoyo incondicional que me ha brindado durante toda mi vida.

A mis amigos del Laboratorio por sacar risas a cada momento y por siempre hacer mi tiempo en el taller una de las mejores experiencias que he tenido.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias por despertar en mí el interés por la investigación y por mostrarme que cuando te dedicas a lo que te apasiona puedes crear una diferencia.

Resumen

El vanadio es un contaminante ambiental que afecta a las biomoléculas. La acción del vanadio se asocia con la generación de especies reactivas de oxígeno las cuales inducen estrés oxidante. Las biomoléculas sufren las consecuencias de la acción del estrés oxidante: ejemplos de ello son los daños provocados al DNA como rompimientos de cadena sencilla y modificación de bases nitrogenadas. Para mitigar estas lesiones, la célula posee mecanismos de reparación de DNA que son específicos para cada tipo de daño. Entre los mecanismos de reparación se destaca la escisión de bases, pues es el principal encargado de corregir el daño ocasionado por estrés oxidante.

En diversos estudios, se ha observado que existe daño diferencial entre machos y hembras, pues éstas generan menor cantidad en comparación con los machos, esto se atribuye a las cualidades que poseen los estrógenos, que es la hormona sexual más abundante en las hembras adultas.

En este trabajo se evalúa la relación entre el vanadio y los mecanismos de reparación de cadena sencilla (en particular la topoisomerasa I), así como la relación que guardan los estrógenos con la menor cantidad de daño que se observa en hembras.

Para esto se utilizaron 35 ratones hembra de la cepa CD-1, de 30-35 g de peso y de 60 días de edad, los cuales se dividieron en 7 grupos experimentales: Control, Anastrozol (acción de los estrógenos inhibida), Vanadio, Vanadio+Anastrozol, Camptotecina, Metilmetano sulfonato y Demecolcine (Controles positivos). Se expusieron a pentóxido de vanadio 0.02 M, y se tomaron muestras de sangre a las 0, 24, 48, 72, 144, 192, 240 y 312 horas post-exposición. Se realizó la electroforesis unicelular alcalina para detectar migración de fragmentos de DNA (Ensayo Cometa), y se realizaron las curvas de daño-tiempo de reparación.

Se observó que el grupo anastrozol no tuvo diferencia con los grupos control, vanadio, vanadio+anastrozol y camptotecina. Estos resultados nos ayudan a clarificar que los estrógenos (presencia o ausencia), no tienen relación directa con la generación de daño al DNA y que el vanadio interfiere con la topoisomerasa I. De igual manera en comparación con datos obtenidos en machos utilizando el mismo modelo, se observó que el vanadio tiene un comportamiento diferente, pues en machos genera daño de tipo aneugénico y clastogénico y en las hembras este metal es clastógeno y a su vez es un inhibidor de la topoisomerasa I, que es la principal encargada de reparar el daño ocasionado por estrés oxidante. Este comportamiento diferencial podría tener repercusiones importantes, pues la no reparación o reparación errónea del daño al DNA, aumenta la susceptibilidad a que otros agentes generen también genotoxicidad, lo que incrementaría la inestabilidad del DNA y podría iniciarse la transformación celular de manera más rápida

Cinética de la reparación de rompimientos de cadena sencilla de DNA inducidos por inhalación de vanadio en ratones hembra de la cepa CD-1

1. Introducción

1.1. 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 degeneración del ecosistema (Vallejo *et al.* 2003).

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. Estos últimos se han incrementado rápidamente debido a la industrialización y la urbanización (Mayer 1999, Vallejo *et al.* 2003, Molina y Molina 2004, INECC 2012).

Los contaminantes atmosféricos se clasifican por su origen en:

- Contaminantes primarios: 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, óxidos de nitrógeno, hidrocarburos y partículas suspendidas (Vallejo *et al.* 2003, INECC 2012).
- Contaminantes secundarios: son originados en la atmósfera por la interacción química o fotoquímica de dos o más contaminantes primarios, por ejemplo: ozono, sulfatos y nitratos (Vallejo *et al.* 2003).

1.1.2. Contaminación en la Ciudad de México

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) comprende a la Ciudad de México y a 59 municipios del Estado de México (INECC 2012). 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 tanto, de los servicios, existe una enorme demanda de energía y de transporte lo que ha generado importantes consecuencias en la atmósfera (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 2.7 millones provienen de los vehículos, 35 000 de las industrias y servicios y el restante de otras fuentes como suelos y 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 al 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, INECC 2012).

1.2. Partículas suspendidas: composición y efectos sobre la salud

Las partículas suspendidas (PS) son una compleja mezcla de materias sólidas, líquidas o ambas, 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 que se encuentran 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 vehículos 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 considera como partículas inhalables a las que tienen un diámetro igual o menor a 10 μm (Vallejo *et al.* 2003) y se clasifican en (INECC 2012):

- Partículas burdas 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, INECC 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 éstas pueden penetrar hasta los alveolos pulmonares en donde se depositan. Son originadas por las fuentes móviles, la producción de materiales de construcción, y por productos derivados de la combustión particularmente diesel e incluyen carbón, dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno, plomo y vanadio (Vallejo *et al.* 2003, SMA 2010, INECC 2012).
- Partículas ultrafinas son aquellas que tienen un diámetro aerodinámico menor a 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, INECC 2012).

Los efectos sobre la salud de las PS dependen de su tamaño y de su composición química. 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 de 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 por insuficiencia respiratoria; en los adultos mayores se asocia con el aumento de muertes por enfermedades respiratorias, complicaciones

cardiovasculares y cáncer de pulmón (WHO 2005, González-Villalba *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.* 2006, 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 aumento en la cantidad y la antigüedad de los vehículos 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).

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 manera natural en la corteza terrestre, sin embargo pueden convertirse en contaminantes si su distribución en el ambiente aumenta. Debido a las actividades humanas, se liberan al ambiente durante procesos como la extracción de minerales, el refinamiento de productos mineros, actividad industrial y emisiones vehiculares (INECC 2012).

Los metales que se encuentran con mayor frecuencia como contaminantes en el aire son 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, INECC 2012).

1.3. Vanadio

El vanadio se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre, 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 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, el carbón y los aceites pesados (Fortoul *et al.* 2002, IARC 2006, Gummow 2011).

Los usos del vanadio incluyen la obtención de aleaciones para 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 las aleaciones de metal-carbón; 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 han sido propuestos 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).

Las principales fuentes de emisión atmosférica del vanadio son:

- Naturales, como el polvo continental, las emisiones volcánicas, incendios forestales y los aerosoles marinos (Barceloux 1999, Gummow 2001).
- Antropogénicas, como actividades en la industria metalúrgica y la quema de combustibles fósiles (Barceloux 1999, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Se ha estimado que cerca de 110 000 toneladas de V son liberadas a la atmósfera anualmente (Mukherjee *et al.* 2013). De estas emisiones se considera 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 las condiciones de urbanización, entre otras variables (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 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 2002 y 2003). Se estima que este metal alcanza valores de $0.114 \mu\text{m}/\text{m}^3$ en PM_{10} y $0.093 \mu\text{m}/\text{m}^3$ en $\text{PM}_{2.5}$ (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 *et al.* (2002) realizaron un estudio en el que se observó mayor presencia de vanadio en tejido pulmonar de habitantes de la década de los 90 comparadas con muestras de residentes de los 60.

1.3.1. Exposición y efectos sobre la salud

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, el tiempo de exposición y de la capacidad de las enzimas encargadas de desintoxicar al organismo (Barceloux 1999, Fortoul *et al.* 2002, 2011).

- Vía oral:

El vanadio se encuentra en los 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 halla disuelto en forma pentavalente, en agua dulce se han localizado 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 de ellos 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, carne y pimienta negra (Mukherjee *et al.* 2004, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

- 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 de hasta 90%. 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, Léonard y Gerber 1994, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006, Gummow 2011).

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 aproximadamente 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.* 2003) y una vez dentro de la célula es reducido de [V(V)] a [V(IV)] (Rodríguez-Mercado *et al.* 2003) por reductores biológicos, principalmente por el glutatión intracelular y el ácido ascórbico (Evangelou 2002, Rodríguez-Mercado *et al.* 2003).

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).

El vanadio se acumula en 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, tiroides, el cerebro, el musculo esquelético, la médula ósea y el tejido adiposo. Los órganos y tejidos 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.* 2003).

La mayor parte del vanadio absorbido es rápidamente desechado principalmente por 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.* 2003, 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 las siguientes 40 a 50 días la otra parte (Rodríguez-Mercado *et al.* 2003).

1.3.2. Vanadio y daño a las biomoléculas

El vanadio es capaz de modificar la actividad de numerosas enzimas como la (Na⁺, K⁺)-ATPasa, la tirosina cinasa, fosfatasa, 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 de 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 de hidroxilo (-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).

1.3.3. Vanadio y genotoxicidad

El principal mecanismo de acción del vanadio es a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por la activación de las MAP cinasas que pueden fosforilar diversas enzimas tales como la ERK 1 y 2, resultando en la activación de distintas vías de señalización (Fortoul *et al.* 2011) y radicales libres hidroxilo (-OH) que dan inicio a la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Ávila-Costa *et al.* 2004). Los radicales libres 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 de daño cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radicales des-ionizantes. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes causa efectos tóxicos y la producción de radicales libres 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 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 radicales libres causan el daño al DNA; pueden formar aductos, rompimientos de cadena sencilla, modificación de bases nitrogenadas, formación de sitios apúricos y apririmídicos (sitios AP), entrecruzamientos DNA-proteínas, sitios sensibles al álcali y con menor frecuencia, ruptura de cadena doble. Los efectos genotóxicos pueden ser provocados por la interacción directa de los xenobioticos (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).

Sin embargo, la célula cuenta con diversos mecanismos de reparación, los cuales son esenciales para el mantenimiento de las funciones adecuadas. Estos mecanismos de reparación constan de cuatro pasos principales que son la detección, donde se reconoce la sección del DNA dañada; escisión, en la que 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, 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 y Simmons 2012).

1.4. 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 (Fenech 2000).
- 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 (Tice *et al.* 2000).

1.4.1. 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 poca cantidad de muestra que requiere (de 10 000 a 50 000 células), es una técnica poco invasiva si se trabaja con sangre periférica, se puede aplicar en muestras frescas o congeladas, además es de fácil y de rápida realización (Tice *et al.* 2000).

Esta técnica consiste en embeber células en geles de agarosa, lisarlas en una solución rica en detergentes, posteriormente el DNA expuesto es sometido a electroforesis bajo condiciones alcalinas (pH>13), este se neutraliza, se fija con etanol absoluto y por último se fluorocromiza con fluorocromos. La apariencia final asemeja un cometa: la cabeza, que está formada por DNA intacto y la cola por los fragmentos (Mussali-Galante *et al.* 2005).

Dependiendo de la variante utilizada, esta prueba permite detectar 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).

Una de las ventajas más importantes al utilizar el ensayo cometa para detectar el daño al DNA, es que esta técnica es poco invasiva (si se realiza con sangre periférica) por lo que permite seguir al mismo individuo a lo largo del tiempo. Además, ofrece la posibilidad de observar la cinética de daño y reparación del material genético de los sujetos experimentales. Esta aplicación del ensayo cometa fue propuesta por Rodríguez-Mercado *et al.* (2011).

1.5. Testigos de efecto genotóxico

Son fármacos de los cuales se conoce el comportamiento y mecanismos de acción, y que en este trabajo se utilizaron para comparar la cinética de reparación y comportamiento del vanadio.

1.5.1. 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 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, Attia *et al.* 2009).

La CPT interfiere con el complejo formado por DNA-Topoisomerasa 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).

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

1.5.2. 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 Enhrenberg 1996, Chang *et al.* 2002).

El MMS es capaz de modificar la guanina a 7-metilguanina y la adenina a 3-metiladenina 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 reparación por escisión de bases (BER) (Sugiyama *et al.* 1992, Fedorcsák y Ehrenberg 1996). EL MMS es excretado como CO₂ a partir de las 30-48 horas (Schwartz y Kmiec 2005).

1.5.3. Demecolcine

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

El demecolcine se une a la tubulina 6 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 aneuploidias (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. Sin embargo se ha observado que una vez excretado, 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 (Hsun *et al.* 2005, Günter y Schütz 2008).

1.6. Daño diferencial entre machos y hembras

Existen una gran cantidad de estudios sobre los efectos tóxicos y genotóxicos de diversos compuestos, se ha observado que estos afectan de manera diferente a hombres y mujeres, o hembras y machos en el caso de modelos biológicos. Estas respuestas diferenciales pueden variar tanto en cinética, mecanismo de acción o susceptibilidad (Rojas-Lemus *et al.* 2014). Bajpayee *et al.* (2002) realizaron un estudio en hombres y mujeres sanos de la India que estudiaban la misma carrera y tenían hábitos iguales o muy parecidos, donde se evaluó, en leucocitos, el daño genotóxico que presentaba cada uno. Se demostró que existe una menor cantidad de daño en las mujeres en comparación de los hombres. De igual manera se ha observado daño en el DNA en células tanto del epitelio nasal como en leucocitos, así como un aumento en el porcentaje de metaplasias escamosas en el epitelio nasal en los hombres en comparación con las mujeres (Fortoul *et al.* 2004).

En ratas wistar se ha descrito que la mitocondria de los machos genera 4 veces más daño oxidante en comparación con las hembras, y que en hembras ovariectomizadas estos niveles son más parecidos a los de los machos. En este estudio también se encontró que las hembras poseen mayor expresión y actividad de Mn-superoxido dismutasa y glutatión peroxidasa, por lo que una mayor cantidad de antioxidantes podría evidenciar una menor susceptibilidad al daño ocasionado por radicales libres (Borrás *et al.* 2003).

En un modelo murino de inhalación de V_2O_5 se encontró que las hembras presentan una disminución significativa de rompimientos de cadena sencilla en células de médula ósea a partir de las 3 semanas de exposición en comparación con los machos (Pérez-De Gante 2009). Con este mismo modelo Rojas-Lemus en 2004 evaluó la incidencia de micronúcleos en machos, hembras y hembras con estrógenos inhibidos, observó que las hembras con estrógenos inhibidos y los machos tienen comportamientos muy similares y, en comparación con las hembras, presentan una mayor incidencia de micronúcleos.

La respuesta diferencial al daño genotóxico se ha relacionado con una gran variedad de factores tales como el sexo, el estilo de vida y la alimentación; se considera que las mujeres se ven menos afectadas por los daños debido a la presencia de estrógenos, ya que éstos están involucrados en la expresión de proteínas antiapoptóticas y pueden ser antioxidantes (Hofer *et al.* 2006).

La importancia que poseen los estrógenos no solo se limita a su potencial antioxidante, sino también a su conocida relación con una gran variedad de afecciones tales como el cáncer. Se ha correlacionado a los estrógenos como factor que interviene en el desarrollo de cáncer de mama (Noriega-Reyes y Langley-McCarron 2008). Debido a esta correlación se han desarrollado fármacos que se utilizan ampliamente para su tratamiento debido a la capacidad que poseen de inhibir la formación de los estrógenos atacando de manera selectiva a la aromatasa, que es la enzima encargada de realizar el último paso en la serie de reacciones que se llevan a cabo durante la síntesis de los esteroides (Brodie *et al.* 1999). Uno de los fármacos más utilizados para la inhibición de dicha enzima es el anastrozol debido a su mayor afinidad por la aromatasa (Buzdar 2001), su capacidad de reducir los niveles de estrógeno e inhibir la aromatización periférica en pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama (Brodie y Njar 2000, Buzdar *et al.* 2002).

En diversos estudios se ha comprobado la eficacia que tiene el anastrozol para la inhibición de la formación de estrógenos, por lo que resulta un excelente fármaco para la evaluación de la participación de los estrógenos en diversos procesos tales como la reparación de daño al DNA, a través de la inhibición de los mismos.

La mayor parte de los estudios en los que se evalúa la respuesta diferencial al daño genotóxico, se han llevado a cabo en humanos. Los estudios experimentales sobre genotoxicidad, muestran que las hembras son menos susceptibles al daño en el DNA. Sin embargo, no está clara la participación de los estrógenos en la menor susceptibilidad que presentan las hembras, o si están implicados en la eficiencia de la reparación o en el tipo de daño que se genera.

2. Justificación

Debido a que el vanadio es un agente que causa genotoxicidad, resulta de vital importancia estudiar si los mecanismos de reparación están involucrados en la respuesta al daño genotóxico ocasionado por inhalación de este metal y la implicación de los estrógenos en la reparación de daño temprano al DNA pues si este daño no es reparado puede llevar a inestabilidad cromosómica, la cual se relaciona con transformación celular y procesos carcinogénicos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar la cinética de reparación de rompimientos de cadena sencilla del DNA inducidos por inhalación de vanadio.

3.2. Objetivos particulares

- 1.- Evaluar el papel de los estrógenos en la cinética de reparación de rompimientos de cadena sencilla, mediante la inhibición de los mismos.
- 2.- Determinar el comportamiento del vanadio en hembras de ratón, comparando la curva con la de los testigos de efecto genotóxico.

4. Método

4.1. Grupos experimentales

Se utilizaron 35 ratones hembra de la cepa CD-1 con un peso de 30-35 g y 60 días de edad. Los 35 individuos se mantuvieron en un periodo de luz-oscuridad de 12 horas, respectivamente, alimentados con Rodent Laboratory Chow y con agua *ad libitum*. Se dividieron en 7 grupos experimentales de 5 individuos cada uno (Testigo, Anastrozol, Vanadio, Vanadio+Anastrozol, Camptotecina, Metil metano sulfonato y Demecolcine).

4.2. Citología Exfoliativa Vaginal

En todos los grupos se llevó a cabo la técnica de citología exfoliativa vaginal de acuerdo con Rojas-Lemus (2014). Se realizó un lavado vaginal con 20 μ L de amortiguador de fosfatos (PBS) a temperatura corporal vaginal (37°C). Se recuperó el amortiguador con la muestra que se tiñó con 20 μ L de azul de metileno (al 0.1%) y se observó con el microscopio de campo claro (Olympus CH30) en aumento total de 40X. Se evaluó la presencia de células escamosas y células nucleadas que son los tipos celulares característicos de las etapas del ciclo estral con mayor presencia de estrógenos (estro y proestro).

4.3. Administración de Fármacos

4.3.1. Administración de Anastrozol

A los grupos Anastrozol y Vanadio+Anastrozol se les administró Anastrozol a una dosis de 20mg/kg para inhibir la producción de estrógenos, de acuerdo con la dosis administrada por Rojas-Lemus en 2014, pues este fármaco evita que el estradiol se una a la aromatasa y se transforme en estrógeno. Posteriormente se realizó citología exfoliativa vaginal para corroborar que no presentaran estro y proestro.

4.4. Inhalación de Vanadio

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 conectada a un ultranebulizador UltraNeb 99 con flujo continuo de 10 L/min de la solución de V₂O₅ (0.02 M), inhalando 1 hora por 3 días consecutivos. De acuerdo con el protocolo de exposición realizado por Flores-Tintor en 2014.

4.5. Testigos de efecto genotóxico

Demecolcine: Se administró en una dosis de 5 ml/kg (de acuerdo con la dosis utilizada por Scheneide *et al.* 1995 y Flores-Tintor 2014).

Metil Metano Sulfonato: A este grupo se le administró por vía intraperitoneal una dosis única de 40 mg/kg (de acuerdo con la dosis reportada por Díaz-Barriga *et al.* 1999 y Flores-Tintor 2014)

Camptotecina: A los organismos de este grupo se les administró por vía intraperitoneal una dosis única de 4 mg/kg (de acuerdo con la dosis descrita por Attia *et al.* 2009 y Flores-Tintor 2014).

4.6. Toma de muestras

Se realizaron diferentes tomas de muestras, para la viabilidad celular con flurocromos se tomaron 2 µL de sangre periférica mediante un corte en la vena caudal al tiempo 0, 24, 48, 72, 144, 192, 240 y 312 horas post-exposición. Las muestras para el ensayo cometa pH>13 se realizó de la misma manera pero con 5 µL de sangre.

4.7. Técnicas experimentales

4.7.1. Citología Exfoliativa Vaginal

La citología exfoliativa vaginal consiste en la evaluación de los cambios en las células del epitelio vaginal a través del análisis en el microscopio de un frotis, el cual se obtiene mediante un lavado vaginal. Esta técnica se ha empleado como un método no invasivo para documentar el ciclo reproductivo en ratones y ratas de laboratorio y así proveer un índice del estatus funcional del eje hipotálamo-pituitaria-ovario.

La caracterización del frotis vaginal es una parte fundamental de esta técnica. Esta caracterización consiste en reconocer los tipos celulares característicos de las etapas del ciclo estral (Estro, Proestro, Metaestro y Diestro). La presencia de estas células usualmente se asocia con el estatus de la mucosa vaginal, del útero y de los ovarios, además se correlaciona con la identificación de alteraciones en las concentraciones de los esteroides sexuales y gonadotropinas circulantes.

Los tipos celulares característicos en estas etapas (Figura 2) son:

- Proestro: se identifica por la presencia de células nucleadas usualmente de apariencia granular bajo el microscopio.
- Estro: esta etapa del ciclo estral está caracterizada por la abundancia de células cornificadas sin núcleo o de apariencia queratinizada.
- Metaestro: este es el periodo transicional durante el cual se observa una combinación de células nucleadas, cornificadas y leucocitos.
- Diestro: esta etapa tiene como característica la presencia de leucocitos.

La caracterización de los tipos celulares de cada etapa cobra relevancia debido a que para cada una se tiene un registro de las hormonas y la cantidad de éstas que se presentan. Las etapas de mayor relevancia para determinar la presencia de estradiol y progesterona son el estro y el proestro. El estro se ve caracterizado por la queratinización de las células epiteliales vaginales, esto es una respuesta al aumento en los niveles de estradiol que alcanza el pico máximo en el estro y comienza a descender en el proestro. De igual manera este aumento en los niveles de estradiol provoca una reacción en la pituitaria y en el hipotálamo lo que desencadena la producción de la hormona luteinizante (Figuras 1 y 2).

Gracias a que con la citología vaginal es posible conocer el estado hormonal de los individuos, se puede seleccionar aquellos que presenten las características ideales para llevar a cabo estudios que involucren la administración de algún compuesto para probar cierto comportamiento o efectos que este pueda tener.

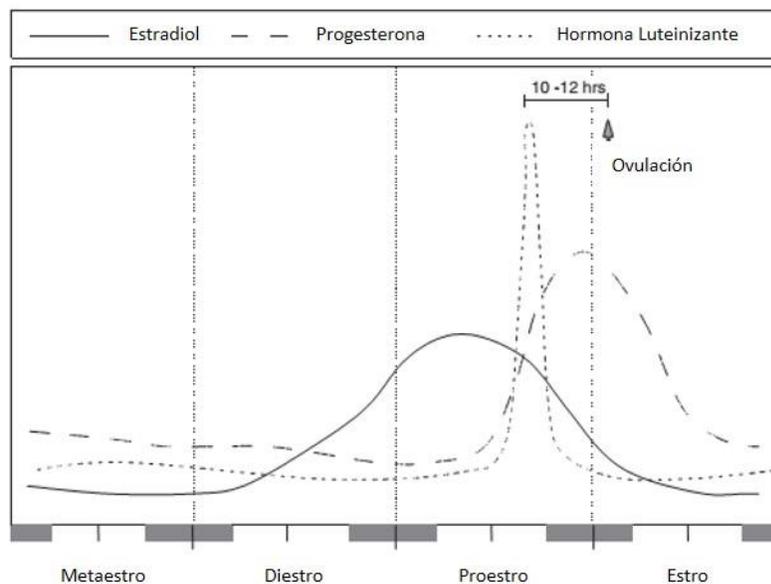


Figura 1. Se observan las curvas de estradiol, progesterona y hormona luteinizante (LH) a lo largo del ciclo estral de una hembra de ratón. Se puede observar que los picos de las 3 hormonas se da entre la etapa de estro y proestro (Modificada de Goldman et al. 2007).

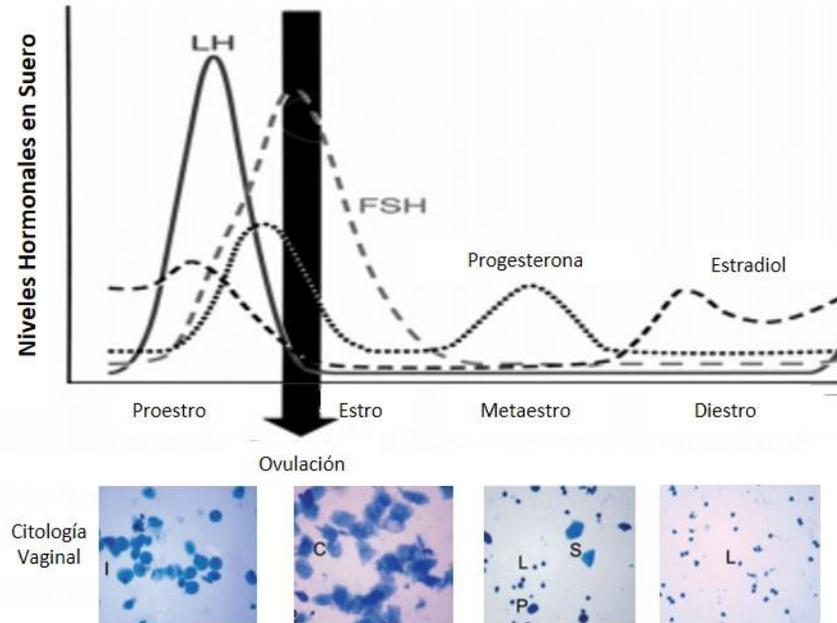


Figura 2. Niveles hormonales en cada etapa del ciclo estral, así como la citología vaginal de cada una donde se muestran los tipos celulares característicos de cada uno (Modificada de Li y Davis 2007 y Caligioni 2009).

4.7.2. Viabilidad celular por fluorocromos

Se preparó una solución con FDA, 0.01 g de diacetato de fluoresceína disuelto en 2 mL de Acetona, Bromuro de Etidio, 0.01 g disuelto en 5 mL de amortiguador de fosfatos, y PBS. Esta solución se prepara antes de utilizarse en las siguientes proporciones: 100 μ L de la solución de Bromuro de Etidio, 15 μ L de la solución de FDA y 2 mL de PBS.

La muestra de sangre periférica se mezcló con la solución anterior en una proporción 1:1: Las muestras se observaron al momento con microscopia de fluorescencia. De un total de 100 células se cuantificó el número de células muertas (fluorescencia roja) y células vivas (fluorescencia verde).

4.7.3. Electroforesis unicelular alcalina

La técnica se realizó de acuerdo con Singh et al. (1998) para detectar los rompimientos de cadena sencilla en el DNA. Cada una de las muestras se realizó por duplicado.

De cada hembra 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 a 39 °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. Se colocaron las laminillas en hielo durante 5 minutos para permitir la solidificación de la segunda capa de agarosa y así poder retirar el cubreobjetos sin riesgo de maltratar la muestra, al retirar el cubreobjetos se coloca una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% la cual se extendió con el cubreobjetos que previamente había sido retirado y se colocó nuevamente en hielo para solidificar la última capa de agarosa y retirar el cubreobjetos.

Una vez solidificadas las capas de agarosa, se colocaron las laminillas en una solución de lisis compuesta de NaCl 2.5 M, Tris 0.01 M, 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 0.3 M y EDTA Na₂ 0.001 M revisando que el pH de este fuera mayor o igual a 13. Se les dejó por 20 minutos en el amortiguador para desenrollar el DNA y transcurrido este tiempo se les sometió a una corriente de 300 mA y 25 V durante 20 minutos. Todo lo anterior en condiciones de oscuridad.

Posteriormente a los 20 minutos de electroforesis, las muestras se neutralizaron con una solución 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 0.02 M 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 esparcieron sobre la muestra, a la cual posteriormente se le colocó un cubreobjetos.

Para el registro de cometas se tomaron al azar el conteo de 200 cometas por laminilla del individuo por cada uno de los tiempos de muestreo y se midió la migración, después se clasificó dentro de una de las cinco categorías propuestas por Rodríguez-Mercado et al. (2011). En donde $r = \text{longitud de la cola (LCo)} / \text{longitud de la cabeza (LCa)}$

Categoría 1: cabeza intacta, no hay daño al DNA

Categoría 2: $r \leq 1$, daño bajo al DNA

Categoría 3: $1 < r \leq 2$, daño moderado al DNA

Categoría 4: $r > 2$, daño severo al DNA

Categoría 5: las células son virtualmente solo DNA migrado, daño total al material genético

4.8. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se procesaron con el programa GraphPad Prism 5 y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba *post hoc* de Tukey para evaluar las diferencias entre cada uno de los tiempos de los diversos tratamientos. 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 .

5. Resultados

5.1. Viabilidad celular

En la tabla 1 se observa que en todos los grupos el porcentaje de viabilidad celular fue mayor al 80%. Este porcentaje es acorde con el requerido para realizar electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa pH>13) (Tice et al. 2000).

Tiempo	Testigo	Anastrozol	Vanadio	Van+An	CPT	MMS	Demecolcine
0	96.8±0.9	96.8±0.4	98.6±0.6	98.2±0.5	96.8±0.5	97.0±0.7	97.4±0.7
24	96.8±0.3	96.0±1.1	95.8±0.3	95.6±0.4	94.2±0.8	96.8±0.6	96.0±0.8
48	96.8±0.8	95.6±1.0	95.6±0.5	95.2±0.4	91.8±0.9	95.2±0.5	95.8±0.6
72	96.6±0.8	96.2±0.9	92.0±0.4	91.4±0.5	91.6±2.0	93.0±0.9	97.4±0.4
144	96.6±0.6	93.6±0.4	95.2±0.4	94.8±0.5	93.2±1.1	92.0±2.2	98.2±0.5
192	95.8±0.9	95.4±0.9	97.6±0.2	97.8±0.7	90.2±1.3	94.8±0.3	97.2±0.4
240	98.0±1.0	94.8±0.9	98.4±0.5	97.2±0.6	91.0±1.2	94.2±1.6	98.2±0.3
312	94.0±0.8	94.2±1.3	98.0±0.5	98.0±0.4	91.2±1.0	93.6±1.2	98.0±0.4

Tabla 1. Viabilidad celular de cada grupo en el tiempo.

5.2. Ensayo Cometa

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): $IMg = \frac{1 + (Categoría\ 2)2 + (Categoría\ 3)3 + (Categoría\ 4)4 + (Categoría\ 5)5}{Total\ de\ células\ contadas}$.

5.2.1. Testigo

En el grupo testigo no se observó una diferencia significativa en el índice de migración del DNA entre el tiempo cero y el resto del tiempo experimental (Figura 3, izquierda).

5.2.2. Anastrozol

Los ratones hembra a los que se les administró este fármaco no mostraron una diferencia significativa en el índice de migración del DNA entre el tiempo cero y el resto de tiempo experimental (Figura 3, derecha).

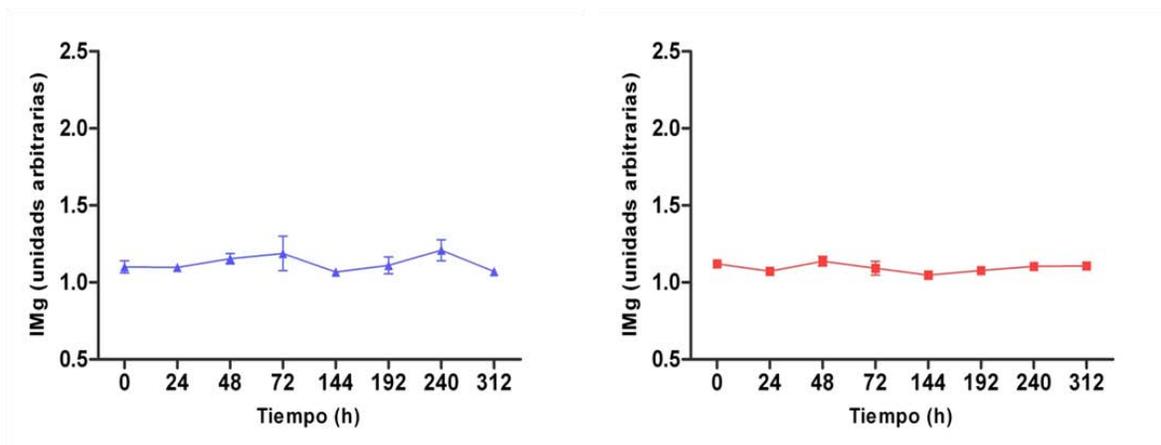


Figura 3. Índice de migración del DNA del grupo testigo (izquierda) y del grupo anastrozol (derecha).

5.2.3. Metilmetano Sulfonato (MMS)

Los ratones hembra 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 72 horas post-exposición. A partir de las 144 horas no se observó diferencia significativa con el tiempo cero (Figura 4, izquierda).

5.2.4. Camptotecina

Los ratones hembra a los que se les administró este fármaco mostraron un aumento significativo en el índice de migración del DNA a las 144 horas. A las 192 horas se observó la disminución significativa del índice de migración (Figura 4, derecha).

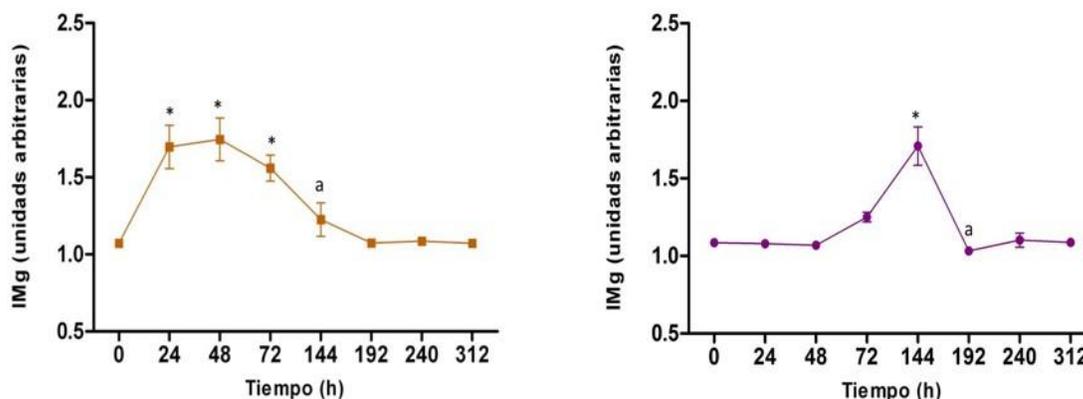


Figura 4. Índice de migración del DNA en leucocitos de ratones hembra del grupo MMS. ANOVA *post hoc* Tukey. $P \leq 0.05$. *Diferente a tiempo 0 h. ^aDiferente a 72 h (izquierda), Índice de migración del DNA en leucocitos de ratones hembra del grupo Camptotecina. ANOVA *post hoc* Tukey. $P \leq 0.05$. *Diferente a tiempo 0 h. ^aDiferente a 144 h (derecha).

5.2.5. Demecolcine

Los ratones hembra a los que se les administró este fármaco mostraron un aumento significativo en el índice de migración del DNA a partir de las 24 y hasta las 240 horas post-administración. A las 312 se presentó la disminución significativa en la migración del DNA de las células (Figura 5, izquierda).

5.2.6. Vanadio

Los ratones hembra que inhalaban este compuesto mostraron un aumento significativo en el índice de migración del DNA a las 72 horas. A las 144 horas la migración del DNA de las células se vio reducida hasta no presentar diferencia con el tiempo cero (Figura 5, derecha).

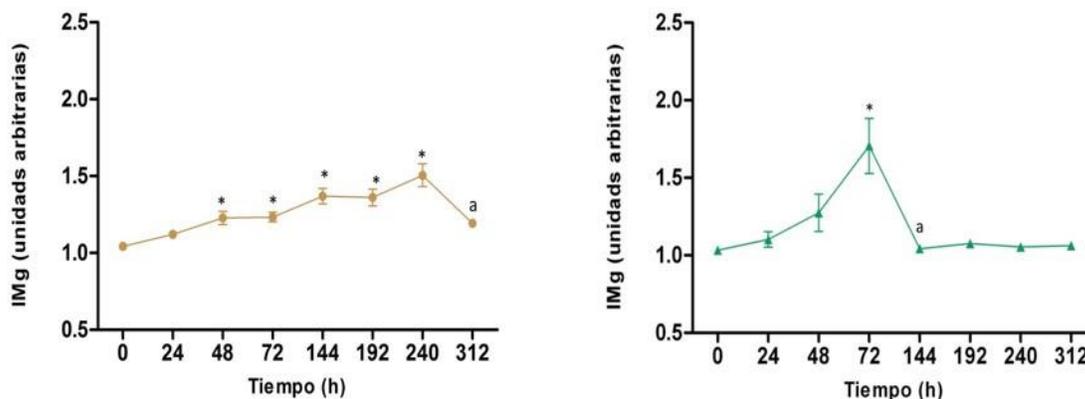


Figura 5. Índice de migración del DNA en leucocitos de ratones hembra del grupo Demecolcine. ANOVA *post hoc* Tukey. $P \leq 0.05$. *Diferente a tiempo 0 h. ^aDiferente a 240 h (izquierda). Índice de migración del DNA en leucocitos de ratones hembra del grupo Vanadio. ANOVA *post hoc* Tukey. $P \leq 0.05$. *Diferente a tiempo 0 h. ^aDiferente a 72 h (derecha).

5.2.7. Vanadio+Anastrozol

A los ratones hembra que inhalaban este compuesto y se les administro este fármaco presentaron un aumento significativo en el índice de migración del DNA a las 72 horas. A las 144 la migración del DNA no mostró diferencia con el tiempo cero (Figura 6).

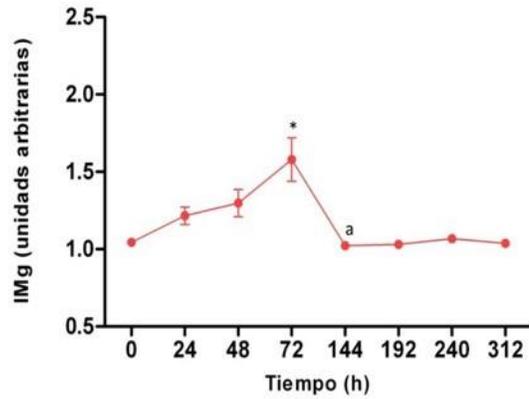


Figura 6. Índice de migración del DNA en leucocitos de ratones hembra del grupo Vanadio+Anastrozol. ANOVA *post hoc* Tukey. $P \leq 0.05$. *Diferente a tiempo 0 h. ^aDiferente a 72 h.

5.3. Comparación entre grupos experimentales

5.3.1. Testigo vs Anastrozol

Los ratones hembra de estos tratamientos no muestran diferencia significativa en el índice de migración del DNA entre el tiempo cero y el resto de tiempos experimentales (Figura 7, izquierda).

5.3.2. Testigo vs Vanadio

Los ratones hembra de estos tratamientos mostraron diferencia significativa en el índice de migración del DNA en el tiempo 72 h (Figura 7, derecha).

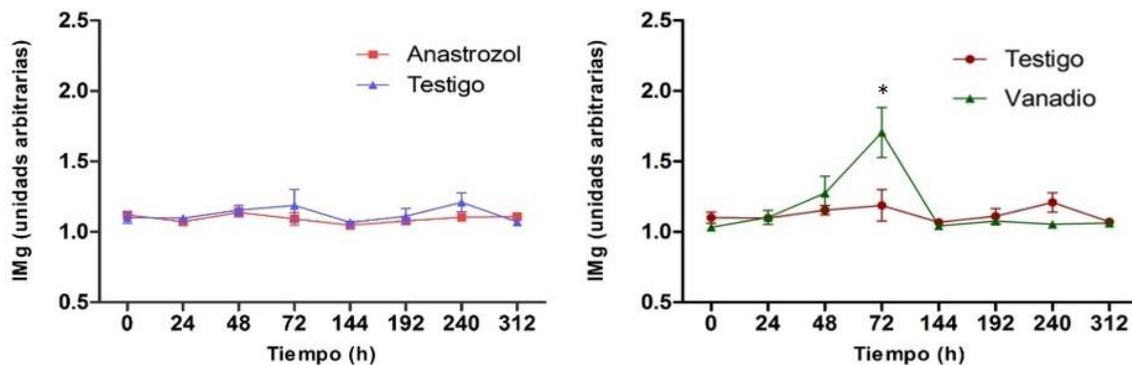


Figura 7. Comparación del índice de migración del DNA del grupo Testigo vs Anastrozol (izquierda). Comparación del índice de migración del DNA del grupo Testigo vs Vanadio * $P \leq 0.05$ (prueba t de Student) (derecha).

5.3.3. Vanadio vs Vanadio+Anastrozol

Los ratones de estos tratamientos no mostraron diferencia significativa en el índice de migración del DNA (Figura 8, izquierda).

5.3.4. Vanadio vs Metilmetano sulfonato

Los ratones hembra de estos tratamientos mostraron diferencia significativa en el índice de migración del DNA a partir de las 24 y hasta las 72 h donde ya no se observa esta diferencia (Figura 8, derecha).

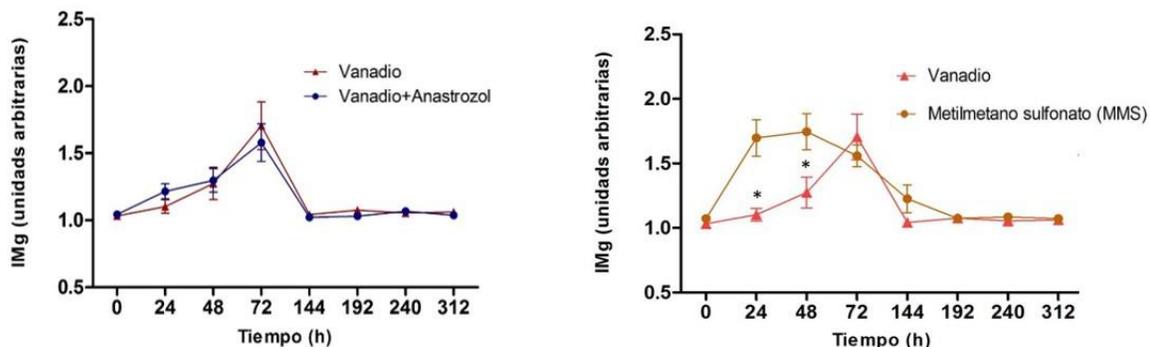


Figura 8. Comparación del índice de migración del DNA del grupo Vanadio vs Vanadio+Anastrozol (izquierda). Comparación del índice de migración del DNA del grupo Vanadio vs Metil metano sulfonato *P<0.05 (prueba t de Student) (derecha).

5.3.5. Vanadio vs Demecolcine

Los ratones hembra de estos tratamientos mostraron diferencia significativa en el índice de migración del DNA a partir de las 72 y hasta el final del tiempo de muestreo (Figura 9, izquierda).

5.3.6. Vanadio vs Camptotecina

Los ratones hembra de estos tratamientos mostraron diferencias significativas en el índice de migración del DNA en los tiempos 72 y 144 h (Figura 9, derecha).

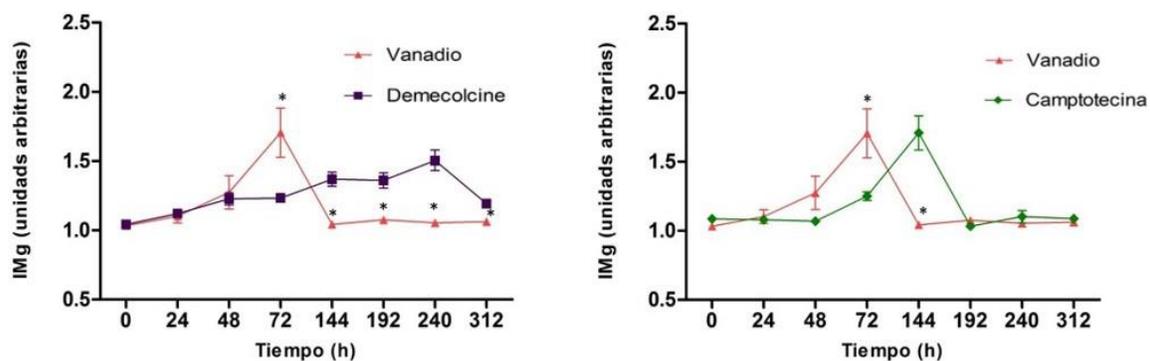


Figura 9. Comparación del índice de migración del DNA del grupo Vanadio vs Demecolcine *P<0.05 (prueba t de Student) (Izquierda). Comparación del índice de migración del DNA del grupo Vanadio vs Camptotecina *P<0.05 (prueba t de Student) (derecha).

6. Resumen de Resultados

6.1. Testigo

En este grupo se observa que no incrementa el índice de migración en ninguno de los tiempos (Figura 3, izquierda). Con esto, se corroboró que los individuos experimentales no generan rompimientos de cadena sencilla por la manipulación o por el paso del tiempo.

6.2. Anastrozol

Como se aprecia en la Figura 3, derecha, el Anastrozol no presenta diferencia significativa en ninguno de los tiempos experimentales, esto muestra que este fármaco no actúa como un agente genotóxico, asimismo se puede comprobar que la ausencia de estrógenos en los individuos no genera rompimientos de cadena sencilla.

6.3. MMS

Este es un agente clastógeno, por lo que genera rompimientos de cadena sencilla atacando directamente el DNA, esto se ve reflejado en la Figura 4, izquierda, pues la diferencia con el tiempo 0 comienza desde las 24 horas. A las 144 horas la migración del DNA no es diferente a la del tiempo 0, esto indica que entre el tiempo 72 y 144 se dio la reparación del daño al DNA.

6.4. Camptotecina

Dado que este es un fármaco que genera rompimientos de cadena sencilla de manera indirecta, es decir afecta el complejo DNA-topoisomerasa I, evitando la religación del DNA y la reparación del daño genotóxico, la curva de la Figura 4, derecha, refleja este comportamiento pues el daño no se observa hasta las 72 horas. Entre las 72 y 144 horas se da la reparación de este daño pues a las 144 ya no hay diferencia significativa con el tiempo 0.

6.5. Demecolcine

Este fármaco no genera rompimientos de cadena sencilla, pues es un agente aneugénico, es decir que afecta la formación de los microtúbulos, lo que inhibe la formación del huso mitótico y por tanto evita la migración de los cromosomas hacia los polos. En la Figura 5, izquierda, se puede observar una diferencia significativa con el tiempo 0 desde las 24 hasta las 240 horas, lo que concuerda con el tipo de daño acumulativo que este fármaco genera.

6.6. Vanadio

En la Figura 5, derecha, se evidencia que el vanadio genera un pico de daño a las 72 horas, tras las cuales éste se repara, este pico se debe al mecanismo de acción del vanadio pues éste genera estrés oxidante y rompimientos de cadena sencilla.

6.7. Vanadio+Anastrozol

En la curva de la Figura 6 se nota que la combinación de Vanadio y Anastrozol genera un pico máximo a las 72 horas, tras las cuales ocurre la reparación del mismo pues los niveles de rompimientos de cadena sencilla son iguales a los del tiempo 0.

6.8. Comparación de curvas

6.8.1. Testigo vs Anastrozol

En la Figura 7, izquierda, se observa que no hay diferencia significativa entre ambos grupos lo que revela que ambos grupos se comportan como buenos grupos testigos, pues no generan picos o incremento de daño.

6.8.2. Testigo vs Vanadio

En esta curva (Figura 7, derecha) se muestra que existe diferencia significativa al tiempo 72 pues es donde ocurre el pico máximo de daño en el vanadio y tras este tiempo el daño se ve reparado pues ya no hay diferencia con el grupo testigo.

6.8.3. Vanadio vs Vanadio+Anastrozol

En la Figura 8, izquierda, se aprecia que ambas curvas presentan el mismo comportamiento. El que ambas sean idénticas evidencia que los estrógenos no intervienen de manera directa en la generación ni en la reparación de daño pues las hembras con estrógenos inhibidos y con estrógenos normales se comportan de la misma manera.

Dado que las curvas son idénticas, para las posteriores comparaciones era indistinto tomar cualquiera de los dos grupos, por lo que se tomó el grupo Vanadio.

6.8.4. Vanadio vs MMS

En esta comparación (Figura 8, derecha) se observan dos curvas muy diferentes, esto es debido a que ambos agentes tienen comportamientos totalmente distintos. Por un lado el MMS al ser un agente clastógeno genera rompimientos a las 24 horas y por otro el Vanadio los origina hasta las 72 horas. Con esta comparación lo que se evidencia es que el vanadio no se comporta como un agente clastógeno, pues las curvas son diferentes.

6.8.5. Vanadio vs Demecolcine

En la comparación de ambos fármacos (Figura 9, izquierda) las curvas no tienen el mismo comportamiento, pues el demecolcine genera un daño que va aumentando conforme pasa el tiempo desde las 72 hasta las 240 horas, a diferencia del Vanadio que solo presenta un pico de rompimientos. Con esto se demuestra que el Vanadio no se comporta como un agente aneugénico.

6.8.6. Vanadio vs Camptotecina

En la Figura 9, derecha, se comparan ambos fármacos, se nota como las curvas son casi idénticas, ambas generando un único pico de daño, con la diferencia de que el vanadio origina este pico de manera más rápida en comparación con la camptotecina. Esta comparación evidencia que el vanadio tiene un comportamiento similar al de la camptotecina por lo que se comporta como un inhibidor de los mecanismos de reparación de rompimientos de cadena sencilla, en particular con la topoisomerasa I.

7. Discusión

¿Por qué el vanadio genera rompimientos?

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

El resultado obtenido coincide con lo observado por Rojas *et al.* (1996), Altamairano-Lozano *et al.* (1996, 1999), Rodríguez-Mercado *et al.* (2003, 2011) y Ehrlich *et al.* (2008), quienes reportaron que el Vanadio es capaz de generar rompimientos de cadena sencilla, sitios alcalilábiles y daño relacionado con estrés oxidante.

¿Por qué el MMS genera rompimientos?

El MMS es un agente con acción directa sobre el material genético. Es capaz de fragmentar el DNA a través de la alquilación de nucleótidos y la metilación de las bases púricas guanina y adenina a 7-metilguanina y 3 metiladenina. Sin embargo, este fármaco es excretado entre las 30 a 48 horas post administración por lo que dicho daño no permanece debido a que los mecanismo de reparación pueden corregirlo (Lundin et al. 2005, Günter y Schütz 2008).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Koppen y Verschaeve (1996), Frotini *et al.* (2000), Fatur *et al.* (2003), Hosseinzadeh *et al.* (2008), que corroboraron que el metil metano sulfonato genera rompimientos de cadena sencilla.

¿Por qué el Demecolcine genera rompimientos?

El Demecolcine es un reconocido agente aneugénico, lo que quiere decir que no actúa directamente sobre el DNA, sino sobre el aparato mitótico. En particular su mecanismo de acción es la inhibición de la elongación de los microtúbulos del huso mitótico. Aunado a esto se ha observado que el demecolcine puede generar rompimientos por causa del metabolismo pues afecta la acción de la ligasa 1, perturba el ciclo celular e inhibe la replicación del DNA, por lo que se pueden acumular rompimientos de DNA (Hsun *et al.* 2005, Günter y Schütz 2008).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Kawakami *et al.* (2003), Rodríguez-Arnaiz *et al.* (2004), Russell *et al.* (2005), Tani *et al.* (2006), Miyoshi *et al.* (2008) y Saraiva *et al.* (2009) quienes corroboraron que el demecolcine afecta la cinética de los microtúbulos, siendo este un agente disruptor de los microtúbulos.

¿Por qué la Camptotecina genera rompimientos?

La camptotecina es un agente clastógeno con acción indirecta. Este fármaco estabiliza el complejo DNA-topoisomerasa I, evitando la religación del DNA y por tanto la reparación del daño generado durante procesos celulares, lo que puede provocar arresto del ciclo celular y/o muerte celular por apoptosis (Morham et al. 1996, Du 2003, Attia et al. 2005).

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Hsiang *et al.* (1985, 1988, 1989), Jaxel *et al.* (1989), Kingsbury *et al.* (1991), Liu *et al.* (2000) y Staker *et al.* (2002) quienes observaron que la Camptotecina, así como compuestos derivados de ella, son inhibidores de la topoisomerasa I.

- *Vanadio y mecanismos de reparación*

En algunos compuestos de vanadio como el Van-7, se ha comprobado que poseen un efecto como inhibidores de la topoisomerasa I, pero a diferencia de fármacos como la Camptotecina, cuyo mecanismo de acción es la estabilización del complejo DNA-topo I para evitar así que desempeñe su papel de manera adecuada, este tipo de compuestos se une al DNA para desestabilizar y evitar la unión de la topoisomerasa I (Xiao-mei *et al.* 2006, Mo *et al.* 2012)

En cuanto a la generación de daño más temprano, esto se debe a que aunado a que interfiere con la topoisomerasa I, el vanadio genera ROS, por lo que no solo genera rompimientos de cadena sencilla sino que evita la reparación de los mismos, por esto es que causa daño al DNA de manera más rápida en comparación con la Camptotecina, que solo interfiere con la topoisomerasa I.

En este trabajo, se comprobó que el vanadio afecta la actividad de la topoisomerasa I, es decir interfiere con el mecanismo de reparación de cadena sencilla lo que implica que genera daño a través de la inhibición de uno de los principales mecanismos para reparar el daño provocado por estrés oxidante, pero aunado a este comportamiento también se sabe que el vanadio origina rompimientos de cadena sencilla. Este comportamiento tan particular que se observó en las hembras representa un problema más serio a largo plazo pues el vanadio no solo genera daño, sino que inhibe la reparación de este daño y por tanto deja a las células susceptibles al efecto del resto de agentes nocivos que se encuentran en el aire. También se conoce que la mala reparación o la no reparación del daño genotóxico puede llevar a inestabilidad cromosómica y facilitar la malignización celular, por lo que al presentar este comportamiento el vanadio también puede incrementar el riesgo de malignización celular y así desencadenar procesos carcinogénicos.

Si bien se ha reportado que las hembras tienen una menor susceptibilidad esto se ha estudiado solo a corto plazo, con todas las implicaciones antes mencionadas de dicho comportamiento del vanadio en las hembras se tienen que llevar a cabo más estudios a largo plazo para clarificar las consecuencias de la exposición prolongada a este metal.

- *Vanadio y Vanadio+Anastrozol ¿si no son estrógenos entonces que podría ser?*

Debido a que el comportamiento de ambos tratamientos es idéntico, es posible afirmar que los estrógenos no intervienen en la generación de rompimientos de cadena sencilla o en la reparación de estos, de igual manera Sanz *et al.* (2007) encontraron que no existe diferencia en la susceptibilidad al daño genotóxico por estrés oxidante en machos y en hembras de ratones que no tenían diferencia en la longevidad, pero si no son los estrógenos ¿qué podría explicar el daño diferencial entre machos y hembras? Otras diferencias metabólicas menos recodidas podrían ser la respuesta:

- Las mitocondrias de las hembras tengan influencia en esta diferencia, pues son más eficientes ya que producen la mitad de peróxidos y tienen 4 veces menos daño oxidante en el DNA mitocondrial en comparación con los machos (Borrás *et al.* 2003).

- Las hembras poseen mayor cantidad de enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa y la *glutación* peroxidasa (Borrás *et al.* 2003), así como niveles más altos de UCP5, la cual es una proteína que está descrita como un regulador de la producción de ROS, pues mientras mayor sea la cantidad de esta proteína, menos ROS se producirán y por tanto menor cantidad de estrés oxidante (Guevara *et al.* 2009, 2011). Esta diferencia también puede estar dada por que en hembras se ha encontrado una mayor expresión de 16S rRNA que es 4 veces mayor. El RNA ribosomal está implicado en la formación de ribosomas y por ende, con la eficiencia en el recambio de proteínas y este componente decrece con la edad. Las hembras al tener una mayor expresión de éste, en comparación con machos de la misma edad, pueden realizar el recambio de proteínas oxidadas, por lo que el efecto del estrés oxidante se puede ver reducido (Borrás *et al.* 2003).

8. Implicaciones del comportamiento.

Cinética de reparación de los rompimientos causados por vanadio: ¿diferente en machos?

El vanadio tiene un comportamiento diferente en hembras y en machos, pues Flores-Tintor (2014) reportó que el vanadio con el mismo protocolo de inhalación se comporta como el Demecolcine, es decir, como un agente aneugénico. En los resultados obtenidos en este trabajo se puede observar que el vanadio se comporta como la Camptotecina, es decir, afecta a la topoisomerasa I. Dado que ambos estudios se realizaron a corto plazo, este comportamiento diferencial podría tener repercusiones importantes, como por ejemplo que a largo plazo las hembras sufran de una mayor cantidad de daño pues, si el vanadio genera rompimientos de cadena sencilla y a su vez inhibe los mecanismos de reparación de este tipo de daño, aumenta la susceptibilidad a que otros agentes generen también genotoxicidad, lo que incrementaría la inestabilidad del DNA y podría dar paso a una malignización celular de manera más rápida. Y en cuanto a los machos, el que el vanadio genere daño de tipo aneugénico es igualmente perjudicial pues éste es irreparable y constituye pérdida total de material genético; sabemos que el vanadio causa daño en el sistema reproductor masculino (Aragón *et al.* 2005) por lo que resulta fácil pensar que esta pérdida de material genético se pueda dar en células sexuales, lo que implicaría heredar material genético dañado y por tanto una gran probabilidad de generar mutaciones.

9. Conclusión

Estos resultados muestran que los estrógenos no influyen en la formación de rompimientos de cadena sencilla ni con la reparación de los mismos. Por otro lado, el vanadio interfiere con la actividad de la topoisomerasa I, lo que significa que los rompimientos generados no pueden ser reparados. La no reparación del daño, implica el aumento de la susceptibilidad celular a la malignización.

Se deben investigar otras diferencias metabólicas para dilucidar cuál o cuáles están implicadas en la protección que tienen las hembras frente al daño al DNA causado por este metal.

10. Objetivos a futuro

Debido a las implicaciones de un comportamiento diferencial de vanadio en hembras y en machos, un estudio a largo plazo es necesario para clarificar varias cosas:

- 1.- Si en algún momento estas “armas” que poseen las hembras para mitigar el daño genotóxico causado por estrés oxidante se ven rebasadas por el vanadio.
- 2.- Determinar si el comportamiento del vanadio cambia con el tiempo en machos y en hembras y observar si el daño que se genera es solo de rompimientos de cadena sencilla o si se incrementan los micronúcleos.
- 3.- Evaluar otras posibilidades para explicar el daño diferencial entre machos y hembras, tales como análisis mitocondriales o de producción de ROS.

11. Bibliografía

- Amador-Muñoz O, Delgado-Rodríguez A, Villalobos-Pietrini R, Munive-Colín Z, Ortiz-Martelo R, Díaz-Gonzales G et al. Partículas suspendidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el sureste de la Ciudad de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2001; 17: 193-204.
- 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; 16: 7-17.
- Altamirano-Lozano M, Valverde M, Alvarez-Barrera, Molina B, Rojas E. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. 1999; 19: 243-255.
- 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, Alesia 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.
- Ávila-Costa MR, Montiel-Flores E, Colín-Barenque, Ordoñez JL, Gutiérrez AL, Niño-Cabrera HG et al. Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical Research*. 2004; 29: 1365-1369.
- Ávila-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
- Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. 2006; 494: 161-172.
- Bajpayee M, Dhawan A, Parmar D, Pandey AK, Mathur N, Seth PK. Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline Comet assay. *Mutation Research*. 2002; 520: 83–91.

- Barceloux DG. Vanadium. *Clinical Toxicology*. 1999; 37(2): 265-278.
- 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.
- Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology & Medicine*. 2003; 34(5): 546-552.
- Brodie A, Lu Q, Long B. Aromatase and its inhibitors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1999; 69: 205-210.
- Brodie AMH, Njar VCO. Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment. *Steroids*. 2000; 65: 171-179.
- Buzdar AU. A Summary of second-line randomized studies of aromatase inhibitors. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2001; 79: 109-114.
- Buzdar AU, Robertson JFR, Eiermann W, Nabholz JM. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole and exemestane. *American Cancer Society*. 2002; 95(9): 2006-2016.
- Caligioni C. Assessing Reproductive Status/Stage in mice. *Current Protocols in Neuroscience*. 2009.
- 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: 65-75.
- Chang M, Bellaoui M, Boone C, Brown GW. A genome-wide screen for methyl methane sulfonate– sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *PNAS*. 2002; 99(26): 16934-16939.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. 2004; 26(3): 249-261.
- Cooper RG. Vanadium pentoxide inhalation. *Indian journal of occupational and environmental medicine*. 2007; 11: 97-102.
- Ehrlich VA, Nersesyan AK, Hoelzl C, Ferk F, Bichler J, Valic E, Schaffer A, Schulte-Hermann R, Fenech M, Wagner KH, Knasmüller S. Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: results of a multiple end point study. *Environmental Health Perspectives*. 2008; 116(12): 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.
- Fatur T, Lah TT, Filipic M. Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*. 2003; 529: 109-116.
- Fedorcsák I, Ehrenberg L. Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methane sulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chemical Scandinavica*. 1966; 20: 107-112.
- Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000; 455: 81-95
- 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.

- Flores-Tintor KA. Evaluación de la reparación de rompimientos del DNA causados por inhalación de vanadio en leucocitos de ratones. 2014. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Fortini P, Pascucci B, Belisario F, Dogliotti E. DNA polymerase β is required for efficient DNA strand break repair induced by methyl methanesulfonate but not by hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Research*. 2000; 28(16): 3040-3046
- Fortoul TI, Quan-Torres A, Sánchez-I, López IE, Bizarro P, Mendoza ML et al. Vanadium in Ambient Air: Concentration in lung tissue from autopsies of México City Residents in the 1960s and 1990s. *Archives of environmental health: An International Journal*. 2002; 57: 446-449.
- Fortoul TI, Valverde M, López MC, Avila-Costa MR, Ávila-Casado MC, Mussali-Galante P, Gonzales-Villalva A, Rojas E, Ostrosky-Shejet P. Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area. *Environmental Research*. 2004; 94: 243 – 248.
- Fortoul TI, Rodríguez-Lara V, González-Villalva A, Rojas-Lemus M, Cano-Gutiérrez G, Ustarroz-Cano M et al. Vanadium Inhalation in a mouse model for the understanding of air suspended particle system repercution. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011. p 1-11.
- Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicology studies. *Birth Defects Research*. 2007; 80: 84-97.
- González-Villava A, Fortoul TI, Ávila-Costa MR, Piñón-Zarate G, Rodríguez-Lara V, Martínez-Levy G et al. Thrombocytosis induced in mice after subacute and chronic V2O5 inhalation. *Toxicology and Industrial Health*. 2006; 22: 113-116.
- Günter S, Schütz P. The effect of inhibited replication on DNA migration on the comet assay in relation to cytotoxicity and clastogenicity. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2008; 655: 22-27.
- Gummow, Bruce. Vanadium: environmental pollution and health effects. En: Nriagu, Jerome O. *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier. 2001. p 628-636.
- 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 particle matter. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2006; 47: 199-211.
- Guevara R, Santadreu FM, Valle A, Gianotti M, Oliver J, Roca P. Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; 46: 169–175.
- Guevara R, Gianotti M, Oliver J, Roca P. Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial oxidative status. *Experimental Gerontology*. 2011; 46: 923–928.
- Heinz A, Rubison KA, Grantham JJ. The transport and accumulation of oxovanadium compounds in human erythrocytes *in vitro*. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1982; 100(4): 593-612.
- Henning UGG, Rudd NI, Hoar DI. Kinotechore 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.
- Hofer T, Karlsson HL, Möller L. DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: A gender difference and the role of life style factors. *Free Radical Research*. 2006; 40(7): 707–714.
- Hosseinzadeh H, Abootorabi A, Sedegnia H. Protective Effect of *Crocus sativus* Stigma Extract and Crocin (trans-crocin 4) on Methyl Methanesulfonate-Induced DNA Damage in Mice *Organs. DNA and Cell Biology*. 2008; 27(12): 657-664.

- Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *The Journal of Biological Chemistry*. 1985; 260(27): 14873-14878.
- Hsiang YW y Liu LF. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intercelular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Research*. 1988; 48: 1722-1726.
- Hsiang YH, Libou MG, Liu LF. Arrest of replication forks by drugs-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Research*. 1989; 49: 5077-5082.
- 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 (2006). Vanadium pentoxide. International Agency of Research on Cancer.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Capítulo 4: Partículas suspendidas, 2012. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/517/cap4.pdf>
- Jaxel C, Kohn KW, Wani MC, Wall ME, Pommier Y. Structure –activity study of the actions of Camptothecin derivates on mammalian Topoisomerase I: Evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. *Cancer Research*. 1989; 49: 1465-1469.
- Kaneda N, Yokokura T. Nonlinear pharmacokinetics of CPT11- in rats. *Cancer Research*. 1990; 50; 1721-1725.
- Kawakami M, Tani T, Yabuuchi A, Kobayashi T, Murakami H, Fujimura T, Kato Y, Tsunoda Y. Effect of Demecolcine and Nocodazole on the Efficiency of Chemically Assisted Removal of Chromosomes and the Developmental Potential of Nuclear Transferred Porcine Oocytes. *Cloning and Stem Cells*. 2003; 5(4): 379-387.
- Kingsbury WD, Boehm JC, Jakas DR, Holden KG, Hecht SM, Gallagher G, Carania MJ, McCabe FL, Faucette LF, Johns RK, Hertzberg RP. Synthesis of water-soluble (Aminoalkyl) camptothecin analogues: Inhibition of Topoisomerase I and antitumor activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1991; 31(1): 98-107.
- Koppen G y Verschaeve L. The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Research*. 1996; 360: 193-200.
- Léonard A, Gerber GB. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutation Research*. 1994; 317: 81-88.
- Li S y Davis B. Evaluating rodent vaginal and uterine histology in toxicity studies. *Birth Defects Research*. 2007; 80: 264-252.
- Liu Lf, Desai S, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP. Mechanism of action of camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000; 922: 1-10.
- Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman ASH, Helleday T. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33(12): 3799-3811.
- Machado A, García N, García C, Acosta L, Córdoba 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.
- Mayer H. Air pollution in cities. *Atmosferic Enviroment*. 1999; 33: 4029-4037.
- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicology. *BioMed Research International*. 2013. p 1-15.
- Mayor-Oxila R. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Instituto de Medicina Tropical*. 2010; 2: 23-29.

- Metha M, Chen LC, Gordon T, Rom W, Tang M. Particle matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutation Research*. 2008; 657: 116-121.
- Miyoshi K, Mori H, Yamamoto H, Kishimoto M, Yoshida M. Effects of Demecolcine and Sucrose on the Incidence of Cytoplasmic Protrusions Containing Chromosomes in Pig Oocytes Matured *In vitro*. *Journal of Reproduction and Development*. 2008; 54(2); 117-121.
- Mo XM, Chen ZF, Qi X, Li YT, Li J. DNA-Binding and Topoisomerase-I-Suppressing Activities of Novel Vanadium Compound Van-7. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2012. p 1-9.
- Molina LT, Molina MJ. Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 2004; 54 (6): 644-648.
- Molina Lt, Molina MJ. Air quality in the Mexico megacity. An integrated assessment. *Eure*. 2006.; XXXII: 141-145.
- Møller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2006; 98: 336-345.
- 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.
- 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.
- Mujherjee 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, Ávila-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.
- NatelsonEA, Giovanella CG, Verschraegen CF, Fehir KM, Ipolyi PD, Harris N, Stenhil 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.
- Noriega-Reyes MY, Langley-McCarron E. Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología 3*. 2008: 29-40.
- Pérez-De Gante CL. Efecto del pentóxido de vanadio sobre las células de médula ósea. Comparación por género. 2009. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J, Johnson GT. *Cell biology*. 2ª ed. Philadelphia. Elsevier. 2010.
- Ramírez P, Eastmond DA, Lacleite JP, Ostrosky-Wegman P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 1997; 368: 291-298.
- 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 particle air pollution. *Mutation Research*. 2005; 592: 119-137.
- Rivero-Rosas H, Pfeifer GD, Lynam DR, Pedroza JL, Jullían-Sánchez A, Canales O, Garfias J. Personal exposure to elements in México 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-Arnaiz R, Castañeda-Sortibrán A, Ordaz-Téllez G. Detection of mitotic recombination and sex chromosome loss induced by adriamycin, chlorambucil, demecolcine, paclitaxel and vinblastine in somatic cells of *Drosophila melanogaster in vivo*. *Mutagenesis*. 2004; 19(2): 121-127.
- 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 y Altamirano-Lozano MA. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2006; 22: 173-189.
- Rodríguez-Mercado JJ, Mateos-Nava RA, Altamirano-Lozano MA. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicology in vitro*. 2011; 25: 1996-2002.
- 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 MA, 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.
- Rubicek DA, Gutiérrez-Castillo Me, Sordo M, Cebrián-García ME, Ostrosky-Wegman P. Micronuclei induced by air particle matter from Mexico City. *Mutation Research*. 2007; 631: 9-17.
- Russell DF, Ibáñez E, Albertini DF, Overström EW. Activated Bovine Cytoplasts Prepared by Demecolcine-Induced Enucleation Support Development of Nuclear Transfer Embryos *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 2005; 72: 161-170.
- Sanz A, Hiona A, Kujoth GC, Seo AY, Hofer T, Kouwenhoven E, Kalani R, Prolla TA, Barja G, Leeuwenburgh C. Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. *Experimental Gerontology*. 2007; 42: 173-182.
- Saraiva NZ, Perecin F, Méo SC, Ferreira CR, Tetzner TAD, García JM. Demecolcine Effects on Microtubule Kinetics and on Chemically Assisted Enucleation of Bovine Oocytes. *Cloning and Stem Cells*. 2009; 11(1): 141-151.
- Secretaria del Medio Ambiente (SMA). Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM 2008. 2010.
- Seo YR, Fishel ML, Amundson S, Kelly MR, Smith ML. Implication of p53 in base excision DNA repair: *in vivo* evidence. *Oncogene*. 2002; 21: 731-737.
- Schwartz TR, Kimec EB. Using methyl methane sulfonate (MMS) to stimulate targeted gene repair activity in mammalian cells. *Gene Therapy and Molecular Biology*. 2005; 19: 193-202.
- Snustad PD, Simmons MJ. Principles of genetics 4^a ed. John Wiley & Sons, Inc. 2012. p 281-283, 296.
- Staker BL, Hjerrild K, Feese MD, Bahnke CA, Burgin AB, Stewart L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *PNAS*. 2002; 99(24):15387-15392.
- 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.
- Sugiyama C, Miyamae Y, Kobayashi H, Fujino Y, Mori M, Ohara K. The micronucleus test of methyl methane sulfonate with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coate slides. *Mutation Research* 1992; 278: 117-120.
- Tani T, Shimada H, Kato Y, Tsunoda Y. Demecolcine-Assisted Enucleation for Bovine Cloning. *Cloning and Stem Cells*. 2006; 8(1): 61-66.

- Thomas CJ, Rahier NJ, Hetch SM. Camptothecin: current perspectives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004; 12: 1585-1604.
- Tice RR, Arguelli, 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: 206-211.
- 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. *Chemical-Biological Interactions*. 2006; 160: 1-40.
- Vallejo M, Jáuregui-Renaud K, Hermosillo AG, Márquez MF, Cárdenas M. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica de México*. 2003; 139: 57-63.
- Wang L, Jiang H, Su L, Tang B, Li D, Li Z. Effects of colchicine or demecolone on cytoplasmic protrusions and assisted enucleation of Golden hamster oocytes. *Cell Biology International*. 2009; 3: 1274-1279.
- Williams JPG. Inhibition of embryonic deoxyribonucleic acid synthesis by colcemid. *European Journal of Pharmacology*. 1968; 3: 337-340
- World Health Organization (WHO). Particle matter air pollution: how it harms health. 2005.
- Xiao-mei ME, Jing LI, Yan-tuan LI. The antitumor activity of a vanadium compound LMC in inhibiting DNA topoisomerase. *Progress in Modern Biomedicine*. 2006; 04.
- 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.