



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO
MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS EN
UN MODELO MURINO EXPUESTO A LA
INHALACIÓN DE VANADIO COMBINADO CON LA
INGESTA DE SACAROSA**

T E S I S

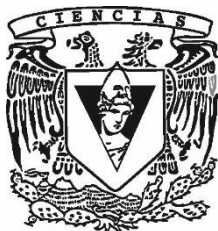
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

(B I Ó L O G O)

P R E S E N T A:

KARLA GIOVANNA RAMÍREZ LÓPEZ

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



CIUDAD DE MÉXICO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Contaminación atmosférica	2
3.1 Partículas suspendidas	3
3.2 Vanadio	4
3.3 Pentóxido de vanadio	5
3.4 Usos del vanadio	5
3.4.1 Industriales	5
3.5 Toxicocinética del vanadio	6
3.5.1 Ingreso a las células	6
3.5.2 Distribución	7
3.5.3 Acumulación	7
3.5.4 Eliminación	8
3.6 Toxicodinámica del vanadio	8
3.7 Principales fuentes de emisión	9
3.8 Vías de exposición	10
3.9 Efectos del vanadio en salud	11
3.10 Efectos del vanadio en el ADN	11
4. Sacarosa	12
4.1 Metabolismo de la sacarosa	13
4.2 Usos en la industria alimentaria	15
4.2.1 Bebidas azucaradas	16
4.3 ¿Por qué se ha convertido en un problema de salud?	17
5. Estrés oxidante	18
5.1 Efecto de los radicales libres	19
5.2 Estrés oxidante por consumo de sacarosa	20
5.3 Formación de los productos finales de la glicación avanzada	20
5.3.1 Glicación del ADN	20

6. Genotoxicidad	21
6.1 Micronúcleos	22
6.2 Técnica de micronúcleos	24
7. Eritropoyesis	25
8. Antecedentes	26
9. Justificación	28
10. Objetivos	28
10.1 Objetivo general	28
10.2 Objetivos particulares	28
11. Hipótesis	28
12. Método	29
12.1 Animales experimentales	29
12.2 Grupos experimentales	29
12.3 Administración de sacarosa	30
12.4 Preparación y exposición a vanadio	30
13. Estrategias experimentales	31
13.1 Toma de sangre periférica	31
13.2 Técnica para evaluar la citotoxicidad: viabilidad celular	31
13.3 Técnica para evaluar la genotoxicidad: micronúcleos teñidos con naranja de acridina	31
14. Análisis estadístico	33
15. Resultados	33
15.1 Viabilidad celular	33
15.2 Micronúcleos con naranja de acridina	34
15.3 Comparación entre grupos experimentales	36
15.4 Coeficiente de correlación de Pearson	41
16. Resumen de resultados	41
17. Discusión	42
17.1 Ausencia de efectos citotóxicos	42
17.2 Efectos genotóxicos	43
17.2.1 Daño al ADN causado por vanadio	43

17.2.2 Estrés oxidante resultado de la ingesta de sacarosa	44
17.3 Interacción entre vanadio y sacarosa	45
17.3.1 Posibles mecanismos de acción, generación de estrés oxidante y el subsecuente daño al DNA	46
17.3.2 Relación sinérgica entre la inhalación de vanadio y la ingesta de sacarosa	48
18. Conclusión	49
19. Perspectivas	50
20. Bibliografía	51

Resumen

La inhalación de metales como el vanadio, adosados a partículas suspendidas en el aire es un suceso cotidiano para la población mexicana. Los estudios indican que este metal genera efectos tóxicos en la salud y que uno de sus principales mecanismos de acción es a través de la formación de radicales libres (RL) y la consecuente oxidación de las biomoléculas, resultado del estrés oxidante. Por otra parte, la ingesta de bebidas azucaradas es un problema de salud prioritario a nivel mundial. Según la Universidad de Yale, México es el primer país consumidor de refrescos en el mundo, sin embargo, los estudios de la acción de la sacarosa sobre el ADN han sido estudiados escasamente. La conjunción de ambas problemáticas representa un factor de riesgo para producir daño en la molécula de ADN, lo cual simultáneamente podría ser un factor de riesgo para desarrollar diferentes tipos de cáncer u otras enfermedades.

El propósito de este estudio fue evaluar el daño genotóxico y citotóxico del efecto de la inhalación de vanadio combinado con la ingesta de sacarosa en un modelo murino, mediante la técnica de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de ratones macho CD-1.

Los grupos experimentales fueron 6: Control, Sacarosa 30%, Vanadio [2mg/m³], Vanadio [2mg/m³] + Sacarosa 30%, Vanadio [1.7mg/m³] y Vanadio [1.7mg/m³] + Sacarosa 30%. Éstos permanecieron con alimento ad libitum. Durante 8 semanas los grupos vanadio y vanadio+ sacarosa, fueron expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio ([2mg/m³] y [1.7mg/m³]), durante 1 hora dos veces por semana en una caja de acrílico cerrada conectada a un nebulizador.

Durante el experimento los grupos sacarosa y vanadio+ sacarosa bebieron agua con sacarosa a una concentración de 30%.

Posteriormente a través del corte de la vena caudal, se obtuvieron las muestras de sangre periférica, con una micropipeta se colectaron 5 µL de sangre. La cual se empleó para el ensayo de MN y para la técnica de viabilidad celular por fluorocromos.

Para evaluar la citotoxicidad se realizó una solución con los fluorocromos bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína y, se mezcló con sangre de ratón en una proporción de 1:1, más adelante se cuantificaron en campos al azar las células muertas y células vivas. De 100 células contabilizadas se observó un porcentaje mayor al 80% de viabilidad celular en todos los tiempos y en todos los grupos experimentales. Los resultados mostraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos, así como tampoco entre grupos.

Para evaluar la genotoxicidad se realizó un frotis sanguíneo y se fijó durante 5 min con metanol, posteriormente se hizo la tinción con naranja de acridina. Los resultados mostraron que la frecuencia de micronúcleos aumenta significativamente en los ratones expuestos a la inhalación de la concentración mayor de vanadio y la ingesta de sacarosa conjuntamente. Las diferencias estadísticamente significativas del grupo Vanadio [2mg/m³] + Sacarosa 30% contra el control se observaron desde el inicio del tiempo experimental.

Los resultados obtenidos mostraron el efecto genotóxico de la conjunción de ambos factores y, por otro lado, amplían el campo de investigación acerca del daño que causa la sacarosa al material genético.

Introducción

La población humana se encuentra expuesta a diversas fuentes de contaminación tanto física, como química y biológica. Dentro de los contaminantes químicos, los metales son de alto riesgo, ya que además de causar severos efectos tóxicos pueden interactuar con el material genético alterando la integridad del genoma y, por consecuencia, modificar el funcionamiento celular. A pesar de que algunos metales son micronutrientes y se encuentran en los seres vivos (hierro, cadmio, zinc, cobre y cromo, entre otros), la exposición prolongada o a altas concentraciones puede inducir daño genotóxico y teratógeno (García-Rodríguez *et al.* 2014).

Por otro lado, actualmente uno de los problemas de salud más prominentes a nivel nacional y mundial es la obesidad. Este fenómeno está ligado a diversos factores como son el consumo de alimentos calóricamente densos, bajos en fibra y altos en azúcares, esto combinado con un estilo de vida de baja actividad física o sedentario (Dommarco-Rivera *et al.* 2013, Barrientos *et al.* 2018).

El consumo mundial de sacarosa o azúcar de mesa ha aumentado de forma logarítmica desde el año 1800. En los últimos 10 años se ha sugerido una asociación entre el consumo de bebidas con endulzantes calóricos y el incremento del riesgo de padecer patologías como obesidad, diabetes, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico y gota (Zago *et al.* 2017).

La población mexicana se encuentra inmersa en ambas problemáticas, tanto en la contaminación atmosférica como el alto consumo de bebidas azucaradas y no se han estudiado las posibles consecuencias de la conjunción de estos factores sobre una biomolécula de suma importancia biológica como lo es el ADN.

Contaminación atmosférica

La atmósfera es la parte del ambiente con la que el organismo humano está permanentemente en contacto (Ballester *et al.* 1999). Los seres humanos están expuestos a un gran número de agentes oxidantes, producto de la contaminación (Rodríguez 2017). Se estima que unos 1500 millones de personas viven en áreas con niveles peligrosamente

elevados de contaminación del aire, y que esa exposición produce la muerte de 7 millones de personas por año en el mundo (Salazar-Rojas y Calvo-Brenes 2019). Por ello, la OMS considera a la contaminación atmosférica como una de las prioridades mundiales en salud (Ballester *et al.* 1999).

Estudios a nivel de salud pública en la Ciudad de México han revelado un elevado índice de enfermedades respiratorias, dermatológicas y de hipertensión arterial que podrían estar asociadas con la presencia de partículas suspendidas a las que se les adosan metales pesados (Aragón-Piña *et al.* 2006).

Partículas suspendidas

Entre los principales contaminantes atmosféricos provenientes de fuentes vehiculares, se encuentran las partículas suspendidas, las cuales son un conjunto de sustancias en estado sólido y líquido, que se localizan suspendidas en el aire o bien, que se depositan en la superficie muy lentamente cuando éstas tienen un diámetro mayor. Algunos ejemplos de materia particulada son el hollín, los aerosoles, la arena, el polvo, entre otros (Blanco *et al.* 2015). Son potencialmente mutagénicas, citotóxicas y carcinogénicas (Villalobos-Pietrini *et al.* 2008).

Presentan una distribución de tamaños que van desde 0.005 hasta 100 μm , aunque la mayoría tienen un tamaño menor a 40 μm . Desde el punto de vista toxicológico, aquellas partículas con diámetros menores a 10 μm (PM 10) conforman la fracción inhalable, la cual se divide, de acuerdo con Blanco *et al.* 2015 en:

- fracción gruesa (diámetros entre 2.5 y 10 μm)
- fina (diámetros menores a 2.5 μm , PM 2.5)
- y ultrafina (diámetros menores a 1 μm)

Las partículas menores a 2.5 micrómetros (PM 2.5) son potencialmente peligrosas, ya que pueden ingresar al sistema respiratorio, depositarse en la tráquea y en los pulmones. Pueden llegar al torrente sanguíneo y generar diversos problemas de salud, mientras que las PM 10 puede depositarse, contaminar las plantas y el suelo (Salazar-Rojas y Calvo-Brenes 2019).

Los compuestos que se adosan a las partículas suspendidas pueden ser de naturaleza orgánica como los hidrocarburos aromáticos policíclicos o inorgánicos como algunos metales, dentro de los que se encuentra el vanadio (González-Villalva *et al.* 2016).

Con relación a la contaminación por metales (como el vanadio) unidos a las partículas, se ha observado una serie de efectos, tales como: taquicardia, incremento de la presión sanguínea y anemia (debido al efecto inhibitor de la hematopoyesis), además de un incremento en los niveles de triglicéridos, efectos neurotóxicos, daños renales tales como la disfunción tubular, evidenciada por un aumento en la excreción de proteínas de bajo peso molecular, el cual progresa en un decremento del ritmo de filtración glomerular (Comisión Ambiental Metropolitana 2011-2020).

Aunque el vanadio no es el único metal que se adosa a las partículas suspendidas, es un buen representante de los contaminantes metálicos. Conocer los efectos que causa sobre la salud, permite inferir el comportamiento de otros metales sobre los organismos.

Vanadio

En la corteza terrestre, el vanadio ocupa el lugar 22 entre los elementos más abundantes con una presencia de 0.014 a 0.02 % (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Es un elemento natural presente en muchas formas minerales diferentes en la corteza terrestre. La liberación natural al medio ambiente se produce por la meteorización de rocas, polvo continental, aerosoles marinos y actividad volcánica (Assem *et al.* 2012).

Es un metal de color grisáceo con densidad de 6.11 g/cm^3 . En la tabla periódica se ubica como el primer elemento de transición del grupo VB, tiene como número atómico 23, configuración electrónica $[\text{Ar}]4s^2 3d^3$, peso atómico 50.95, punto de fusión 1950°C y punto de ebullición 3600°C . Existe en diferentes estados de oxidación que van de -1 a +5, y generalmente pasa de un estado a otro por la transferencia de un electrón a través de procesos de óxido-reducción (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Este metal fue “descubierto” y reportado por primera vez en 1801 por Andrés Manuel del Río, uno de los fundadores de la mineralogía en México, su trabajo en el plomo pardo de Zimapán le llevó a observaciones del nuevo elemento al que llamó Eritronio (del griego ερυθρος [erithros] que quiere decir rojo) debido al color rojo de las sales que dicho metal produce al reaccionar con ácidos (López 2019).

Luego, en 1830 en Suecia, el químico sueco Nils Gabriel Sefström encontró el elemento antes descrito por Del Río en muestras de minerales provenientes de la mina de Taberg (Suecia), y le nombró Vanadio en honor a *Vanadis*, diosa de la belleza en la mitología escandinava (López 2019).

Pentóxido de vanadio

El pentóxido de vanadio es el compuesto más comercial, es una sal de color amarillo-rojizo, con punto de fusión de 1750 °C y punto de ebullición de 690 °C, es un agente químico peligroso, su límite de exposición ocupacional a polvos y humos es de 0.05 mg/m³ (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Uso del vanadio

a) Industrial

El vanadio se emplea en la industria metalúrgica para la manufactura de aleaciones de alta resistencia y baja corrosión; forma amalgamas principalmente con aluminio (Al), titanio (Ti), boro (B), cromo (Cr), níquel (Ni), manganeso (Mn) y tungsteno (W). Se utiliza en la preparación de vidrio, de pinturas de aplicación común, en colorantes para fotografía y cinematografía. En la industria agrícola se usa en la elaboración de fungicidas e insecticidas y como micronutriente en fertilizantes, además en la producción de ácido sulfúrico y caucho sintético. Se aplica en materiales de superconductividad y es importante en la industria de la energía atómica, en la construcción de maquinaria aérea y en la tecnología espacial (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Toxicocinética del vanadio

Actualmente se sabe que el vanadio puede participar en procesos biológicos en forma de anión o catión (Aguilar-Cuevas *et al.* 2012).

El vanadio unido a las partículas suspendidas que entra al árbol respiratorio es capaz de penetrar profundamente en las vías respiratorias (Choi *et al.* 2004), atravesar la barrera hematogaseosa y alcanzar el torrente sanguíneo (Rosales-Castillo *et al.* 2001), como se esquematiza en la Figura 1.

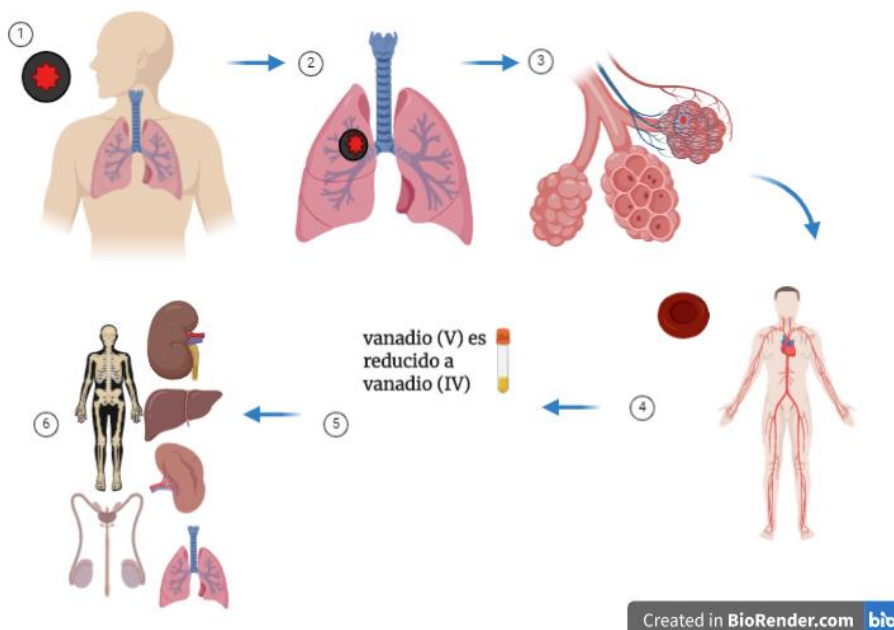


Figura 1. En este esquema se representa el ingreso de vanadio al organismo. 1.- Inhalación de partículas suspendidas que contienen vanadio. 2- El vanadio adosado a las partículas suspendidas penetra profundamente en el árbol respiratorio. 3- Llega a los sacos alveolares, atraviesa la barrera hematogaseosa. 4. Ingres a al sistema circulatorio. 5. En la sangre el V (V) es reducido a V (IV). 6- Se distribuye a todos los órganos y tejidos, incluida la médula ósea roja.

Ingreso a las células

Una vez en el torrente sanguíneo, puede ser reducido por diferentes antioxidantes como las catecolaminas, el glutatión de los eritrocitos o por el ácido ascórbico (AA) y otras sustancias reductoras en el plasma, pasando del estado de oxidación V a IV (Evangelou 2002).

Posteriormente es transportado por la albúmina y la transferrina, una de las proteínas que contienen hierro con las que el vanadio probablemente se asocia selectivamente, cerca del 90% del vanadio en sangre se encuentra principalmente en el plasma; el vanadio puede entrar a la célula mediante los mecanismos de transporte de aniones (Barceloux 1999; Evangelou 2002; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Algunos estudios de farmacocinética en eritrocitos demuestran que la entrada de vanadio a la célula se lleva a cabo en dos etapas, cada una regida por un mecanismo en particular. En la etapa inicial el V(V) cruza la membrana celular a través del sistema de intercambio aniónico, en tanto que en la segunda etapa el cruce es mucho más lento e involucra el producto reducido, el V(IV) y un mecanismo de paso semejante al de los cationes divalentes (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Distribución

Su transporte por el organismo está considerado en un tiempo medio de 1 hora (Barceloux 1999).

Intracelularmente el vanadio se distribuye en el núcleo, las mitocondrias, los microsomas y en el citoplasma en células de hígado (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

En un estudio realizado en 2002, el vanadio administrado a ratas en estado de oxidación tetravalente y pentavalente se distribuyó intracelularmente principalmente en la fracción nuclear (30-40%), seguido de la fracción citosólica y las fracciones mitocondriales (Evangelou 2002).

Acumulación

Varios estudios en modelos animales indicaron que el vanadio en su forma de vanadil (IV) se acumula principalmente en los riñones, el bazo, los huesos, el hígado y, en menor medida, en los pulmones y los testículos, siendo el tejido óseo el sitio principal de acumulación de este metal (Evangelou 2002). También se ha detectado en corazón, tiroides, cerebro, músculo esquelético, médula ósea y tejido graso. Los órganos que no remueven

con facilidad el metal son hueso, músculos y pulmón, donde permanece por tiempo prolongado (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Por otro lado, también hay evidencia de que el vanadio se acumula más en las células y tejidos cancerosos que en los normales (Evangelou 2002).

Eliminación

El vanadio se elimina rápidamente por los riñones con una vida media biológica de 20 a 40 h en orina. La etapa de eliminación se considera bifásica, en la primera fase se elimina la mayoría del vanadio y además es rápida, siendo a lo más, 20 horas; la segunda fase es más lenta y se elimina el resto del metal, esta fase tarda hasta 50 días. El vanadio que no fue absorbido es eliminado por vía urinaria y otra pequeña cantidad es eliminada en las heces (Barceloux 1999; Evangelou 2002).

Toxicodinámica del vanadio

El vanadio puede ser altamente tóxico para los seres humanos y algunos animales debido a que puede afectar importantes funciones celulares (Altamirano-Lozano *et al.* 1993) entre las que se encuentran el ciclo celular, las vías de señalización y la sobrevivencia celular (SCF 2004).

Se ha descrito que impide las actividades de diferentes ATPasas, proteínas quinasas, ribonucleasa y fosfatasas. Se ha demostrado también que inhiben o estimulan la actividad de muchas enzimas de ADN o ARN que inducen varios efectos genotóxicos y mutagénicos (Mukherjee *et al.* 2004). Uno de sus principales mecanismos de acción es la oxidación de las biomoléculas, este mecanismo es comúnmente conocido como estrés oxidante (Barceloux 1999).

Por otro lado, el vanadio tiene semejanzas estructurales y electrónicas a los grupos fosfato [$\text{PO}_4^{3-} \approx \text{VO}_4^{3-}$] y se considera que esa similitud físico-química es suficiente para explicar los efectos de fosforilación de las biomoléculas (Morinville *et al.* 1998; Evangelou 2002; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2010; Arrambide-Brianthe 2014).

El vanadio es capaz de interferir en la homeostasis del organismo causando efectos adversos a la salud (Rojas-Lemus *et al.* 2014).

Principales fuentes de emisión

Los seres humanos y otras especies pueden estar expuestos al metal a través de la atmósfera, el vanadio puede estar en forma de vapores y polvo generados por la refinación metalúrgica, por los productos de la quema de los aceites combustibles, por la erosión del suelo, emisiones volcánicas, incendios forestales y otros procesos antropogénicos (Evangelou 2002; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

En las grandes urbes la principal fuente es la quema de combustibles fósiles, ésta da como resultado la dispersión de un amplio número de metales, dentro de los que se encuentra el vanadio (V) (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Las fuentes antropogénicas representan aproximadamente dos tercios del vanadio atmosférico, específicamente en forma de óxidos de vanadio. Es el elemento traza más abundante en los combustibles fósiles, la quema de éstos y de sus derivados provee una fuente importante de vanadio en el ambiente. Altas concentraciones de vanadio (hasta 50% de los elementos traza) aparecen en los depósitos de petróleo especialmente en aquellos que proviene de Iraq, Irán, Kuwait, Venezuela y del Golfo de México (Rojas-Lemus *et al.* 2014). Se estima que el 90% del vanadio que es emitido cada año a la atmósfera proviene principalmente de la combustión del petróleo y de sus derivados como la gasolina (Rojas-Lemus *et al.* 2014).

El nivel medio de vanadio en las ciudades con un alto consumo de combustibles fósiles es de 0.62 pg/m³, en comparación con 0.011 pg/m³ en el área rural (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Los niveles en el ambiente dependen de las condiciones climáticas, la posición geográfica y las condiciones de urbanización, entre otros factores. Para la Ciudad de México se han

reportado valores que alcanzan $0.114 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en aeropartículas de $10 \mu\text{m}$ y $0.093 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en las de $2.5 \mu\text{m}$ (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Otra fuente importante es por la vía oral a través de la ingestión de alimentos y agua que contienen vanadio. Recientemente se examinó la cantidad de vanadio en los alimentos que se ingieren en la dieta cotidiana y el riesgo toxicológico que esto representa (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Vías de exposición

Los seres humanos están expuestos por dos vías principales: la oral y la inhalada (Assem *et al.* 2012).

Vía oral: por agua y alimentos.

Vía inhalada: por los contaminantes presentes en la atmósfera.

Por vía oral, los alimentos son la mayor vía de exposición, en éstos el vanadio se encuentra en los estados de oxidación III y IV. Las concentraciones en peso fresco de grasas, aceites, frutas y vegetales van de 1 a $10 \mu\text{g}/\text{kg}$; en granos, alimentos de mar y carnes de 5 a $40 \mu\text{g}/\text{kg}$; en eneldo o pimienta negra las cantidades detectadas se encuentran en 431 y $987 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente y en tabaco para fumar de 1 a $8 \mu\text{g}/\text{g}$. Se ha estimado, que la ingesta de vanadio en la dieta en promedio es de 13 a $15 \mu\text{g}/\text{día}$ y algunos autores, mencionan que alcanza valores de $60 \mu\text{g}/\text{día}$ (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Su requerimiento para los humanos no ha sido confirmado, pero debido a sus múltiples mecanismos de acción se ha estimado que, en el caso de ser necesario, la ingesta aproximada sería de $15 \mu\text{g}$ por día (Assem *et al.* 2012).

La segunda fuente de exposición con más importancia es la vía aérea, varios reportes coinciden en que el 10 % del vanadio ingerido o el 25 % inhalado respectivamente, es absorbido y transportado a varios tejidos del cuerpo por el torrente sanguíneo (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Es por eso que la vía inhalada es más importante, ya que el porcentaje de absorción es más elevado comparado con el porcentaje de vanadio que se absorbe por la vía oral.

Efectos del vanadio en salud

La toxicidad del vanadio en trabajadores laboralmente expuestos está bien documentada. Los óxidos de vanadio presentes en las partículas de menos de 10 μm de diámetro de las cenizas y polvos, producto de la quema de combustible fósil, están asociados con efectos adversos a la salud. La exposición crónica por inhalación en ambientes laborales induce cambios en los órganos respiratorios y la aparición de bronquitis, rinitis, laringitis y faringitis, en algunos casos produce cambios en el ritmo cardíaco y la aparición de un color verdoso en la lengua de trabajadores fumadores. También se han reportado alteraciones bioquímicas en sangre como la disminución de grupos sulfhidrilo y cambios en la concentración de la albúmina y del colesterol (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

La exposición aguda (de 0.2 a 1 mg/m^3) a polvos de vanadio en personas voluntarias, indujo síntomas como tos, irritación en nariz y mucosa oral, mientras que una exposición aguda a concentración más alta causó irritación sensorial, fiebre, conjuntivitis, aumento del movimiento intestinal, dermatitis, vómito, diarrea, problemas respiratorios, temblores y daño renal (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Efectos del vanadio en el ADN

Los compuestos de vanadio han ganado mucha importancia en los últimos años debido a su bien conocido potencial tóxico, mutagénico y genotóxico a través de interacciones con el ADN (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Varias líneas de evidencia indican que V (IV) y V (V) inducen la escisión del ADN, aunque no reaccionan directamente con los componentes del ADN, actúan principalmente a través de la producción de especies de oxígeno altamente reactivas generadas en las células, llevándolas a un estado de estrés oxidante provocando daños en bases nitrogenadas, enlaces cruzados o roturas de filamentos en células proliferantes que se manifestarán como

micronúcleos. En algunos sistemas celulares se ha demostrado que los compuestos de vanadio causan daño clastogénico y aneugénico (Rojas-Lemus *et al.* 2014).

En 2011, se reportó que la inhalación del vanadio causa roturas de cadena sencilla de ADN, que es consistente con otros estudios que utilizaron otros modelos animales y diversos compuestos de vanadio (Fortoul *et al.* 2011). Un ejemplo de estos estudios, son el ensayo de electroforesis en gel de células individuales (ensayo cometa) y la migración de ADN elaborado por Fortoul y colaboradores quienes revelaron que el V_2O_5 induce roturas de cadena sencilla de ADN en leucocitos de sangre y cultivos de linfocitos humanos y en células testiculares, en una dosis-respuesta clara (Fortoul *et al.* 2011). Además de que recientemente el pentóxido de vanadio ha sido clasificado por la IARC (2006) como un posible carcinógeno para los seres humanos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Sacarosa

Una de las dos problemáticas tratadas en este estudio es el consumo de sacarosa, tema que se abordará a continuación.

La sacarosa es un disacárido, formado por una molécula de glucosa y una de fructosa, es conocida como azúcar común o azúcar de mesa (Partearroyo *et al.* 2013).

El 70% del azúcar del mundo se produce a partir de la caña de azúcar y el resto de la remolacha. Es conocida por el hombre desde hace más de 2500 años. Se conoce la existencia de la caña de azúcar por un almirante de Alejandro Magno (356-323 a.C.) llamado Nearco que la menciona en una expedición a la India. De la época de los romanos datan referencias sobre el azúcar elaborado; por ejemplo, en las crónicas del asalto al palacio del rey de Persia en el año 627 d.C. por las tropas del emperador Flavio Heraclio Augusto (575-641 d.C.). Este disacárido formó parte del botín, junto con sedas y especias de diversos tipos (Gómez-Morales *et al.* 2013).

Hoy en día es consumida por gran parte de la población mundial y es enormemente apreciada por su cualidad de hacer más apetecibles los alimentos (Gómez-Morales *et al.* 2013). Además de que se produce en más de 130 países dentro de los cuales México se localiza en los primeros lugares de producción (Quiles-Izquierdo 2013).

Metabolismo de la sacarosa

Cuando la sacarosa entra al organismo, por medio de oxidación catabólica se transforma en moléculas más pequeñas y simples, este es un proceso que libera una importante cantidad de energía que es utilizada para llevar a cabo el conjunto de reacciones químicas y fisicoquímicas que tienen lugar en todas las células del organismo (Berg 2018). La sacarosa proporciona la energía que el organismo necesita para el funcionamiento de los diferentes órganos, como el cerebro y los músculos, es decir, la funcionalidad esencial a lo largo de la vida del ser humano (Partearroyo *et al.* 2013).

La fructosa libre, consumida como tal o proveniente de la hidrólisis enzimática de la sacarosa, se absorbe en la última parte del duodeno y en el yeyuno. Se absorbe por difusión facilitada mediante el transportador GLUT5 y se difunde a la sangre a través del GLUT5 o GLUT2 (Figura 2). A diferencia de la glucosa, la absorción de fructosa no es dependiente de ATP ni del cotransporte de sodio. La absorción de fructosa es lenta, aunque su absorción aumenta cuando se consume conjuntamente con glucosa y aminoácidos. También se observó que durante el consumo excesivo y sostenido de fructosa, la tasa de absorción aumenta (Zago *et al.* 2017).

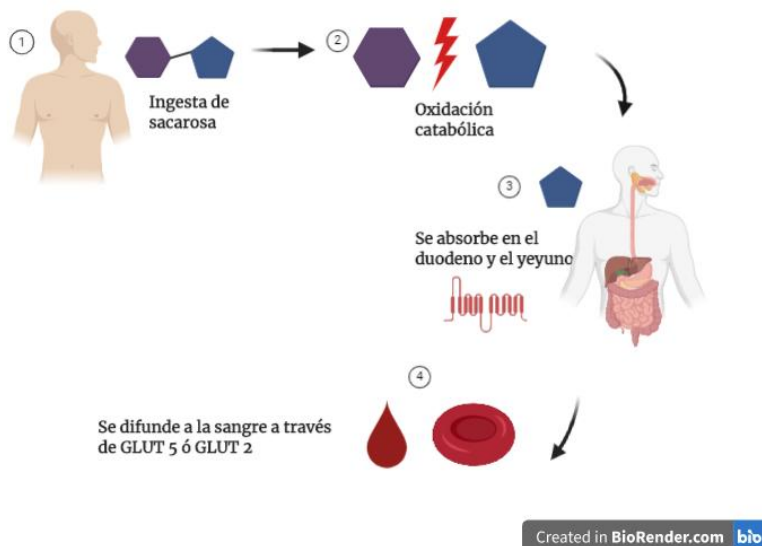


Figura 2. Metabolismo de fructosa. 1- Ingesta de sacarosa vía oral. 2- Mediante oxidación catabólica la sacarosa se descompone en fructosa y glucosa. 3- La fructosa es absorbida por difusión facilitada mediante el transportador GLUT5 en la última parte del duodeno y en el yeyuno. 4- Se difunde a la sangre a través del GLUT5 o GLUT2.

La glucosa puede ser metabolizada en cualquier tejido. Para entrar en la glucólisis se transforma en glucosa 6-fosfato, la cual realiza la enzima glucoquinasa en el hígado y que en el resto de los tejidos efectúa una isoenzima de la anterior: la hexoquinasa. La glucosa 6-fosfato se convierte entonces en fructosa 6-fosfato, y ésta por acción de la fosfofructoquinasa, en fructosa 1,6-bifosfato, que continúa la vía glucolítica con la formación de las triosas y finaliza en la conformación de piruvato (Zago *et al.* 2017) como se esquematiza en la Figura 3.

El consumo muy elevado de fructosa (monosacárido de la sacarosa), se ha asociado a un aumento de los niveles de triglicéridos, de la grasa visceral, de la presión arterial, de la resistencia a la acción hipoglucemiante de la insulina, y a una disminución de los niveles de HDL-colesterol. Estas variaciones, de forma individual y en conjunto, se han asociado con el aumento en el riesgo de padecer alguna enfermedad cardiovascular. Gran parte de estos efectos que causa la fructosa se debe a que casi el 50% de la cantidad absorbida se convierte en ácidos grasos, a diferencia de otros hidratos de carbono, como el almidón, que solo un 5% se convierte en ácidos grasos (Gómez-Morales *et al.* 2013).

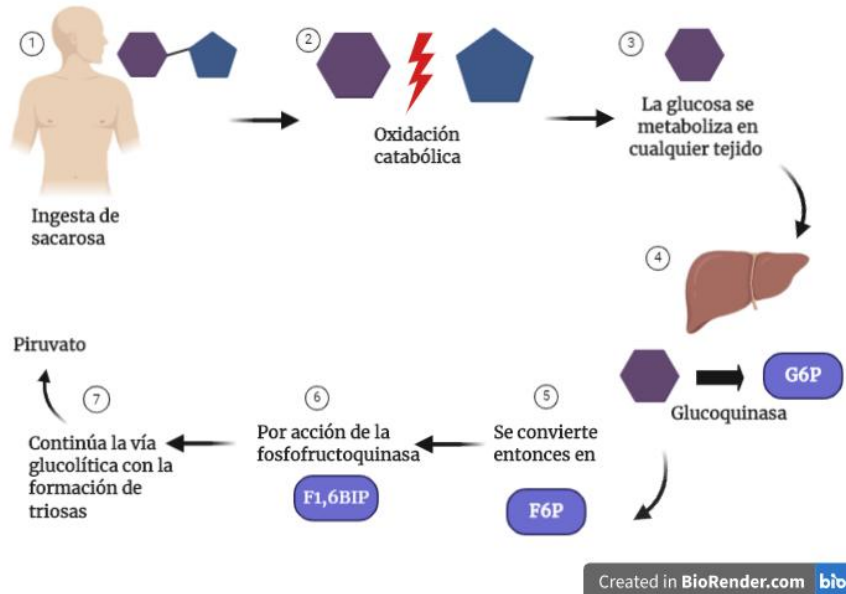


Figura 3. Metabolismo de glucosa. 1- Ingesta de sacarosa vía oral. 2. Mediante oxidación catabólica la sacarosa se descompone en fructosa y glucosa. 3- La glucosa puede ser metabolizada en cualquier tejido. 4- Para entrar a la glucólisis se transforma en glucosa 6-fosfato, modificación que se lleva a cabo en el hígado por la enzima glucoquinasa. 5-La glucosa 6-fosfato se convierte entonces en fructosa 6-fosfato. 6- Esta a su vez por acción de la fosfofructoquinasa se transforma en fructosa 1,6-bisfosfato. 7- Continúa la vía glucolítica con la formación de las triosas y finaliza en la conformación de piruvato.

Usos en la industria alimentaria

Principalmente se utiliza para la conservación de alimentos, como edulcorante para dar palatabilidad a las bebidas y alimentos, para conferir ciertas características a los alimentos como viscosidad, textura, cuerpo y la capacidad de dotarlos de aromas o de un color tostado (Quiles-Izquierdo 2013).

En México, 26% del total de la energía consumida por la población proviene de bebidas azucaradas. El consumo de estos productos, sumado a la mala alimentación contribuye a severos problemas de salud en la población mexicana (Barrientos-Gutiérrez *et al.* 2018).

Bebidas azucaradas

Se define como bebida azucarada a toda aquella que le han añadido carbohidratos simples de origen natural (azúcares) aparte de los que ya contenía en su composición original. En este rubro se encuentran las bebidas carbonatadas regulares o gaseosas, jugos endulzados y bebidas hidratantes (Albarrán-Alonso 2018).

Las bebidas azucaradas pueden ser endulzadas con azúcar proveniente de la remolacha azucarera, caña de azúcar u otros edulcorantes (Silva-O Paulo 2014).

La cantidad encontrada en los refrescos oscila entre los 4 y los 25 gramos. En el caso de las bebidas saborizadas, varía entre los 5 y los 28 gramos de azúcar; ambos rangos presentes en una muestra de 200 mL (Revista del consumidor, mayo 2012) como se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Porcentaje en gramos de sacarosa encontrada en refrescos y aguas saborizadas. Elaboración propia con datos de la revista del consumidor, mayo 2012.

En promedio se ingiere 50 gramos de azúcar equivalentes a 200 kilocalorías extras. Se demostró que un litro de refresco tiene el equivalente a 27 cubitos de azúcar; por lo cual, si en promedio se ingiere medio litro de esta bebida diariamente, se consume alrededor de 14 cubos de azúcar por día (Rodríguez-Burelo *et al.* 2014).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la ingesta diaria no debe superar el 5% de toda tu ingesta calórica, equivalente a 25 gramos (Carceller 2019).

¿Por qué se ha convertido en un problema de salud?

El consumo de bebidas azucaradas en nuestro país se ha convertido en un problema alarmante y urgente. En el año 2012, México se convirtió en el primer consumidor de refrescos en el mundo, superando por primera vez a Estados Unidos (Delgado 2019). Un estudio de la Universidad de Yale en Estados Unidos reporta que un mexicano promedio bebe 163 litros al año, lo que representa medio litro al día. También se ha comprobado que siete de cada 10 niños en comunidades rurales desayunan con refresco (Delgado 2019).

Este consumo elevado es responsable de 12.1% de las muertes asociadas con diabetes, enfermedad cardiovascular y cáncer secundario en la población mexicana (Rodríguez-Burelo *et al.* 2013; Barrientos-Gutiérrez *et al.* 2018).

Previo a la muerte, existen consecuencias metabólicas producto del aumento en el consumo de bebidas azucaradas, por ejemplo, el daño al hígado y a los riñones, el incremento de triglicéridos, mayor presión sanguínea, hígado graso, hipertensión arterial, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, la obesidad abdominal e hipertrigliceridemia (Gómez-Miranda *et al.* 2013; Mendoza-Velázquez *et al.* 2019). La evidencia metaanalítica ha permitido establecer que el consumo diario de 355 mL (una porción) de bebidas azucaradas al día o más está asociado con 37% de incremento en el riesgo de obesidad, 83% en diabetes y 22% en dislipidemia e hipertensión (Barrientos-Gutiérrez *et al.* 2018).

Entre 1999 y 2006 se triplicó el consumo de bebidas azucaradas entre los adultos mexicanos, y justamente este sector de la población son 15 por ciento más propensos a padecer obesidad (Delgado 2019).

Por lo anterior, un grave problema de salud pública derivado del consumo de bebidas azucaradas es la obesidad, diversos estudios realizados han demostrado la relación entre el consumo de bebidas azucaradas, el sobrepeso y obesidad (Rodríguez-Burelo *et al.* 2014).

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa (Dávila-Torres *et al.* 2014). En la actualidad, México y Estados Unidos ocupan los primeros lugares de prevalencia mundial de obesidad en la población adulta (30 %), la cual es diez veces mayor que la de países como Japón y Corea (4 %). Respecto a la población infantil, México ocupa el cuarto lugar de prevalencia mundial de obesidad, aproximadamente 28.1 % en niños y 29 % en niñas (Barrera-Cruz *et al.* 2013; Dávila-Torres *et al.* 2014).

En nuestro país, las tendencias de sobrepeso y obesidad en las diferentes encuestas nacionales muestran un incremento constante a lo largo del tiempo, se han alcanzado proporciones preocupantes (Barrientos-Gutiérrez *et al.* 2019).

Como resultado del sobrepeso y la obesidad se incrementa significativamente el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), mortalidad prematura y el costo social de la salud, además de que reducen la calidad de vida. Se estima que 90 % de los casos de diabetes mellitus tipo 2 son atribuibles al sobrepeso y la obesidad (Barrera-Cruz *et al.* 2013). Además de que es bien sabido que los pacientes con diabetes tipo 2 tienen niveles elevados de daño en el ADN (Al-Aubaidy y Jelinek 2011). Se demostró que el daño en el ADN se produce como consecuencia del estrés oxidante (Barrera-Cruz *et al.* 2013).

Estrés oxidante

El daño o estrés oxidante se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno (EROS) pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes (Venereo-Gutiérrez 2002).

Los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo que les da una configuración espacial generando gran inestabilidad (Venereo-Gutiérrez 2002).

Desde el punto de vista molecular, son pequeñas moléculas que se producen por diferentes mecanismos, y causan daño celular (oxidante) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo (Venereo-Gutiérrez 2002).

Se ha demostrado que los radicales libres pueden afectar negativamente a la supervivencia celular debido a una alteración en la membrana a través del daño oxidante de los lípidos, las proteínas y la modificación irreversible del ADN (Rico-Rosillo *et al.* 2018).

Efecto de los radicales libres

En lípidos: se produce daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular y se produce edema y muerte celular. La peroxidación lipídica representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que son importantes para su funcionamiento normal; sin embargo, son vulnerables al ataque oxidante iniciado por los radicales libres del oxígeno (Venereo-Gutiérrez 2002).

En proteínas: hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilo (Venereo-Gutiérrez 2002).

En el ADN: hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidantes de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes (Venereo-Gutiérrez 2002).

Estrés oxidante por consumo de sacarosa

El mecanismo de toxicidad de sacarosa sigue sin estar claro. Sin embargo, es posible sugerir que el estrés oxidante inducido por el alto consumo de sacarosa, así como las reacciones de glicación de ADN inducidas por sacarosa, sean posibles causas de daño en el ADN. Por otro lado, no se puede descartar la influencia de otros mecanismos (Franke *et al.* 2017).

Formación de los productos finales de la glicación avanzada

Glicación del ADN

La reacción química que ocurre entre proteínas y azúcares reductores, y que forma un grupo heterogéneo de productos de color marrón se conoce como reacción de Maillard (Méndez 2003).

La formación de productos de Maillard comienza con la reacción de los grupos amino de las proteínas, particularmente lisina, arginina e histidina, con carbohidratos reductores que incluyen a la glucosa, fructosa, triosas y sus correspondientes derivados fosforilados. Esta modificación se denominó “glucosilación no enzimática,” “glicación” (porque no se requiere la mediación de enzimas)” o “reacción de Maillard,” que en el caso de la glucosa conduce en horas a la formación reversible de una base de Schiff (reacción entre el grupo amino de la lisina y el carbonilo de la glucosa). Esta base de Schiff se transforma en un compuesto más estable, una cetoamina o fructosamina conocida como producto de Amadori (Méndez 2003). Después, a través de subsecuentes rearrreglos moleculares, que incluyen reacciones de deshidratación, condensación, oxidación y ciclización; procesos que llevan semanas o meses, se forma un grupo heterogéneo de productos fluorescentes y café oscuro, llamados productos finales de glicación avanzada “AGE” (por las siglas del inglés: "advanced glycation end-product") (Méndez 2003).

En las vías alternas para la formación de AGEs, participa la glucosa. La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo y el que más participa en las reacciones de glicación, aunque a una tasa más lenta que otros carbohidratos. En la circulación sanguínea se encuentra mayoritariamente la glucosa, que es en este sentido, el azúcar menos tóxico, lo

que representa una ventaja evolutiva para todas las especies. Por otro lado, la glicación ocurre preferentemente en los grupos amino libres de las proteínas, pero también con las otras biomoléculas como las apolipoproteínas, las lipoproteínas de baja densidad (LDL), los lípidos y los ácidos nucleicos. Con respecto a esto último, el daño por glicación del ADN se ha asociado con mutagénesis y carcinogénesis (Cárdenas-León *et al.* 2009).

La degradación de proteínas extracelulares modificadas por AGEs requiere que estos sean reconocidos por receptores específicos (RAGEs) (Fuentes *et al.* 2015).

Los RAGE actúan como un receptor de diversos ligandos liberados por células inflamadas, estresadas y dañadas. Los receptores para AGEs han sido identificados en la superficie de macrófagos, células endoteliales, células mesangiales, fibroblastos, células del epitelio glomerular (podocitos) y neuronas, entre otras. El papel preciso de los receptores de AGEs, en los eventos patológicos no está claro y actualmente existe controversia de cuáles promueven o limitan la disfunción de órganos y tejidos. A la fecha se han descrito dos grupos de receptores: uno representado por RAGE asociado con estrés oxidante, crecimiento y procesos inflamatorios, a través de vías de señalización intracelular y el otro relacionado con los procesos de degradación y eliminación de AGEs, así como de resíntesis de las proteínas eliminadas por esta vía (Fuentes *et al.* 2015).

Genotoxicidad

Existe un gran número de compuestos, capaces de interactuar con el ADN, directa o indirectamente, provocando cambios y/o alterando la información contenida en el material genético, lo cual puede contribuir a un aumento de enfermedades de etiología genética, si dichas enfermedades ocurren en la línea somática puede derivar en cáncer y si sucede en células germinales puede afectar tanto a los individuos expuestos como a su descendencia (Lizárraga *et al.* 2018).

En la actualidad, un elevado número de contaminantes están liberados en el ambiente, los cuales no han sido evaluados para determinar su riesgo genético en los seres vivos, incluido el hombre. En las últimas décadas se ha incrementado el interés por conocer dichos efectos

y el impacto que tienen sobre la salud, también se han implementado procedimientos para determinar y evaluar el daño. Afortunadamente, se cuenta con herramientas útiles para medir la genotoxicidad de los agentes (Lizárraga *et al.* 2018; Fenech, 2002).

Los biomarcadores son una herramienta útil para evaluar el riesgo potencial de las diferentes exposiciones ambientales y como indicadores de riesgo genético (Lizárraga *et al.* 2018).

Los biomarcadores de exposición detectan si el agente genotóxico ha penetrado en el organismo a distintos niveles. Localizan la presencia de agentes mutagénicos y/o carcinogénicos en tejidos y secreciones corporales. Si el agente se ha introducido y ha interactuado con el material genético (mutágenos/ carcinógenos), se puede detectar por la aparición de aductos en proteínas (albúmina y hemoglobina) y en ADN, así como por la formación de Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH), reflejando una exposición primaria (Lizárraga *et al.* 2018).

Las técnicas citogenéticas más utilizadas para detectar cambios cromosómicos (estructurales o numéricos), para evaluar el riesgo genético de determinadas poblaciones expuestas a contaminantes, son la técnica de análisis de aberración cromosómica (AC), intercambio de cromátidas hermanas y de micronúcleos (Lizárraga *et al.* 2018).

Micronúcleos

Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, corresponden a material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicos (Fortoul *et al.* 2011). Se observan como cuerpos extranucleares suspendidos en el citoplasma y corresponden a fragmentos cromosómicos o cromatídicos acéntricos, así como a fragmentos con centrómero que pueden ser cromosomas completos, en los eritrocitos de algunas especies, el MN permanece solo en el citoplasma, una vez que estos han expulsado su núcleo (Soto *et al.* 2018).

La formación de MN en las células en división es el resultado de la ruptura de los cromosomas debido a lesiones de ADN no reparadas o mal reparadas, o la mala segregación cromosómica debido al mal funcionamiento mitótico. Estos eventos pueden ser inducidos por el estrés oxidante, la exposición a clastógenos o anéugenos, defectos genéticos en el punto de control del ciclo celular y / o genes de reparación del ADN, así como deficiencias en los nutrientes necesarios como cofactores en el metabolismo del ADN y la maquinaria de segregación cromosómica. Todos estos eventos pueden causar la formación de MN a través de reordenamientos cromosómicos, alteración de la expresión génica o aneuploidía, efectos asociados con el fenotipo de inestabilidad cromosómica que a menudo se observa en el cáncer (Bonassi *et al.* 2007).

La formación de anomalías nucleares como MN, reordenamientos cromosómicos y puentes anafásicos (que conducen a ciclos de ruptura-puente de fusión y generación de más MN) son eventos comúnmente vistos en las primeras etapas de la carcinogénesis (Bonassi *et al.* 2007).

El ensayo de MNs es uno de los más empleados en estudios de genotoxicidad por exposición ambiental u ocupacional en poblaciones humanas, para determinar el potencial genotóxico de diferentes compuestos, y también es considerado como una prueba importante para comprobar que las sustancias, a las que son expuestos los animales, pueden inducir aberraciones cromosómicas o numéricas y éstas, a su vez, en la aparición y la progresión de tumores (Hayashi *et al.* 2000).

La prueba de micronúcleos está considerada como un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente (Zalacaín *et al.* 2005) *in vitro* o *in vivo* combina facilidad en su realización, sencillez en la evaluación y una alta sensibilidad, características que han llevado a validar y recomendar su uso como prueba de genotoxicidad por instituciones como el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (Corvi *et al.* 2008) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD 2010).

Técnica de micronúcleos

El uso de la técnica del recuento de MN como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesto por primera vez en 1976, cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica. El empleo de células sanguíneas representa una fuente de fácil acceso y que, al estar distribuidas por todo el cuerpo, constituyen un sistema de detección sistémico, es decir, que pueden reflejar lo ocurrido en algún tejido blanco (Zalacaín *et al.* 2005).

Este ensayo se encarga de evaluar la frecuencia o cantidad de micronúcleos (MN) en reticulocitos (igualmente conocidos como eritrocitos policromáticos). Estos micronúcleos son pequeños cuerpos casi esféricos los cuales son remanencias de ADN, las cuales quedan dentro del reticulocito en el proceso de eritropoyesis. El ensayo también contempla la frecuencia o la relación reticulocitos-eritrocitos, con el fin de estimar la muerte celular (Hayashi *et al.* 2000).

Los micronúcleos pueden ser observados con diversas técnicas de marcaje dependiendo del interés del investigador. Una de las técnicas empleadas para evidenciar los micronúcleos es con naranja de acridina (NA). Este marcaje es bastante sencillo y los resultados que se pueden obtener con ella, en términos estadísticos, son robustos. Entre las facilidades que hay al utilizar naranja de acridina corresponde a que es sencillo diferenciar reticulocitos (fluorescen en rojo debido a la remanencia de ARN-riboosómico) y eritrocitos (que no emiten fluorescencia) por su color dado que es específico de ácidos nucleicos: el ADN fluoresce en amarillo-limón (y delata la presencia de un MN en el citoplasma del reticulocito o del eritrocito) o ARN, por esto mismo, al momento de observar en el microscopio no hay cabida para falsos positivos (Hayashi *et al.* 1983,2000).

La técnica de MN teñidos con naranja de acridina se lleva a cabo en eritrocitos, por lo que es importante explicar cómo se lleva a cabo el proceso de formación de estas células dentro de la médula ósea roja.

Eritropoyesis

La eritropoyesis es un proceso por el cual las células madre hematopoyéticas son estimuladas al pasar por una serie de etapas de diferenciación celular para dar lugar finalmente a la formación de glóbulos rojos maduros (Grosso *et al.* 2017), que son las células encargadas del transporte de oxígeno a los tejidos (Alija 2019). Comienza en la médula ósea y está regulada por la hormona eritropoyetina (EPO). A partir de las células precursoras eritropoyéticas se forman los proeritroblastos. De ellos derivan los eritroblastos, que en divisiones sucesivas llegarán a formar reticulocitos que en su fase madura son los glóbulos rojos o eritrocitos (Brito 2014). Este proceso se esquematiza en la Figura 5.

Los eritrocitos sobreviven una media de 120 días, mientras que los granulocitos solamente lo hacen unas pocas horas; esto significa que, para mantener los niveles de células sanguíneas constantes, se deben producir cada día 10^{13} células nuevas (Alija 2019), lo que indica el altísimo índice mitótico de este linaje celular en médula ósea.

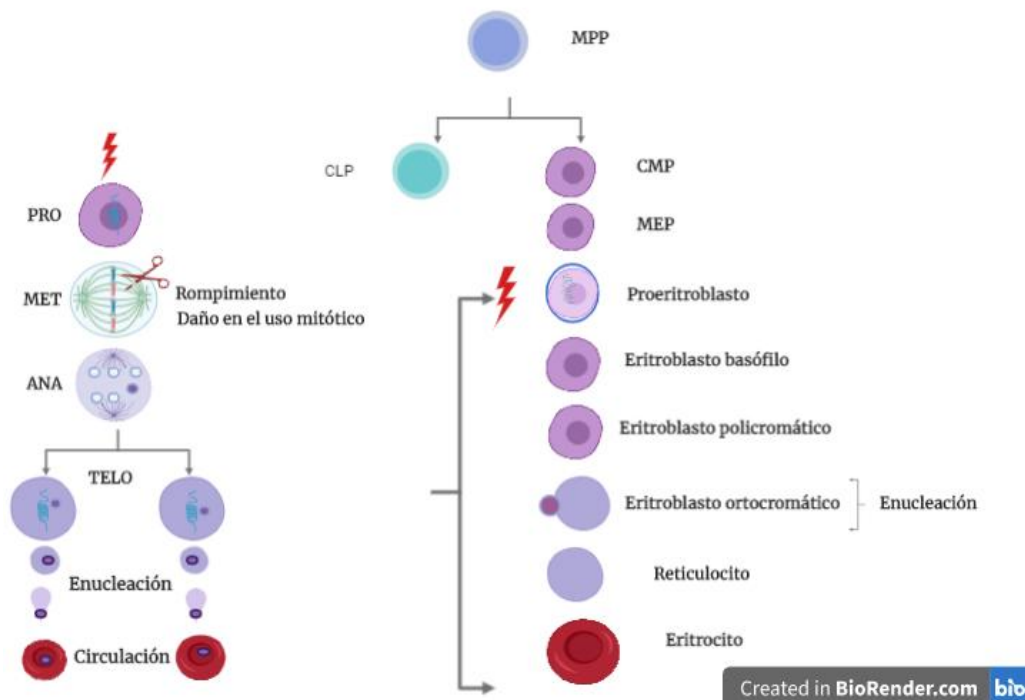


Figura 5. Maduración de células eritroides y mecanismo de generación de micronúcleos durante la eritropoyesis. Izquierda: se representa el proceso por el cual un eritrocito en circulación puede presentar micronúcleos. El agente xenobiótico penetra en la célula durante la mitosis, específicamente en la profase. Durante la división celular el agente puede causar daños, rompimientos e intercambios cromosómicos o

inhibición de las biomoléculas relacionadas con la disyunción de las cromátidas hermanas y así ocasionar disfunción del aparato mitótico. En la telofase se produce el pequeño núcleo separado del núcleo principal, éste permanece en el citoplasma. Durante la enucleación se expulsa el núcleo principal y el micronúcleo creado permanece en el citoplasma de la célula anucleada. PRO (profase), MET (metafase), ANA (anafase), TELO (telofase). Derecha: se representa el proceso de formación y maduración de los eritrocitos. CMP (progenitor mieloide común), MEP (progenitor eritromieloide).

Antecedentes

La exposición a vanadio en habitantes de la Ciudad de México ha sido evidenciada por Fortoul y colaboradores, desde el año 2002, en su grupo de trabajo se han realizado diversos protocolos con el fin de estudiar los efectos sistémicos del vanadio. Estos protocolos se llevan a cabo en un modelo de inhalación, utilizando ratones (*Mus musculus*) de la estirpe CD-1 (Fortoul *et al.* 2011).

Debido a que la inhalación es la vía por la cual los organismos están principalmente expuestos a los contaminantes atmosféricos y por la que más vanadio absorbe el organismo, Fortoul y colaboradores (2011) han desarrollado un modelo experimental en el cual los animales son expuestos a la inhalación de partículas de diámetro similar a las que se respiran cotidianamente (0.5-5 μm) a través de un ultranebulizador.

Fortoul (2011) y Rojas Lemus (2014) han descrito que la inhalación de pentóxido de vanadio causa daño primario al ADN de leucocitos de sangre periférica de ratones macho; mismo efecto que se observó en células de médula ósea de ratones hembra y macho, con una respuesta diferencial en el número de células dañadas, dependientes del sexo, sin cambios en la viabilidad celular en los dos tejidos. En estos trabajos se ha reportado la actividad genotóxica del vanadio sin causar muerte celular (citotoxicidad).

En cuanto a los modelos de inhalación expuestos a V_2O_5 (en concentración de 2.57 mg/m^3) y la ingesta de sacarosa (Albarrán-Alonso *et al.* 2015,2018), reportó daños a la histología del páncreas, alteración al metabolismo de glucosa, hiperglucemia e hipoglucemia en ratones CD1.

La concentración mayor utilizada por Albarrán Alonso et al. 2015 y 2018 fue la empleada en el presente trabajo, misma que se compara con las inhaladas por trabajadores ocupacionalmente expuestos como lo reporta Aseem *et al.* (2012) en individuos de calderas

expuestos a altos niveles de V_2O_5 ($0.05\text{--}5.3\text{mg} / \text{m}^3$) durante la conversión de la planta de energía de petróleo a carbón. En cuanto a la concentración menor Rodríguez Mercado y Altamirano Lozano (2006) describen que en las grandes urbes se han detectado concentraciones en el aire que van de 0.15 a $1.5 \text{mg}/\text{m}^3$. Por lo que en el presente trabajo la concentración menor simula a la que una población está expuesta.

El daño al sistema hematopoyético también ha sido reportado. Algunos estudios describen anemia normocrómica normocítica, con una disminución de la hemoglobina y del hematocrito. Esta anemia podría ser consecuencia de la hemólisis, como lo han propuesto otros investigadores, o podría ser un tipo de suicidio de eritrocitos identificado como eriptosis, específicamente descrito para la toxicidad del vanadio, aunque también podría suponerse como la consecuencia del deterioro de la eritropoyesis (Delgado *et al.* 2011).

Los posibles mecanismos de acción del vanadio sobre el material genético también han sido reportados en estos trabajos, al igual que con Mussali *et al.* (2005) quienes mencionan la interacción del vanadio sobre la tubulina- γ , lo que implica que pueden intervenir en la correcta formación del aparato mitótico, y por ende en la formación de micronúcleos.

Diversos autores (Fortoul *et al.* 2001, Ávila-Costa *et al.* 2005, Rojas-Lemus *et al.* 2014), han demostrado que los metales como el vanadio causan estrés oxidante, este mecanismo de acción es uno de los principales; el estrés oxidante produce daño al DNA a través de la generación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (EROs).

Por otro lado, en otro modelo realizado por Espinosa-Zurutuza *et al.* (2017) se reporta que la ingesta de agua con sacarosa al 30%, en ratones (*Mus musculus*) de la cepa CD-1, causa peroxidación lipídica y esto es resultado del estrés oxidante, por lo que podría tener una repercusión en el DNA. También Hansen *et al.* (2008) y Franke *et al.* (2017) exponen que el consumo prolongado y en concentraciones altas la sacarosa podría representar un factor que dañe al DNA.

Los resultados muestran que por separado ambos factores (la inhalación de vanadio y la ingesta de sacarosa) son capaces de causar daños en los animales experimentales, por ello

es importante evaluar el efecto (que bien podría ser sinérgico), de dichos factores sobre el material genético de los organismos expuestos.

Justificación

La contaminación atmosférica y la ingesta de sacarosa son dos problemáticas que de manera independiente la OMS ha catalogado como prioridad, además de que generan diversos padecimientos, ambos sucesos se conjuntan en la vida diaria del individuo y no se conoce el efecto simultáneo de los dos factores sobre el ADN.

Objetivo general

Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de la ingesta de sacarosa al 30% en combinación con la inhalación de dos concentraciones de vanadio (1.56 y 2.57 mg/m³) en ratones CD1.

Objetivos particulares

En sangre periférica de ratones macho CD-1 de 32-33 g de peso y de 60 días de edad, repartidos en 6 diferentes grupos experimentales y muestreados a las 0, 24 horas, 7, 14, 21 y 28 días de exposición/ingesta:

1. Evaluar la viabilidad celular mediante la técnica de citotoxicidad por fluorocromos.
2. Cuantificar la frecuencia de micronúcleos teñidos con naranja de acridina.
3. Comparar la actividad genotóxica y citotóxica entre los diferentes grupos experimentales.

Hipótesis

- La frecuencia de micronúcleos será más elevada en la concentración más alta de vanadio, comparada con la concentración menor a la que fueron expuestos los ratones.
- La frecuencia de micronúcleos será más elevada en los ratones que estuvieron expuestos a la concentración mayor de vanadio combinado con la ingesta de sacarosa.

Método

Este protocolo experimental siguió los procedimientos publicados por Fortoul *et al.* (2011) para el protocolo de inhalación de vanadio, así como la administración de sacarosa publicado por Espinoza-Zurutuza *et al.* (2017).

Animales experimentales

Este experimento fue realizado con ratones CD-1 machos, los cuales fueron proporcionados por la Unidad Académica Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Los animales fueron tratados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Todos los ratones se mantuvieron en fotoperiodos de luz: oscuridad 12:12 horas, con comida (Purina Rodent Laboratory Chow 5001[®], México) y agua *ad libitum*.

Este protocolo es parte del proyecto “Contaminación atmosférica y consumo de bebidas azucaradas. Evaluación de la combinación de sus efectos en la salud en un modelo en ratón” que está registrado y aprobado por las comisiones de Investigación y de Ética y de la Facultad de Medicina, UNAM, con número 100/214 (Oficio No. FMED/CI/SPLR/119/2014).

Grupos experimentales

Se utilizaron 30 ratones macho de la estirpe CD1 de 55 días de edad. Los animales se aclimataron en el bioterio de mantenimiento durante 5 días, de manera que al inicio del experimento tenían 60 días de vida. Los 30 animales fueron separados aleatoriamente en 6 grupos experimentales de 5 ratones cada uno. Las características de los grupos se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos experimentales empleados en el protocolo

Grupo	Abreviatura	Condiciones de exposición o administración
1. Control	Con	Sin exposición ni ingesta de sacarosa
2. Sacarosa	Sac	Ingesta de agua con sacarosa al 30%
3. Vanadio 0.01 M	Van 0.01	Inhalación de vanadio en concentración de 1.56 mg/m^3
4. Vanadio 0.02 M	Van 0.02	Inhalación de vanadio en concentración de 2.57 mg/m^3
5. Vanadio 0.01 M+ Sacarosa	Van 0.01+Sac	Inhalación de vanadio en concentración de 1.56 mg/m^3 + Sacarosa al 30%
6. Vanadio 0.02 M+ Sacarosa	Van 0.02+Sac	Inhalación de vanadio en concentración de 2.57 mg/m^3 + Sacarosa al 30%

Administración de sacarosa

Se preparó una solución de sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, azúcar común) en agua de bebida a una concentración de 300 g/L (30%) y se proporcionó a los ratones para su consumo *ad libitum*. El agua con sacarosa se colocó en los bebederos y se cambió diariamente durante todo el tiempo del experimento.

Preparación y exposición a vanadio

El vanadio (V) (Sigma-Aldrich[®], EUA) fue preparado en dos concentraciones en medio acuoso para su posterior nebulización; las dos concentraciones de vanadio dentro de la caja de acrílico fueron de 0.01 M (1.56 mg/m^3) y 0.02 M (2.57 mg/m^3).

Todos los ratones que fueron expuestos a vanadio lo inhalaron dentro de una caja de acrílico transparente (44 cm x 21 cm x 36 cm) durante una hora dos veces por semana, por cuatro semanas.

El vanadio se administró con un nebulizador ultrasónico YueHua[®] modelo WH-802 que, de acuerdo con la información del fabricante, 80% de las partículas nebulizadas que llegan a los ratones tienen un rango de 0.5 a 5 μm de diámetro aerodinámico (Espinoza-Zurutuza *et al.* 2017).

Estrategias experimentales

Toma de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica tomadas de los ratones se obtuvieron a través del corte de la vena caudal (de acuerdo con la NOM-ZOO-1999, apartado 8.2.1), con una micropipeta (BiohitProline®). Se colectaron 5 µL de sangre de cada individuo y se procesaron para el ensayo de micronúcleos con naranja de acridina y para la técnica de viabilidad celular por fluorocromos.

Técnica para evaluar la citotoxicidad: viabilidad celular por fluorocromos

Para evaluar la viabilidad celular se llevó a cabo el método descrito por Strauss (1991) con ciertas modificaciones; se preparó una solución con 0.01 g de diacetato de fluoresceína (FDA) disuelto en 2 mL de acetona (solución 1: S1). Por otra parte, 0.01 g de bromuro de etidio (BrEt) se disolvió en 5 mL de amortiguador de fosfatos (PBS) (solución 2: S2). La solución de trabajo se preparó cada vez que se realizó la prueba de viabilidad en las siguientes proporciones: 10 µL S1 y 50 µL de S2 en 1.2 mL de PBS (solución final: SF). Se mezcla la SF con sangre del ratón en una proporción 1:1 (1 µL de sangre y 1 µL de SF) y se cuantifican, en campos al azar, las células muertas o metabólicamente inactivas que fluorescen de color rojo y células vivas o metabólicamente activas que fluorescen de color verde. En total se contabilizan 100 células, y se obtiene la proporción de células vivas con respecto a las muertas.

Las muestras se observan con un microscopio de epifluorescencia Olympus® modelo BX51, con un filtro de excitación de 480-550 nm y uno de absorción de 570 nm (WB); se utilizó el objetivo de 40X para el conteo.

Técnica para evaluar la genotoxicidad: micronúcleos teñidos con naranja de acridina.

Para la prueba se utilizó naranja de acridina (NA) (Sigma-Aldrich) con la que se preparó una solución con agua destilada a una concentración de 1 mg/mL. De los 5 µL de sangre obtenida de cada ratón, 2 µL se colocó en un portaobjetos y con ayuda de otro se realizó un frotis delgado. La muestra en el frotis se fijó con metanol durante 5 min, se secó al aire y se

guardó para su posterior tinción y conteo. Cada muestra se realizó por duplicado.

El frotis de sangre se tiñó con 25 μL de la solución de NA (1mg de fluorocromo naranja de acridina en 25 ml de H_2O destilada. Se empleó un microscopio de epifluorescencia Olympus[®] modelo BX51, con un filtro de excitación de 480-550 nm y uno de absorción de 570 nm (WB); se utilizó un objetivo de 40X para el conteo. En cada muestra de sangre teñida con la naranja de acridina se identificó lo siguiente (Figura 6):

- **Leucocitos:** cuyos núcleos exhiben fluorescencia amarillo-limón.
- **Reticulocitos o eritrocitos policromáticos (EPCs):** emiten fluorescencia color rojo.
- **Eritrocitos o eritrocitos normocromáticos (ENCs):** no emiten fluorescencia.
- **Micronúcleos (MN):** pueden estar en el citoplasma de los EPC o de los ENC, se observan como pequeños cuerpos esféricos que emiten fluorescencia amarillo-limón.

La frecuencia de MN se contabiliza de la siguiente manera:

1. Calcular la proporción de EPCs por cada 1 000 ENCs
2. Cuantificar la frecuencia de MN en 1000 ENCs.
3. Por cada 2 000 EPCs se registró el número de MN en EPCs, obteniendo así la frecuencia de MN en cada grupo. En esta prueba, este es el parámetro que indica genotoxicidad.

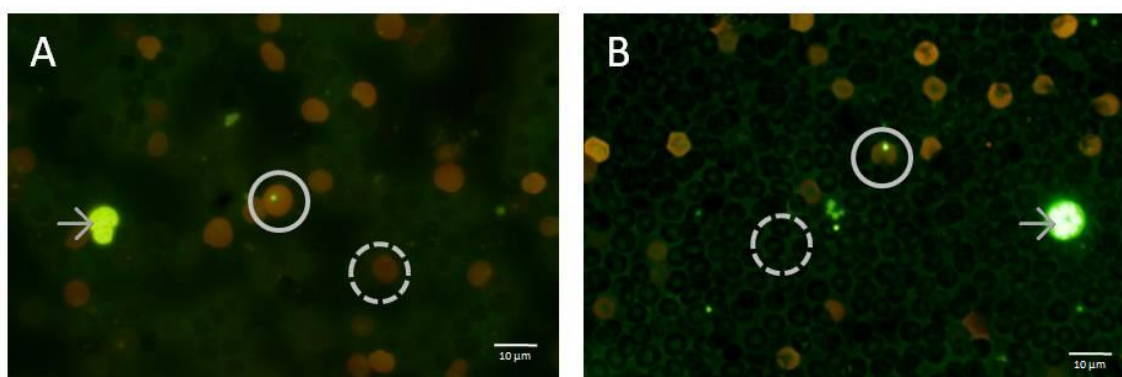


Figura 6. En A se observa el frotis de sangre periférica teñido con naranja de acridina: el círculo de línea continua muestra un reticulocito o EPC con un micronúcleo en su citoplasma. El círculo de línea punteada muestra un reticulocito no micronucleado. Nótese que, en ambos casos, al ser reticulocitos exhiben fluorescencia roja. La flecha señala a un leucocito en el que se observa la fuerte fluorescencia amarillo limón del ADN nuclear. En B se observa en el círculo de línea continua un reticulocito micronucleado, en el círculo

de línea punteada los eritrocitos maduros o ENC's que no exhiben fluorescencia y por lo tanto se ven oscuros. La flecha señala un leucocito. Ambas fotomicrografías son originales y pertenecen a este proyecto.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico GraphPadPrism[®] versión 5.0 (2007). Para comprobar si los datos presentaban una distribución normal, se realizó la prueba de normalidad D'Agostino-Pearson. Para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos experimentales del mismo grupo (tiempo 0 comparado con 24 h, 7, 14, 21 y 28 días) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba *post-hoc* Bonferroni para cada uno de los seis grupos. Posteriormente, se compararon entre sí los seis grupos experimentales a través de un análisis de varianza y la prueba *post-hoc* Bonferroni. Para determinar la influencia de las variables (concentración de vanadio inhalado e ingesta de sacarosa) sobre la frecuencia de micronúcleos, se calculó el Coeficiente de Correlación de Pearson.

La diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando el valor de p fue menor o igual a 0.05 ($p \leq 0.05$).

En las gráficas los datos se presentan como media \pm el error estándar de la media (SEM).

Resultados

No se registraron decesos, todos los animales experimentales sobrevivieron hasta el día 28 del experimento.

Viabilidad celular

La viabilidad celular evaluada por la técnica dual de fluorocromos, en todos los grupos (Control, Sac, V(0.01), V(0.01)+Sac, V(0.02) y V(0.02)+Sac) se observó un porcentaje mayor al 80% de viabilidad en todos los tiempos del experimento (28 días).

Las pruebas estadísticas mostraron que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos experimentales, así como tampoco entre grupos. Los resultados (expresados en media \pm error estándar) se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 7.

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad celular a diferentes tiempos y entre los distintos grupos experimentales

Tiempo (Día)	Control	Sacarosa	Vanadio (0.01)	Vanadio (0.02)	Vanadio (0.01)+ Sac	Vanadio (0.02) + Sac
0	93.6 ± 0.67	94.6 ± 0.81	95.2 ± 0.91	95.2 ± 1.11	92.6 ± 1.17	93.6 ± 2.50
1	92.8 ± 0.97	92.8 ± 0.97	92.8 ± 0.97	94.4 ± 0.92	93.8 ± 0.49	92.2 ± 1.02
7	93.2 ± 1.46	93.2 ± 1.46	91.6 ± 1.29	94.2 ± 0.66	92.8 ± 1.36	93.8 ± 1.07
14	92.4 ± 0.92	95.4 ± 0.51	91.0 ± 1.18	89.4 ± 1.29	92.6 ± 2.50	89.4 ± 2.31
21	93.6 ± 1.03	93.6 ± 1.03	91.6 ± 3.01	93.2 ± 1.47	88.8 ± 3.92	91.6 ± 1.50
28	91.7 ± 1.61	89.8 ± 2.96	90.0 ± 0.91	88.9 ± 0.98	90.8 ± 1.97	89.1 ± 0.99

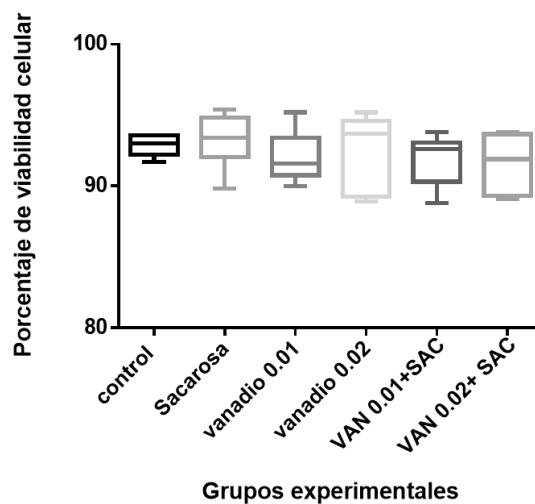


Figura 7. Diagrama de caja y bigotes mostrando la distribución de los porcentajes de viabilidad celular de los diferentes tiempos muestreados, en cada grupo experimental. No se presentaron diferencias estadísticas.

Micronúcleos con naranja de acridina

a) Grupo control

En el grupo control no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos experimentales (Figura 8, izquierda).

b) Grupo Sacarosa

En el grupo sacarosa se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 14, 21 y 28 respecto al tiempo 0 (Figura 8, derecha).

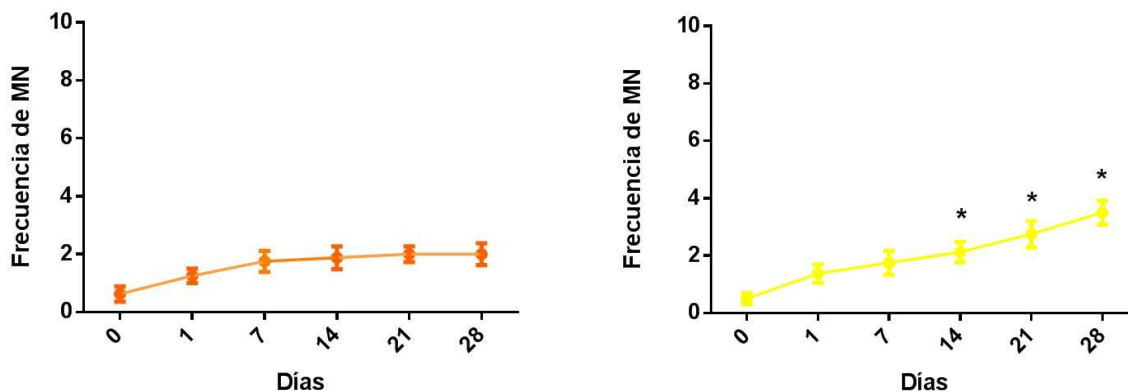


Figura 8. Izquierda Grupo control. Frecuencia de micronúcleos por cada 2000 reticulocitos en sangre periférica de ratón CD1. **Derecha:** Grupo Sacarosa (Sac) Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratón macho. Diferencias significativas entre los tiempos 14, 21 y 28 vs tiempo 0 * $P \leq 0.05$ ANOVA, *post-hoc* Bonferroni.

c) Grupo Vanadio 0.01

En el grupo Vanadio concentración 0.01M se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 7 y 14 con respecto del tiempo 0 (Figura 9, izquierda).

d) Grupo vanadio 0.02

En el grupo Vanadio [0.02] se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 7, 14, 21 y 28 respecto del tiempo 0 (Figura 9, derecha).

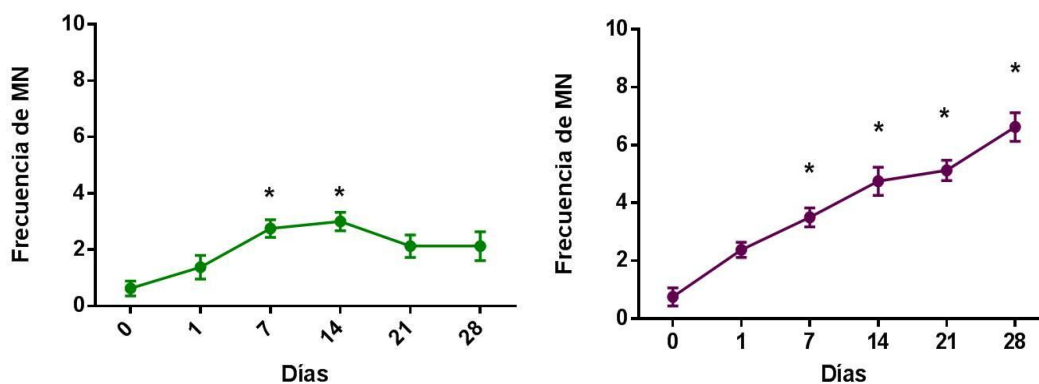


Figura 9. Izquierda: Grupo Vanadio [0.01] Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratón. Diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 7 y 14 vs tiempo 0 * $p \leq 0.05$ ANOVA, *post-hoc*

Bonferroni. **Derecha:** Grupo vanadio [0.02] Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratón macho. Diferencias significativas entre los tiempos 7, 14, 21 y 28 vs tiempo 0 * $p \leq 0.05$ ANOVA, *post-hoc* Bonferroni.

e) Grupo vanadio [0.01 + sacarosa]

En el grupo vanadio [0.01] + sacarosa, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 7, 14, 21 y 28 respecto al tiempo 0 (Figura 10, izquierda).

f) Grupo vanadio [0.02] + sacarosa

En el grupo vanadio [0.02] + sacarosa se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 1, 7, 14, 21, 28 respecto al tiempo 0 (Figura 10, derecha).

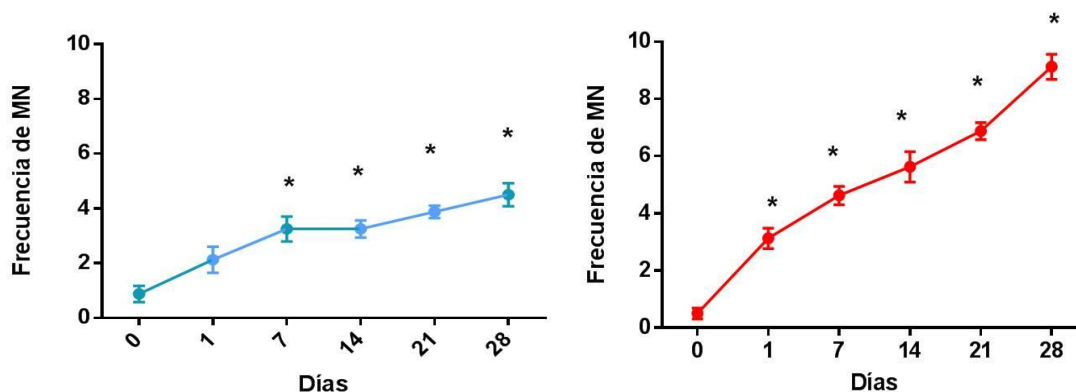


Figura 10. Izquierda: Grupo vanadio [0.01]+ sacarosa. Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratón macho. Diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 7, 14, 21 y 28 vs tiempo 0 * $P \leq 0.05$ ANOVA, *post-hoc* Bonferroni. **Derecha:** Vanadio [0.02] + sacarosa. Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratón macho. Diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 1, 7, 14, 21 y 28 vs tiempo 0 * $P \leq 0.05$ ANOVA, *post-hoc* Bonferroni.

Comparación entre grupos experimentales

a) Grupo control y grupo sacarosa

El comportamiento de ambos es similar, solo se pueden observar diferencias estadísticamente significativas en el día 28 (Figura 11).

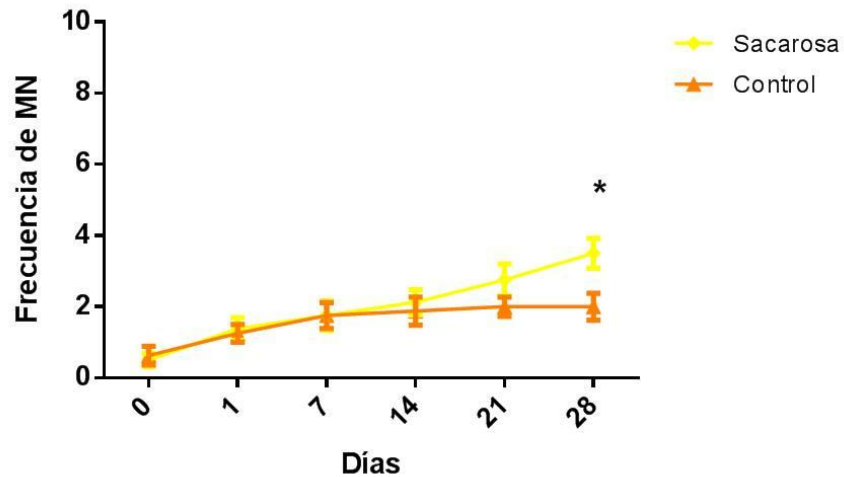


Figura 11. Control vs sacarosa. Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratón macho. Diferencias estadísticamente significativas únicamente en el tiempo 28. * $P \leq 0.05$ ANOVA, *post-hoc* Bonferroni.

b) Comparación grupo vanadio [0.01] y vanadio [0.02]

A partir del tiempo 1 en las dos concentraciones de vanadio se puede observar una diferencia significativa con respecto del tiempo 0. Ambas concentraciones aumentan y las diferencias estadísticamente significativas se observan en los tiempos 14, 21 y 28 (Figura 12).

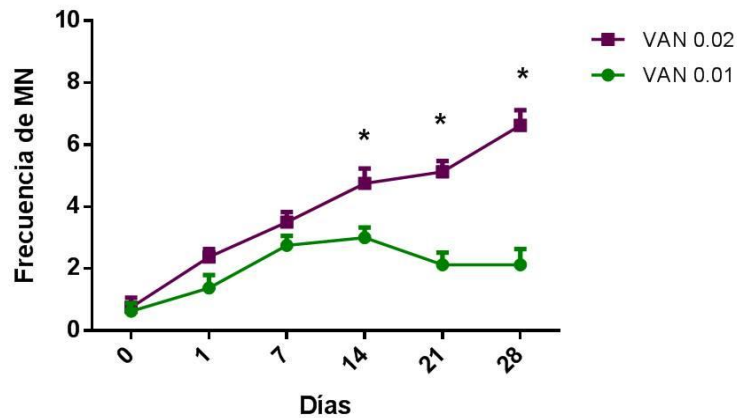


Figura 12. Grupo vanadio [0.01] y vanadio [0.02] Comparación de los grupos vanadio en diferentes concentraciones en la que se muestra la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratón macho. Diferencias estadísticamente significativas en el tiempo 14, 21 y 28. * $P \leq 0.05$ ANOVA, *post-hoc* Bonferroni.

c) Comparación grupo vanadio [0.01] y vanadio [0.01 + sac]

En el tiempo 1 y 7 el comportamiento es similar, sin embargo, a partir del tiempo 21, el vanadio [0.01] + sacarosa va en aumento, comparado con el vanadio [0.01] en el cual baja la concentración de micronúcleos, a partir del tiempo 14 (Figura 13).

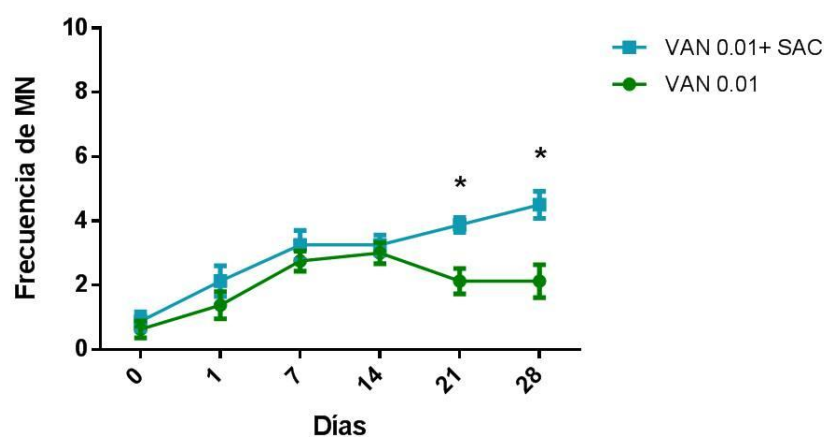


Figura 13. Vanadio 0.01 vs vanadio 0.01 + sacarosa. Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratón macho. Diferencias estadísticamente significativas únicamente en el tiempo 21 y 28. * $P \leq 0.05$ ANOVA, *post-hoc* Bonferroni.

d) Comparación grupo vanadio [0.01]+ sacarosa y vanadio [0.02] + sacarosa

El comportamiento es similar al primer y séptimo día, las diferencias estadísticamente significativas comienzan a observarse a partir del día 14 en adelante (Figura 14).

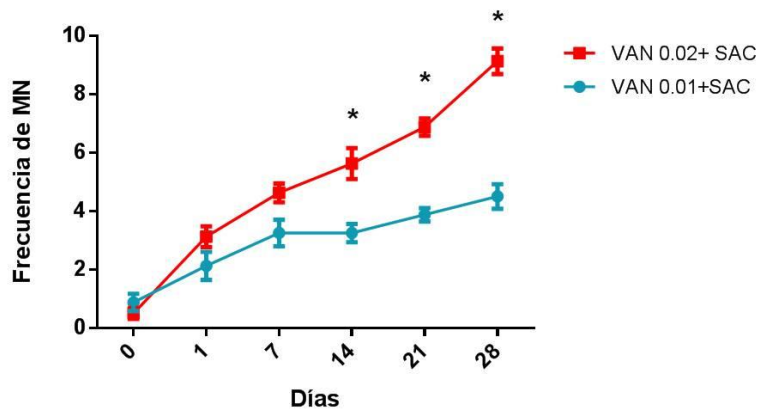


Figura 14. Vanadio 0.01+ sacarosa y vanadio 0.02 + sacarosa. Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratón macho. Diferencias estadísticamente significativas en el tiempo 14, 21 y 28. * $p \leq 0.05$ ANOVA, *post-hoc* Bonferroni

e) **Comparación grupo vanadio [0.02] y vanadio [0.02] + sacarosa**

Desde el tiempo 1 se puede observar en los dos grupos un aumento y es hasta el tiempo 21 y 28, en el que se puede observar una diferencia estadísticamente significativa.

El comportamiento es similar, en el tiempo 21 y 28 es cuando la concentración de vanadio [0.02] + sacarosa aumenta significativamente (Figura 15).

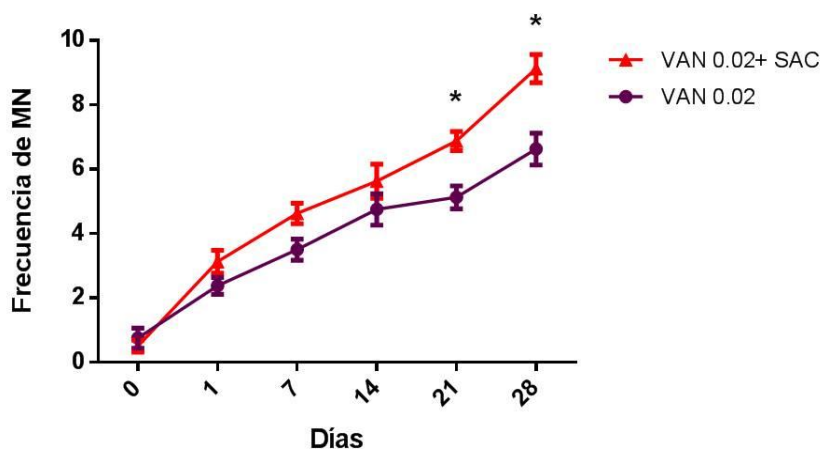


Figura 15. Vanadio 0.02 y vanadio 0.02 + sacarosa. Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratón macho. Diferencias estadísticamente significativas únicamente en los tiempos 21 y 28. * $p \leq 0.05$ ANOVA, *post-hoc* Bonferroni.

f) Comparación grupo control contra los demás grupos

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. En el tiempo 1 se observan diferencias del grupo vanadio [0.02] + sacarosa con respecto al tiempo 0.

En el tiempo 7 se observan diferencias estadísticamente significativas de los grupos vanadio [0.01]+ sacarosa, vanadio [0.02], y vanadio [0.02]+ sacarosa, con respecto al tiempo 0.

En el tiempo 14 se observan diferencias estadísticamente significativas de los grupos vanadio [0.01]+ sacarosa, vanadio [0.02] y vanadio [0.02]+ sacarosa, con respecto al tiempo 0

En el tiempo 21 se observan diferencias estadísticamente significativas de los grupos vanadio [0.01] + sacarosa, vanadio [0.02] y vanadio [0.02] + sacarosa, con respecto al tiempo 0.

En el tiempo 28 se detectaron diferencias estadísticamente significativas de los grupos vanadio [0.01] + sacarosa, vanadio [0.02], vanadio [0.02] + sacarosa y sacarosa, con respecto al tiempo 0.

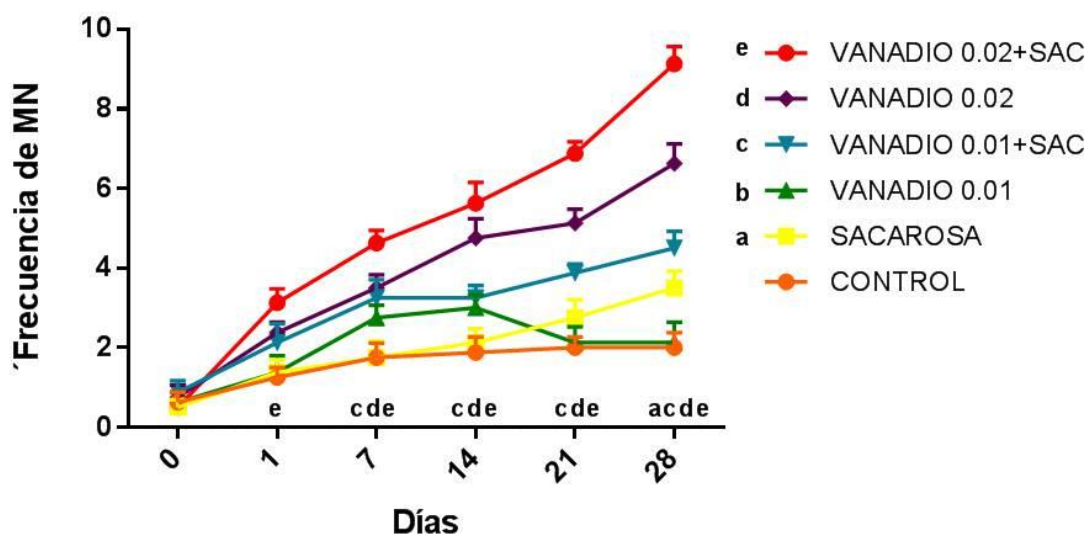


Figura 16. Comparación grupo control contra todos los demás grupos. Las letras indican el grupo que tuvo diferencia estadísticamente significativa vs el grupo control, en los diferentes tiempos. * $p \leq 0.05$ ANOVA, *post-hoc* Bonferroni.

Coefficiente de correlación de Pearson

Todos los grupos analizados, de acuerdo con prueba de normalidad D'Agostino-Pearson presentaron distribución apegada a la curva normal. Se realizó la prueba de Correlación de Pearson para todos los grupos. Esta prueba se realizó con un intervalo de confianza de 95% y dos colas. En la Tabla 3 se presentan los resultados.

Tabla 3. Coeficiente de correlación de Pearson en los grupos experimentales, en donde se analiza la relación que hay entre el tiempo experimental y la frecuencia de micronúcleos generados por cada agente (vanadio y sacarosa).

Grupo	Valor de r^2	Valor de r	Valor de p	Significancia estadística
Vanadio 0.01	0.2506	0.5005	0.3118	No
Vanadio 0.02	0.9159	0.9570	0.0027	Sí
Sacarosa	0.9352	0.9670	0.0016	Sí
Vanadio 0.01 + Sac	0.8259	0.9087	0.0121	Sí
Vanadio 0.02 + Sac	0.9122	0.9550	0.0181	Sí

Resumen de resultados

- El grupo control no presentó MN en ninguno de los tiempos experimentales.
- La sacarosa genera MN por sí sola, a partir del día 14, y éstos aumentan conforme avanza el tiempo de exposición.
- El V en concentración baja genera MN en los días 7 y 14.
- El V en concentración más alta genera MN a partir del día 7 y éstos aumentan conforme avanza el tiempo de exposición.
- El V y la sacarosa en conjunto generan MN.
- La concentración más alta de vanadio + sacarosa causan más micronúcleos comparados con la concentración más baja de vanadio + sacarosa. La frecuencia de MN aumenta con la concentración de vanadio mayor.

Discusión

Existen diversos estudios realizados *in vivo* e *in vitro* (Fortoul *et al.* 2011, Ávila-Costa *et al.* 2005; Rojas-Lemus *et al.* 2014) en donde se demuestra que la inhalación de metales como el vanadio inducen daño genotóxico. En el caso de la sacarosa, el mecanismo de toxicidad aún no está del todo claro, pero se sugiere que el daño al ADN está causado por AGEs resultado del proceso de glicación (Franke *et al.* 2017). Los AGEs son hoy día motivo de estudio, ya que aún se desconoce si pueden generar efectos sinérgicos con metales como el vanadio.

Otro punto que se debe destacar es la importancia de la ruta de exposición, ya que la respuesta genotóxica depende de la dosis y, por lo tanto, está relacionada con la forma en que ingresa al organismo, es decir, en este caso el vanadio fue vía inhalada en la cual el porcentaje de absorción es más elevado, comparado con el porcentaje de vanadio absorbido por la vía oral (Assem *et al.* 2012). O sea, por la vía inhalada el daño que se ocasiona puede ser mayor que el causado cuando este metal es ingerido.

Ausencia de efectos citotóxicos

La viabilidad celular no se vio afectada, en todos los grupos fue mayor al 85%, lo cual indica que los factores solos o en combinación no inducen efectos citotóxicos.

En el caso del vanadio, después del daño producido posiblemente por las ERO generadas por la inhalación, puede ser que las células activen cascadas de señalización celular involucradas en la proliferación y crecimiento celular, conduciendo a la formación de tumores, pero no provocando muerte celular (Assem *et al.* 2012) lo que lo hace peligroso ya que las células se pueden transformar y malignizar.

Por otro lado, la sacarosa no induce citotoxicidad ya que el estrés oxidante resultado de los productos de glicación avanzada se forma a una tasa constante pero lenta en condiciones fisiológicas, y su acumulación es progresiva. La glucosa contenida en la sacarosa es el azúcar menos tóxico, lo que representa una ventaja evolutiva para todas las especies (Carvajal 2015).

En la generación de estrés oxidante causado por AGEs, existen también las formas heterogéneas de RAGEs, de los cuales los solubles son secretados a la circulación y participan en la captura de productos de glicación avanzada, funcionando como receptores señuelo, por su capacidad de neutralizar o inhibir los efectos dañinos de los AGEs (Gómez *et al.* 2015).

Estos dos mecanismos impiden que las células activen mecanismos para muerte celular ya que atenúan el daño, lo que explicaría la ausencia de efectos citotóxicos observados en este estudio.

Efectos genotóxicos

Los resultados muestran la actividad genotóxica del vanadio y de la sacarosa, tanto solos como en su combinación. Existen diversos agentes causantes de daño genético tanto exógenos como endógenos, ejemplo de los primeros son los metales y la sacarosa.

Daño al ADN causado por vanadio

El vanadio induce efectos genotóxicos a través de diferentes mecanismos, entre los cuales destaca el estrés oxidante, que es un desbalance en el estado de óxido-reducción natural provocado por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que son capaces de dañar la integridad de las membranas y de las proteínas. A partir de esto se observan más alteraciones provocados por las ERO, como es el daño genotóxico donde se evidencia el rompimiento de material genético de cadena sencilla y la formación de micronúcleos (Albarrán-Alonso *et al.* 2015). El incremento de las ERO genera un aumento de la actividad de proteína cinasa C (PKC), activando señales intracelulares de estrés metabólico y oxidante, caracterizado por incrementos en las actividades de NF-kB, p38, MAPK, Jak/STAT, las cuales activan diferentes vías metabólicas, encienden genes y provocan una respuesta masiva y de largo plazo (Calderón-Salinas *et al.* 2013).

Otro tipo de daño es el causado por su configuración espacial parecida a los fosfatos, es la inhibición de proteínas que poseen este grupo (PO_4^-) como por ejemplo la adenilato ciclasa y la gliceraldehido-3-fosfato, entre otras (Albarrán-Alonso *et al.* 2015).

El daño genotóxico provocado depende de la cantidad de vanadio. Está documentado que en grandes dosis es altamente tóxico (Altamirano-Lozano *et al.* 1999). Cantidades más bajas de vanadio presentes en las células pueden permanecer unidas a las moléculas de grasa y no estar disponibles para producir toxicidad inmediata ya que se sabe que este metal se incorpora en el tejido adiposo tras la suplementación (Mukherje *et al.* 2004).

En un estudio realizado por Mailhes y colaboradores en 2003, se mostró evidencia de un aumento de MN en PCE's de médula ósea, dependiente de la dosis en animales expuestos a sulfato de vanadil (VOSO_4), ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) o metavanadato de amonio (NH_4VO_3) (Assem *et al.* 2012) mientras la dosis era más alta, más micronúcleos se presentaban.

Estrés oxidante resultado de la ingesta de sacarosa

Un posible mecanismo por el cual se produce estrés oxidante resultado del consumo de sacarosa es causado por la formación de los productos finales de glicación avanzada (AGEs). Los AGEs son de naturaleza y origen endógeno; sin embargo, también se pueden adquirir a partir de fuentes exógenas como por ejemplo alimentos y bebidas procesados.

En la interacción de la glucosa con las proteínas se conduce a la formación de un producto Amadori y luego a productos finales de glicación avanzada (AGEs) (Carvajal 2015).

La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo y el que más participa en las reacciones de glicación (Carvajal 2015).

Estos productos pueden formarse por medio de reacciones oxidantes y no oxidantes. Las primeras pueden ser aceleradas significativamente por metales de transición como el cobre, el hierro y el vanadio los cuales pueden conducir a la formación de EROs y a la posterior inducción también de estrés oxidante (Méndez 2002; Fuentes *et al.* 2015; Lizárraga *et al.* 2018)

La glicación ocurre preferentemente en los grupos amino libres de las proteínas, pero también con los de otras biomoléculas como los ácidos nucleicos, estos AGEs, a través de sus receptores (RAGE), inactivan enzimas y alteran sus estructuras y funciones, promoviendo la formación de radicales libres (Maritim *et al.* 2003).

Los RAGES son receptores multi-ligandos que median muchos de los efectos de los AGES y se expresan en diversos tejidos. Se encuentran en la membrana de células endoteliales

fagocitos mononucleares, monocitos, macrófagos, hepatocitos microglia, células de músculo liso, astrocitos, ciertas neuronas, células mesangiales y podocitos, entre otras. En condiciones normales la expresión de los RAGEs es baja, mientras que, en condiciones patológicas, tales como la inflamación y la diabetes, hay un mayor nivel de los mismos, coincidente con un nivel más elevado de AGE (Carvajal 2015).

Se ha observado glicación de las bases nitrogenadas que constituyen a los ácidos nucleicos la cual provoca anormalidades en el patrón del ADN. Estas anormalidades podrían acumularse de manera progresiva y tal acumulación acelerada por metales podría ser responsable de los cambios en el material genético que incluyen aberraciones cromosómicas, ruptura de cadenas del ADN y una declinación en los procesos de reparación, replicación y transcripción (Fuentes *et al.* 2015).

La glicación de los ácidos nucleicos puede también ser responsable del aumento en la frecuencia de anormalidades congénitas en niños de madres diabéticas. La exposición del embrión a altas concentraciones de glucosa combinado con la inhalación de metales que se encuentran en la atmósfera podría conducir a un mayor daño al ADN, en etapas críticas del desarrollo, causar rupturas cromosómicas y mutagénesis (Méndez 2003).

El daño por glicación del ADN se ha asociado con mutagénesis y carcinogénesis (Carvajal 2015).

Interacción de vanadio y sacarosa

Lo que muestran los resultados obtenidos en el presente trabajo, es que cuando los dos agentes, sacarosa y vanadio, se combinan, aumentan significativamente sus efectos, es decir, ocurre un fenómeno llamado *sinergia* o *potenciación*, en el cual el efecto de un agente se ve incrementado debido a la presencia de otros agentes. En algunos textos se matiza la potenciación como el incremento en el efecto provocado por un agente tóxico activo en presencia de otros mucho menos activos (Cavallé 2011).

Posibles mecanismos de acción para la generación de estrés oxidante y el subsecuente daño al DNA

La generación de estrés oxidante podría ser el primer mecanismo de acción que posiblemente se da por la facultad de la glucosa de auto-oxidarse, lo cual sucede de manera muy abundante en condiciones de mayor concentración de la misma en la célula (Calderón *et al.* 2013). Debido al incremento de la entrada de glucosa, la célula tiene ahora una presión metabólica inducida por alta concentración de sustrato para alimentar en exceso a la cadena respiratoria, pero sin un incremento correspondiente y proporcional en la necesidad de ATP en la célula, lo que hace que el potencial protomotriz se acumule en exceso y la cadena respiratoria pueda generar más $O_2^{\cdot-}$ que en condiciones de óptimo acople entre la formación de ATP y la función de la cadena respiratoria (Calderón *et al.* 2013).

En tal condición la autooxidación conduce en primera instancia a la formación de enediol. Con este compuesto en presencia de metales de transición, como el Fe^{+3} o el vanadio, reacciona con el oxígeno y una proteína para originar un producto oxidado llamado 1,4-dideoxiglucosona-proteína lo que resulta en una proteína glicada y capaz de generar una oxidación en cadena que dará lugar a los llamados productos de glicación avanzada AGE (por las siglas del inglés: "advanced glycation end-product") (Calderón *et al.* 2013). Cabe destacar que la formación de AGES en el organismo se produce de forma lenta, debido a las menores temperaturas. Estos pueden ser reconocidos por las defensas del organismo, y ser eliminadas por los macrófagos o degradados por enzimas (Ruiz 2009). Es por eso que, el efecto genotóxico de la sacarosa es débil por sí solo, y necesita un potenciador que en este caso es el vanadio.

La oxidación de estos productos intermediarios (AGES), pueden producir la oxidación parcial de oxígeno con la consecuente formación del radical superóxido, mismo que con la actividad de la enzima superóxido dismutasa se convierte en H_2O_2 y con metales de transición se puede transformar en radical hidroxilo, todos los cuales contribuyen a la oxidación de lípidos, proteínas y ADN (Calderón *et al.* 2013).

Por ejemplo, la autooxidación de la desoxirribosa puede inducir liberación de bases y rompimiento de cadena sencilla en las hebras de ADN, lo que puede conducir a la formación de micronúcleos (MN) (Maritim *et al.* 2003). En el ensayo de MN con naranja de acridina se cuantifica el número de micronúcleos por cada 2 000 reticulocitos y la frecuencia de reticulocitos por cada 1 000 eritrocitos para evaluar muerte celular; el incremento en la frecuencia de micronúcleos es indicador de genotoxicidad (Araldi *et al.* 2015; Cedano-Díaz *et al.* 2012; Hayashi *et al.* 2000).

Además de la autooxidación de la glucosa existe otro mecanismo por el cual se pueden originar AGES. En el segundo posible mecanismo de acción, numerosos estudios indican la evidente participación de los metales de transición como catalizadores de los procesos oxidantes a nivel biológico y, por tanto, su toxicidad puede estar en parte relacionada con el daño oxidante celular y tisular. Metales como: el hierro, cobre, cadmio, cromo, plomo, mercurio, níquel y vanadio entre otros, exhiben la habilidad de producir especies reactivas del oxígeno que intervienen en procesos de peroxidación lipídica y daño en el ADN (Ruiz 2009).

Distinto del primer mecanismo, la glucosa se oxida en una reacción dependiente del metal de transición a un anión radical enediol que se convierte en cetoaldehído reactivo y en radicales anión superóxido. Los radicales anión superóxido sufren una mutación a peróxido de hidrógeno, que, si no es degradado por catalasa o glutatión peroxidasa, y en presencia de metales de transición, puede conducir a la producción de radicales hidroxilo extremadamente reactivos (Maritim *et al.* 2003). Dicho de una manera sencilla, la glucosa origina AGEs mediante la glicación, este proceso se puede llevar a cabo por dos vías oxidante y no oxidante, la reacción oxidante la cataliza el vanadio lo que conduce a la formación de ERO y genera estrés oxidante.

Como se ha mencionado, la sobreproducción del $O_2^{\cdot-}$ generada por la auto-oxidación de la glucosa y los AGE, generan daño oxidante a los ácidos nucleicos y la reducción de las defensas antioxidantes, la capacidad redox de la célula y la capacidad amortiguadora antioxidante (Carvajal 2015), es así como se explica el daño al ADN.

Otro mecanismo generador de estrés oxidante es la interacción entre AGE y RAGE, en esta interacción se activan vías de transducción de señales lo que conduce a la expresión de genes proinflamatorios (Wautier *et al.* 2016), las células inflamadas producen más EROS, ciclo que genera más inflamación y oxidación (Ott *et al.* 2014).

La relación es sinérgica entre la inhalación de vanadio y la ingesta de sacarosa

El coeficiente de correlación de Pearson muestra el porcentaje de asociación entre las variables estudiadas (Suárez *et al.* 2011), ya que es una medida de dependencia lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas, mide el grado de relación entre ellas.

En los valores mostrados para los grupos experimentales Vanadio (0.02) y sacarosa el coeficiente de correlación de Pearson indica que por sí solos estos factores son generadores de micronúcleos, ya que tienen un coeficiente de correlación positiva muy alto, es decir, que mientras aumenta el tiempo de exposición la frecuencia de micronúcleos es más elevada.

En cuanto al grupo experimental expuesto a vanadio en la menor concentración (0.01) se puede observar que la correlación positiva es muy baja, es decir, que el aumento de micronúcleos no fue significativo, lo que implica que los MN no incrementan de manera lineal conforme se eleva el tiempo de exposición.

Con estos resultados también se muestra que la cantidad a la que se exponen los individuos es de suma importancia, ya que a mayor concentración de vanadio ocurre un mayor daño al ADN identificado con la presencia de MN.

Con relación al grupo experimental Van (0.01+Sac) el valor muestra que el porcentaje de asociación entre las dos variables es alto, es decir que cuando estas variables se combinan y conforme aumenta el tiempo la cantidad de micronúcleos aumenta.

En el caso del grupo experimental Van (0.02+Sac) el grado de correlación positiva es muy alto y hay significancia estadística, lo cual indica que el porcentaje de asociación es

elevado, ocurre que las dos variables combinadas producen mayor cantidad de MN con respecto al incremento en el tiempo.

La interacción entre ambos factores resultó ser, en cualquiera de los dos grupos experimentales analizados, sinérgica.

Otro posible mecanismo que causa estrés oxidante es la interacción AGE-RAGE. En esta interacción se activa la NADPH-oxidasa el cual es un complejo multiproteico que produce EROs, que a su vez causan una disminución de AGER-1 y SIRT1, la reducción provoca un aumento en los procesos de inflamación y las células inflamadas producen EROs. y así continúa un ciclo que genera más oxidación e inflamación.

Conclusión

Los resultados demuestran la relación sinérgica entre la inhalación de vanadio y el consumo de sacarosa, ya que el aumento en la frecuencia de MN cuando ambos factores se encuentran presentes es progresiva y significativa. Este daño genotóxico manifestado como la aparición de MN, depende de la cantidad inhalada de vanadio, ya que es posible que el metal actúe como catalizador en la reacción de Maillard. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que a mayor concentración de vanadio inhalado se incrementa el número de micronúcleos, aunque sea la misma concentración de sacarosa ingerida. Este aumento está asociado con daño genotóxico y, por ende, con el aumento de la posibilidad de que se desarrollen patologías, entre ellas procesos carcinogénicos.

Los resultados muestran que la inhalación de pentóxido de vanadio y la ingesta de bebidas azucaradas acrecientan el número de micronúcleos, efecto adverso que puede ocasionar daño a la salud de la población, ya que México es el primero país consumidor de bebidas azucaradas y no hay una regulación por parte de las autoridades competentes en cuanto a las concentraciones de sacarosa contenidas en bebidas que se consumen diariamente, además de que las gasolinas producidas en nuestro país tienen un alto porcentaje de vanadio, y eso repercute en la dosis inhaladas a la que estamos expuestos. Al mismo tiempo que la regulación de contaminantes metálicos no está estipulada.

Todas estas variables a las que se está expuesto cotidianamente repercuten en la salud de la población y este estudio contribuye a entender el proceso por el cual se produce este daño, además de que puede ayudar a generar una concientización por parte de las autoridades, para mejorar la regulación de la contaminación atmosférica, así como cada uno de los habitantes sobre el consumo de bebidas azucaradas y sobre la responsabilidad que cada uno tiene para mantener o recobrar su salud.

Perspectivas

Los resultados de este proyecto abren un prometedor campo de investigación, entre las preguntas que pueden plantearse están:

- ¿Cuál es el origen de los MN generados por la interacción vanadio-sacarosa? ¿Son de origen aneugénico o clastogénico?
- ¿Los componentes naturales utilizados como anti-genotóxicos o antioxidantes atenuarán el daño causado por estos factores?
- Los antioxidantes exógenos ¿Inhibirán o prevendrán la glicación de proteínas causada por estos agentes?

Por supuesto, hacen falta estudios para entender de manera más precisa el mecanismo por el cual la sinergia de estas dos variables causa los efectos genotóxicos observados. Y a pesar de que los estudios actuales no han podido demostrar de manera precisa el proceso por el cual la sacarosa produce daño genotóxico, así como con el papel preciso de los RAGES. Sin embargo, ha habido un avance significativo.

Posteriores investigaciones tendrán que realizarse para entender el proceso de sinergismo o potenciación con diferentes variables a las que la población mundial está expuesta diariamente para así mejorar la calidad de vida y reducir los efectos potencialmente mortales.

Bibliografía

- **Al-Aubaidy HA, Jelinek HF.** Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinology.* 2011;164:899–904.
- **Albarrán Alonso JC.** Inhalación de vanadio e ingesta de bebidas altas en sacarosa: estudio de la morfofisiología del páncreas y su relación con los niveles de glucosa en sangre [tesis licenciatura]. Ciudad de México. Universidad Nacional Autónoma de México; 2015
- **Albarrán Alonso JC.** Estudio de la regulación de la glucemia en un modelo de inhalación de vanadio e ingesta de bebidas altas en sacarosa: participación de la insulina y el glucagón [tesis Maestría]. Ciudad de México. Universidad Nacional Autónoma de México; 2018
- **Altamirano- Lozano M, Alvarez BL, Roldán RE.** Efectos teratogénicos y citogenéticos del pentóxido de vanadio en ratones. *Investigación en Ciencias Médicas.* 1993; 21: 711-713.
- **Aiija Piret P.** Control molecular de la eritropoyesis [Trabajo fin de grado]. Santander. Facultad de medicina universidad de Cantabria; 2019.
- **Aragón-Piña A, Campos-Ramos AA, Leyva-Ramos R, Hernández-Orta M, Miranda-Ortiz N, Luszczevski-Kudra A.** Influencia de emisiones industriales en el polvo atmosférico de la ciudad de San Luis Potosí, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 2006;22:5–19.
- **Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, de Sá Júnior PL, Nozima BHN, Ito ET, et al.** Uso del ensayo cometa y micronúcleos para estudios de genotoxicidad: una revisión. Vol. 72, *Farmacoterapia y biomedicina;* 2015. p. 74–82.
- **Arrambide Brianthe G.** Compuestos de vanadio de interés bioinorgánico. 2014.
- **Assem Louise F, Stephen Levy L.** Toxicidad por inhalación de vanadio. Vol. 9789400709, *Vanadio:Enfoques bioquímicos y biológicos moleculares.* Springer Netherlands; 2012. 1–228 p.
- **Ávila-Costa MR, Colín-Barenque L, Zepeda-Rodríguez A, Antuna SB, Saldivar O L, Espejel-Maya G, et al.** Rotura del epitelio endimario después de la inhalación de pentóxido de vanadio: un modelo experimental de ratones. *Cartas de neurociencia.* 2005;381:21–5.
- **Ballester Díez F, Tenías JM, Pérez-Hoyos S.** El impacto de la contaminación del aire en la salud humana: una introducción. *Revista Española de Salud Pública.* 1999;73:109–21.
- **Barceloux DG.** Vanadium. *Toxicología clínica.* 1999; 37: 265-278.
- **Barrera-Cruz A, Rodríguez-González A, Molina-Ayala MA.** Escenario actual de la obesidad en México. *Revista Médica Instituto Mexicano del Seguro Social.* 2013;51:292–9.

- **Barrientos-Gutiérrez T**, Colchero AM, Sánchez-Romero LM, Batis C, Rivera-Dommarco J. Posicionamiento sobre los impuestos a alimentos no básicos densamente energéticos y bebidas azucaradas. *Salud Publica Mex* 2018; 60:586–91.
- **Blanco Jiménez S**, Altuzar Villatoro F, Jiménez Gatica B, Aguilar Noguez G, Benítez Macías M de los Á, Pablo Santiago M. Evaluación de Partículas Suspendidas PM 2.5 en el Área Metropolitana de Monterrey 2 Directorio elaboración trabajos de campo y análisis de laboratorio. México; 2015
- **Bonassi S**, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, *et al.* Una mayor frecuencia de micronúcleos en los linfocitos de sangre periférica predice el riesgo de cáncer en humanos. *Carcinogénesis*; 28:625–31. 2007
- **Brito C**. Regulación de la eritropoyesis. Universidad de Chile.
- **Calderón Salinas JV**, Muñoz Reyes EG, Quintanar Escorza MA. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Revista de Educación bioquímica*. 2013.32:53–66.
- **Carceller R**. Qué le pasa a tu cuerpo cuando abusas de las bebidas energéticas. <https://www.muyinteresante.com.mx/preguntas-y-respuestas/azucar-que-pasa-reduces-consumo/>. 2019. p. 1
- **Cárdenas-León M**, Díaz-Díaz E, Argüelles-Medina R, Sánchez-Canales P, Díaz-Sánchez V, Larrea F. Glicación y entrecruzamiento de proteínas en la patogénesis de la diabetes y el envejecimiento. 2009
- **Carvajal Carvajal C**. Productos finales de glicación (AGES) y la nefropatía diabética. *Medicina Legal de Costa Rica*. 2015;32:154–60.
- **Castro Ramírez R**, Aguilar Cuevas O, Barba-Behrens NY, Sánchez García JJ, López-Sandoval H. Química Inorgánica medicinal: vanadio, platino, oro. *Educ quím*. 2018;23(1):33–40.
- **Cavallé Oller N**. Exposición simultánea a varios agentes químicos: criterios generales de evaluación del riesgo. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. 2011;1–8.
- **Cedano Díaz A**, Martínez González S, Escalera Valente F, Salgado Moreno S, Fernando CD, Macías Coronel H, *et al.* La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos. 2012;43–54.
- **Choi JH**, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH, Cho MH. Comparative study of PM2.5 - and PM10 - induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Vet Sci (Suwon-si, Korea)*. 2004;5:11–8.
- **Comisión Ambiental Metropolitana**. Programa para mejorar la calidad del aire de la Zona Metropolitana del Valle de México 2011-2020. 2012. 2011;388.
- **Corvi R**, Albertini S, Hartung T, Hoffmann S, Maurici D, Pfuhrer S, *et al.* ECVAM

- retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT). *Mutagenesis*. 2008 Jul 1;23:271–83.
- **Dávila-Torres J**, De Jesús González-Izquierdo J, Barrera-Cruz A. Panorama de la obesidad en México. *Revista Médica Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2015;53:241–9.
 - **Delgado L**. La anemia y sus pruebas de laboratorio. *Univesidad Nacional de México*. 2011;2–134.
 - **Delgado S**. México, primer consumidor de refrescos en el mundo. *Gaceta UNAM*. 2019
 - **Dommarco Rivera JA**, Hernadez Avila M, Aguilar Salinas CA, Vadillo Ortega F, Murayama Rendon C. Obesidad en México recomendaciones para una política del estado. 2013. 536 p.
 - **Espinosa-Zurutuza M**, González-Villalva A, Albarrán-Alonso JC, Colín-Barenque L, Bizarro-Nevares P, Rojas-Lemus M, et al. El estrés oxidativo como un mecanismo involucrado en el daño renal después de la exposición subcrónica a la inhalación de vanadio y bebidas endulzadas orales en un modelo de ratón. *Internacional Journal of Toxicology*. 2018;37:45–52.
 - **Evangelou AM**. Vanadio en el tratamiento del cáncer. Vol. 42, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002. p. 249–65.
 - **Fenech M**. 2000. Técnica de micronúcleos in vitro. *Mutat. Res*. 455: 81–95.
 - **Fortoul TI**, Rodriguez-Lara V, Gonzalez-Villalva A, Rojas-Lemus M, Cano-Gutierrez G, Ustarroz-Cano M, et al. Inhalación de vanadio en un modelo de ratón para la comprensión de la repercusión sistémica de partículas en suspensión en el aire. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011; 11 pages ,2011.
 - **Franke SIR**, Molz P, Mai C, Ellwanger JH, Zenkner FF, Horta JA, et al. El alto consumo de sacarosa induce daño al ADN en ratas wistar macho. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2017;89:2657–62.
 - **Fuentes M**, Olmos P, Santos JL. Productos finales de glicación avanzada (AGEs) y su importancia en enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición. Vol. 8, *Rev. chil. endocrinología. diabetes*. 2015.
 - **García Rodríguez M**, García Cárdenas G, Montaña Rodríguez A, Altamirano Lozano M. Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio [I]) en ratones de la cepa CD-1: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular. *Acta Univ*. 2014;24:91–6.
 - **Gómez-Miranda LM**, Jiménez-Cruz A, Bacardí-Gascón M. Estudios aleatorizados sobre el efecto del consumo de bebidas azucaradas sobre la adiposidad en adolescentes y adultos; Revisión sistemática. Vol. 28, *Nutricion Hospitalaria*. 2013. p. 1792–6.
 - **Gómez Morales L**, Beltrán Romero LM, García Puig J. Azúcar y enfermedades

cardiovasculares. *Nutr Hosp.* 2013;88–94.

- **Gómez S JR**, Islas C MC. *Farmacología Molecular: AGEs y RAGEs.*
- **González-Villalva A**, Rodríguez-Lara V, Montaña LF, Lima-Melo A, Ramirez G, Fortoul TI. Cambios en sangre generados después de la inhalación de vanadio. *Curr Top Toxicology.* 2009;6:31–8.
- **Grosso R**, Fader CM, Colombo MI. Autofagia: evento necesario durante la eritropoyesis. Vol. 31, *Blood Reviews.* 2017. p. 300–5. 2017.04.001
- **Hansen M**, Baunsgaard D, Autrup H, Vogel UB, Møller P, Lindecrona R, et al. La sacarosa, la glucosa y la fructosa tienen una genotoxicidad similar en el colon de la rata y afectan el metaboloma. *Food and Chemical Toxicology.* 2008;46:752–60.
- **Hayashi M**, Sofuni T, Ishidate M. Una aplicación de tinción fluorescente con naranja de acridina a la prueba de micronúcleos. *Mutat Res Lett.* 1983 Jun 1;120:241–7.
- **Hayashi M**, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD, et al. Ensayo in vivo de micronúcleos de eritrocitos de roedores. II. Algunos aspectos del diseño del protocolo, incluidos los tratamientos repetidos, la integración con las pruebas de toxicidad y la puntuación automatizada. In: *Environmental and Molecular.* 2000 p. 234–52 1098-2280 35:33C234:
- **Johnson RK**, Appel LJ, Brands M, Howard B V., Lefevre M, Lustig RH, et al. La ingesta de azúcares en la dieta y la salud cardiovascular una declaración científica de la asociación americana del corazón. Vol. 120, *Circulation.* 2009. p. 1011–20.
- **Kowluru RA**, Kowluru A, Mishra M, Kumar B. Estrés oxidante y modificaciones epigenéticas en la patogenia de la retinopatía diabética. *Prog Retin Eye Res.* 2015;48:40–61.
- **Lizárraga Vargas LC.** Efecto genotóxico de linfocitos humanos en cultivo expuestos a dicromato de potasio. 2018.
- **López Hernández S.** El vanadio, recuento del proceso de desarrollo científico. 2019;(V).
- **Maritim AC**, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review Vol. 17, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.* John Wiley & Sons, Ltd; 2003. p. 24–38
- **Méndez JD.** Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gac Med Mex.* 2003;139:49–55.
- **Mendoza-Velázquez A**, Aguirre Sedeño D. Impuesto especial a alimentos y bebidas y su impacto en la inflación en México: dinámica, persistencia y cambio de régimen. *Rev Panam Salud Pública.* 2019;43:1.
- **Morinville A**, Maysinger D, Shaver A. From Vanadis to Atropos: vanadium

compounds as pharmacological tools in cell death signaling. *TIPS*. 1998; 19: 452-460.

- **Mukherjee B**, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. Vanadio- un elemento atípico con significado biológico. *Toxicology Letters*. 2004;150:135–43.
- **Partearroyo T**, Campayo ES, Moreiras GV. El azúcar en los distintos ciclos de la vida: Desde la infancia hasta la vejez. *Nutr Hosp*. 2013 28:40–7.
- **Quiles Izquierdo J**. Patrón de consumo e ingestas recomendadas de azúcar. *Nutr Hosp*. 2013;28:32–9.
- **Rico-Rosillo MG**, Oliva-Rico D, Vega-Robledo GB. Envejecimiento: algunas teorías y consideraciones genéticas, epigenéticas y ambientales. *Revista Médica Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2018;56:287–94.
- **Rodríguez Burelo M del R**, Avalos García MI, López Ramón C. Consumo de bebidas de alto contenido calórico en México: un reto para la salud pública. *Salud en Tabasco*. 2014;20(1):28–33.
- **Rodríguez Heredia D**. Intoxicación ocupacional por metales pesados. *MEDISAN*. 2017;21:7003–16.
- **Rodríguez Mercado JJ**, Altamirano Lozano MA. Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad. Vol. 22, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. México; 2006. p. 173–89.
- **Rodríguez Mercado JJ**, Álvarez-Barrera L, Altamirano-Lozano MA. Daño cromosómico inducido por óxido de vanadio en linfocitos periféricos humanos. *Drug Chem Toxicol*. 2010;33:97–102.
- **Rojas-Lemus M**, Altamirano-Lozano M, Fortoul TI. Diferencias de sexo en los efectos genotóxicos y citotóxicos en sangre como consecuencia de la inhalación de vanadio: evaluación del ensayo de micronúcleos. *J Appl Toxicol*. 2014;34:258–64.
- **Rosales-Castillo JA**, Torres-Meza VM, Olaiz-Fernández G, Borja-Aburto VH. Efectos agudos de la contaminación del aire en la salud: evidencia de estudios epidemiológicos. *Salud Publica Mex*. 2001;43:544–55.
- **Ruiz Roca B**. Propiedades antioxidantes de los productos de la reacción de maillard y su influencia en la absorción de hierro y cobre. Relación con la capacidad quelante de metales. 2009.1 p.
- **Salazar-Rojas T**, Calvo-Brenes G. Valoración de las propiedades magnéticas en bioindicadores y en polvo urbano, como método alternativo para monitorear la contaminación atmosférica en zonas de flujo vehicular: Resultados preliminares sobre metales pesados en bioindicadores. *TM*.

5 de abril de 2019 [citado 21 de agosto de 2020];32:Pág. 55-64.

- **SCF**. Opinión del Panel Científico de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias sobre una solicitud de la Comisión relacionada con el nivel máximo de ingesta tolerable de vanadio. Request no. EFSA-Q- 2003- 018. *The EFSA Journal*. 2004; 33: 1-22
- **Silva O. P**, Durán A. S. Bebidas azucaradas, más que un simple refresco [Internet]. Vol. 41, Revista Chilena de Nutrición. Sociedad Chilena de Nutrición Bromatología y Toxilógica; 2014p. 90–7.
- **Soto M**, García-Santisteban I, Krenning L, Medema RH, Raaijmakers JA. Chromosomes trapped in micronuclei are liable to segregation errors. *J Cell Sci*. 2018;131(13).
- **van den Berg E**. Si el cerebro necesita azúcar para funcionar, ¿por qué tenemos que dejar de comerlo? [Internet]. Elpais.com. 2018 [citado el 14 de junio de 2021]. Disponible en: https://elpais.com/elpais/2018/05/28/buenavida/1527522543_389263.html
- **Venereo Gutiérrez JR**. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cuba Med Mil*. 2002;31:126–33.
- **Villalobos Pietrini R**, Amador Muñoz O, Flores Márquez AR, Guzmán Rincón J, Munive Colín Z, Hernández Mena L, et al. Materia orgánica extraída de las aeropartículas de la ciudad de México y sus efectos genotóxicos. *TIP Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas*. 2008 Dec;11:105–9.
- **Zago L**, Zugasti B, Zuleta Á, Presner N, Lobbe V, De La Plaza M. Critical analysis of fructose consumption part one. the fructose on nutrition. metabolic aspects. *Actual en Nutr*. 2017 Mar;18:26–36.
- **Zalacain M**, Sierrasesúmaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. Vol. 28, *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2005. p. 227–36.