

51261 2
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"ZARAGOZA"

EFFECTOS MUTAGENICO Y TERATOGENICO
DEL PENTOXIDO DE VANADIO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION EN
BIOLOGIA DE LOS SISTEMAS HUMANOS
P R E S E N T A :
BIOLOGA ELIA ROLDAN REYES

DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO



MEXICO, D. F.

1992



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 está 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.

INDICE GENERAL

<u>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS</u>	i
RESUMEN	iii

CAPITULO I

1.- INTRODUCCION	1
1.1) CONTAMINACION Y ENFERMEDAD	1
1.2) GENETICA TOXICOLOGICA	4
1.3) INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH's)	8
1.4) CINETICA DE LA DIVISION CELULAR (C.D.C.)	9
1.5) MECANISMOS DE REPARACION	10
1.5.1) Fotorreactivación	13
1.5.2) Reparación por escisión	13
1.5.3) Reparación postreplicativa o por recombinación	15
Reparación por recombinación en mamíferos	15
1.5.4) Reparación S.O.S.	15
1.5.5) Reparación y mutagénesis	16
1.5.6) Inhibidores de la reparación	17
1.6) TOXICOLOGIA REPRODUCTIVA	22
1.6.1) Pruebas utilizadas en Toxicología Reproductiva	27
1.6.2) Exposición durante todo el ciclo reproductivo	28
1.6.3) Exposición durante partes del ciclo reproductivo	28

1.7) EL RATON COMO MODELO DE ESTUDIO EN TERATOGENESIS	30
1.7.1) Embriogénesis	32
1.7.2) Organogénesis	33
1.8) METALES	35
1.8.1) Vanadio	38
1.8.2) Cinética del vanadio	43
JUSTIFICACION	48
HIPOTESIS	50
OBJETIVOS	51
CAPITULO II	
2.- MATERIAL Y METODOS	52
2.1) MUTAGENESIS	52
2.1.1) Cultivos	53
2.1.2) Tratamientos	53
a) Lotes	53
2.1.3) Análisis estadístico	56
2.2) TERATOGENESIS	56
2.2.1) Animales	56
2.2.2) Análisis estadístico	57
CAPITULO III	
3.- RESULTADOS Y DISCUSION	59
3.1) MUTAGENESIS	59
3.2) EFECTOS SOBRE LA GESTACION	78

3.3) ANOMALIAS ESQUELETICAS	84
3.4) COMENTARIOS Y CONCLUSIONES	88
CAPITULO IV	
4.- REFERENCIAS	90
PUBLICACIONES	110

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<u>FIGURA 1</u>	11
Incorporación de BrdU en cromosomas de linfocitos humanos durante dos ciclos de replicación.	
<u>FIGURA 2</u>	12
Fotomicrografías de cromosomas de linfocitos humanos en metafases de primer, segundo y tercer ciclo.	
<u>FIGURA 3</u>	21
Estructura química de la cafeína y las purinas del ADN.	
<u>FIGURA 4</u>	23
Proceso reproductivo.	
<u>FIGURA 5</u>	29
Períodos de tratamiento en experimentos de Toxicología Reproductiva.	
<u>FIGURA 6</u>	34
Embriogénesis en ratón.	
<u>FIGURA 7</u>	44
Cinética del vanadio.	
<u>FIGURA 8</u>	54
Protocolos de aplicación de la cafeína.	
<u>FIGURA 9</u>	61
Frecuencia de ICH's en linfocitos humanos tratados con cafeína a diferentes concentraciones.	
<u>FIGURA 10</u>	63
Efecto de la cafeína sobre la frecuencia de ICH's en linfocitos humanos en cultivos tratados con pentóxido de vanadio.	
<u>FIGURA 11</u>	65
Distribución de ICH's/célula en cultivos tratados con cafeína a las 0 horas.	
<u>FIGURA 12</u>	66
Distribución de ICH's/célula en cultivos tratados con cafeína a las 24 horas.	
<u>FIGURA 13</u>	67
Distribución de ICH's/célula en cultivos tratados con cafeína a las 48 horas.	

<u>FIGURA 14</u>	70
Efecto de la cafeína (0 H) sobre la cinética de división de linfocitos humanos tratados <u>in vitro</u> con V_2O_5 .	
<u>FIGURA 15</u>	71
Efecto de la cafeína (24 H) sobre la cinética de división de linfocitos humanos tratados <u>in vitro</u> con V_2O_5 .	
<u>FIGURA 16</u>	72
Efecto de la cafeína (48 H) sobre la cinética de división de linfocitos humanos tratados <u>in vitro</u> con V_2O_5 .	
<u>TABLA 1</u>	26
Compuestos químicos capaces de alterar el proceso reproductivo y el desarrollo de los organismos.	
<u>TABLA 2</u>	40
Concentraciones de vanadio en el ambiente y en algunos alimentos.	
<u>TABLA 3</u>	62
Cinética del ciclo celular, tasa de proliferación (TPL) y frecuencia de ICH's en cultivos de linfocitos humanos tratados con cafeína a las 24 horas.	
<u>TABLA 4</u>	79
Efecto embriotóxico del pentóxido de vanadio en ratones hembra tratados durante la gestación (día 6 al 15).	
<u>TABLA 5</u>	82
Anomalías presentes e los fetos de ratones hembra tratados con pentóxido de vanadio durante la gestación (día 6 al 15).	
<u>TABLA 6</u>	86
Efecto del pentóxido de vanadio sobre el proceso de osificación en fetos de ratones hembra tratados durante la gestación (día 6 al 15).	

RESUMEN

En la última década el vanadio ha destacado, debido al amplio uso que se le da en las industrias y a su acumulación gradual en el aire, el suelo, el agua y los organismos. Este metal se encuentra dentro de los grupos de elementos peligrosos para la salud.

Resultados previos mostraron que el pentóxido de vanadio (V_2O_5) aplicado a cultivo de linfocitos humanos *in vitro* en concentraciones de 2,4 y 6 ug/ml no incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) ni la de intercambio de cromátidas hermanas (ICH's), sin embargo es capaz de alterar el aparato mitótico, lo cual se muestra en el incremento en la proporción de células poliploides, modifica la distribución de ICH's por célula y la duración del ciclo celular (TDL).

La posibilidad de que éste compuesto produzca lesiones que al ser reparadas no se puedan expresar como ICH's fue considerada, por lo que en la presente investigación se utilizó cafeína (en combinación con el vanadio), como inhibidor de la reparación, porque se sabe que la cafeína es capaz de interferir con éste proceso en el ácido desoxirribonucleico (ADN), ya que potencializa los efectos genotóxicos de otros agentes como las radiaciones y los agentes alquilantes. Los resultados obtenidos son, en los cultivos tratados con las mismas concentraciones mencionadas de V_2O_5 o cafeína (20 ug/ml aplicada a las 0, 24 ó 48 horas), la frecuencia de ICH's no se modificó. Cuando el vanadio se combinó con la cafeína, y se aplicó a las cero horas, la frecuencia de ICH's no se modificó, sin embargo, a las 24 y 48 horas de cultivo hubo un aumento en las frecuencias de ICH's a las concentraciones de 6 ug/ml (7.64 ± 0.59), para el primer caso y para 4 ug/ml (1.60 ± 0.46) y 6 ug/ml (3.56 ± 0.63) para el segundo, (vs 5.88 ± 0.21 , $P < 0.05$, 0.01 y 0.001).

Con respecto a la TDL, se modificó en las concentraciones de 4 y 6 ug/ml de pentóxido de vanadio (30.15 y 22.38 vs 25.26 $P < 0.05$ y 001). Cuando se aplicó cafeína a las 24 horas la TDL disminuyó (23.55 vs 25.26); y cuando se adicionó a las 48 horas este parámetro se incrementó (29.0 vs 25.26, $P < 0.05$). En los tratamientos con vanadio en combinación con cafeína se encontró que a las cero y 48 horas de aplicación la cafeína la TDL aumentó (30.77 y 30.97 vs 25.26, $P < 0.01$), a las concentraciones de 6 y 4 ug/ml respectivamente.

Por otro lado, durante esta investigación a ratones hembras gestantes se les inyectó intraperitonealmente pentóxido de vanadio en una concentración de 8.5 mg/Kg de peso, del día 6 al 15 de gestación. Los resultados mostraron que el compuesto químico utilizado causó: disminución en el peso fetal (1.04 ± 1.05 vs 1.39 ± 0.05 g $P < 0.001$), aumento del porcentaje de camadas con fetos anormales (23.07 vs 60.0 % $P < 0.05$), y también

un incremento en el porcentaje de fetos anormales (10.07 vs 2.42, $P < 0.05$). La proporción de sexos se modificó (62.41 ♀♀ / 37.59 ♂♂ vs 44.35 ♀♀ / 55.65 ♂♂, $P < 0.05$). De las malformaciones observadas el acortamiento de miembros se incremento significativa en el lote tratado (5.36 vs 0.0%, $P < 0.01$). A nivel de sistema óseo se observó una reducción en el número de centros de osificación de miembros superiores e inferiores (8.95 ± 0.33 vs 13.45 ± 0.07 y 6.25 ± 0.41 vs 14.66 ± 0.52 $P < 0.005$) respectivamente; y alteraciones en la morfología de las costillas (4/101 vs 0/80).

Los resultados muestran que el pentóxido de vanadio es un agente mutagénico y teratogénico y que existe una correlación entre ambos efectos.

1.- INTRODUCCION

1.1) CONTAMINACION Y ENFERMEDAD

En el planeta se conocen cerca de 6 millones de elementos químicos, tanto naturales como sintéticos, de los cuales entre 70,000 y 80,000 son de uso cotidiano, aumentando anualmente entre 500 y 1000 compuestos diferentes (IRPTC,1985).

Una de las preocupaciones de hoy día es la interacción de estas sustancias con el hombre y su posible repercusión sobre la salud, debido a que existen numerosas evidencias que han mostrado que son muchas las sustancias que pueden producir daño en el organismo (Carson et al.,1987; ECETOC,1983). Además del poder tóxico de estos compuestos, algunos son capaces de alterar de manera importante el material genético, originando mutaciones que dan lugar al desarrollo del cancer o la aparición de malformaciones (Kallén, 1987).

Diversos estudios han mostrado que las alteraciones cromosómicas son una de las causas más importantes de la morbilidad y mortalidad en el hombre, alteraciones que se asocian en gran proporción a muchas de las muertes fetales tempranas, de la muerte de algunos recién nacidos, de la mayoría de los casos de retraso mental, de algunas malformaciones congénitas. Se asocian también problemas de fertilidad y muchas otras enfermedades (Hook, 1981; Smithells, 1987).

En las últimas décadas un sinúmero de reportes científicos y de divulgación han mostrado su creciente preocupación por la

elevada frecuencia de casos con problemas reproductivos en el hombre y al aumento en el índice de malformaciones congénitas (Houge, 1984).

En muchos países, incluyendo México, las malformaciones congénitas constituyen la tercera causa más frecuente de morbi-mortalidad infantil (Mutchinick *et al.*, 1988). Los estudios epidemiológicos realizados muestran que la frecuencia de estas anomalías varía entre el 5 y el 7 %, aunque se sabe que estas cifras no reflejan la realidad del problema, debido en gran medida a que existen algunas alteraciones que no son detectadas al nacimiento, por lo que estas escapan a las estadísticas (Guzmán-Toledano, 1986)

Entre 1978 y 1985 el Programa Mexicano de Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas Externas registró 248,934 nacimientos de niños vivos, de los cuales 4,701 presentaban alguna malformación, mientras que en el mismo período, de 4480 casos de nacimientos de niños muertos se encontró que 504 estaban malformados (Mutchinick *et al.*, 1988).

Dentro de los factores que juegan un papel importante en la etiología de las malformaciones podemos mencionar: la edad materna, la nutrición, las enfermedades, las alteraciones cromosómicas o genéticas y a la exposición a agentes químicos. Este último merece especial atención ya que los compuestos químicos se encuentran presentes en el medio en que se desenvuelve la mujer fértil y la embarazada (ECETOC, 1983; Houge, 1984)

Junto con las malformaciones congénitas se han podido encontrar diversas alteraciones relacionadas con las exposiciones a estos tipos de agentes. Se puede mencionar como ejemplo la teratospérnia, la infertilidad, el aumento en la frecuencia de abortos espontáneos y los nacimientos prematuros, todas ellas juegan un papel importante en la alteración del proceso normal reproductivo (ECETOC, 1983; Hogue, 1984; Palmer, 1980).

Al conocer el problema que implican los efectos de los agentes químicos, en muchos países, las Agencias de Protección Ambiental, antes de autorizar la utilización de alguna sustancia de uso humano, recomiendan que además de las pruebas de análisis mutagénico se realicen una serie de ensayos para poder detectar los posibles efectos que, sobre la reproducción y el desarrollo, pudieran tener estos compuestos.

En la actualidad, la mayoría de estos protocolos, también se emplean para evaluar el efecto de los contaminantes ambientales sobre el desarrollo humano.

Por tales motivos la Agencia de Protección Ambiental (US-EPA), al igual que otros de los organismos encargados de la seguridad ambiental, han impulsado a la Toxicología Reproductiva, área responsable de realizar las evaluaciones de los efectos reproductivos y teratogénicos de los agentes químicos, físicos y biológicos.

La Teratología como rama de la Toxicología Reproductiva se encarga de estudiar los efectos de la exposición a factores intrínsecos (por ejemplo, desbalance hormonal, desnutrición,

etc.) y extrínsecos (por ejemplo la exposición a agentes químicos), en relación a la aparición de las malformaciones congénitas. Todos aquellos agentes que son capaces de inducir o incrementar la incidencia de algún tipo de malformación congénita se le conoce como teratógeno (Dupplexis,1973; Fieshbein,1976; Erikkon,1984). Se ha definido a las malformaciones congénitas como un defecto permanente anatómico, histológico o químico que no puede ser reparado por el crecimiento o desarrollo del organismo (Langhman,1976; Fieshbein,1976,Navarrete,1981).

En la actualidad, con el uso de modelos biológicos de prueba la relación entre las malformaciones congénitas y los eventos mutagénicos inducidos por agentes químicos es uno de los puntos de mayor interés debido a la poca información en la que se correlacionan estos dos procesos, además que en la mayoría de los casos estos fenómenos se estudian de manera excluyente uno del otro (ECETOC, 1983; WHO, 1985).

1.2) GENÉTICA TOXICOLÓGICA

La Genética Toxicológica es el estudio sistemático de los efectos de los agentes físicos, químicos y biológicos presentes en el ambiente, sobre el sistema genético de los organismos, así como las consecuencias de tipo genético para el futuro de las especies (Prival, 1980, Moutschen, 1985).

La Genética Toxicológica permite evaluar la habilidad de las sustancias químicas para inducir cambios en el material hereditario de los organismos, mediante una gran variedad de

tipos celulares. Estos incluyen bacterias, hongos, cultivo de células de mamífero, células somáticas y germinales de plantas superiores y animales, y en algunos casos hasta con los organismos completos .

El hecho de que la naturaleza del material genético, el ácido desoxirribonucleico (ADN), sea esencialmente la misma en todos los organismos ha permitido utilizar una serie de modelos biológicos de prueba para obtener información útil sobre el potencial de los agentes químicos que inducen cambios hereditarios (Prival, 1980, Moutschen, 1985).

Con base en el nivel de detección del daño genético, los diferentes sistemas biológicos de prueba se pueden separar en cuatro grupos:

Grupo I: Son todas aquellas pruebas que detectan el posible daño al ADN a nivel molecular, dan información suficiente para clasificar a los agentes como mutágenos potenciales.

Grupo II: Incluye las pruebas que detectan mutaciones a nivel celular, ya sea de una manera directa o indirecta, mediante el empleo de microorganismos, plantas superiores, células en cultivo o mamíferos completos, lo que permite tener un mayor poder de resolución.

Grupo III: Son todos aquellos sistemas que permiten establecer los efectos directos de los agentes mutagénicos sobre los cromosomas.

Grupo IV: Recopila una serie de ensayos a largo plazo, que hacen evidente el efecto de los agentes sobre la descendencia de

los organismos tratados.

Dentro de los sistemas biológicos de prueba utilizados, el cultivo de células de mamífero se ha considerado como uno de los sistemas ideales para poder evaluar los efectos citogenéticos de una gran cantidad de agentes mutagénicos, donde el cultivo de linfocitos es uno de los más usados para este fin (Maher y McCormick, 1982; Natarajan y Obe, 1982).

Los linfocitos humanos representan una población de células que se encuentran en el estado de G₀ presintético del ciclo celular, en el cual su actividad bioquímica y fisiológica está muy deprimida, tanto que sólo el 2% de los linfocitos periféricos muestran actividad replicativa del ADN (Natarajan y Obe, 1982), y que probablemente provienen de un grupo de células linfoides del tipo de los linfocitos T estimulados o de algún tipo de células plasmáticas inmaduras, las cuales representan linfocitos B estimulados también (Ling y Kay, 1975).

Nowell en 1960 mostró que existía la posibilidad de estimulación de los leucocitos humanos, y lograr su división mitótica *in vitro*, por la adición de una sustancia llamada fitohemaglutinina (PHA). En 1962 Carstairs determinó que las células blanco de la PHA eran los linfocitos, y estableció que estos no son células en un estado total de diferenciación y que conservan su pluripotencialidad, (Natarajan y Obe, 1982).

En la sangre de las personas sanas, las concentraciones de linfocitos varían mucho con la edad, encontrándose por ejemplo en un adulto de 21 años el número de estas células es de 2500/mm³,

mientras que en los recién nacidos la cantidad es más del doble (5500/mm³) (Natarajan y Obe, 1982).

En el hombre, el 80% de los linfocitos periféricos son pequeños, el 5% son medianos y un 15% de estos pertenecen a las células grandes llamadas linfoides (Natarajan y Obe, 1982). En los adultos el 70% de los linfocitos son de tipo T, mientras que el 30% restante corresponden al tipo de los linfocitos B, estas proporciones varían con la edad (Smith et al., 1974, Steel et al., 1975).

Desde el punto de vista mutagénico el linfocito ofrece una serie de ventajas que lo hacen muy interesante, como el hecho de presentar una vida media de 2 a 4 años, lo que permite que acumule lesiones en su ADN, además de encontrarse en un estado definido del ciclo celular (Go), y mediante la adición de agentes mitogénicos como la fitohemaglutinina puede ser inducido a la división en condiciones controlables, y por último, estas células han demostrado poseer una baja actividad de reparación, por lo que durante mucho tiempo ha sido uno de los sistemas ideales para el estudio del efecto de la exposición crónica a bajas concentraciones de mutágenos, y realizar una gran variedad de análisis como 1) Aberraciones cromosómicas (AC), en metafase, 2) Intercambio de cromátidas hermanas (ICH), 3) Asociaciones de satélites (AS), 4) Cinética de la división celular (CDC), 5) Micronúcleos (MCN), en interfase, 6) Mutaciones puntuales dominantes (MPD), e 7) Infidelidad en la síntesis del ADN (Evans y O'Riordan, 1975, Natarajan y Obe, 1982, Albertini et al., 1982,

Moutschen, 1985).

Hasta hace algunos años la mayoría de las técnicas empleadas en citogenética para detectar el efecto mutagénico de agentes químicos, físicos y biológicos en los cromosomas se utilizaban las tinciones convencionales por ejemplo Giemsa, lo que no permitía una clara observación de estos efectos por lo que se buscaron metodologías más sensibles que pudieran detectar estos daños no observable con éstas técnicas. En 1974 Latt, y Perry y Wolff de manera independiente implementaron una técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas que ha aportado valiosos datos acerca del efecto de las sustancias químicas en el ADN. La técnica se ha desarrollado ampliamente hasta la fecha, ya que ha demostrado ser altamente sensible, ya que se pueden detectar lesiones en el ADN, aún a concentraciones de 10 a 100 veces menores que las usadas comúnmente para producir aberraciones cromosómicas incluso en el humano (Wolff, 1977), (Morimoto y Wolff, 1980, Waksvik et al., 1981, Schneider et al., 1984).

1.3) INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH'S)

La técnica de intercambio de cromátidas hermanas se basa en la incorporación de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) al ADN durante dos ciclos de replicación continuos (Figura 1A) y su posterior revelado mediante el uso de un colorante fluorocromado Hoechst-33258 en combinación con la luz ultravioleta y colorantes como el Giemsa, de tal modo que las células cuyo ADN ha incorporado BrdU por un ciclo de duplicación (monofilarmente sustituidas) teñirán

de una manera homogénea (Figura 1A) , mientras que las células que ya han pasado por dos ciclos de replicación y cuyos cromosomas muestran una cromátida monofilamente sustituida y la otra bifilarmente sustituida, teñirán de una manera diferencial, oscura la primera y palididad la segunda (Figura 1B) (Perry y Wolff, 1974). De esta manera se pueden evidenciar los intercambios entre las cromátidas hermanas. Los intercambios involucran la ruptura de cadenas dobles del ADN en ambos brazos del cromosoma (Figura 1C) y su posterior reubicación, sin llegar a alterarse la morfología del cromosoma (Perry y Evans, 1975).

1.4) CINÉTICA DE LA DIVISION CELULAR (C.D.C.)

El hecho de que la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas se base en la incorporación de un análogo de la timidina como es la bromodesoxiuridina durante dos ciclos de división, da la posibilidad de estudiar la cinética de proliferación de los linfocitos, ya que según el patrón de tinción se puede determinar , el número de veces que se ha dividido una célula. Las células que se han dividido una sola vez, muestran por lo tanto una tinción homogénea en ambas cromátidas (Figura 2A), mientras que las que se han dividido dos veces presentan la tinción diferencial de cromátidas hermanas, donde una de ellas es clara, mientras que la otra es oscura (Figura 2B), y las células que ya pasaron por tres o más ciclos muestran una tinción mezclada, se observan cromosomas con ambas cromátidas pálidas, con porciones de cromátidas oscura y lo que

resta pálido (Figura 2C).

El análisis de la frecuencia de células en metafase las cuales se han replicado por I, II y III o más ciclos, provee información sobre los efectos citostáticos o citotóxicos de los agentes químicos (Ivett y Tice, 1982).

Las lesiones inducidas en el ADN de los linfocitos por agentes mutagénicos, pueden estar sujetas en algunos de los casos a la reparación, a pesar de la baja actividad, (Perry y Thomson, 1984), lo que conduce a que las lesiones no reparadas o mal reparadas formen mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas importantes. Los efectos primarios de los mutágenos en el ADN generalmente pueden ser evaluados por diferentes vías, como por ejemplo las bioquímicas, o con el empleo de algunos métodos citológicos y microfluorométricos (Natarajan y Obe, 1982).

1.5) MECANISMOS DE REPARACION

La evolución orgánica ha generado el establecimiento de ciertos tipos de mecanismos que permitan la supervivencia de los seres vivos. En general se puede decir que todas las células, desde los procariontes hasta las de los mamíferos (Rommelaere et al., 1974), tienen la capacidad de reparar el daño causado al ADN, tanto por agentes físicos (Hetzl et al., 1976; Waldstein y Setlow, 1976) como químicos (Bordin et al., 1976; Craddock et al., 1976; Rydberg, 1977). Sin embargo, en algunas células como las Clamydomonas y en las mitocondrias humanas no se han evidenciado estos mecanismos (Swinton, 1975; Clayton et al.,

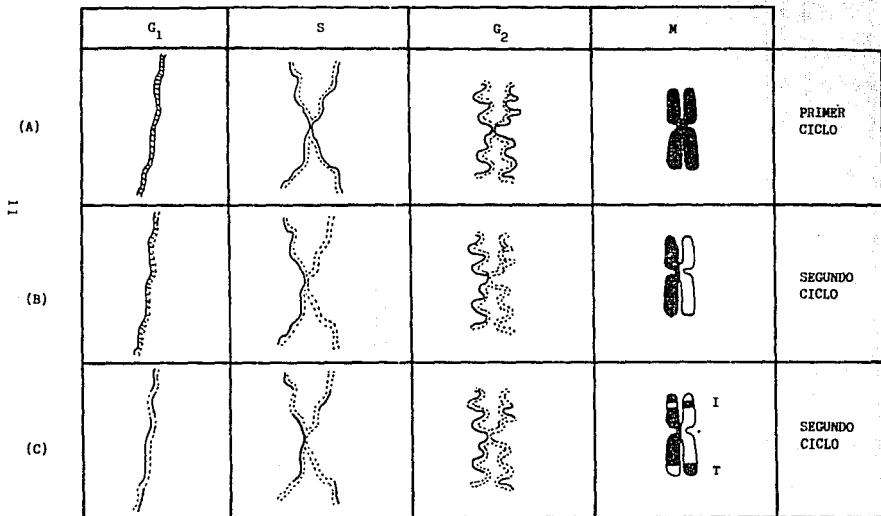


FIG. 1 Incorporación de BrdU (—) en cromosomas de linfocitos humanos durante dos ciclos de replicación: (A) Primer ciclo, (B) Segundo ciclo, (C) Segundo ciclo mostrando un intercambio terminal (T) y uno intersticial (I).



Figura 2A.- Fotomicrografía de cromosomas de linfocitos humanos en metafase de primer ciclo de división.

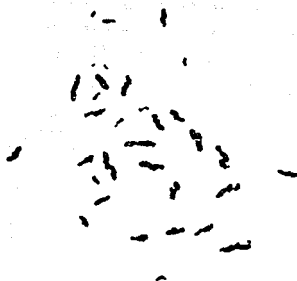


Figura 2B.- Fotomicrografía de cromosomas de linfocitos humanos en metafase de segundo ciclo de división.



Figura 2C.- Fotomicrografía de cromosomas de linfocitos humanos en metafase de tercer ciclo de división.

1976).

Se conocen en la actualidad cuatro tipos principales de mecanismos de reparación: 1) Fotorreactivación; 2) Reparación por escisión, el cual actúa antes de la duplicación del ADN (o fase de síntesis); 3) Reparación postreplicativa ó por recombinación, repara el daño que persiste aún después de S, 4) Reparación SOS.

1.5.1) Fotorreactivación.-Albert Kelner descubrió en 1949 que la sobrevivencia de bacterias irradiadas con luz ultravioleta se veía aumentada cuando eran expuestas subsecuentemente a una fuente intensa de luz azul. Las bases moleculares de estos efectos permanecieron sin aclarar por muchos años. Como podía la luz azul (un quantum de energía de 3 eV), revertir el daño producido por la luz UV (5eV) ? Actualmente se sabe que in situ es relativamente simple y requiere de una enzima fotorreactivante llamada ADN fotoliasa que cataliza el rompimiento de enlaces covalentes entre el anillo ciclobutano de los dímeros de pirimidina (timinas). Tiene una eficiencia del 80% al 90% de los productos totales de la UV, utiliza la luz visible como fuente de energía.

1.5.2) Reparación por escisión.-Requiere la presencia de tres tipos de enzimas diferentes, endonucleasas, ADN polimerasas y polinucleótido ligasas. La primera enzima cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster cercano al extremo 5' del dímero de Timina (T) de un ADN irradiado y su actividad depende del ATP presente en el medio. La ADN polimerasa I tiene actividad 5'

exonucleasa, además de polimerasa, la enzima separa el dímero junto con otros nucleótidos adyacentes, lo que resulta en un hueco en la molécula de ADN, este hueco es posteriormente llenado por polimerización. Finalmente la polinucleotido ligasa, une el final de la nueva cadena de nucleótido con el extremo preexistente. Esta enzima también participa de una manera importante en la reparación por recombinación. Tanto la fotorreactivación como la reparación por escisión, son mecanismos de reparación prerreplicativos, actúan antes de la fase S.

1.5.3) **Reparación postreplicativa o por recombinación.**- Fue descubierta por Rupp y Howard-Flanders (1968). Debido a que al momento de la síntesis de nuevas moléculas de ADN, los dímeros de timina no tienen nucleótidos complementarios, quedan huecos opuestos a cada dímero (Buhl y Reagan, 1975), los cuales son reparados por recombinación. Se han propuesto varios modelos para tratar de explicar los complejos mecanismos de la recombinación genética (Meselson y Radding, 1975; Potter y Drexler, 1976; Wagner y Radam, 1976). Ya que varias de las moléculas de ADN permanecen con cierto número de dímeros, el resultado final es que algunas de éstas son "sacrificadas" al quedarse con el daño para que otras sean reparadas por múltiples intercambios entre las moléculas. Algunos autores no están de acuerdo con el hecho de que se encuentran huecos en el ADN opuestos a cada dímero (Menighini y Hanawalt, 1975). La presencia de los dímeros de pirimidinas reduce la velocidad de replicación del ADN (Hewitt y Meyn, 1975) y es causa de la recombinación que se

presenta durante y/o después de la replicación de éste (Lin y Howard-Flanders, 1976).

Reparación por recombinación en mamíferos

Se ha observado que en células de mamíferos, las radiaciones aumentan la frecuencia de recombinación, lo cual pudiera ser la consecuencia de fenómenos de reparación por que se presentaran en el momento de la replicación del ADN o después de la misma (Radman y Herrera, 1970).

Mediante técnicas autorradiográficas, se ha demostrado, (Rommelaere et al., 1973), que en células de criceto (hamster Chino) la frecuencia de recombinación aumenta después de la irradiación con luz UV. También se ha observado un incremento en la recombinación cuando se daña el ADN con agentes químicos como el N-acetoxi-acetilaminofluoreno (D'Ambrosio y Setlow, 1976), dimetilnitrosamina y metilmetanosulfonato (Craddock et al., 1976). La metilación del ADN es necesaria para la reparación de los linfocitos expuestos a la mostaza nitrogenada (Drahovsky et al., 1976).

1.4.4) Reparación SOS.- Es un sistema inducible y mutagénico (Caillet-Fauquet, 1976; Radman, 1975). En E. coli se requiere de síntesis de proteínas y de la presencia de los genes *rec* y *lex*. En este sistema se observa que la supervivencia del fago Lambda irradiado es mayor cuando el hospedero (E. coli) ha sido también irradiado. La hipótesis propone que al irradiar al hospedero se induce un sistema de reparación en las bacterias, que tienen

ahora mayor capacidad para reparar el ADN dañado del fago, pero con un incremento en la frecuencia de mutación debido a la acción de una "polimerasa infiel" (Radmam, 1975).

Los requerimientos fisiológicos y genéticos para la expresión de la reparación SOS son parecidos a los que se necesitan para la inducción del prófago.

La señal que induce a los genes reprimidos para que el sistema opere, es probablemente un bloqueo temporal de la replicación del ADN o la presencia de lesiones en el mismo. El hecho de que la mutagénesis aumente como resultado de este proceso, puede ser consecuencia secundaria de las condiciones fisiológicas de ensayo-error bajo las cuales opera el sistema SOS. Devoret et al., (1975) reporta que en condiciones de máxima homología entre el fago Lamda infectante y las bacterias lisogénicas infectadas, eliminan aparentemente la posibilidad de que la reparación SOS sea el resultado de un incremento en la recombinación.

Es notable la similitud existente entre la reparación por el sistema SOS y la transformación oncogénica en cultivos de células de mamíferos. Para que la "transformación" se presente en ambos casos se requiere una respuesta celular activa al agente inductor. Además, Ames et al., (1973), demostraron que la mayoría de los carcinógenos son mutágenos potentes.

1.5.5) Reparación y mutagénesis

Según Witkin (1975), en las células genéticamente dañadas,

los medios usados para la supervivencia como son la mutagénesis y la reparación, son inseparables. Las mutaciones en el ADN dañado se pueden originar por lesiones que no pueden ser reparadas o bien por errores producidos por el sistema de ensayo-error, que cambió la secuencia de bases en el momento de la reparación (reparación por recombinación, reparación SOS).

Varios autores han señalado que existen sistemas de reparación "exactos y mutagénicos". La reparación por escisión es un mecanismo exacto (Witkin, 1968) que elimina las lesiones premutacionales en el ADN, mientras que la reparación por recombinación es mutagénica.

1.5.6) Inhibidores de la reparación

Actualmente se conocen una gran cantidad de agentes químicos que son capaces de inhibir la reparación, ya sea por mecanismos directos o bloqueando el funcionamiento de las enzimas encargadas de este proceso.

Algunos de los inhibidores se utilizan en la terapéutica como la cloroquina (López-Zumel et al., 1975) que se usa contra la malaria, o la prednisolona y la flufenaminacida que son antirreumáticos (Dunky et al., 1975). Ciertos esteroides como la cortisona (Ivanova-Glavanakova et al., 1975) y análogos de bases nitrogenadas como el bromouracilo (Myers et al., 1977), incrementa la sensibilidad de las células a las radiaciones ionizantes y a la UV.

Dentro de la gran diversidad de sustancias químicas que

invaden constantemente el medio ambiente, algunas son producto de la tecnología desarrollada por el hombre, pero otras se originan como productos naturales provenientes de ciertos organismos, como por ejemplo esta la luteosquirina, originada por hongos del arroz y que es un antirreparador muy eficiente (Mouton y Fromageot, 1971) y la cafeína que es un inhibidor específico de la reparación del daño provocado por la radiación UV (Ehmann et al., 1976; Fujiwara y Tarsumi, 1976; Lung, 1975, Tondeur y Rommelaere, 1977).

La cafeína es el principal componente del café, té, y muchos refrescos principalmente los de cola, chocolates, analgésicos y otras drogas, (Pollard et al., 1987) y su consumo es significativo entre gran número de personas. Es probable que sirva como fungicida, herbicida, e insecticida, para las plantas que lo producen (Shin et al., 1990).

El contenido de cafeína varía según el producto del que se trate. En café encontramos desde 170 mg/tasa de 180 ml en el expreso, 110 mg/tasa en el filtrado, 75 mg/tasa en el instantáneo y 1 mg/tasa en el descafeinado. En el té de bolsa 50 mg/tasa y en el de hojas y el instantáneo 30 mg/tasa. En chocolate tenemos 40 mg/barra de 40 g. Los refrescos de cola dietéticos o regulares contienen 45 mg/180 ml. Estos valores permiten establecer el cálculo total del consumo de cafeína al sumar la ingesta de café, té, refrescos de cola y chocolate (Beaulac-Baillargeon y Desrosiers, 1987).

Por otra parte, en reportes recientes (Sharma, 1987),

donde utilizan un sistema de prueba vegetal, Hordeum vulgare L (cebada var. IB-65), proponen a la cafeína como un radioprotector de la radiación de tipo ionizante.

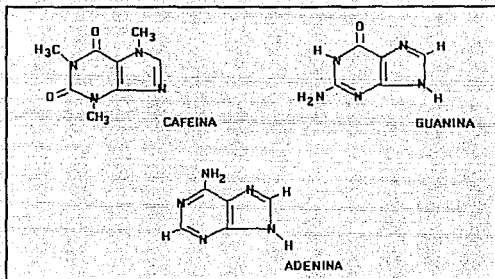
Estudios teratológicos sobre la cafeína y sus metabolitos, donde se utilizaron dosis altas mostraron que este compuesto induce malformaciones embrionarias extensivas y retraso en el desarrollo en varias especies de animales de laboratorio (Tarka, 1982). Sin embargo cuando se utilizan dosis que van de 30 a 60 mg/Kg de peso los efectos de la cafeína son controvertidos (Aeschbacher et al., 1980; Nolen, 1981; Butcher et al., 1984; Dunlop y Court, 1981).

Por otro lado, se ha establecido también que la cafeína tiene efectos mutagénicos en bacterias, hongos, plantas y cultivo de células humanas (Ostertag et al., 1965), sin embargo estos efectos en animales y humanos son inciertos (Epstein, 1970).

La cafeína potencializa los efectos mutagénicos y letales de agentes genotóxicos. Se sabe que esto se debe al menos en algunos organismos, a la inhibición de la reparación del ADN (Selby y Sancar, 1990). En E. coli la cafeína (10 a 100 mM), inhibe los mecanismos de reparación de fotorreactivación y escisión de nucleótidos in vivo (Witkin, 1969) y en el sistema de células permeabilizadas. También se ha demostrado que la cafeína (10 mM), inhibe el proceso de reparación por escisión de nucleótidos en células HeLa (Selby y Sancar, 1990).

Asimismo la cafeína tiene una estructura química (Figura 3), similar a las purinas que constituyen al ADN y, por lo tanto,

FIGURA 3.- ESTRUCTURA QUIMICA DE LA CAFEINA Y DE LAS PURINAS



el potencial de interferir con la división y el metabolismo celular (Alder, 1970).

Por otro lado, el desarrollo normal de los organismos está determinado por interacciones de factores genéticos y ambientales que pueden conjugarse y provocar en el individuo alteraciones, que originan malformaciones fácilmente reconocibles al nacimiento o defectos durante el desarrollo. Las causas de los efectos adversos sobre la reproducción humana son múltiples y no fácilmente comprendidos (Inger-Lise *et al*; 1987), lo cual ha provocado que se desarrolle una nueva área del conocimiento encaminada al estudio de tales problemas, la Toxicología Reproductiva.

1.6) TOXICOLOGIA REPRODUCTIVA

La Toxicología Reproductiva es una rama de la Toxicología relacionada con los efectos adversos producidos por agentes exógenos sobre el proceso de reproducción (Figura 4) (ECETOC, 1983).

Dentro del proceso reproductivo se han podido identificar varios estados vulnerables a los agentes químicos, los cuales comprenden la gametogénesis, el comportamiento sexual (copulación), la fertilización, el periodo de preimplantación, la implantación, la embriogénesis, la fetogénesis, la relación materno-placento-fetales, el parto, la lactancia, el desarrollo postnatal y la pubertad (ECETOC, 1983; Palmer, 1980). Donde la gametogénesis, la gestación (blastogénesis, implantación, embriogénesis y fetogénesis), y el desarrollo postnatal son las más sensibles.

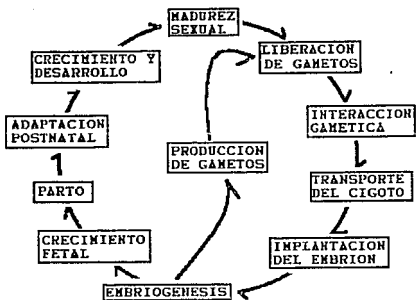


FIGURA 4.- CICLO REPRODUCTIVO

MATTISON, 1981

Las alteraciones ocurridas dentro del período de la gametogénesis se pueden manifestar en la población como: reducción en la fertilidad, esterilidad producida por alteraciones morfológicas, bioquímicas o fisiológicas; reducción en el número de espermatozoides; cambios en la morfología, motilidad y maduración del espermatozoide; fallas en la ovulación; mutaciones en la células germinales que originan: 1) esterilidad, 2) muerte del embrión y 3) aparición de malformaciones congénitas.

Los efectos de los agentes químicos sobre el período de gestación se pueden evidenciar tomando en cuenta:

-El alargamiento o acortamiento del mismo período, puede conducir a abortos e incrementar la probabilidad de encontrar productos muertos al nacimiento.

-Destrucción del blastocito.

-Daño al feto o alguna alteración que provoca un desarrollo anormal en el período de post-implantación.

-Bloqueo de la implantación o desprendimiento del blastocito.

-Interferencia con el desarrollo durante la fetogénesis, que origine cambios morfológicos.

-Retraso en el crecimiento y alteraciones funcionales.

-Bloqueo o dificultad en el parto.

-Variaciones en el tiempo del parto.

Por último, las alteraciones del crecimiento y desarrollo pueden manifestarse de la siguiente forma:

-Alteraciones del comportamiento materno.

-Cambios en las concentraciones hormonales o en la nutrición, que resultan en un desarrollo físico y funcional anormales, y disminuyen la probabilidad de sobrevivencia de los recién nacidos.

-Presencia de agentes químicos en la leche, que consecuentemente originan una exposición directa del recién nacido.

-Alteraciones en la maduración determinadas por:

- 1.- Alteraciones orgánicas
- 2.- Cambios enzimáticos
- 3.- Trastornos endócrinos
- 4.- Trastornos inmunológicos

Algunas de las sustancias que provocan infertilidad tanto masculina como femenina son el benceno, el disulfuro de carbono, el cloropropano, el dinitrotolueno (DDT), el dibromoetileno, etc. (Ortiz-Monasterio *et al*; 1987), mientras que agentes como las radiaciones ionizantes, los hidrocarburos aromáticos, los aldenidos alcalinos y las nitrosaminas, son capaces de producir lesiones en el ovario, necrosis de los ovocitos y atresia, mientras que agentes como el DDT y algunos análogos de este insecticida inducen cistitis folicular y una reducción en el número de cuerpos lúteos (Maronport, 1987). En la tabla 1 se presenta la lista de los agentes mejor conocidos, capaces de alterar el proceso reproductivo y el desarrollo de los organismos.

Estudios realizados en animales de laboratorio demostraron que agentes como la acrilamida y sus análogos inducen daño testicular, elevan la frecuencia de reabsorciones fetales, disminuye el recuento espermático, y se manifiestan una alta incidencia de anomalías morfológicas en los espermatozoides (Sakamoto y Hashimoto, 1985).

TABLA 1 . COMPUESTOS QUIMICOS CAPACES DE ALTERAR EL PROCESO REPRODUCTIVO Y EL DESARROLLO DE LOS ORGANISMOS.

EMBRIOTOXICIDAD

Benceno
PBC
Plomo
Arsénico
Mercurio

MUERTE NEONATAL

Cadmio
Plomo
Mercurio

TERATOGENESIS

Aldin
Plaguicidas
Dimetil-sulfoxido
Dioxinas
Hexaclorofeno
PBC

BAJO PESO AL NACIMIENTO

Cloropreno
Percloroetileno
Cadmio
Plomo
Mercurio

CANCER EN LA DESCENDENCIA

Hidrocarburos
Plomo
Estrógenos

ANOMALIAS EN EL DESARROLLO

PBC
Cadmio
Plomo
Mercurio

MUTACIONES EN CELULAS GERMINALES

Cloruro de vinilo

ABORTOS ESPONTANEOS Y MUERTE FETAL

Cloropreno
Dibromocloropropano
Dioxinas
Cadmio
Plomo
Mercurio

(Ortiz-Monasterio et al., 1987).

Investigaciones realizadas en 270 casos de intoxicación de mujeres embarazadas mostraron que el 45% de estos sufrieron además una intoxicación del embrión, el feto o la placenta, mientras que en el 40% de los embarazos se alteró de manera significativa el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Maronport, 1987).

A partir de la tragedia de la talidomida en los años 60's se vió la necesidad de proponer y desarrollar sistemas de evaluación específicos para todas las sustancias de uso y consumo humano, con el objeto de reducir el riesgo de daño y evitar otro desastre como el acontecido (Montgomery y Reinhardt, 1980).

1.6.1) Pruebas utilizadas en Toxigología Reproductiva

Varias organizaciones legisladoras internacionales como la Agencia de Protección Ambiental (EPA-USA), la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA-USA), el Ministerio de Agricultura, Bosques y Pesca (MAFF-Japón) y la Organización Mundial de la Salud (WHO), han desarrollado diversas pruebas para evaluar los efectos de los agentes químicos sobre la reproducción usando mamíferos como modelo.

De acuerdo al período de exposición, las pruebas pueden ser divididas en dos grupos:

1.6.2) Exposición durante todo el ciclo reproductivo

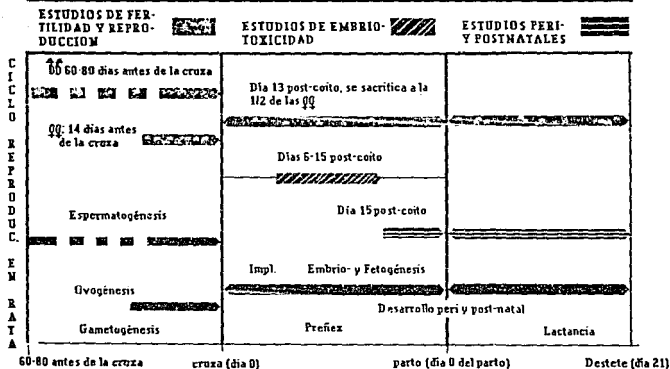
Los agentes químicos son administrados desde al menos un ciclo espermatogénico y en el último estado de la maduración del ovocito antes de que los animales de la generación progenitora (P ó Fo) sean apareados. La exposición de las hembras se continúa después del apareamiento hasta el final de la lactancia (Figura 5). Se recomienda que algunas de las hembras sean examinadas por operación cesárea antes del parto, ya sea a la mitad de la gestación (FDA, 1966) o justo antes de que termine (CSM, 1974). Se requiere que la exposición se extienda desde la primera generación (F1) hasta la lactancia de la segunda generación (F2). Todos estos estudios permiten detectar los efectos adversos sobre la fertilidad y capacidad reproductiva de más de una generación (ECETOC, 1983).

1.6.3) Exposición durante partes del ciclo reproductivo

Estudios convencionales en esta categoría son usualmente llamados estudios de "teratogenicidad" y "peri y postnatales" y requieren que las hembras estén expuestas al agente químico durante la organogénesis (Figura 5). En los estudios teratogénicos, los animales gestantes son operados por cesárea antes del día del nacimiento, y se registra el número de crías y la incidencia de alteraciones morfológicas en el feto (ECETOC, 1983).

El procedimiento anterior permite la detección de los efectos embriotóxicos y fetotóxicos, como por ejemplo, retraso en

FIGURA 5.- PERIODOS DE TRATAMIENTO EN EXPERIMENTOS DE TOXICOLOGIA REPRODUCTIVA



el crecimiento, variaciones anatómicas, teratogenicidad y letalidad. Además, las crías darán información acerca de la sobrevivencia y desarrollo posnatal, Así como de las anomalías funcionales. El desarrollo del sistema nervioso central (SNC) y la diferenciación del sistema urogenital pueden ser evaluados en las etapas peri y postnatales, también la sobrevivencia y maduración física y funcional de las crías y los efectos sobre el parto, la lactancia y el comportamiento de las hembras.

1.7) EL RATON COMO MODELO DE ESTUDIO EN TERATOGENESIS

Para estudios en Toxicología, el ratón y la rata son los modelos que se utilizan con mayor frecuencia por sus características, como talla pequeña, fácil manejo y mantenimiento en el bioterio, fisiología bien caracterizada, y también permite utilizar varias vías de administración de sustancias o fármacos (ECETOC, 1983; Harkness y Wagner, 1989).

El ratón (Mus musculus), es un roedor del orden Rodentia y de la familia Muridae. Este, así como otros animales que se utilizan en la investigación, son incluidos en dos categorías principales con base a sus características ecológicas y genéticas. La categoría ecológica incluye: 1) ratones libres de gérmenes perceptibles (axénicos); 2) ratones con flora y fauna específicas (xénobióticos); 3) ratones libres de microorganismos patógenos específicos; y 4) ratones convencionales, los cuales incluyen a todos los que son obtenidos bajo una variedad de condiciones (Harkness y Wagner, 1989).

La categoría genética incluye: 1) ratones cruzados al azar, los cuales son derivados de las cruza entre ratones emparentados * no; 2) ratones consanguíneos o endogámicos, son genéticamente homogéneos y descienden de al menos 20 cruza consecutivas entre hermanos y hermanas; y 3) el híbrido F1, es producto de la cruza entre ratones de dos cepas consanguíneas diferentes. Existen varios esquemas consanguíneos, pero cada cruza entre ratones hermanos reduce la heterosis existente hasta en un 19 por ciento aproximadamente (Harkness y Wagner, 1989).

Los ratones endogámicos, han originado una variedad de cepas-específicas de colores de pelo. Consecuentemente, estas cepas se establecen en los laboratorios, escuelas y hogares donde se crían y son considerados como mascotas más que como un modelo en el cual estudiar las enfermedades humanas, la razón original por la cual fueron seleccionados (Harkness y Wagner, 1989).

La madurez sexual varía según la cepa, la estación del año, tasa de crecimiento, el número de individuos por camada, y la nutrición. A pesar de que el ratón puede tener un primer estro entre los 28 y 40 días de edad, se pueden reproducir por primera vez cuando tienen 50 días de edad (20 a 30 g). El ratón que se reproduce muy joven o después de la semana 10 tiene una fertilidad reducida. (Harkness y Wagner, 1989).

El ciclo estral dura de 4 a 5 días, con un promedio de 12 horas durante el periodo estral. Excepto para el estro post-parto, el estro no se presenta durante la lactancia. Las hembras agrupadas en una misma caja pueden entrar en un periodo de

anestro continuo, el cual se termina con el olor o la presencia del macho. La mayoría de las hembras entonces, entrarán en celo en 72 horas aproximadamente, una sincronización de ciclos, conocido como el efecto Whitten. También la pseudopreñez interrumpe la ciclicidad de los animales.

Durante el desarrollo intrauterino, se realizan una serie de eventos organizados a través de secuencias ontogénicas orquestadas, determinadas por la interacción de la información genética del embrión o del feto y los procesos fisiológicos de la madre, por lo que cualquier alteración en este orden o funcionamiento puede originar alguna anomalía reconocible al nacimiento o algún defecto fisiológico y reproductivo detectable posteriormente (Beaudoin, 1980; Palmer, 1980; ECETOC, 1983).

1.7.1) Embriogénesis

El desarrollo embrionario del ratón se inicia con la fertilización del óvulo por el espermatozoide. 24 horas después el embrión está constituido por dos estados celulares, que continúan dividiéndose lentamente sin ningún incremento en la masa, y se desliza a lo largo del oviducto dentro del útero para la implantación a los 4.5 días después de la fertilización. Este lento desarrollo permite que el tejido uterino tenga tiempo para prepararse para recibir al embrión (Hogan *et al.*, 1986).

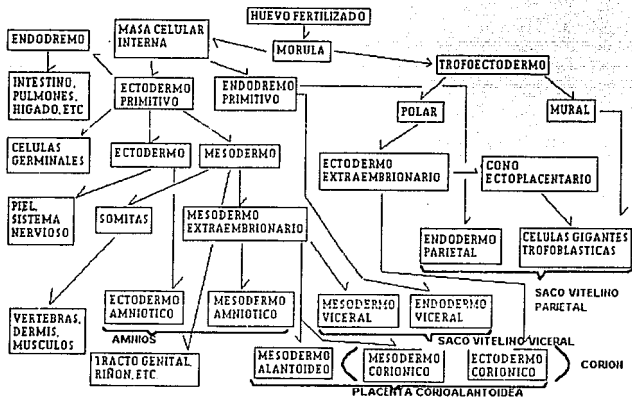
El embrión, genera entonces las primeras dos líneas celulares, el trofoectodermo y el endodermo primitivo, las cuales formarán la base de la placenta y las membranas vitelinas

extraembrionarias necesarias para las interacciones sucesivas con la madre. A partir de que la implantación se ha efectuado hay un incremento dramático en el crecimiento del embrión, particularmente en el pequeño grupo de células pluripotenciales conocido como ectodermo primitivo, a partir del cual se desarrollará el feto. Entre los 5 y 10 días después de la fertilización se establece el plan básico del cuerpo del ratón dentro de las células del ectodermo primitivo y sus descendientes. En resumen, el mesodermo está formado y dividido en pares repetidos de bloques de somitas que, generan un patrón segmentado a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo. La placa neural se induce y se pliega hacia arriba dentro del tubo neural, y se forman los primordios de la nariz, orejas y ojos. Las células de las crestas neurales empiezan su migración, y se establecen el corazón, el sistema circulatorio y los primordios o yemas de los miembros. Por lo tanto, es durante este período que muchos de los genes controlan la diferenciación y morfogénesis de los órganos adultos que están en juego (Figura 6) (Hogan et al., 1986)

1.7.2) Organogénesis

Al completarse la implantación y la aparición de la línea primitiva y el mesodermo embrionario asociado, el embrión entra en el estado de organogénesis y maduración. El período de organogénesis comprende desde la aparición de la línea primitiva hasta 8 ó 9 días más. Durante este período, los órganos están

FIGURA 6.- EMBRIOGENESIS EN RATON



bajo diferenciación, y toman su morfología adulta. Este es el período de mayor susceptibilidad a la acción de teratógenos, y cada órgano atraviesa por uno o más períodos críticos. En general, el tratamiento temprano en el período organogénico afecta principalmente al sistema nervioso, ojos, y orejas, mientras que un tratamiento tardío en la organogénesis afecta el paladar, esqueleto y estructuras urogenitales. Es posible por lo tanto elegir el momento en que se da el tratamiento para producir malformaciones en órganos específicos. No únicamente la sensibilidad a los teratógenos cambia durante la organogénesis, sino que también ciertas drogas afectan selectivamente a ciertos órganos (Beaudoin, 1980).

1.8) METALES

De los 109 elementos químicos identificados aproximadamente 80 son considerados usualmente como metales (Vouk, 1990).

La definición más útil de metal desde el punto de vista toxicológico, es la que se basa en las propiedades de los iones en solución acuosa: un metal es un elemento que bajo condiciones biológicas significativas puede reaccionar, perdiendo uno o más electrones y formar así un catión (Vouk, 1990).

Dentro de los elementos considerados como muy peligrosos tanto por el programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) como por La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos están los metales, ya que con el tiempo se ha demostrado ampliamente su toxicidad y los efectos adversos que

producen sobre los organismos (Ortiz-Monasterio et al.,1987).

Los metales, aunque algunos de ellos son micronutrientes esenciales en muchos organismos, en altas concentraciones son tóxicos, debido a que la mayoría de ellos tienden a formar complejos con las moléculas orgánicas, cuando se fijan y acumulan en los tejidos (Villanueva et al.,1988).

Además de su gran potencial toxicológico algunos metales como el cromo, plomo, níquel, zinc, cadmio y mercurio son capaces de inducir mutaciones y alterar el proceso reproductivo (ECETOC,1983; Villanueva et al.,1988). La mayoría de los organismos muestran poca estabilidad y adaptabilidad a elevadas concentraciones de estos elementos (Deknudt y Deminnatti,1978).

Dentro de los metales podemos encontrar a los llamados metales pesados y a los ligeros, de los cuales algunos son elementos traza (Duffus, 1983, Lenhinger, 1982), es decir aquel que se encuentra presente en la corteza terrestre en una concentración de 100 ppm o menos, dentro de la tabla periódica sólo doce de estos compuestos cumplen con estas características: oxígeno, silicio, aluminio, hierro, calcio, sodio, potasio, magnesio, titanio, hidrógeno, fósforo y manganeso.

Por otro lado los metales pesados han sido definidos como elementos cuya densidad es superior a 5 g/cm^{-3} , mientras que los ligeros presentan una densidad inferior, mucho de estos son esenciales para la vida (Duffus, 1983).

La toxicidad y el peligro que representan los metales y derivados metálicos a nivel de las enfermedades de tipo

ocupacional y como contaminantes ambientales ha tenido un gran interés para las organizaciones preocupadas por su impacto en el ambiente y las repercusiones en la salud de todos los organismos vivos (Hahon y Booth, 1984).

La EPA ha definido a algunos metales como el berilio (un metal traza ligero) y al mercurio (un metal traza pesado), como peligrosos, mientras que el bario, cadmio, cobre, manganeso, níquel, zinc y estaño, son considerados como potencialmente peligrosos (Deknudt y Deminatti, 1978, Deknudt y Gerber, 1979, Umeda y Nishimura, 1979, Andersen et al., 1983, Duffus, 1983), y cuyo manejo y uso debe de mantenerse bajo control. De los mencionados anteriormente, todos excepto el manganeso son metales traza, mientras que el bario es el único metal no pesado de este grupo (Duffus, 1983).

A partir de 1970 se sumaron once elementos a la lista de compuestos traza que son nutrientes esenciales. Estimando que en la dieta animal los requerimientos de estos elementos usualmente es de menos de 1 ug/g, y frecuentemente menos de 50 ng/g de dieta seca, han sido designados como ultratraza (Nielsen, 1988). Los once elementos son arsénico, boro, bromo, cadmio, fluor, plomo, litio, níquel, silicio, estaño y vanadio. Evidencias recientes (Nielsen et al.; 1984) indican que el arsénico, boro, níquel y silicio, son elementos altamente esenciales, y además tienen un papel muy importante en el proceso salud-enfermedad. Así mismo se ha reportado que el vanadio es un elemento relativamente tóxico, ya que unos pocos ug/g en la dieta pueden ejercer un efecto

farmacológico in vivo, especialmente si el estado nutricional del organismo no es el óptimo.

De todos los metales el vanadio y sus compuestos han despertado gran interés debido a que en los últimos años se ha acumulado en mayor proporción y gradualmente tanto en el ambiente como en los organismos, lo cual aumenta su ya elevado potencial toxicológico (Waters, 1977; Phillips et al., 1983).

1.8.1) Vanadio

El vanadio pertenece al grupo VI de los metales de transición, dentro de los cuales se incluyen el niobio y el tántalo (Phillips et al., 1983), aparece en la naturaleza en forma combinada en los estados de oxidación -1, 0, +2, +3, +4, y +5, se encuentra además en forma de isótopo v^{50} y v^{51} (Baroch, 1983; Phillips et al., 1983; Rosenbaum, 1983).

La forma más común del vanadio en la extracción, comercialización y como desecho es la pentavalente (como pentóxido de vanadio), siendo además la más tóxica para los mamíferos (Hansen y Stern, 1984).

Aunque el vanadio no es un contaminante común en el ambiente se pueden encontrar grandes cantidades de este en el medio por efecto del uso de combustibles de tipo fósil como el petróleo y de elementos como el carbón que son utilizados para la obtención de energía, dando como resultado su acumulación y produciéndose así un gran impacto en la salud humana (Sabbioni et al., 1983).

Asimismo y de manera general se puede decir que las concentraciones de vanadio en el aire son más altos en las áreas urbanas que en las rurales (Phillips et al., 1983 WHO, 1988) (Tabla 2). Los promedios anuales van desde 20 a 100 ng/m³, sin embargo, y de manera excepcional se han registrado promedios altos que exceden a los 200-300 ng/m³, en las grandes ciudades, y en un lapso de 24 horas el promedio puede elevarse hasta los 1000 ng/m³ (US EPA, 1977).

Se sabe que el contenido de vanadio en el petróleo está directamente relacionado con el contenido de azufre (WHO, 1988), debido a esto en 1970 en los Estados Unidos de Norteamérica se introdujo combustible con un menor contenido de azufre lo que resultó en una disminución de la cantidad de vanadio en el ambiente. Un efecto similar puede producirse por el cambio de petróleo pesado a destilado, lo cual fue registrado en Boston por Barry et al. (1975).

Estos datos ilustran la importancia del combustible fósil como fuente de vanadio en el aire urbano. Los patrones observados en otras áreas son similares pero menos extremos en concentración y fluctuación. Las variaciones en las concentraciones de vanadio en el petróleo y el carbón, dependen principalmente del tipo de los combustibles usados, a su vez la concentración de este compuesto en el medio depende de los factores meteorológicos.

En relación con la presencia de vanadio en el agua, Durfor y Becker (1963) incluyen vanadio en sus análisis para elementos traza en el agua potable de ciudades grandes de Norteamérica. De

TABLA 2.- CONCENTRACIONES DE VANADIO EN EL AMBIENTE Y EN ALGUNOS ALIMENTOS

PRESENCIA DE VANADIO EN EL AMBIENTE			
FUENTE	RANGO DE CONCENTRACION		
SUELO	300.0	-	310.0 ppb
RIOS Y LAGOS	0.2	-	220.0 mg/l
AGUA DE MAR	0.001	-	0.3 mg/l
AGUA POTABLE	0.0	-	6.0 ppb
PLANTAS	0.16	-	7.0 mg/Kg p.s.
ANIMALES	0.10	-	2.3 mg/Kg p.s.
AIRE URBANO	2.0	-	1000.0 ng/m3
AIRE NO URBANO	0.2	-	75.0 ng/m3

PRESENCIA DEL VANADIO EN ALIMENTOS			
ALIMENTO	CONCENTRACION ($\mu\text{g/Kg}$)		
CEREALES	43.0		
FRESAS	31.41		
LECHUGA	21.0		
ACEITES	0.2	-	4.0
GRASAS	0.2	-	4.0
CARNE DE RES Y DE CERDO	0.2	-	4.0
HIGADO (RES O CERDO)	8.5		
RINON (RES O CERDO)	8.5		
POLLO Y PEZCADO	1.7	-	38.0
LECHE	0.2	-	3.6
HUEVOS	0.2	-	3.6
CERVEZA	3.2	-	11.0
VINO	3.2	-	11.0

Modificado de : Soremark, 1967, Myron et al., 1977, Byrne y Kosta, 1978

las muestras analizadas, el 91% presentaron menos de 10 ug de vanadio/litro; la concentración máxima fue de 70 ug/litro, y los promedios fueron aproximadamente de 4.3 ug/l. (Tabla 2), muchas de las muestras fueron negativas.

Por otro lado la información sobre el contenido de vanadio en alimentos es escasa y dispersa (Tabla 2) (Myron *et al.*, 1977, Byrne y Kosta, 1978).

La toxicidad del vanadio en animales de experimentación depende principalmente de la especie y la ruta de administración. En general, la toxicidad es menor cuando el metal es administrado por la ruta oral, moderada cuando es por vía respiratoria y alta cuando se aplica por inyección (WHO, 1988).

La toxicidad de este elemento también varía considerablemente con la naturaleza del compuesto, el vanadio es tóxico ya sea como catión o como anión. Se sabe que la toxicidad del vanadio se incrementa de forma directamente proporcional a su valencia, de tal forma que el V^5 es el más tóxico. Entre los óxidos de vanadio, el pentóxido de vanadio es el más soluble y es más tóxico que el trióxido o dióxido (WHO, 1988).

Los efectos del vanadio se han estudiado por medio de varios compuestos, especies y protocolos de prueba, es importante señalar que la mayoría de los estudios que se han efectuado con el pentóxido de vanadio, se ha administrado por inhalación ó intragástrico, y que no se reportan estudios hechos con este compuesto donde se haya administrado por inyección (vía intraperitoneal) (Roschin, 1967, Roschin, 1968, WHO, 1988).

El principal mecanismo de acción del vanadio es el bloqueo de numerosos procesos metabólicos celulares por inhibición de enzimas como las ATPasas, fosfatasa, quinasas y muchas otras (Jones y Basinger, 1983, Sabbioni et al., 1983). Esto indica que el vanadio posee un amplio espectro de acción en el cuerpo y que su acción tóxica no es análoga a ninguna otra (Roschin, 1968).

Se conoce poco sobre las interacciones del vanadio con el ADN, así como su posible acción carcinogénica y su efecto sobre el proceso reproductivo en el hombre (WHO, 1988), aunque se ha reportado que en animales de laboratorio este metal en forma de metavanadato se acumula en la placenta y es excretado por la leche (WHO, 1988).

Entre 1971 y 1974, numerosos descubrimientos reportados por cuatro diferentes grupos de investigación concluyeron que el vanadio es un nutriente esencial. Sin embargo una aproximación a estos estudios sobre la carencia del vanadio, reveló que estos son confusos e inconsistentes (Nielsen, 1988).

Nechay et al., (1986), sugieren que las diferencias observadas entre animales con deficiencias y suplementos de este compuesto, fueron el resultado de una respuesta de tipo farmacológico a dietas altamente suplementadas con vanadio de 0.5 a 3.0 ug/g. Estas dosis probablemente representan niveles de 10 a 100 veces más que lo establecido en una dieta bajo condiciones normales. El vanadio es un elemento relativamente tóxico para los organismos, por lo tanto, unos pocos ug/g en la dieta pueden ejercer un efecto farmacológico in vivo especialmente si el

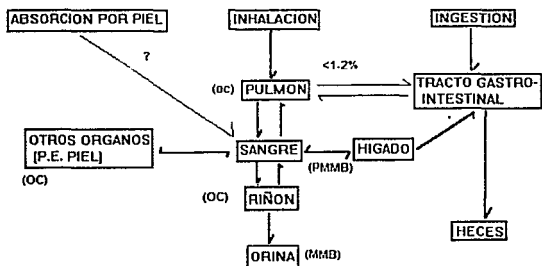
estado nutricional de los organismos estuvo por debajo de lo óptimo; esto probablemente fue el caso en los estudios efectuados entre 1971 y 1974. Por lo tanto, se requiere de estudios reproducibles y consistentes acerca de la esencialidad del vanadio como micronutriente y hasta que esto no se haga, no es apropiado discutir sobre su importancia en la nutrición (Nielsen, 1988).

Aunque no existen datos de alteraciones producidas por deficiencias de este metal en el hombre, el vanadio ha mostrado ser esencial en la nutrición de algunos organismos como los pollos y las ratas, (Hopkins y Mohr, 1974, Siemon *et al.*, 1982), observándose que la eliminación de este metal de la dieta produce alteraciones metabólicas importantes (Sabbioni *et al.*, 1983).

1.8.2) Cinética del vanadio

Por otro lado y desde el punto de vista metabólico, al tamaño de la partícula y la solubilidad determinan la absorción por respiración o inhalación. Se estima que aproximadamente el 25% de los compuestos de vanadio solubles al ser inhalados son absorbidos. En el caso del V probablemente es absorbido por el tracto gastrointestinal (< 1-2%) y es eliminado principalmente por heces (Figura 7). Poco después de la absorción, se observa una distribución uniforme y equitativa en tejidos blandos, sin embargo, los sitios de almacenamiento a largo plazo son el hueso, el músculo y la médula (Alessio *et al.*, 1988). El vanadio absorbido es transportado en el suero unido a la

FIGURA 7.- CINETICA DEL VANADIO



transferrina.

Los datos sobre la excreción de vanadio son limitados. No obstante se sabe que la excreción urinaria es la ruta predominante para la eliminación de este compuesto cuando ha sido absorbido.

En los trabajadores ocupacionalmente expuestos la cinética de eliminación urinaria está influenciada por el grado de exposición. En trabajadores con altos niveles de vanadio en la orina se determinó la concentración de éste, después de la jornada de trabajo y se encontraron de 60 a 70 ug/g de creatinina (Kawai et al., 1989).

Por su parte los efectos tóxicos en órganos críticos durante la exposición ocupacional a cenizas y gas de vanadio, puede ocasionar irritación aguda en el tracto respiratorio, que consiste de rinorrea, epistaxis, disnea, y ocasionalmente bronquitis asmática aguda (Alessio et al.; 1988).

Estos efectos aparecen algunas horas después de cumplir con la jornada laboral y desaparecen en algunos días. No hay un consenso de donde estos efectos pulmonares del vanadio lleven de forma progresiva a la bronquitis crónica y al enfisema después, de que la exposición cesa.

El vanadio también causa efectos gastroentéricos, tales como náusea, vómitos y dolor abdominal. Es frecuente observar en trabajadores expuestos a altas concentraciones de vanadio, que la lengua toma una coloración verde. Se ha observado en estos trabajadores alteraciones de tipo eczema o urticaria generalizada

(Elinder et al., 1988).

A nivel mutagénico existe poca información acerca del efecto del vanadio sobre el ADN (Graedel et al., 1986; Hansen y Stern, 1984). Estudios realizados en cebolla mostraron que los iones vanadato eran capaces de inhibir la formación de la placa celular que induce la aparición de células binucleadas (Navas et al.; 1985), mientras que en el cultivo de linfocitos humanos el pentóxido de vanadio mostró ser altamente citotóxico, al alargar la duración del ciclo celular (Roldán, 1988; Roldán y Altamirano, 1990).

Desde el punto de vista teratogénico, hay pocos datos acerca del efecto del vanadio o de alguno de sus compuestos (NIOSH, 1977; Graedel et al., 1986; Carson et al., 1987, WHO, 1988).

Carlton y colaboradores (1982), inyectaron hamsters con vanadato de amonio utilizando tres concentraciones diferentes (0.47, 1.88, y 3.75 mg/Kg de peso), a partir del día 5 al 10 de gestación, observando en el grupo tratado un incremento significativo en las anomalías esqueléticas al analizar comparativamente contra el testigo, también se detectó un aumento en la mortalidad en la concentración de 1.88 mg/Kg, esto indica que no hay una relación dosis respuesta.

En otro estudio se inyectaron vía intravenosa a ratones hembras albinas de la cepa NMRI, con una solución de 1mM V_2O_5 disuelta en agua destilada, la cual se aplicó en los días 3 ó 8 de gestación, se sacrificaron en el día 17 de gestación, al examinar los cuernos uterinos para cuantificar los embriones

reabsorbidos, y se extrajeron los fetos para una análisis cuidadoso. El pentóxido de vanadio no produjo ningún efecto en el número de implantaciones, en el lote tratado al día 3 en relación con el testigo, no presentaron diferencias en el número de individuos por camada, peso fetal ó morfología interna o externa.

El 71% de los fetos del grupo tratado al día 8, mostraron un retraso significativo en la osificación en los huesos supraoccipital, esternón, metatarsales y vértebras caudales. En algunos fetos se presentó ruptura en la columna vertebral (Wide, 1984).

JUSTIFICACION

Para muchos países (incluyendo México) el incremento anual tanto en las tasas de malformaciones congénitas como en los problemas de fecundidad es evidente. Dichas malformaciones han sido asociadas en muchas ocasiones con la presencia de elementos contaminantes en el medio, lo que significa que el hombre se encuentra constantemente expuesto a ellos durante todas las etapas de la vida, donde se incluyen los períodos perinatales y reproductivos.

Entre los elementos considerados como peligrosos para la salud por algunos de los organismos oficiales encargados de evaluar y valorar el riesgo de la exposición a estos agentes, se encuentran los metales. En la última década el vanadio ha destacado, debido al amplio uso que se le da en las industrias y a su acumulación gradual en el aire, el suelo, el agua y los organismos.

Aunque existe poca literatura acerca del efecto mutagénico y teratogénico del vanadio (WHO, 1988) los estudios realizados previamente en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis de la ENEP-Zaragoza, (Roldán, 1988), han mostrado que el vanadio no puede ser descartado como un agente mutagénico, y permite sugerir que las alteraciones producidas por este metal en el ADN son reparadas. Por este motivo en el presente trabajo se estudio la respuesta mutagénica del vanadio aplicado in vitro en linfocitos humanos tratados con un agente inhibidor de la reparación del ADN como lo es la cafeína, y correlacionar su posible acción

teratogénica con los efectos observados en los fetos de ratones hembras tratadas con el pentóxido de vanadio durante la gestación.

HIPOTESIS

El pentóxido de vanadio es un mutágeno de acción débil, y se sabe que muchas de las lesiones producidas al ADN son reparadas, y que la cafeína es un inhibidor de los sistemas de reparación. Por lo tanto si los cultivos de linfocitos humanos expuestos al pentóxido de vanadio son tratados previamente con cafeína, es posible que el daño inducido por este metal se haga evidente.

Por otra parte, el pentóxido de vanadio es la forma más común en el ambiente y más tóxica para los mamíferos. De tal forma que al ser aplicado este compuesto (V_2O_5) a ratones hembras gestantes, las crías presentarán malformaciones en la morfología externa y en el sistema óseo en general.

OBJETIVOS GENERALES

- I Estudiar el efecto mutagénico del pentóxido de vanadio (V_2O_5) sobre los cromosomas de linfocitos humanos.
- II Evaluar el efecto teratogénico del V_2O_5 sobre los fetos de ratón hembra tratados con este compuesto.
- III Estudiar la relación entre el posible potencial mutagénico del pentóxido de vanadio y su efecto teratogénico

OBJETIVOS PARTICULARES

- φ Cuantificar la frecuencia de ICH'S en cultivo de linfocitos humanos tratados con V_2O_5 en combinación con cafeína.
- φ Evaluar el efecto de la cafeína en combinación con el V_2O_5 sobre la cinética del ciclo celular de linfocitos humanos cultivados in vitro.
- φ Cuantificar el tipo y la frecuencia de malformaciones morfológicas y la frecuencia de alteraciones esqueléticas en los fetos de lo ratones hembras tratados con pentóxido de vanadio.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1) MUTAGENESIS:

2.1.1) Cultivos

A partir de donadores humanos sanos, se extrajeron por punción venosa 5 ml de sangre periférica, con una jeringa heparinizada. Posteriormente 0.5 ml de esta sangre se cultivó en 4.75 ml de medio McCoy 5A suplementado con 0.25 ml de fitohemaglutinina M (microlab), y se incubaron durante 72 horas a 37°C en la obascuridad.

A las 24 horas de iniciados los cultivos y ya que las células empezaron a dividirse, a cada frasco se le adicionó 0.1 ml de una solución de 5-bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma) en una concentración de 200 ug/ml. A las 70 horas a cada cultivo se le adicionó 0.1 ml de una solución de colchicina (Merck, 100 ug/ml), y se les dejó hasta completar las 72 horas.

Una vez transcurrido este tiempo los cultivos se centrifugaron a 1000 RPM durante 5 minutos y el paquete celular se sometió a un choque hipotónico con una solución de cloruro de potasio (KCl 0.075 M) por 20 minutos a 37°C. Posteriormente se realizo otra centrifugación y las células se fijaron en una solución de Metanol-Acido Acético (3:1), con tres cambios de la mezcla fijadora, 20, 15 y 10 minutos respectivamente.

Del último cambio de la solución fijadora se realizaron preparaciones por goteo las cuales se dejaron secar al aire.

2.1.2) Tratamientos

a) Lotes

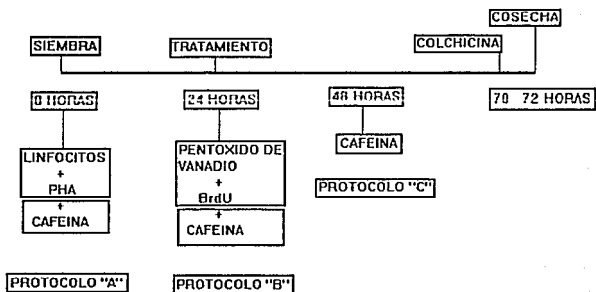
En todos los casos, por cada concentración utilizada se realizaron dos experimentos y cada uno por duplicado, contando con lotes testigo y tratado, distribuidos de la siguiente manera:

- 1) testigo
- 2) cafeína
- 3) vanadio (2 ug/ml)
- 4) vanadio (4 ug/ml)
- 5) vanadio (6 ug/ml)
- 6) cafeína (20 ug/ml) + vanadio (2 ug/ml)
- 7) cafeína (20 ug/ml) + vanadio (4 ug/ml)
- 8) cafeína (20 ug/ml) + vanadio (6 ug/ml)

Una vez determinada la concentración de cafeína a emplear se realizaron tres tipos de protocolos (Figura 8):

- a) Para poder determinar el efecto de la cafeína sobre el mecanismo de reparación del ADN previo a los tratamientos con vanadio al inicio del cultivo a cada frasco se le adicionó cafeína, 24 horas después, se les agregó la bromodesoxiuridina y las tres diferentes concentraciones de pentóxido de vanadio (2, 4 ó 6 ug/ml).
- b) Para determinar el efecto de la cafeína sobre los mecanismos de reparación del ADN durante el primer ciclo de replicación, a las 24 horas de iniciados los cultivos, a cada frasco se le adicionó la BrdU, la cafeína y el pentóxido de vanadio (2, 4 o 6 ug/ml).
- c) Para determinar el efecto de la cafeína sobre el mecanismo de reparación del ADN en linfocitos previamente tratados con el posible agente mutagénico, a las 24 horas de iniciados los

FIGURA 8.- TRATAMIENTO CON CAFEINA A LAS 0, 24 O 48 HORAS



cultivos, a cada frasco se le agregó la BrdU y el pentóxido de vanadio (2, 4 o 6 ug/ml). Después de 24 horas a cada uno de los cultivos se le adicionó la cafeína.

En todos los casos los cultivos se dejaron continuar hasta completar 72 horas.

Una vez hechas las preparaciones, se tñieron con una solución de Hoechst-33258 (0.1 ug/ml) durante 20 minutos en la obscuridad. Posteriormente las laminillas se lavaron en agua corriente y se irradiaron con luz UV por 2 horas sumergidas en una solución de KCl 0.075 M. Transcurrido este tiempo se incubaron por 60 minutos en una solución salina de citratos (0.03 M de citrato de sodio) 2XSSC, a 60° C. Finalmente las preparaciones se lavaron y tñieron con una solución de Giemsa (Sigma) (1:30) en agua corriente durante 20 minutos, después se lavaron al chorro de agua y se dejaron secar al aire.

Todas las evaluaciones se realizaron al doble ciego en un microscopio de contraste de fases Carl Zeiss.

Para la determinación de la cinética del ciclo celular se observaron al azar 100 células en metafase por concentración y se cuantificaron las células en primera, segunda y tercera o divisiones sucesivas.

El tiempo medio de división linfocítica (TDL) se obtuvo al aplicar la siguiente fórmula propuesta por Ivett y Tice (1982):

$$TDL = \frac{\text{Tiempo de BrdU en el medio}}{1 \text{ (I)} + 2 \text{ (II)} + 3 \text{ (III)}} \times 100$$

en donde I, II y III representan las proporciones de células en primera, segunda y tercera o divisiones subsecuentes respectivamente.

El análisis de la frecuencia de ICH's se realizó al observar 50 metafases bien extendidas en segundo ciclo de duplicación, se cuantifico el número y tipo de ICH's, considerando a los intercambios terminales como uno, y a los intersticiales como dos (Figura 1c).

2.1.3) Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó, aplicando Z para proporciones, a la cinética de división celular; mientras que para la frecuencia de ICH's por metafase se aplicó la prueba de análisis de varianza seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Duncan. También para la distribución de ICH's por metafase en los distintos ensayos se aplicó Z para proporciones.

2.2) TERATOGENESIS

2.2.1) Animales:

Se emplearon ratones de ambos sexos de 2 meses de edad y de 30-35 g de peso, de la cepa CD-1, obtenidos del bioterio de la ENEP-Zaragoza, UNAM. Los animales fueron mantenidos en cajas de fibra de vidrio con ciclos constantes de luz oscuridad (8 y 16 horas respectivamente) y con libre acceso al agua y al alimento.

Para todos los estudios, las cruizas se efectuaron durante la noche (de 8:00 pm a 8:00 am). La presencia de espermatozoides en el frotis vaginal o la presencia de tapón espermático, se

consideró como evidencia de cópula y como día cero de preñez.

Los estudios se realizaron en lotes de 20 animales, en todos los casos se conto con un lote testigo (sin tratamiento).

La administración del pentóxido de vanadio se realizó por vía intraperitoneal y la dosis empleada fue determinada con base a la dosis letal media (LD₅₀) de la sustancia (Beaudoin, 1980).

En el desarrollo del estudio se siguieron los lineamientos propuestos por la ECETOC (1983) y por la EPA (1988).

Hembras preñadas de seis días de gestación fueron tratadas diariamente con pentóxido de vanadio hasta el día 15 de gestación. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical el día 18; los fetos fueron extraídos por cesárea. Se registró el número total de fetos, el número de crías vivas y muertas, el número total de implantaciones y el número de reabsorciones por hembra preñada. Los fetos fueron pesados individualmente y revisados inmediatamente para registrar la frecuencia y tipo de malformaciones presentes .

Un tercio de los fetos, tomados al azar, fueron colocados en fijador de Bouin para posteriores estudios histopatológicos, mientras que el resto de los organismos fueron colocados en alcohol 70% para ser desvicerados, aclarados y teñidos con rojo de alizarina para el estudio de las anomalías esqueléticas.

2.2.2) Análisis estadístico

Para el análisis de peso fetal, el número de fetos vivos y muertos, el número total de implantes, el número total de

implantes por hembra, y la suma de reabsorciones por hembra se aplicó la prueba de "t" de Student. En el caso del número total de camadas con fetos anormales, total del número de fetos anormales y de alteraciones fetales, se utilizó la prueba de diferencia de proporciones o Z. La proporción de sexos se analizó por χ^2 para bondad de ajuste.

3.- RESULTADOS Y DISCUSION

3.1) MUTAGENESIS

Resultados previos mostraron que, los tratamientos realizados con el pentóxido de vanadio en concentraciones de 2, 4 y 6 ug/ml no eleva significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales, ni la de ICH's, sin embargo induce un incremento en la frecuencia de células poliploides, incrementa la cinética de división de linfocitos humanos en cultivo y altera la distribución de ICH's por célula (Roldán y Altamirano, 1990).

Se sabe que muchos agentes, son capaces de inhibir de manera importante los mecanismos de reparación del ADN ya sea directamente o por bloqueo del funcionamiento de las enzimas encargadas de este proceso (Roberts *et al.*, 1974; Selby y Sancar, 1990), por lo que al ser usados en combinación con sustancias de poca acción mutagénica (mutágenos débiles) logran poner de manifiesto este daño (Beaulac-Baillargeon *et al.*, 1987).

Estudios realizados en células eucarióticas han demostrado que los pretratamientos con cafeína son capaces de aumentar la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por compuestos químicos o físicos (Roberts *et al.*, 1974), además de inhibir la reparación por excisión de los dímeros de timidina inducidos por radiación UV. Por otro lado evidencias recientes sugieren que puede interferir también con la reparación post-replicativa en bacterias deficientes en el mecanismo de excisión (Swietlinskaa y Zuk, 1974).

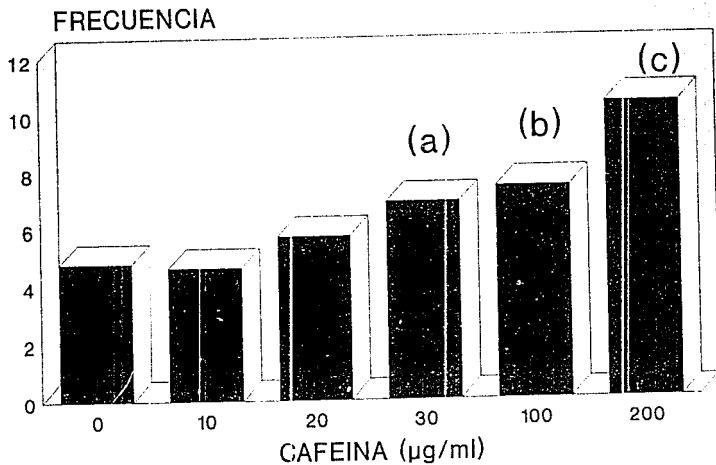
En la figura 9 y en la tabla 3 se muestran los resultados de los experimentos preliminares realizados para determinar la concentración de cafeína a ser empleada en combinación con el pentóxido de vanadio. Al ser probadas las concentraciones de 10, 20, 30, 100 y 200 ug/ml se observó una correlación dosis respuesta, y se encontró que la concentración de 20 ug/ml era una dosis alta que no inducía un incremento estadísticamente significativo de ICH's .

La distribución de células en primero, segundo o tercer ciclo en los tratamientos con 10, 20, 30, 100 y 200 ug/ml se encuentra en la tabla 3 . En todas las concentraciones se modificó la cinética de división celular con respecto al testigo. En la concentración mayor (200 ug/ml) se encontró una disminución de las terceras metafases al ser comparadas con los otros tratamientos ($P < 0.001$ vs testigo). Esta modificación se vió reflejada en la tasa de proliferación linfocítica la cual aumentó (misma tabla).

En la figura 10, se presentan los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la cafeína aplicada a las 0, 24 y 48 horas respectivamente sobre la inducción de ICH's por pentóxido de vanadio.

En el lote tratado con cafeína a las cero horas de cultivo (protocolo A), y vandio con cafeína, no produjo modificaciones en la frecuencia de ICH's respecto a aquellos que sólo recibieron cafeína, sin embargo cuando la cafeína se aplicó a las 24 horas de iniciados los cultivos (protocolo B), la concentración de 6

FIGURA 9.-FRECUENCIA DE ICH'S EN
LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS *in vitro* CON
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CAFEINA



(a)= $P < 0.05$, (b)= $P < 0.01$, (c)= $P < 0.001$
VS TESTIGO, "t" DE STUDENT

TABLA 3.- CINETICA DEL CICLO CELULAR, TASA DE PROLIFERACION LINFOCITICA (TPL) Y FRECUENCIA DE ICH's EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON CAFEINA A LAS 24 HORAS.

CAFEINA ($\mu\text{g/ml}$)	(%) M3 (#)	TPL (Hrs)	\bar{X} DE ICH/ CELULA \pm e.e. (\$))
0	32	24	4.79 \pm 0.61
10	46a	22	4.63 \pm 0.60
20	50a	22	5.70 \pm 0.51
30	24a	25	6.91 \pm 0.51*
100	50a	21	7.43 \pm 0.37**
200	13a	30	10.35 \pm 0.82***

a $P < 0.05$ Z para diferencia de proporciones, vs testigo.

* $P < 0.05$ "t" de Student, vs testigo.

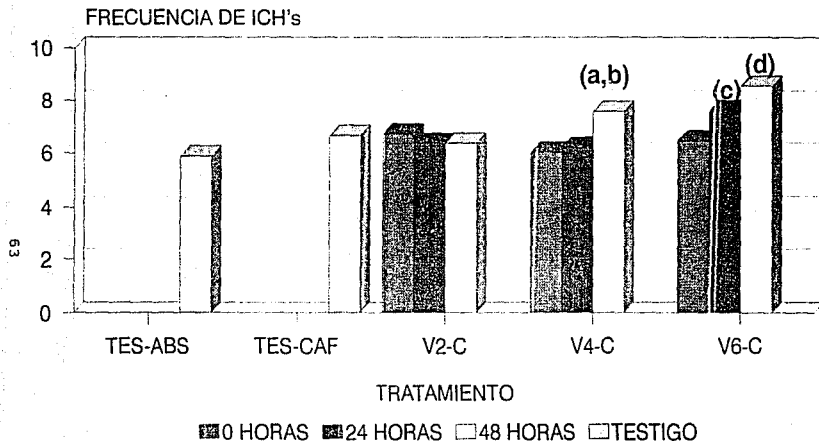
** $P < 0.01$ "t" de Student, vs testigo.

*** $P < 0.001$ "t" de Student, vs testigo.

(#): n=100

(\$): n=35

FIGURA 10.- EFECTO DE LA CAFEINA SOBRE LA FRECUENCIA DE ICH'S EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVOS TRATADOS CON V2O5



A= $P < 0.05$ VS V4; B= $P < 0.01$ VS T; C= $P < 0.025$
 VS T; D= $P < 0.001$ VS T. ANDEVA Seguida de
 DUNCAN.

ug/ml de vanadio, provocó un aumento significativo en la frecuencia de ICH's con respecto al grupo que no recibió vanadio. Resultados semejantes se observaron en los cultivos con 4 ó 6 ug/ml de pentóxido de vanadio y en los que la cafeína se adicionó 48 horas después de iniciados los cultivos (4 ug: 7.6 ± 0.46 ; 6 ug: 8.56 ± 0.63 vs 5.88 ± 0.21 $P < 0.001$).

En las figuras 11, 12 y 13 se presentó la distribución de ICH's en los cultivos tratados con cafeína aplicada a diferentes tiempos como lo indican los protocolos A, B, y C, en combinación con el pentóxido de vanadio. En el tratamiento con cafeína a las cero horas el 80% de las células presentaron entre 1 y 9 ICH's por célula, llegando a observar células hasta con más de 16 ICH's (Figura 11A). Sólo la adición de 4 ug de pentóxido de vanadio redujo el porcentaje de células con ICH's en el rango de 10 a 12 (Figura 11C), mientras que la adición de 6 ug/ml redujo aquellas que se hallaban en el rango de 1 a 3 e incrementó las que se encontraban en el rango de 7 a 9 (Figura 11D). El tratamiento con cafeína 24 horas después de iniciados los cultivos no modificó el porcentaje de ICH's por célula respecto al observado cuando la cafeína se aplicó al tiempo cero. Resultados semejantes se obtuvieron al administrar 2 ó 4 ug/ml de vanadio, excepto en los tratamientos con 6 ug/ml y en el caso en que el número de ICH's/célula fue más de 16 (Figura 12D).

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos de los tratamientos con cafeína a las 48 horas (protocolo C), se observó que en la frecuencia de células con 1 a 3 ICH's hubo una

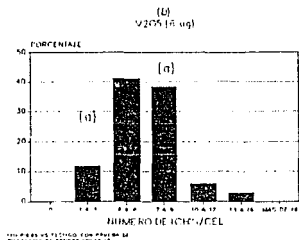
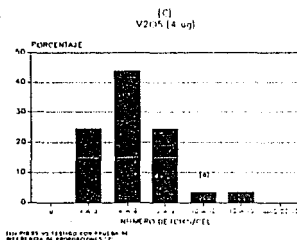
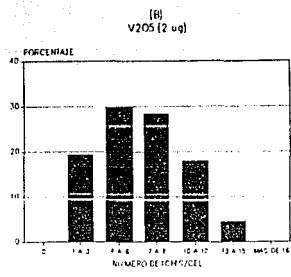
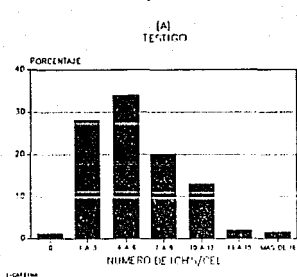


FIGURA 11.-DISTRIBUCION DE ICH'S POR CELULA EN CULTIVOS TRATADOS CON PENTOXIDO DE VANADIO Y CAFEINA A LAS 0 HORAS. (A) TESTIGO CON CAFEINA UNICAMENTE, (B) VANADIO 2 μ g/ml MAS CAFEINA, (C) VANADIO 4 μ g/ml MAS CAFEINA, (D) VANADIO 6 μ g/ml MAS CAFEINA.

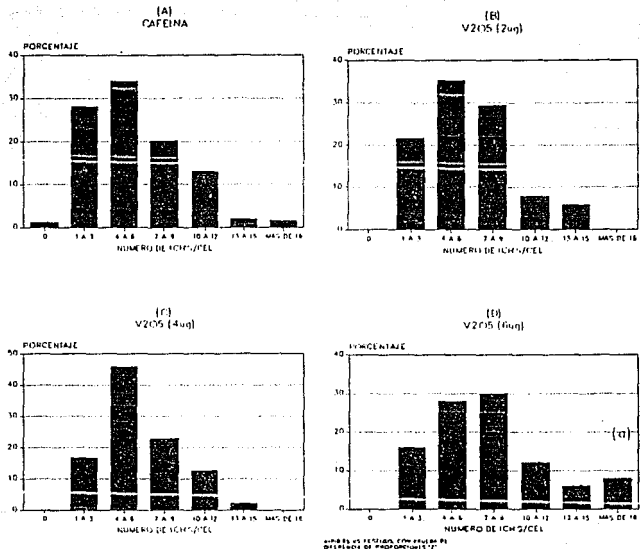
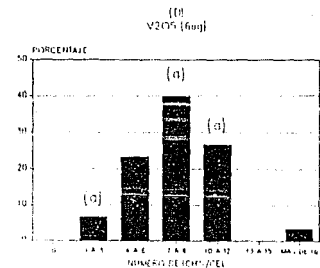
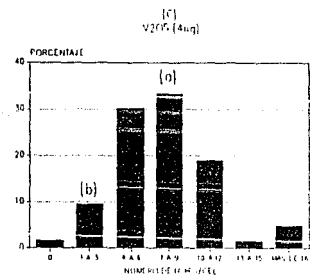
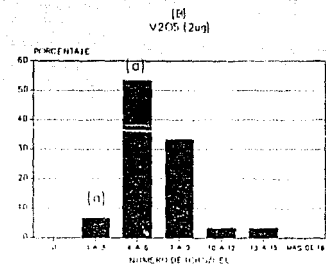
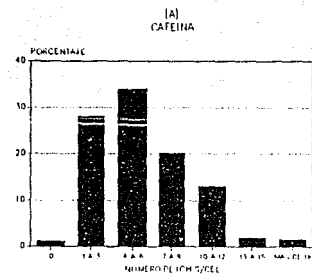


FIGURA 12.- DISTRIBUCION DE ICHNE'S POR CELULA EN CULTIVOS TRATADOS CON PENTOXIDO DE VANADIO Y CAFEINA A LAS 24 HORAS. (A) TESTIGO CON CAFEINA UNICAMENTE, (B) VANADIO $2\mu\text{g}/\text{ml}$ MAS CAFEINA, (C) VANADIO $4\mu\text{g}/\text{ml}$ MAS CAFEINA, (D) VANADIO $6\mu\text{g}/\text{ml}$ MAS CAFEINA.



IMPRESIONES DE LOS TESTIGOS CON
PRUEBA DE DETERMINACION DE PROBABILIDADES Z

IMPRESIONES DE LOS TESTIGOS CON
PRUEBA DE DETERMINACION DE PROBABILIDADES Z

FIGURA 13.- DISTRIBUCION DE ICH'S POR CELULA EN CULTIVOS TRATADOS CON PENTOXIDO DE VANADIO Y CAFEINA A LAS 48 HORAS. (A) TESTIGO CON CAFEINA UNICAMENTE, (B) VANADIO 2 µg/ml MAS CAFEINA, (C) VANADIO 4 µg/ml MAS CAFEINA, (D) VANADIO 6 µg/ml MAS CAFEINA.

disminución significativa en todos los tratamientos con respecto al testigo. En el porcentaje de células que presentaban 4 a 6 intercambios sólo se observó un incremento en la concentración de 2 ug/ml (Figura 13B). Para el intervalo que comprende de 7 a 9 ICH's/célula encontramos que el porcentaje de células que presentaron tal distribución aumentaba significativamente en relación con el testigo en la concentración de vanadio de 4 y 6 ug/ml (Figuras 13C y D). Así mismo tenemos que el porcentaje de células con un número de ICH's que comprende de 10 a 12 también aumentó significativamente en relación al testigo, pero sólo en la concentración más alta de vanadio (Figura 13D).

La metodología de marcaje con BrdU para el análisis de los ICH's puede ser usado simultáneamente para el análisis de la cinética celular (Ivett y Tice, 1982; Beek y Obe, 1979).

Los resultados respecto al porcentaje de terceras divisiones y a la tasa de proliferación linfocítica se muestran en las figuras 14, 15 y 16, donde se observa que en los tratamientos con cafeína a las 24 (Figura 15) y 48 horas (Figura 16) de iniciados los cultivos modificó significativamente el porcentaje de terceras metafases, esto se refleja en la TPL (23.00 horas para cafeína aplicada 24 horas después de iniciados los cultivos 29.00 horas para el tratamiento a las 48 horas vs 25.26 horas del testigo).

Cuando se aplicó únicamente el vanadio se encontraron modificaciones del porcentaje de terceras divisiones a las concentraciones de 4 y 6 ug/ml. En estos casos la TPL observada

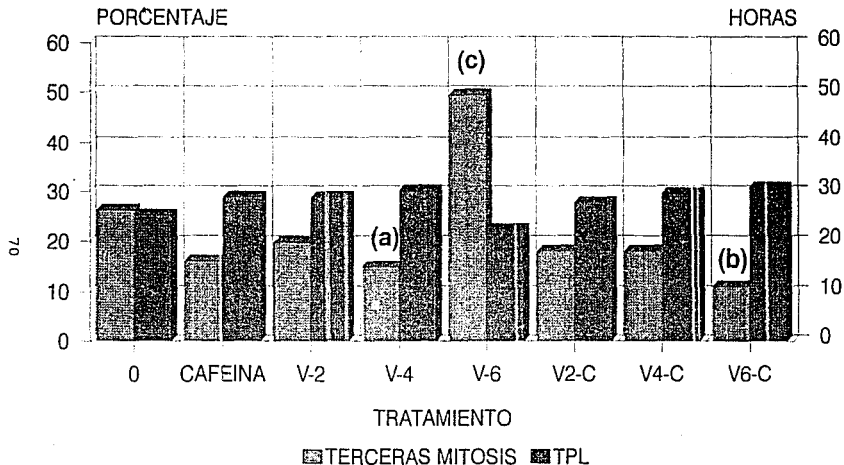
fue de 30.15 h y 22.38 h vs 25.26 horas del testigo (Figuras 14, 15 y 16).

En los tratamientos con vanadio en los cuales la cafeína estuvo presente desde las cero horas de cultivo se encontró que en la concentración de 6 ug hubo una disminución significativa del porcentaje de terceras metafases (11.0 vs 26.25 del testigo) lo que da una TPL de 30.77 horas (Figura 14) ; se observó el mismo comportamiento en el caso de los cultivos tratados con cafeína a las 48 horas pero en la concentración de 4 ug/ml (Figura 16).

Los resultados muestran que el pentóxido de vanadio no induce aberraciones cromosómicas estructurales, ni altera la frecuencia normal de ICH's; sin embargo es capaz de alterar el aparato mitótico, lo cual se demuestra por el incremento en la frecuencia de células poliploides. Por otro lado este metal tiene un efecto sobre la cinética de proliferación celular la cual se refleja en la TPL e indica un alargamiento en el tiempo normal del ciclo celular (aproximadamente 24 horas) reportado para linfócitos (Boogs y Winkelstein, 1985).

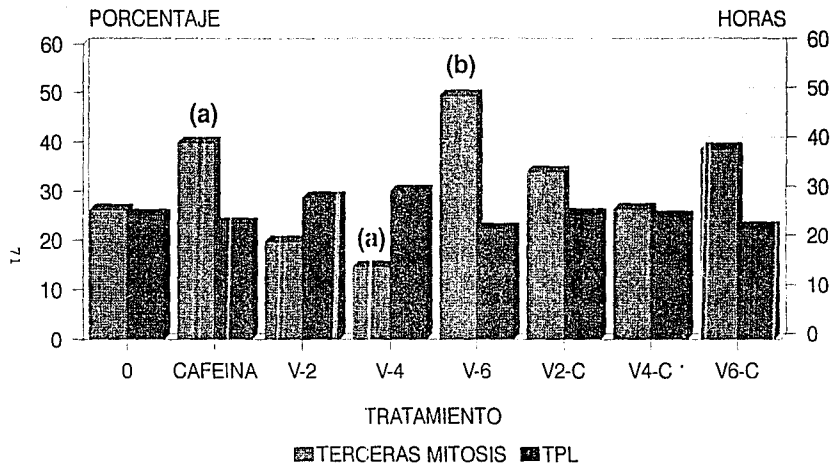
Por otro lado los datos encontrados al tratar los cultivos con pentóxido de vanadio en combinación con cafeína fueron diferentes a los observados cuando se trataron con cafeína o vanadio únicamente. El tratamiento con cafeína a las cero horas de cultivo no alteró la frecuencia de ICH's (cuando el vanadio se aplicó 24 horas después), sin embargo cuando la cafeína se adicionó de manera simultánea ó 24 horas después que el vanadio

**FIGURA 14.- EFECTO DE LA CAFEINA (0 H)
SOBRE LA CINETICA DE DIVISION DE LINFO-
CITOS HUMANOS TRATADOS *in vitro* CON V2O5**



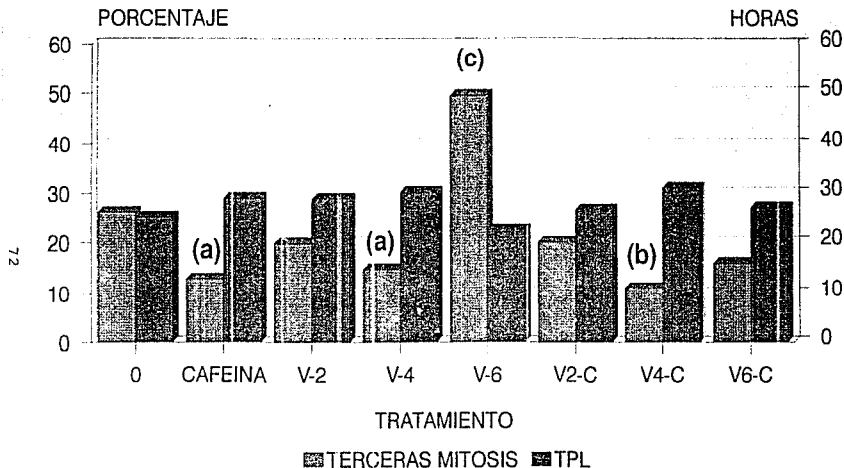
**A=P<0.05; B=P<0.01; C=P<0.001, VS
TESTIGO, Z PARA PROPORCIONES**

**FIGURA 15.- EFECTO DE LA CAFEINA (24 H)
SOBRE LA CINETICA DE DIVISION DE LINFO-
CITOS HUMANOS TRATADOS in vitro CON V205**



**A=P<0.05; B=P<0.001, VS TESTIGO, Z PARA
PROPORCIONES**

**FIGURA 16.- EFECTO DE LA CAFEINA (48 H)
SOBRE LA CINETICA DE DIVISION DE LINFOCI
TOS HUMANOS TRATADOS in vitro CON V2O5**



**A=P<0.05; B=P<0.01; C=P<0.001, VS
TESTIGO, Z PARA PROPORCIONES**

se observó un incremento en la frecuencia de ICH's.

Estos resultados sugieren la posibilidad de que el vanadio esté produciendo lesiones que al ser reparadas no se puedan expresar como ICH's, por lo que la acción de la cafeína como un inhibidor de la reparación permite que estas lesiones originen los intercambios.

Los ICH's han sido universalmente observados en cromosomas vegetales, animales y humanos. Se parte del hecho de que una cromátida de una célula eucariótica contiene un ADN duplex sin ningún entrecruzamiento, los ICH's pueden ser considerados como recombinación de dos moléculas idénticas de ADN. El proceso de replicación del ADN es esencial para la formación de estos eventos, es diferente de la recombinación de fagos y bacterias, por lo que los ICH's pueden producirse por lesiones que se originan en el ADN, las cuales inhiben o retrasan la replicación (Ikushima, 1980).

Las rupturas de cadena sencilla inducidas en el ADN participan de manera directa en la formación de aberraciones cromosómicas y de ICH'S. Los modelos involucran la participación de nucleasas para cadena sencilla, una síntesis de ADN normal y los mecanismos de reparación del ADN por recombinación (Speit et al., 1984).

La mayoría de los modelos propuestos para explicar la formación de ICH's relacionan de manera directa el sitio de una lesión en el ADN y el sitio en el cual se produce un intercambio (Schvartzman et al., 1984). Algunas evidencias experimentales

muestran que un cierto número de lesiones que pueden conducir a la formación de ICH's pueden ser eliminadas. Kligerman et al (1988), propone que las pérdidas de estas lesiones se pueden deber a varios procesos: muerte celular, dilución de las lesiones por división celular o por reparación del ADN.

Algunas de las evidencias mostradas pueden estar indicando que en este caso la reparación del ADN puede ser el mecanismo que permita que las lesiones efectuadas por el pentóxido de vanadio no sean expresadas como intercambios.

Algunas enfermedades genéticas se caracterizan por presentar deficiencias en los mecanismos de reparación; ejemplos de tales desordenes hereditarios son el Síndrome de Bloom, Anemia de Fanconi, Xeroderma Pigmentoso, Ataxia Talangiectasia, y el Síndrome Cocaínico (Hanawalt, 1990). En el caso del Síndrome de Bloom la frecuencia de ICH's se eleva de 7 a 8 veces más que las células normales (Tsuji et al., 1988).

El vanadio ha demostrado ser mutagénico en sistemas como E. coli y S. typhimurium, aunque en eucariontes los resultados son contradictorios (Sun, 1987; WHO, 1988).

La ADNasa I es una de las enzimas que participan en la reparación del ADN en los mamíferos (Sabbioni et al., 1983), la cual requiere de cationes divalentes para la hidrólisis, dando como primer paso la ruptura de cadena sencilla en el ADN. Se sabe que los iones de transición (como el Mn^{+2}) interactúan con la molécula de ADN para que la DNasa pueda producir este efecto, por lo que es muy probable que el ión vanadato sea capaz de

interactuar con el ADN y/o las proteínas para acentuar el rompimiento de los enlaces fosfodiéster (Sabbioni et al., 1983).

Se ha sugerido que la cafeína se une al ADN con una alta afinidad por las regiones dañadas (Domon et al., 1970), y así interfiere con las uniones específicas de las enzimas reparadoras (Kihlman, 1977), sin embargo, ninguna de estas proteínas, que han sido purificadas de procariontes, son inhibidas por la cafeína (Selby y Sancar, 1990).

Como ya se ha mencionado la cafeína posee una estructura química similar a las purinas constitutivas de la molécula de ADN y, por lo tanto, el potencial de interferir con la división y el metabolismo celular (Alder, 1970). Además es bien conocido el hecho de que la cafeína potencializa los efectos mutagénicos y letales de agentes genotóxicos (Osterga et al., 1965; Cleaver, 1969; Selby y Sancar, 1990). Se sabe que esto se debe, al menos en algunos organismos, a la inhibición de la reparación del ADN (Selby y Sancar, 1990). En E. coli y en el sistema de células permeabilizadas, la cafeína (10 a 100 mM), inhibe los mecanismos de reparación de fotorreactivación y escisión in vivo (Witkin, 1969). También se ha mostrado que la cafeína (10 mM), inhibe el proceso de reparación por escisión de nucleótidos en células HeLa (Selby y Sancar, 1990).

Si la acción de la cafeína hace que se manifiesten las lesiones inducidas por el V₂O₅ como aumento en la frecuencia de ICH's, y éstas son el producto de lesiones postreplicativas, entonces podemos sugerir que este compuesto está alterando el

proceso de reparación postreplicativo.

El hecho de que en los cultivos pretratados con cafeína antes de la aplicación del pentóxido de vanadio no mostraran diferencias significativas en la frecuencia de ICH's con respecto al testigo, y que en los cultivos tratados con cafeína y vanadio con 24 horas de iniciados los cultivos se observará un incremento en la frecuencia de ICH's y que en los cultivos tratados con la cafeína 24 horas después de la aplicación del vanadio (a las 48 horas de iniciados los cultivos) se encontrarán incrementos en las frecuencias de ICH's hace suponer que el vanadio requiere de al menos un ciclo completo para poder producir las lesiones que van a conducir a la formación de ICH's. Además la acción de la cafeína parece ser de tiempo limitado, esto explica porque en el primer protocolo, este compuesto no es capaz de inhibir por tiempo suficiente los mecanismos de reparación, y que a las 72 horas (tiempo de la cosecha), se pudieran evidenciar los intercambios, esté mismo fenómeno se pudo observar cuando la cafeína actuó más cerca del tiempo de acción del vanadio.

Goth y Cleaver (1976), reportaron que la cafeína es rápidamente metabolizada in vitro (0.5 a 3 horas), por diferentes tipos celulares. Sin embargo Nolan y Kidder (1979), sugieren que los linfocitos humanos no son capaces de metabolizar este compuesto resultados que llevan a pensar que la cafeína se mantiene como tal sin metabolizarse e interactúa con las células humanas a través del período de cultivo. Pero cuanto tiempo permanece activa esta sustancia en dicho cultivo?. La respuesta

a esta pregunta con base en nuestros resultados es que la actividad de este compuesto no va más allá de un ciclo de replicación (24 horas) de las células en cuestión .

En estudio efectuados en ratas preñadas se vió que la vida media de la cafeína es de 6.9 horas (Leal, et al., 1989), contradictorio con datos de otras investigaciones donde se reportaron valores de 2.2 horas en la misma especie (Jiritano et al., 1985), 4.3 en conejos (Dorrbecker et al. 1988), y en mujeres embarazadas se ha visto que hay un incremento en la vida media de esta substancia de 5.3 a 18.1 horas, debido a que la cinética de eliminación se modifica durante el embarazo (Aldridge et al., 1981).

Se sabe que en ciertas concentraciones la cafeína (2.4 mM), inhibe normalmente la síntesis de ADN durante la fase de S (O'Neill, 1979). La explicación más probable se basa en la habilidad de la cafeína para inhibir la síntesis de novo de purinas endógenas y el transporte y utilización de purinas exógenas (Meneghini, 1974; Waldren y Patterson, 1979). Este efecto se reflejó como un aumento en los ICH's. Otra alternativa puede ser que, como la síntesis de ADN este inhibida y la cadena de ADN crece retardadamente, aumenta la probabilidad de que los ICH's ocurran azarosamente.

La dosis de cafeína (20 ug/ml de cultivo, lo cual equivale a 1.0298×10^{-4} mM), empleada en este trabajo es baja en comparación con lo reportado para la inducción de ICH's y de aberraciones en el mismo sistema de prueba por otros autores

(Weinstein *et al.*, 1973, Guglielmi y Tice, *Com. per.*), por lo que los resultados que encontramos se pueden deber realmente a la acción del vanadio sobre la molécula de ADN, al inducir lesiones. Estas lesiones se expresan como ICH's, y con una posible inhibición del proceso de reparación postreplicativo por acción de la cafeína, sin que pueda atribuírsele acción mutagénica directa.

Por otro lado los datos experimentales que muestran que el vanadio induce cambios en la concentración de grupos -SH y de cistina, alteraciones en la formación de glucógeno y de aminoácidos de tipo ceto, así como en el metabolismo del colesterol y la síntesis de ADN y ARN, muestran que este metal tiene un amplio espectro de acción en el organismo y que su acción tóxica no es análoga a ningún otro metal (Roschin, 1967; WHO, 1988).

3.2) EFECTOS SOBRE LA GESTACION

En la tabla 4 se muestran los resultados del efecto embriotóxico del pentóxido de vanadio al ser aplicado durante los días 6 a 15 de gestación (8.5 mg/g). De las camadas obtenidas en el grupo testigo se encontró un promedio de 11.46 ± 0.75 implantes/hembra, encontrando en total 25 reabsorciones. El promedio del peso fetal en este caso fue de 1.39 ± 0.05 g/feto. Al comparar los datos del grupo tratado con los del testigo se encontró una disminución significativa del peso fetal y un ligero aumento en el número de reabsorciones.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**TABLA 4.- EFECTO EMBRIOTOXICO DEL PENTOXIDO DE VANADIO EN RATONES
HEMBRA TRATADOS DURANTE LA GESTACION (DIA 6 AL 15).**

	DOSIS (mg/kg)	
	TESTIGO	8.5
NO. CAMADAS	13	15
\bar{X} DEL PESO FETAL \pm ee.	1.39 \pm 0.05	1.04 \pm 0.05(*)
# FETOS VIVOS	122	146
# FETOS MUERTOS	2	3
TOTAL DE IMPLANTES	149	175
IMPLANTES/HEMBRA \pm ee.	11.46 \pm 0.75	11.67 \pm 0.56
TOTAL DE REABSORCIONES (%)	25 (19.38)	26 (14.86)

(*) $P < 0.001$ CON PRUEBA DE "t" DE STUDENT VS TESTIGO.

Dentro de los primeros parámetros analizados para poder establecer la posible acción embriotóxica o fetotóxica de un compuesto están las muertes tempranas, expresadas como reabsorciones, y el bajo peso al nacimiento. Datos presentados por la Organización Mundial de la Salud muestran que el vanadio al ser aplicado en el cuarto día de preñez incrementa la frecuencia de mortalidad embrionaria como resultado de efectos a nivel pre-implantación, sin embargo en el presente trabajo los resultados no permiten establecer que el vanadio sea capaz de aumentar la frecuencia de reabsorciones o de pérdidas post-implantación, aunque no se descarta esta posibilidad ya que la dosis empleada fue en general más baja que la utilizada en otros experimentos ya realizados (WHO, 1988).

El bajo peso al nacimiento se correlaciona, con la presencia de anomalías congénitas (Van Den Berg y Yerushalmy, 1966; Scott y Usher, 1966). Y es en general un índice importante de la condición del recién nacido. Este parámetro refleja además en algunos casos la condición materna, ya que existe la posibilidad de que se deba a la toxicidad o desnutrición materna más que a la acción del agente directamente sobre el feto (Brimblecome et al., 1968; Bergner y Susser, 1970).

Los efectos de la desnutrición materna sobre el feto han sido frecuentemente estudiados en términos de crecimiento celular (Winick et al., 1973). Esto depende en parte del tiempo que dura la gestación, la desnutrición materna generalmente conduce a un menor número de células en la placenta y en varios órganos

fetales, esto sucede tanto en animales como en el hombre (Brasel y Winick, 1972).

Los resultados del bajo peso de los fetos tratados con vanadio no pueden ser debidos ni a toxicidad ni a desnutrición materna, ya que los animales gestantes no mostraron síntomas de ninguno de estos procesos, sin embargo los datos del efecto in vitro del pentóxido de vanadio sobre el aparato mitótico y la cinética de proliferación celular (Roldán y Altamirano, 1990) pueden explicar este fenómeno, ya que probablemente al incrementarse el tiempo normal del ciclo celular y se produzca que la división se efectue más lentamente y de forma defectuosa. Este efecto podría suceder in vivo reflejandose en un menor número celular, y posiblemente su consecuencia final es un peso más bajo por feto.

Al evaluar las anomalías macroscópicas presentes en los fetos de los ratones tratados con el vanadio se encontró que de 13 camadas que constituían el lote testigo sólo tres de ellas presentaban fetos con alguna anomalía, no así en el lote tratado, donde se observó que de un total de 15 camadas, 9 de ellas, presentaban individuos con varios tipos de alteraciones (Tabla 5). Tal diferencia entre ambos lotes es significativa, estos resultados sugieren una acción teratogénica por parte del pentóxido de vanadio.

En la tabla 5 se aprecia que la proporción de sexos en ambos lotes está modificada, y es en el lote tratado donde la proporción de hembras en relación con la de los machos, se

TABLA 5.- ANOMALIAS PRESENTES EN LOS FETOS DE RATONES HEMBRA TRATADOS CON PENTOXIDO DE VANADIO DURANTE LA GESTACION (DIA 6 AL 15)

	DOSIS (mg/kg)	
	TESTIGO	8.5
NO. CAMADAS	13	15
CAMADAS CON FETOS ANORMALES (%)	3 / 13 (23.07)	9/15 (60.0) (a)
TOTAL DE FETOS EXAMINADOS	124	149
PROPORCION DE SEXOS (♀/♂)	44.35/55.65	62.41/37.59 (c)
PROPORCION DE SEXOS CON ANOMALIAS (♀/♂)	1.82/2.90	9.30/8.93
TOTAL DE FETOS ANORMALES (%)	3 (2.42)	15 (10.07) (a)
No. DE FETOS CON : (%)		
AREAS HEMORRAGICAS	0	4 (2.68)
OJOS ABIERTOS	3 (2.42)	2 (1.34)
ACORTAMIENTO DE MIEMBROS	0	8 (5.36) (b)
POLIDACTILIA	0	2 (1.34)
PALADAR HENDIDO	0	1 (0.67)
"TUMORES"	0	1 (0.67)

(a) $P < 0.05$ VS TESTIGO Z PARA PROPORCIONES

(b) $P < 0.01$ VS TESTIGO Z PARA PROPORCIONES

(c) $P < 0.005$ VS TESTIGO χ^2 PARA BONDAD DE AJUSTE

incrementa significativamente.

Al comparar el porcentaje de fetos que presentaban alguna malformación se encontró que este se incrementaba significativamente respecto al lote testigo (Tabla 5).

Las anomalías macroscópicas en los fetos de ratones hembras tratados con pentóxido de vanadio durante la gestación más frecuente fue el acortamiento de miembros, le siguieron las áreas hemorrágicas. Los ojos abiertos y polidactilia presentaron la misma frecuencia que el testigo, mientras que paladar hendido y "tumores" se manifestaron como casos únicos (tabla 5).

Basándose en el "Síndrome del Edema" estudiado por Grabowski, (1979), y cuyo mecanismo es conocido como desbalance osmolar, en embriones de pollo sujetos a hipoxia, es posible dibujar con detalle los eventos sucesivos en la teratogénesis de malformaciones características de la cabeza, extremidades, cuartos traseros y algunas otras como los edemas y los hematomas.

La primera reacción reconocida en el sistema embrionario después del tratamiento con algunos agentes es la hiperosmolaridad en ciertos compartimientos extraembrionarios, con lo cual se puede tener una entrada repentina de fluido proveniente de estos compartimientos dentro del embrión como resultado de una hipervolemia y un aumento en la presión sanguínea dentro del embrión. Todos estos cambios tempranos en la osmolaridad de los fluidos pueden considerarse como el mecanismo que causa el primer daño evidente en la formación del edema, los hematomas, y las vejigas (o ámpulas llenas de líquido)

(Grabowski, 1979; Willson, 1979).

El hecho de que el vanadio pueda afectar de manera importante el equilibrio osmolar del organismo al alterar la bomba de Na^+ y K^+ , puede hacerlo un agente inductor de las áreas hemorrágicas observadas, sin embargo en el caso del paladar hendido, la polidactilia y los tumores aunque no fueron estadísticamente significativos, respecto al grupo testigo, no puede ser determinante.

Los edemas, hematomas etc, pueden llevar a otros eventos patogénicos causando una distorsión mecánica e isquemia en los tejidos, alcanzando proporciones severas en las extremidades y en la superficie de estructuras de la cabeza donde la embriogénesis anormal rendirá eventualmente un defecto final (Willson, 1979).

El defecto más frecuentemente observado fue el acortamiento de miembros, sin que existieran anomalías severas en estos, por lo que este defecto pudo ser debido al igual que en el caso del bajo peso al nacimiento, a una menor tasa de división celular. Este efecto podría provocar un menor número de células, y originar un menor desarrollo de los miembros, ya que el vanadio es capaz de afectar el aparato mitótico en general (Roldán y Altamirano, 1990; Sharma y Talukder, 1987).

3.3) ANOMALIAS ESQUELÉTICAS

En muchos reportes se han descrito diversas variantes del sistema de análisis esquelético en el ratón CD-1, describiéndose

cerca de 88 alteraciones (Beck, 1989). El esqueleto de los animales de prueba y su estudio desde el punto de vista prenatal es uno de los puntos de mayor atención entre los teratólogos (Millen y Woolman, 1963), ya que el esqueleto fetal es un fino indicador de daño durante el desarrollo, aún sin que se manifiesten alteraciones morfológicas externas.

Al evaluar el promedio de aparición de centros de osificación en el esternón y los miembros superiores e inferiores se encontro que los dos últimos parámetros mostraron cada uno por su parte diferencias significativas con respecto al testigo (Tabla 6).

Estos resultados donde se aprecia claramente una disminución en la aparición de los centros de osificación de extremidades indican una acción adversa del pentóxido de vanadio sobre el proceso de osificación al menos en estas estructuras.

Se sabe que los huesos de la base del cráneo, de la columna vertebral, la pelvis y las extremidades se llaman huesos cartilagosos, porque se forman inicialmente, sobre un modelo de cartilago hialino, que es reemplazado por hueso debido a un proceso llamado osificación endocondral (Bloom-Fawcett, 1987).

Se sabe que los compuestos de vanadio inhiben las ATP fosfohidrolasas, las ribonucleasas, las adenilatocinasa, las fosfofructuocinasas, y la síntesis de ADN y proteínas, y además altera la actividad de la fosfatasa alcalina y de la síntesis de colágena (Wuthier y Register, 1985), por lo que esta parece ser la vía por la cual el vanadio altere la formación de hueso.

TABLA 6.- EFECTO DEL PENTOXIDO DE VANADIO SOBRE EL PROCESO DE OSIFICACION EN FETOS DE RATONES HEMBRA TRATADOS DURANTE LA GESTACION (DIA 6 AL 15)

	DOSIS (mg/kg)	
	TESTIGO	8.5
No. DE CAMADAS	13	15
TOTAL DE FETOS EXAMINADOS	80	101
MEDIA DE CENTROS DE OSIFICACION POR FETO EN :		
ESTERNON	6.06 ± 0.07 (a)	5.86 ± 0.08 (b)
METATARSOS Y FALANGES	13.45 ± 0.47	8.95 ± 0.33 *
METACARPOS Y FALANGES	14.66 ± 0.52	6.25 ± 0.41 *
\bar{X} DE COSTILLAS POR FETO	13.26 ± 0.05	13.21 ± 0.04
ALTERACIONES EN LA MORFOLOGIA DE COSTILLAS	0/80	4/101

(a) n= 78 * P< 0.0005 VS TESTIGO "t" DE STUDENT

(b) n= 93

Wide (1984), reporta un retraso en la osificación del hueso supraoccipital, esternón, metatarsos y vértebras caudales en ratones tratados con pentóxido de vanadio (1 mmol) en el día 8 de gestación. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el pentóxido de vanadio si altera el proceso de osificación.

La frecuencia de anomalías en las costillas, no obstante que no es estadísticamente significativa, concuerda con los datos reportados por Sun (1987), el cual encuentra un incremento en las alteraciones esqueléticas (costillas supernumerarias, costillas onduladas y esternones fusionados) al administrarle a ratas, ya sea por vía intraperitoneal o por vía oral, pentóxido de vanadio en una concentración de 0.3 y 9 mg/kg respectivamente.

Los resultados del presente estudio muestran una interdependencia entre 4 de los parámetros estudiados: Citotoxicidad (cuantificada por alteraciones del índice mitótico y cinética de proliferación), bajo peso de los fetos, acortamiento de los miembros y una reducción de la osificación. El vanadio es un potente inhibidor de la síntesis de ADN y de proteínas, y es factible que este efecto sea el responsable de las alteraciones observadas en este estudio.

Con base en lo anterior podemos sugerir que sí hay una correlación entre el efecto mutagénico y teratogénico de este compuesto.

3.4) COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

En relación con el incremento en los ICH's, el pentóxido vanadio ocasiona lesiones que son reparadas las cuales en tratamientos normales efectuados in vitro no se expresan.

Con respecto a los ICH's, la cafeína aplicada a las cero horas de cultivo (24 horas antes de la aplicación del vanadio), no inhibio los mecanismos de reparación, por lo que creemos que el tiempo de acción de la cafeína en los cultivos no es de más de un ciclo de replicación.

El vanadio necesita al menos de un ciclo de división para poder manifestar el daño como intercambios de cromátidas hermanas, lo cual lo coloca como un posible agente S-dependiente.

Los tratamientos simultáneos con vanadio y cafeína también alteran la cinética de división celular, sin que se observe alguna relación dosis-dependiente.

El daño inducido por el vanadio no puede ser evidenciado por si solo, sin embargo al inhibir los mecanismos de reparación se pone de manifiesto su efecto como un incremento en la frecuencia de ICH's. El pentóxido de vanadio puede considerarse como un agente mutagénico.

El pentóxido de vanadio mostró efectos fetotóxicos, los cuales fueron evidenciados por una disminución del peso y un retraso del proceso de osificación.

La frecuencia de camadas con animales alterados, de fetos malformados, las diferentes alteraciones encontradas y las anomalías presentes en las costillas de algunos fetos muestran que el pentóxido de vanadio es un agente teratógeno.

Existe una correlación entre el efecto mutagénico y teratogénico del pentóxido de vanadio.

4.- REFERENCIAS

- Abramovsky, I., Vorsanger, G. y Hirschhorn, K. (1978) Sister chromatid exchange induced by X-ray of human lymphocytes and the effect of l-cysteine. *Mutat. Res.* 50:93-100.
- Aeschbacher, H.U. Milton. H., Poot, A. y Wurzner, H.P. (1980) Effect of caffeine on rat offspring from treated dams. *Toxicol. Lett.* 7:71-77.
- Albertini, R.D., Sylverter, D.L. y Allen, E.F. (1982). The G-thioguanine -resistant peripheral blood lymphocytes assay for direct mutagenicity testing in humans. En: Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology . Academic Press, N.Y.
- Alder, I.D. (1970) The problem of caffeine mutagenicity. en: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man. Cap 24. Vogel, F., Rohrborn, G. eds, New York: Springer-Verlag.
- Aldridge, A. Bailey, J. y Neims. A.H. (1981) The disposition of caffeine during pregnancy and after pregnancy. *Semin Perinatol.* 5:310-313.
- Alessio, L., Maroni, M. y Dell'Orto, A. (1988). Biological monitoring of vanadium. En: Biological Monitoring of Toxic Metals. Clarkon, T.W., Friberg, L., Nordberg, G.F. y Sager, P.R. eds. Plenum Press, N.Y.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. y Lee, F.D. (1973) Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70:2281-2285.
- Andersen, O., Ronne, M. y Norderberg, G.F. (1983). Effects of inorganic metal salts on chromosome length in human lymphocytes. *Hereditas*, 80:65-70.
- Anderson, H.C. (1981). Induction of sister chromatid exchanges by streptonigrin, and antibiotic and antineoplastic agent. *Hereditas* 95:141-148.
- Bateman, A.J. (1966) Testing chemicals for mutagenicity in a mammal. *Nature (Lond.)* 210:205-206.
- Baroch, E.F. (1983). Vanadium and vanadium alloys. En: Encyclopedia of Chemical Technology. Vol. 23 Ed. J.Wiley and Sons.
- Barry, E.F., Rei, M.T., Reynolds, H.H., y O'Brien, J. (1975). Determination of nickel and vanadium on the

- atmosphere of eastern Massachusetts. Environ. Lett.. 8(4):381-385.
- Beaudoin, A.R. (1980). Embriology and teratology. En: The Laboratory Rat: Research Applications Vol 2. Backer, H.J., Lindsey, J.R. y Weisbroth, S.H. (Eds.) Academic Press, N.Y.
- Beaulac-Baillargeon, L. Ph. D. y Desrosiers, C.B.Sc. (1987) Caffeine-cigarette interaction on fetal growth. Am. J. Obstet. Gynecol. 157 (5):1236-1240
- Beck, S.L. (1989). Prenatal ossification as and indicator of exposure to toxic agents. Teratology 40:365-374.
- Beek, B. y Obe, G. (1979) SCEs in human leukocyte chromosomes: Espontaneous and induced frequencies in early and late proliferating cells in vitro. Hum. Genet. 49:51-61.
- Bergner, L. y Susser, M.W. (1970). Low birth weight and prenatal nutrition: An interpretative review. Pediatrics 46:946.
- Bishum, N., Williams, D. y Mills, J. (1974). The enhancement by caffeine on two tumor cell lines. Mutation Res. 26:151-155.
- Blanco, M. y Armengod, M.E. (1976) Role of the bacterial and phage recombination systems and of DNA replication in genetic recombination of UV-irradiated phage lamda. Mol. Gen. Genet. 146:51-54.
- Bloom-Fawcett, D. W. (1987). Tratado de Histología. Décimo primera Edición. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. México.
- Bolaños, F. (1990) El Impacto Biológico: Problema Ambiental Contemporáneo. UNAM, México.
- Boogs, D.R., y Winkelstein, A. (1985) El Leucocito. Ed. El Manual Moderno, México D.F.
- Bordin, F., Carlassare, F., Baccichetti, F. y Anselmo, I. (1976) DNA repair and recovery in Escherichia coli after psoralen and angelicin photosensitization. Biochim. Biophys. Acta 447:249-259.
- Brasel, J. A. y Winick, M. (1972). Maternal nutrition and prenatal growth. experimental studies of effects of maternal undernutrition on fetal and placental growth. Arch. Dis. Child 47:47 9.
- Braun, A. G. (1985) New perspectives in test for teratogenicity. Homburger (Ed.) Safety Evaluation and Regulation of

Chemicals 2. 2nd Int. Conf. Cambridge. Mass.

- Brenneke, H. (1937). [Ratiation damage to mouse and rat sperm, observed from the early development of the ova.] *Strahlentherapie*, 60:214-238.
- Brimblecome, F.S.W., Ashford, J. R., and Fryer, J. G., (1968). Significance of low birth weight in perinatal mortality. *Br. J. Prev. Soc. Med.* 22:27.
- Buhl, S.N. y Regan, J.D. (1975) Effects of caffeine on postreplication repair in xeroderma pigmentosum cells. En: Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawalt y R.B. Setlow, Eds.). Plenum Press, Nueva York, Part B, pp. 627-630.
- Butcher, R. E.; Vorhees, C.V. y Wootten, V. (1984) Behavioural and physical development of rats chronically exposed to caffeinated fluids. *Fundam. Agth in perinatal mortality. Br. J. Prev. Soc. Med.*
- Byrne, A. R. y Costa, L. (1978). Vanadium in foods and in human body fluids and tissues. *Sci Total Environ.* 10:17-30.
- Caillet-Fauquet, P. (1976) Etude biochimique, chez E. coli d'un mécanisme de réparation inductible et mutagène. Tesis. Université Libre de Bruxelles, Bélgica.
- Carlton, B.D., Brneke, M.B. y Fisher, G.L. (1982) Assessment of the the teratogenicity of ammonium vanadate using Syrian golden hamsters. *Environm. Res.*, 29(2):256-262.
- Carson, B.L., Ellis III, H.V. y McCann, J.L. (1987). *Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Human*. Lewis Publisher, Inc.
- Carstairs, K. (1962). The human small lymphocyte: Its, Possible Pluripotential quality. *Lancet* 1:829-832.
- Carrano, A. V. y Moore, D. H. (1982). The rationale and methodology for quantifying sister chromatid exchanges in humans. En: *Mutagenicity: New horizons in genetic toxicology*. Cap. 10 Academic Press. N. Y.
- Christian, M.S. Y Hoberman, A.M. (1985) Current in vivo reproductive toxicity and teratology methods. Homburger (Ed)., Safety Evaluation and Regulation of Chemicals 2. 2nd Int. Conf. Cambridge, Mass.
- Clayton, D.A., Doda, J.N. y Friedberg, F.C. (1976) Absence of a pyrimidine dimer repair mechanism for mitochondrial DNA in

- mouse and human cells. En: Molecular Mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawalt y R.B. Setlow, Eds.). Plenum Press New York, part B, pp. 589-591.
- Cleaver, J.E. (1969) Repair replication of mammalian cell DNA synthesis on dark repair. *Radiat. Res.* 37:334-348.
- Craddock, V.M., Henderson, A.R. y Ansley, C.M. (1976) Repair replication of DNA in the intact animal following treatment with dimethylsitosamine and with methyl methanesulfonate studeid by fractionation of nuclei in a zonal centrifuge. *Biochim. Biophys Acta* 447:53-64.
- CSM (1974) Committee on safety of medicines. Guidelines of reproduction studies for guidance of applicants for product licences and clinical trial certificates.
- D'Ambrosio, S.M. y Setlow, R.B. (1976) Enhancement of postreplication repair in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:2396-2400.
- Darab, D.J., Minkoff, J.S. y Sulik, K.K. (1987) Pathogenesis of median facial clefts in mice trated with methotrexate. *Teratology* 36:77-86.
- Deknudt, Gh. y Deminnatti, M. (1978). Chromosome studies in human lymphocytes after in vivo exposure to metal salts. *Toxicology* 10:65-70.
- Deknudt, Gh. y Gerber, G.B. (1979). Chromosomal aberrations in bone marrow cells on mice given a normal o a calcium deficient diet supplemented with various heavy metals. *Mutation Res.* 68:163-168.
- Darnerud, P.O. y Lundkvist, V. (1987) Studies on implantation and embryonic development in mice given a highly chlorinated hexadecane. *Pharmacol. Toxicol.* 60:239-240.
- Devoret, R. Blanco, M, George, J. y Radman, M. (1975) Recovery of phage from ultraviolet damage. En: Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawalt y R.B. Setlow, Eds.). Plenum Press, Nueva York, Part A, pp. 155-171.
- Dial, Ch.A.B. y Dial, N.A. (1987) Paraquat on reproduction and mortality en two generations of mice. *Environ. Contam. Toxicol* 16:759-764.
- Doloy, M.T., Legor, R., Hardy, M. y Reillaudou, m. (1978). Chromosome abnormalities produced in human lymphocytes by organic extracts from river water. En: Mutagen-induced chromosome damage in man. New Haven Yale University Press.

- Domon, M.; Barton, B.; Porte, A. y Rauth, A.M. (1970) Int. J. Radiat. Biol. 17:395-399.
- Dorrbecker, S.H.; Reyes, J.R.; Dorrbecker, B.R. y Kramer, P.A. (1988) Caffeine disposition in the pregnant rabbit; I: pharmacokinetics following administration by intravenous bolus and continuous zero-order infusion. Dev. Pharmacol. Ther. 11:109-117.
- Drahovsky, D., Lackojand, I. y Wacker, A. (1976) Enzymatic DNA methylation during repair synthesis in non-proliferating human peripheral lymphocytes. Biochim. Biophys. Acta 447:139-143.
- Duffus, J.H. (1983). Toxicologia Ambiental. Cap. 6 Ed. Omega Barcelona España.
- Dunky, A., Tuschl, P. Tausch, G. y Eberl, R. (1975) In vivo investigation of the effect of antirheumatic drugs on DNA-synthesis and DNA repair. Studia Biophys. 50:172.
- Dunlop, M. y Court, J.M. (1981) Effects of maternal caffeine ingestion on neonatal growth in rats. Biol. Neonate. 39:178-184.
- Dupplessis, T.H. (1973). Embriopatías. en: Genética, Enfermedades Hereditarias del metabolismo. Ed. Espax.
- Durfor, C.N. y Becker, E. (1963) Public water supplies of the 100 largest cities in the United States, 1962, Washington D.C. US Geological Survey (Water-Supply Paper No. 1812).
- ECETOC (1983). Identification and assesment of the effects of chemicals on production and development reproductive toxicology. Monograph No. 5.
- Ehmann, U.K., Gehring, U. y Tomkins, G.M. (1976) Caffeine, cyclic AMP and postreplication repair of mammalian cell DNA. Biochim. Biophys. Acta 447:133-138.
- Elinder, C-G., Gerhardsson, L. y Oberdoerster, G. (1988). Biological Monitoring of Toxical Metals - Overview. En: Biological monitoring of toxic metals. Clarkson, T.W., Friberg, L., Nordberg, G. F. y Sager, P. R. Plenum Press. New York and London.
- EPA (1988) (Environmental Protection Agency). Guidelines for reproduction studies for safety evaluation of drugs for human use. Washington DC.

- Epstein, S. (1970) The failure of caffeine to induce mutagenic effects or to synergise the effects of known mutagens in mice. En: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man. Chap. 25, Vogel F, Rohrborn G, eds. New York: Springer-Verlag, 1970.
- Erikkson, U.J. (1984). Congenital malformations in diabetic animal models-Review. *Diab. Res.* 1:57-66.
- Evans, H.J. y O'Riordan, M.L. (1975). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test. *Mutation Res.* 31:135-148.
- Falukner-Hudson, T.G. (1964) Vanadium: Toxicology and Biological Significance. Elsevier Science Pub., N.Y.
- FDA (1966) Food and drug administration. Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use.
- Fishbein, L., Flamm, W.G. y Folk, H. L. (1970). Chemical Mutagens: Environmental Effects on Biological Systems-Environmental Science. An Interdisciplinary Monograph Series. Academic Press N.Y.
- Fishbein, L. (1976). Teratogenic, mutagenic and carcinogenic effects of insecticides. en: Insecticide Biochemistry and Physiology. Ed. Wilkison, C.F. Plenum press, N.Y.
- Fujiwara, Y. y Tarsumi, M. (1976) Replicative bypass repair of ultraviolet damage to DNA of mammalian cells: caffeine sensitive and caffeine resistant mechanisms. *Mutation Res.* 37:91-110.
- Ganesan, A.K. y Seawell, P.C. (1975) The effects of *lexA* and *recF* mutations on postreplication repair and DNA synthesis in Escherichia coli K-12. *Mol. Gen. Genet.* 141:189-205.
- Gardner, M.B. (1981). Viruses as environmental carcinogens: An agricultural perspective. En: Genetic Toxicology. Plenum Press. N.Y.
- Giri, A.K., Sanyal, R., Sharma, A. y Talukder, G. (1979) Cytological and cytochemical changes induced through certain heavy metals on mammalian systems. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 2: 391-394.
- Gómez-Arroyo, S.M., Altamirano, M. y Villalobos-Pietrini, R. (1981) Sister chromatid exchanges induced by some chromium compounds in human lymphocytes in vitro. *Mutation Res.* 90:425-431.

- Goth, R., y Cleaver, J.E. (1976) Metabolism of caffeine to nucleic acid precursors in mammalian cells. *Mutation Res.* 36:105-114.
- Graedel, T.E., Hawkins, D.T., Claxton, L.D. (1986). Atmospheric Compounds. Academic. Press. N.Y.
- Grabowski, C.T. (1979) Altered electrolyte and fluid balance. En: Handbook of teratology, Vol 2. Wilson, J.G. y Fraser, F.C. eds. Plenum Press, N.Y.
- Gude, W.D., Cosgrove, G.E. y Hirsch, G.P. (1982). Histological atlas of the laboratory mouse. Plenum Press, N.Y.
- Guglielmi, G. E. y Tice, R.R. Comunicación personal.
- Guzmán-Toledano, R. (1986). Defectos congénitos en el recién nacido. Ed. Trillas México.
- Hahon, N. y Booth, J.A. (1984). Effects of Chromium and Manganese particles on the Interferon System. *J. Interferon Res.* 4:17-27.
- Hanawalt, P.C. (1990) Selective DNA repair in expressed genes in mammalian cells. *Mutat. Environm.* Parte A. pp. 213-222.
- Hansen, D.K., Walker, R.C. y Grafton, T.F. (1990) Effect of lithium carbonate on mouse and rat embryos in vitro. *Teratology* 41:155-160.
- Hansen, K. y Stern, R.M. (1984). A survey of metal-induced mutagenicity in vitro and in vivo. *Toxicol. Environ. Chem.* 9:87-91.
- Harkness, J.E. y Wagner, J.E. (1989) The biology and medicine of rabbits and rodents. Lean & Febiger, London.
- Hersh, J.H., Podruch, P.E., Rogers, G. y Weisskopf, B. (1985) Toluene embryopathy. *J. Pediatrics* 106(6):922-927.
- Hertwig, P. (1935). [Sterility phenomena in mice irradiated with X-rays.] *Z. Induct. Abstamm.-U. VererbLehre*, 70:517-523.
- Hetzl, F.W., Kruuv, J. y Frey, H.E. (1976) Repair of potentially lethal damage in X-irradiated V-79 cells. *Radiation Res.* 68:300-307.
- Hewitt, R.R. y Meyn, R.E. (1975) Concerning pyrimidine dimers as "blocks" to DNA replication in bacteria and mammalian cells. En: Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawalt y R.B. Setlow, Eds.). Plenum Press, Nueva York, Part B, pp.

635-638.

- Hofer, K.G., Hofer, M.G., Ieracitano, J. y McLaughlin, W.H. (1977) Radiosensitization of hypoxic tumor cells by simultaneous administration of hyperthermia and nitroimidazoles. Radiation Res 70:362-377.
- Hoffman, G.R. (1981). Overview of genetic toxicology. En: Genetic Toxicology. Plenum Press. N. Y.
- Hogan, B., Costantini, F. y Lacy, E. (1986). Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harborg Laboratory, N.Y.
- Holdway, D.A., Sprague, J.B. y Dick, J.B. (1983). Bioconcentration of Vanadium in American Flagfish over one reproductive cycle. Water Res. 17:(8) 937-941.
- Hollander, A. (1971a). Chemical mutagens principles and methods for their detection. Vol. 1 Plenum Press. N.Y.
- Hollander, A. (1971b). Chemical mutagens. principles and methods for their detection. Vol. 2 Plenum Press. N.Y.
- Hollander, A. (1973). Chemical Mutagens. principles and methods for their detection. Vol. 3 Plenum Press. N.Y.
- Hollander, A. (1976). Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. Vol. 4 Plenum Press. N.Y.
- Hollander, A. y de Serres, F.J. (1978). Chemical mutagens. principles and methods for their detection. Vol. 5 Plenum Press. N.Y.
- Holloman, W.K. y Radding, C.M. (1976) Recombination promoted by super helical DNA and the recA gene of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73:3910-3914.
- Hook, E.B. (1981). Contribution of chromosomal abnormalities to human morbidity and mortality. Cytogenet. cell. Genet. 33:101-106.
- Hopkins, L.L. y Mohr, H.E. (1974). Vanadium as and essential nutrient. Fed. Proc. 33:1173-1175.
- Houge, C.J.R. (1984). The effect of common exposures on reproductive outcomes. Teratog. Carcinog. Mutag. 4:45-57.
- IARC (1987) Monograph on The Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Suppl. 6, IARC, Lyon.

- Ikushima, T. (1980) Intrachromosomal distribution of spontaneous sister chromatid exchanges and its relevance to the mechanism of their formation. *Annu. Rep. Res.* 13:67-74.
- Inger-Lise, H. Heldaas, S.S., Langard, S., Steen-Johnsen, J., Christensen, A. y Heldaas, K. (1987) Surveillance of pregnancies as a means of detecting environmental and occupational hazards. I Spontaneous abortions, congenital malformations and cytogenetic abnormalities in a newborn population. *Hereditas* 107:197-203.
- IRPTC (1985) (International Register of Potentially Toxic Chemicals)., United Nations Environment Program. Geneva.
- Ivanova-Glavanakova, S., Altmann, H. y Mukherjee, R. (1975) DNA repair and DNA repair inhibitors in *Drosophila* investigations. *Studia Biophys.* 50:117-121.
- Ivett, J. L. y Tice, R. R. (1982). Average generation time: A new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. *Environ. Mutagen.* 4:358.
- Jiritano, L.; Bortolotti, A. Errick, J.K. (1985) Caffeine disposition after oral administration to pregnant rats. *Xenobiotica* 15:1045-51.
- Jones, M.M. y Basinger, M.A. (1983) Chelate antidotes for sodium vanadate and vanadyl sulphate intoxication in mice. *J. Toxicol. Environm. Health* 12:749-756.
- Kallén, B. (1987) Search for teratogenic risks with the aid of malformation registries. *Teratology* 35:47-52.
- Kaplan, W.D. y Lyon, M.F. (1953) Failure of mercaptoethylamine to protect against the mutagenic effects of radiation. II. Experiments with mice. *Science* 118:777-778.
- Kawai, T., Seiji, K., Watanabe, T. Nakatsuka, H. e Ikeda, M. (1989). Urinary vanadium as a biological indicator of exposure to vanadium. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 61:283-287.
- Kelner, A. (1949) Effect of visible light on the recovery of *Strptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 35:73-79.
- Khera, K.S. (1987). Maternal toxicity of drugs and metabolic disorders-a possible etiologic factor in the intrauterine death an congenital malformation: A critique on human data. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* 17:345-375.

- Kitchin, K.T. y Ebron, M.T. (1983) Maternal hepatic and embryonic effects of 1,2,3,4-Tetrachlorobenzene en the rat. *Toxicology* 26:243-256.
- Kitchin, K.T., Ebron, M.T. y Svendsgaard, D. (1984) In vitro study of embryotoxic and dismorphogenic effects of mercuric chloride and methyl mercury chloride in the rat. *Fed Chem Toxic* 22(1):31-37.
- Kihlman, B.A. (1977) Caffeine and Chromosomes (Elsevier, New York).
- Kligerman, A.D., Bryant, M.F., Erexson, G.L. y Rabinowitz, J.R. (1988) Persistence of ICH-inducing lesions in lymphocytes of mice exposed to diaziquone. *Environ. Molecular Mutagen.* 12:185-199.
- Langhman, J. (1976). Embriología Médica. ed. Interamericana. México.
- Latt, S.A. (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: Detection by fluorescence and induction by mitomicyn C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71:3162-3166.
- Lenhinger, A. L. (1982). Bioquímica. Segunda Edición. Ed. Omega, Barcelona España.
- Lessa, J.M.M., Becak, W., Nazareth-Rabello, Pereira, C.A.B. y Ungaro, M.T. (1976). Citogenetics studies of DDT on human lymphocytes in vitro. *Mutation Res.* 40:131-138.
- Leal, M.; Barletta, M. y Carson, S. (1989) Maternal-fetal electrocardiographic effects and and pharmacokinetics after an acute iv administration of caffeine to the pregnant rat. *Reproductive Toxicol.* 4:105-112.
- Lin, P.F. y Howard-Flanders, P. (1976) Genetic exchanges caused by ultraviolet photoproducts in phage Lamda DNA moleules: the role of DNA replication. *Mol. Gen. Genet.* 146:107-115.
- Ling, N. R. y Kay, J.E. (1975). Lymphocyte Stimulation. North Holland Amsterdam Pub.
- Lopez-Zumel, M., Astudillo, M.D. y Alvarez, M.V (1975) Studies on chloroquine as a DNA depair inhibitor. *Studia Biophys. Acta* 442:162-173.
- Lung, H. (1975) Model for repair inhibition by caffeine. *Studia Biophys.* 50:213-221.

- Magnuson, B.A., Schiefer, H.B. y Hancock, D.S. (1986) Cardiovascular effects of mycotoxin T-2 after topical application in rats. *Can. J. Physiol Pharmacol* 65:799-802.
- Maher, V.M. y McCormick, J.J. (1982). Measurement of mutations in somatic cells in culture. En: Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology. Acad. Press. N.Y.
- Maronpot, R.R. (1987) Ovarian toxicity and carcinogenicity in eight recent national toxicology program studies. *Environm. Hlth. Persp.* 73:125-130.
- Mattison, D.R. (1981) The effects in biologically foreign compounds on reproduction. En: Drugs in pregnancy (ed. R.W. Abdul-Karim), p.101. G.F. Stickley Co., Philadelphia.
- McEntee, K., Hesse, J.E. y Epstein, W. (1976) Identification and radiochemical purification of the recA protein of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 73:3979-3983.
- McLean, J.R., McWilliams, R.S., Kaplan, J.G. y Birboim, H.C. (1982) Rapid detection of DNA strand breaks in human peripheral blood cells and animal organs following treatment with physical and chemical agents. En: Chemical Mutagenesis, Human Population Monitoring, and Genetic Risk Assessment. Bora, K.C., Douglas, G.R., Nestmann, E.R. eds. Elsevier, N. Y.
- Meneghini, R. (1974) Repair replication of Opossum lymphocyte DNA: Effect of compounds that bind to DNA. *Chem. Biol. Interac.* 8:113-126.
- Meneghini, R. y Hanawalt, P.C. (1975) Postreplication repair in human cells: on the presence of gaps opposite dimers and recombination. En: Molecular mechanisms for repair of DNA. (P. C. Hanawalt y R.B. Setlow, Eds). Plenum Press, Nueva York, Part B, pp. 639-642.
- Meselson, M.S. y Radding, C.M. (1975) A general model for genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:358-361.
- Millen, J.W. y Woollman, H.M. (1963). Congenital malformation of the skeletal system. en: *Effects of drugs on the fetus* (Int. Cong. Series No. 64). Excerpta Medica Foundation, Amsterdam.
- Montgomery, R.R. y Reinhardt, C.F. (1980) Industrial toxicology. En: Survey of Contemporary Toxicology V.I Wiley-interscience Pub. N.Y.

- Morimoto, K. y Wolff, S. (1980). Increase of sister chromatid exchanges and perturbations of cell division kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites. *Cancer Res.* 40:1189-1193.
- Mouton, R.F. y Fromageot, P. (1971) Inhibition of post UV-irradiation growth in the dark of *Tetrahymena pyriformis* by caffeine and the oncogenic mycotoxin luteoskyrin. *FEBS Letters.* 15:45-48.
- Moutschen, J. (1985). Introduction to Genetic Toxicology. Ed. John Wiley & Sons. N. Y.
- Muller, G., Bernuzzi, V., Desor, D. Hutin, M-F, Burnel, D. y Lehr, P.R. (1990) Developmental alterations in offspring of females rats orally intoxicated by aluminium lactate at different gestation periods. *Teratology* 42:253-261.
- Muscarella, D.E., Keown, J.F. y Bloom, S.E. (1984) Evaluation of genotoxic and embryotoxic potential of clorpyrifos and its metabolites in vivo and in vitro. *Environm. Mutagen.* 6:13-23.
- Mutchinick, O., Lisker, R. y Babinski, V. (1988). Programa Mexicano de "Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas Externas". *Salud Pública de México* 30:88-100.
- Myers. D. K., Childs, J.D. y Jones, A.R. (1977) Sensitization of bacteriophage T4 to ^{60}C -t radiation and to low-energy X-radiation by bromouracil. *Radiation Res.* 69:152-165.
- Myron, D. R., Givand, S. H., y Nielsen, F. H. (1977). Vanadium content of selected foods as determined by flameless atomic absorption spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 25(2): 297-299.
- Navarrete, J.I. (1981). Factores que predisponen a las malformaciones congénitas. *Gen. ed. Cetus. UNAM.*
- NAS, (1974). National Academy of Sciences. Vanadium. Washington, D.C. Printing and Publishin Office, 117 pp
- Natarajan, A.T. y Obe, G. (1982). Mutagenic testing with cultured mammalian cells. Cytogenetic assays. En: Mutagenicity: A New Horizons in Genetic Toxicology. Acad. Pres. N.Y.
- Navas, P., Hidalgo, A. y Garcia-Herdurgo, G. (1985). Cytokinesis in onion roots: inhibition by vanadate and caffeine. *Experientia* 42:437-439.

- Nechay, B.R., Nanninga, L.B., Nechay, P.S.E., Post, R.L., Grantham, J.J., Macara, I.G., Kubena, L.F., Phillips, T.D. y Nielsen, F.H. (1986). Role of vanadium in biology. Fed. Proc 45:123-132.
- Nielsen, F.H., Shuler, T.R. McLeod, T.G. y Zimmerman, T.J. (1984) Nickel influences iron metabolism through physiologic, pharmacologic and toxicologic mechanisms in the rat. J. Nutr 114:1280-1288.
- Nielsen, F.H. (1988). Possible future implications of ultratrazza elements in human health and disease. En: Current Topics in Nutrition and Disease. Prasad, A.S. Ed. Alan R. Liss, Inc., New York.
- NIOSH, (1977). Natl. Inst. Occupational Safety and Health. Criteria for a recommended standard: occupational exposure to vanadium. Washington, D.C.
- Nolan, L.L. y Kidder, G.W. (1979) Caffeine: its action on purine metabolizing enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 91:253-262.
- Nolen, G.A. (1981) The effect of brewed and instant coffee on reproduction and teratogenesis in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 58:171-183.
- Norton, S. y Sheets, L. (1983) Neuropathy in the chick from embryonic exposure to organophosphorus compound. Neurotoxicology 4(4):137-142.
- Nowel, P.C. (1960). Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 20:462-466
- Ohno, H.F., Hanaoka, F. y Yamada, M. (1982) Inducibility of sister-chromatid exchanges by heavy metal ions. Mutation Res. 104:141-145.
- O'Neill, F.J. (1979) Differential effects of cytochalasin B and caffeine on control of DNA synthesis in normal and transformed cells. J. Cell. Physiol. 101:201-218.
- Ortiz-Monasterio, P.F., Cortinas de Nava, C. y Maffey, G.M.L. (1987). Manejo de los desechos industriales Peligrosos en México. Ed. Universo 21, México.
- Osterga, W.; Duisberg, E. y Sturmman, M. (1965) The mutagenic activity of caffeine in man. Mutation Res. 2:293-296.
- Ostertag, W.E., Duisberg, E. y Sturmman, M. (1965) The mutagenic activity of caffeine in man. Mutat Res 2:293-296.

- Palmer, A.K. (1980). The Principles and Methods in Modern Toxicology. Elsevier/North Holland, N.Y.
- Perry, P.E. y Thomson, E. J. (1984) . The methodology of sister chromatid exchanges En: Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier Sci. Pub.
- Perry, P. y Evans, H.J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258:121-125.
- Perry P. y Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 257:156-158.
- Phillips, T.D., Nochay, B.R. y Herdelbaugh, N.D. (1983). Vanadium chemistry and the kidney. *Fed. Proc.* 42:2969-2973.
- Pillans, P.I., Fold, P.I. y Donzi, S.F. (1988) The effect of in vivo administration of teratogenic doses of vitamin A during the preimplantation period in the mouse. *Teratology* 37:7-11.
- Pollard, I.; Jabbour, H. y Mehrabani, P. A. (1987) Effects of caffeine administered during subsequent fuction in the adult rat: Prolonged effects on a second generation. *J Toxicol. Environm. Health* 22:1-15.
- Potter, H. y Dressler, D. (1976) On the mechanisms of genetic recombination intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:3000-3004.
- Prival, M.J. (1980). Genetic toxicologic: Regulatory aspects. *J. Environm. Pathol. Toxicol.* 3:99-111.
- Radman, M. (1975) SOS repair hypothesis: phenomenology of an incudible DNA repair wich es accompanied by mutagenesis. En: Molecular mehanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawalth y R.B. Setlow, Eds.). Plenum Press, Nueva York, Part A, pp. 355-367.
- Radman, M. y Errera, M. (1970) Enhanced efficiency of excision repair of non replicated UV-damage E. coli DNA. *Mutation Res.* 9:553-560.
- Roberts, J. J., Sturrock, J. E. y Waed, K. N. (1974). The enhancement by caffeine of alkylation-induced cell death, mutations and chromosomal aberrations in Chinese hamster cells, as result of inhibition of post-replication DNA repair. *Mutation Res.* 26:129-143
- Roldán, R. E. (1988). Induccion de aberraciones cromosómicas e

- intercambio de cromátidas hermanas por algunos compuestos metálicos en cultivos de linfocitos humanos in vitro. Tesis profesional. Fac. Ciencias, UNAM.
- Roldán, R. E. and Altamirano, L. M. A. (1990). Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Res* 245:61-65.
- Rommelara, J, y Errera, M. (1973) Unscheduled DNA synthesis and repair replication in UV-irradiated Chinese-hamster cells. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 81:200-202.
- Rommelaere, J., Cornelis, J.J., Miller-Faures, A. y Errera, M. (1974) The influence of 5-Bromodeoxyuridine on DNA repair in Chinese hamster cells exposed to ultraviolet radiation. *Biochim. Acta* 340:388-399.
- Roschin, I. V. (1967). Toxicology of Vanadium compound used in modern industry. *Water Res.* 32:26-32.
- Roschin, I. V. (1968). Vanadium and its compounds Moscow Medicina Publishing House.
- Rosenbaum, J.B.(1983). Vanadium Compounds. En: Encyclopedia of Chemical Technology. Vol. 23 Ed. J. Wiley and Sons.
- Rosiles, R.M. y Perez, A.H. (1981) Consideraciones generales sobre algunas micotoxinas en alimentos para animales domésticos durante los años 1977-1980. *Veterinaria Méx.* 12:229-233.
- Rupp, W.D. y Howard-Flanders, P. (1968) Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. *J. Mol. Biol.* 31:291-304.
- Russell, W.L., Russell, M.B., y Kimball, A.W. (1954) The relative effectiveness of neutrons from a nuclear detonation and from a cyclotron in inducing dominant lethals in the mouse. *Am. Nat.* 88:269-286.
- Rydberg, B. (1977) Bromouracil mutagenesis in *Escherichia coli*. Evidence for involvement of mismatch repair. *Mol. Gen. Genet.* 152:19-28.
- Sabbioni, E., Clereci, L. y Barzzelli, A. (1983) Different effects of vanadium ions on some DNA-metabolizing enzymes. *J. Toxicol. Environ. Hlth.* 12:737-748.
- Sakamoto, J. y Hashimoto, K. (1985) Reproductive toxicity of

- acrylamide and related compounds in mice- Effects on fertility and sperm morphology . Arch. Toxicol. 59:201-205.
- Sarthy, P.V. y Meselson, M. (1976) Single burst study of rec and red mediated recombination in bacteriophage lamda. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73:4613-4617.
- Schafer, H. (1939) The fertility of male mice after irradiation with 200r. Z. mikrosk. anat. Forsch. 46:121-152.
- Schafer, L.A., Van'T Hof, J., Hayes, C.G., Burton, R.M., y De Serres, F.J. (1978). Exploratory monitoring of air pollutants for mutagenic activity with the Tradescantia stamen hair system. Environm. Health Perspect. 27:51-66.
- Schiefer, H.B., Rousseaux, C.G., Hancock, D.S. y Blakley, B.R. (1987) Effects of low-level long-term oral exposure to T-2 toxin in CD-1 Mice. Fd. Chem. Toxic 25(8):593-601.
- Schneider, E.L., Bickings, C.K. y Sternberg, H. (1984). Aging and sisterchromatid exchange. VII Effect of aging of background SCE in vivo. Cytogenet. Cell Genet. 33:249-253.
- Schvartzman, J.B., Goyanes, V.J. y Tice, R.R. (1984) DNA damage persistence and site specificity in SCE formation. En: Sister Chromatid Exchanges. Tice, R.R., Hollaender, A. eds. Plenum Press, N.Y.
- Scott, K. E. y Usher, R. (1966). Fetal malnutrition: Its incidence, cause, and effects. Am. J. Obstet. Gynecol. 94:351.
- Selby, P. Ch. y Sancar, A. (1990) Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3522-3525.
- Sharma, G.J. (1987) Influence of radiation dose and dose-rate on modification of barley seed radiosensitivity by post-treatment with caffeine. Ind. J. Exp. Biol. 25:595-598.
- Sharma, A. y Talukder, G. (1987) Effects of metals on chromosomes of higher organisms. Environ. Mutagen. 9:191-226.
- Shepard, T.H. (1976) Catalog of teratogenic agents., 2nd ed. Johns Hopkins University Press.
- Shin, Ch.G. Strayer, J.M. Wani, M.A. y Snapka, R.M. (1990) Rapid evaluation of topoisomerase inhibitors: Caffeine inhibition of topoisomerases in vivo. Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 10:41-52.

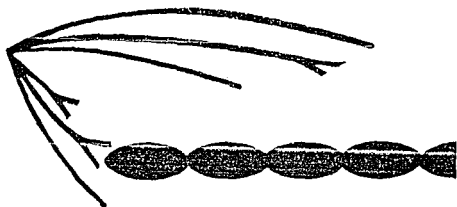
- Shiraishi, Y., Yamamoto, K. y Sanberg, A.A. (1979). Effects of caffeine on chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges induced by Mitomicina-C in BrdU-labeled human chromosomes. *Mutation Res.* 62:139-149.
- Siemon, H., Schneider, H. y Fuhmann, G.F. (1982) Vanadium increased selective K⁺ permeability in human erythrocytes. *Toxicology* 22:272-278.
- Singh, D.P. (1979) Effects of certain chemical pollutants on plant chromosome. Phd. Thesis Submitted to University of Calcuta.
- Singh, O.P. y Sharma, A. (1980) Effects of certain metallic pollutants in plants genetic systems: a review. *Nucleus*, 23:15-29.
- Smith, M.A., Evans, J. y Steel, C.M. (1974). Age related variation in proportion of circulating T cells. *Lancet* 2:292-294
- Smithells, R.W. (1987) A clinician's view of teratogenesis. *Arch. Toxicol., Suppl.* 11:122-127.
- Sorsa, M., Hemmink, K. y Vainio, H. (1982). Biological monitoring of exposure to chemical mutagens in the occupational environment. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 2:137-150.
- Soremark, R. (1967). Vanadium in some biological specimens. *J. Nutr.* 92:183-190.
- Speit, G., Hochsattel, R. y Vogel, W. (1984) The contribution of DNA single-strand breaks to the formation of chromosome aberrations and SCEs. En: Sister Chromatid Exchanges. Tice, R.R., Hollaender, A. eds. Plenum Press. N.Y.
- Steel, C. M., Evans, J. y Smith, M.A. (1975). Age-related changes in T and B cells. *Lancet* 1:914-915.
- Stendhal, D.H. y Sprague, J.B. (1982). Effects of Water Hardness and pH on Vanadium Lethality to Rainbow Trout. *Water Res.* 16:1479-1488.
- Stroking, H.E. (1981) The Metals en: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology 3rd Ed. Cap. 29 Vol. 2A. Wiley-Interscience.
- Sun, M. ed. (1987) Toxicity of vanadium and its environmental health standard. Chengdu, West China University of Medical Sciences, 20 pp.
- Swietlinskaa, Z y Zuk, K. (1974). Effect of caffeine on chromosome damage induced by chemical mutagens and ionizing radiation

- in Vicia faba and Secale cereale. Mutation Res 26:89-97.
- Swinton, D.C. (1975) Absence of a pyrimidine dimer excision and repair replication in *Chlamidomonas reinhardtii*. En: Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hamawalt y R.B. Setlow, Eds.). Plenum Press, Nueva York, Part B, pp. 585-588.
- Tarka, S. M. Jr. (1982) The toxicology of cocoa and methylxanthines: A review of the literature. CRC Crit. Rev. Toxicol. 9:275-312.
- Tondeur, F. y Rommelaere, J. (1977) Interaction of caffeine with the DNA of Chinese hamster cells. Biochim, Biophys. Acta 475:562-570.
- Tsuji, H., Heartlein, M.W. y Latt, S.A. (1988) Disparate effects of 5-Bromodeoxyuridine on sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Bloom Syndrome fibroblasts. Mutation Res 198:24-53.
- Umeda, M. y Nishimura, M. (1979). Inducibility of chromosomal aberrations by metal compound in cultured mammalian cells. Mutation Res. 67:221-229.
- US EPA (1977). Scientific and technical assessment report on vanadium, Washington DC, US Environmental Protection Agency (STAR series, EPA-600/6-77-002).
- van den Berg, B. J. and Yerushalmy, J. (1966). The relationship of the rate of intrauterine growth of infants of low birth to mortality, morbidity, and congenital anomalies. J. Pediatr. 69:531.
- Vijayalaxmi, y Evans, H.J. (1982). Bleomycin-induced chromosomal aberrations by metal compound in cultured mammalian cells. Mutation Res. 105:107-113.
- Villanueva, S., Botello, A.V. y Páez-Osúna, F. (1988). Evaluación de algunos metales pesados en organismos del río Coatzacoalcos y de la laguna del ostión, Veracruz, México. Contam. Ambient. 4:19-31.
- Vouk, V. (1990) General chemistry of metals. En: Handbook on the toxicology of metals. Frieberg, L., Nordberg y Vouk, V. (Eds.) Elsevier Science Publisher B.V.
- Volkert, M.R. George D.L. y Witkin, F.M. (1976) Partial suppression of the *lexA* phenotype by mutations (*rnm*) which restore ultraviolet resistance but not ultraviolet mutability to *Escherichia coli* B/r *uvrA lexA*. Mutation Res. 366:17-28.

- Wagner, R.E. y Radam, M. (1976) A Mechanism for initiation of genetic recombination. Proc, Natl. Acad. Sci. USA. 72:3619-3622.
- Waksvik, H. Magnus, P. y Berg, K. (1981). Effects of age, sex and genes on sister chromatid exchanges. Clin. Genet. 20:449-454.
- Waldstein, E.A. y Setlow, R.B. (1976) Repair of V-ray-induced single strand breaks in toluenized Escherichia coli cells, Biochim. Biophys. Acta 442:154-161.
- Waldren, C.A. y Patterson, D. (1979) Effects of caffeine on purine metabolism and ultraviolet light-induced lethality in cultured mammalian cells. Cancer Res. 39:4975-4982.
- Waters, M.D. (1977). Toxicology of vanadium. Adv. Mod. Toxicol. 2:147-189.
- Weinstein, D., Mauer, I., Katz, M.L. y Kazmer, S. (1973) The effect of caffeine on chromosomes of human lymphocytes: A search for the mechanism of action. Mutation Res. 20: 115-125.
- WHO (1985) (World Health Organization) Guide to Short-term test for detectin mutagenic and carcinogenic chemicals. Environmental Health Criteria 51, Geneva.
- WHO (1988) (World Health Organization) Vanadium. Environmental Health Criteria 81, Geneva
- Wide, M. (1984) Effect of short-term exposure to five industrial metals on the embryonic and fetal development of the mouse. Environ. Res. 33:47-53.
- Willson, J.G. (1979). Current status of teratology. en: Handbook of teratology. Willson, J.G. y Fraser, F.C. eds. Vol 1. Plenum Press, N.Y.
- Winick, M., Brasel, A., and Velasco, E. G. (1973). Effects of prenatal nutrition upon pregnancy risk. Clin. Obste. Gynecol. 16:184.
- Witkin, E.M. (1968) The role of DNA repair and recombination in Mutagenesis. Proc-Int. Congr. Genet. 12th. 3:225-245.
- Witkin, E.M. (1969) Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. Ann. rev. Genetics 3:525-552.
- Witkin, E.M. (1975) Relationships among repair, mutagenesis , and survival: overview. En: Molecular mechanisms for repair of DNA. (P.C. Hanawalt y R.B. Setlow, Eds.). Plenum Press, Nueva York, Part A, pp. 347-353.

- Wolff, S. (1977). Chromosome effects induced by low levels of mutagens. En: Research in photobiology. Plenum Pub. Corp. N.Y.
- Wright, H.V., Asling, C.W., Dougherty, H.L., Nelson, M.M. y Evans, H.M. (1958). Prenatal development of the skeleton in Long-Evans rats. *Anat. Rec.* 130:659-677.
- Wuthier, R.E. y Register, T.C. (1985) Role of alkaline phosphatase, a polyfunctional enzyme, in mineralizing tissues. En: *The Chemistry and Biology of Mineralizing Tissues*. Butler, W.T. Ed. Ebsco Media, Birmingham.
- Yuhas, J.M., Yurconic, M. Kligerman, M.M., West, G. y Peterson, D.F. (1977) Combined use of radioprotective and radiosensitizing drugs in experimental radiotherapy. *Radiation Res.* 70:433-443.

PUBLICACIONES



MEMORIAS

PRIMERA REUNION NACIONAL
DE INVESTIGACION
DE LA
SOCIEDAD MEXICANA DE GENETICA

11-13 DE OCTUBRE DE 1989.

LA TRINIDAD (CENTRO DEL IMSS),
SANTA CRUZ, TLAXCALA

INDUCCION DE MALFORMACIONES CONGENITAS EN RATONES TRATADOS CON PENTOXIDO DE VANADIO.

Roldán, R.E. y Altamirano, L.M.
Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, Campo 11, IENEP-Zaragoza, UNAM.

El vanadio y alguno de sus compuestos han despertado interés debido a su gradual acumulación en el ambiente y en los organismos vivos (Waters, 1977; Phillips et al., 1983).

Este metal es ampliamente usado en la industria de la construcción, cerámica, electrónica, tintas y colorantes (Baroch, 1983; Phillips et al., 1983; Carlson et al., 1987). Su presencia en el ambiente se debe a que el vanadio se obtiene como un co-producto o como un producto de desecho en la extracción de minerales como el uranio, fosfato, bauxita, titanio, etc., siendo la principal fuente de contaminación la refinación y combustión del petróleo.

Existen pocos estudios sobre el efecto mutagénico, carcinogénico y teratogénico del vanadio, siendo los resultados en la mayoría de los casos contradictorios y poco concluyentes.

En el presente trabajo se pretende evaluar los efectos sobre ratones machos y hembras al ser tratados con pentóxido de vanadio durante los periodos de gametogénesis, gestación y desarrollo postnatal, analizando los efectos del vanadio sobre las células gaméticas, sobre el embrión, feto y animales recién nacidos, evaluando la embriotoxicidad, inducción de mutaciones letales dominantes, frecuencia de malformaciones congénitas, número de implantaciones y muertes fetales, así como el desarrollo y muerte postnatal.

MATERIAL Y METODOS.

ANIMALES:

Para todos los experimentos se emplearan ratones de la cepa CD-1 machos y hembras de 45 días de edad y con un peso aproximado de 35 gramos, los cuales serán mantenidos en condiciones estándar de bioterio, con ciclos de luz y oscuridad controlados y libre acceso al alimento y al agua.

TRATAMIENTOS:

Lotes de animales:

Para todos los experimentos se contará con un grupo de animales testigo y un lote de animales tratados. En todos los casos los lotes estarán constituidos por un mínimo de 12 animales tanto machos como hembras (según sea el protocolo) (FDA, 1966).

Agente químico:

Para los tratamientos se empleará el pentóxido de vanadio (99.00 de pureza, obtenido del Instituto de Química de la UNAM.) el cual será disuelto en agua destilada (8 mg en 100 ml de agua), empleándose soluciones nuevas en cada tratamiento. La dosis a emplear será de 5.7 mg/kg de peso (1/4 de la LD₅₀ oral reportada para ratones).

Via de aplicación:

En todos los casos los tratamientos se realizarán por vía intraperitoneal.

EVALUACIONES:

Para todas las evaluaciones se seguirá el protocolo establecido por la "US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA).

A) Determinación del efecto sobre la fertilidad y la reproducción

Para este tipo de evaluaciones se determinará el potencial tóxico del vanadio sobre la función gonadal y el comportamiento reproductivo de los animales de ambos sexos, así como las modificaciones en las tasas de concepción, estadíos de gestación tempranos y tardíos, parto, lactación y desarrollo de los descendientes.

En este caso se tendrá un grupo de machos y hembras los cuales serán tratados diariamente con el pentóxido de vanadio. A los machos se les aplicará el tratamiento diariamente durante los 60 días anteriores al apareamiento, mientras que a las hembras 14 días antes de la cruce.

Una vez concluidos los tratamientos los animales serán puestos a cruzar (uno a uno) y por medio de frótis vaginal se determinará el día 0 de gestación (presencia de tapón vaginal o de espermatozoides).

Durante el desarrollo de la gestación, la mitad de las hembras serán sacrificadas el día 13 y por cesárea se examinará la distribución y número de cuerpos luteos, el número de implantaciones y el número de fetos vivos. El resto de las hembras se les dejará terminar la preñez y al nacimiento se contarán el número de animales, viabilidad, peso de los mismos y presencia de alteraciones morfológicas macroscópicas.

La viabilidad de las madres y de los recién nacidos, así como las variaciones en los pesos se registrarán al nacimiento y durante los días 4, 7, 14 y 21 post-parto (tomando el día del nacimiento como el primero).

B) Estudios multigeneracionales.

Para poder establecer los efectos del vanadio sobre la reproducción en dosis continuas, se tomaran animales de ambos sexos y sexualmente maduros (generación F0) y se les aplicará el vanadio durante 10 semanas hasta el cruzamiento, después del cual a las hembras se les continuará la aplicación durante la preñez y la lactación de la F1. A la F1 obtenida, se les cruzará y se obtendrá la F2, sobre la cual se evaluarán los efectos del vanadio como infertilidades, disminución del número de fetos por camada, así como alteraciones en los órganos reproductivos.

C) Estudios de embriotoxicidad.

Para poder determinar el potencial embriotóxico del vanadio se tomará un grupo de hembras y se cruzarán uno a uno con los machos. Una vez determinado el día 0 de preñez las hembras serán pesadas cada tercer día. A partir del sexto día se aplicará el pentóxido de vanadio diariamente hasta el día 16 de gestación. El día 19 las hembras serán sacrificadas y los fetos se extraerán por cesárea, analizando los úteros para determinar el número de implantaciones, el número de reabsorciones tempranas y tardías, así como el número de fetos vivos y muertos. Los ovarios serán examinados y se cuantificará el número de cuerpos lúteos, mientras que los fetos extraídos serán pesados y examinados para determinar la presencia y frecuencia de alteraciones o malformaciones macroscópicas. Posteriormente un tercio de los fetos (elegidos al azar) serán procesados y teñidos con alizarina para determinar el tipo y frecuencia de anomalías esqueléticas.

Referencias:

- Baroch, E.F. (1983). Encyclopedia of chemical technology. Vol. 23:673-687.
- Carson, B.L., Ellis, H.V. y McCann, J.L. (1987). Toxicology and biological monitoring of metals in humans. Lewin Pub. Inc.
- FDA (1966). European Chemical Industry Ecology & Toxicology Center (1983). Monograph #5.
- Phillips, T.D., Nechay, B.R. y Heidelbaugh, N.D. (1983). Federation Proc. 42:2969-2970.
- Waters, M. (1977). J. Toxicol. Environm. Hlth. 12:737-748.

ASOCIACION MEXICANA DE MUTAGENESIS
CARCINOGENESIS Y TERATOGENESIS
AMBIENTAL

APARTADO POSTAL No. 22-671
C.P. 14410 MEXICO, D.F.

MEMORIAS DEL
III CONGRESO
NACIONAL

19-22 DE
FEBRERO 1991

METEPEC, PUE.



EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Zamia loddigesii* Miq. SOBRE CULTIVO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA HUMANA.

GUILLERMINA ANTONIO M., Ma. del SOCORRO FERNANDEZ y LAURA MARTINEZ.

Facultad de Biología - Xalapa, Universidad Veracruzana.

El uso de plantas medicinales es una práctica muy frecuente en México. Dentro de estas plantas se encuentra *Zamia loddigesii* Miq., una cicada que además de ser usada como medicina también es alimenticia en la región sureste del Estado de Veracruz. A las cicadas se les han detectado propiedades neurotóxicas y carcinogénicas las cuales están dadas por los compuestos azoxiglicosídicos que contienen.

Se evaluó el efecto citogenético del extracto del tallo de *Zamia loddigesii* Miq., mediante el análisis de aberraciones cromosómicas en metafase de linfocitos de sangre periférica humana. Las concentraciones de 100, 200, 500, 700 y 1000 ppm fueron adicionadas a las 0 horas y 24 horas de iniciado el cultivo.

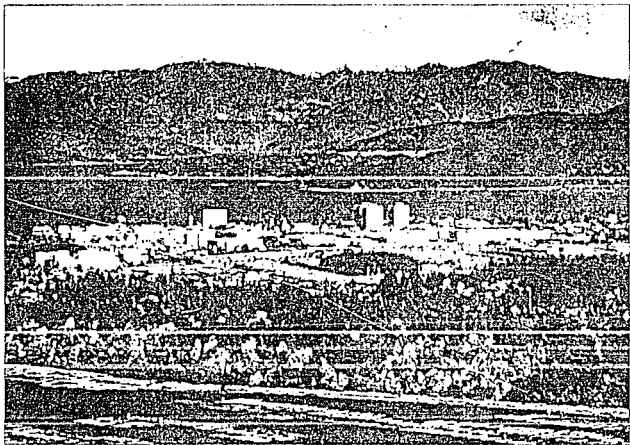
En ningún caso hubo alteraciones citogenéticas significativas, observándose solo una disminución en el índice mitótico a la concentración de 500 ppm.

EFFECTOS DEL PENTOXIDO DE VANADIO SOBRE EL PROCESO DE GESTACION EN EL RATON. Roldán, R.E. y Altamirano, L.M. Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, Campo-II, Bioterio, ENEP-ZARAGOZA, UNAM.

El potencial embriotóxico y fetotóxico del pentóxido de vanadio (V_2O_5), fue evaluado al tratar ratones hembras gestantes con este compuesto. Los resultados obtenidos muestran que en el grupo testigo se encontró un promedio de 9.67 implantes/hembra, con un total de 10 reabsorciones. El promedio del peso fetal en este caso fue de 1.48 g/feto, mientras que en el lote tratado fue de 1.07 g/feto, aumentando el número de reabsorciones (30) con respecto al testigo. Al evaluar las anomalías presentes en los fetos de los ratones tratados se encontró que de 77 fetos que constituían el lote testigo sólo uno de ellos (1.3%) presentaban alguna anomalía. Por su lado en el lote tratado, se observó que de un total de 162 fetos analizados 11 de ellos (6.8%) presentaban alguna alteración. De las anomalías encontradas, las más frecuentes fueron acortamiento de miembros (7/162 vs 0% del testigo), polidactilia (4/162; 2.4% vs 0 del testigo), áreas hemorrágicas y ojos abiertos (3/162; 1.9% en ambos casos), mientras que en el caso de la hernia umbilical, paladar hendido y la presencia de "tumores" se detectaron en un sólo caso de los 162 (0.6%). Al evaluar el efecto del vanadio sobre la formación del esqueleto se observó que en el grupo tratado el 3.79% de los fetos (3/79) mostraban alteraciones en la morfología de las costillas vs 0% del grupo testigo. ESTE TRABAJO FUE AFUYADO PARCIALMENTE POR EL CONACYT, CLAVE P220CCDR891527 Y POR LA DGEA-UNAM CLAVE IN-202089-ENZA.

SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION

Supplement Number 1 / Biology of Reproduction / Volume 44



SSR

JULY 29-31, 1991 • 24th ANNUAL MEETING
UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
VANCOUVER

321 EFFECTS OF VANADIUM PENTOXIDE (V2O5) ON FETAL DEVELOPMENT OF MICE. M.A. Altamirano*, E. Koldán and L. Alvarez*
Lab. Reproductive Toxicology, Biology of Reproduction Research Unit, FNEP-Zaragoza, UAM, A.P. 0-020, México 15000 D.F., México

V2O5, a product of fossil fuel combustions, is the most toxic form of vanadium for animals. Since there are many environmental toxics which affect fetal development, it was decided to analyze the effects of V2O5 administration to pregnant mice, on foetuses viability and weight.

Pregnant female mice from the C57BL strain, were injected daily from day 6 to 15 of pregnancy, with V2O5, 11.9 mg/Kg, or saline. The animals were sacrificed on day 18, and the number of healthy foetuses and reabsorptions were recorded. The foetuses were weighed and inspected for the presence of malformations.

No differences in the number of implantations (control 9.6±2.2, treated 10.4±3.3) and reabsorptions (10/87 vs 30/192) were observed. The weight of foetuses in V2O5 treated mice was lower than in control ones (1.07±0.02 vs 1.62±0.05, 190.01 Student's t test). The number of fetal malformations was higher in treated animals (11/162 vs 1/77, 145.05, Chi square test). The frequency of fetal malformations was: shortening of forelimbs and hindlimbs 7/162; polydactyly 4/162; hemorrhagic areas 3/162; open eyes 3/162; others 3/162. Seventy-three foetuses from V2O5 treated mice were analyzed, stained with alizarine-S and inspected for skeletal abnormalities. Three out of 79 foetuses showed wavy ribs.

Present results show that V2O5 administration during pregnancy affects foetal growth and increases the incidence of fetal malformations.

Supported by DGFA 18-200209-UAM-ENZA.

322 SPECIFIC BINDING OF (3H) COCAINE TO HUMAN SPERMATOZOA. Ricardo A. Yzaguiré, Randall R. Odem* and Kenneth L. Pickett*, Department of Obstetrics and Gynecology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, 63110.


Exposure of males to cocaine has been increasingly linked to abnormal development of their offspring, but the mechanisms that mediate this phenomenon are unclear. To investigate the role of the sperm, this study examined the interaction of cocaine with human spermatozoa and its effect on their motility and viability. Washed human sperm were incubated with treated cocaine in the presence and absence of cocaine under varying assay conditions. The reactions were stopped by rapid vacuum filtration on glass fiber filters and the radioactivity was quantitated. It was found that (3H)-cocaine rapidly bound to human sperm, specifically and in a time-dependent manner. Using optimal incubation conditions it was determined that there are approximately 10^{10} cocaine-binding sites per cell. The binding had a dissociation constant (Kd) of 12.6 nM, which indicates high affinity receptor binding. The viability and motility of the sperm were assessed by light microscopy and swim tank tests and were found to be unaffected by concentrations of cocaine several-fold higher than those produced in vivo. These findings support the theory that the spermatozoa may transport cocaine into the ovum where it may consequently affect the development of the embryo.

323 ACUTE AND CHRONIC EFFECTS OF ORAL CHLOROTRIAZINE ADMINISTRATION ON RAT LUTRIOUS CYCLING ACTIVITY. J.C. Ebridge*, P.J. Estroff*, M.K. Tennant*, L.T. Wadsworth*, M.O. Tiedry*, C.B. Zecher* and J.T. Stevens*, Department of Physiology and Pharmacology, Bowman Gray School of Medicine, Winston-Salem, NC 27107 and *27103-0201 Division, CHA-GEIGY Corporation, Cincinnati, OH 27419.

Chlorotriazine acts in vitro on plant photosynthesis and copy widespread use as herbicides in the agricultural industry. Although the acute reproductive toxicity in animal systems, some studies have indicated that the compounds may interact with androgen (Knewald *et al.*, *J. Steroid Biochem.*, 1987) and estrogen (Eldridge *et al.*, *Endocrine Society Meeting*, 1991) receptor binding. The goal of the present studies was to determine the influence of orally administered Atrazine (ATR) and Simazine (SIM) on parameters of rat estrous (E) cycling activity. In acute studies, 2 weeks of oral ATR administration significantly disrupted E cycles, and also suppressed ovarian and uterine weights and plasma estradiol, in both Sprague-Dawley (SD) and Fisher 344 (F-344) rat strains. F-344 animals were the less adversely affected of the two levels. Oral SIM administration for 2 weeks produced similar results to those of ATR, but to a lesser degree. Serum corticosterone levels were significantly elevated by both ATR and SIM in both strains, but serum prolactin was not elevated by treatment. Prolonged oral ATR administration was associated, in a dose-related manner, with elongated E cycles and persistent estrus by 9 months of dosing, in SD but not F-344 rats. Long-term SIM feeding also induced a dose-related and time-related increase of estrus days, at the expense of diestrus days, in SD rats. Chronic SIM administration was significantly correlated with elevated plasma estradiol in SD rats and elevated plasma progesterone in F-344 rats. Prolactin levels were again not elevated by any treatment. Feeding indicated the acutely administered chlorotriazines induced significant alterations of normal rat E cycle activity. With prolonged feeding, the alteration resembled an acceleration of changes that normally occur during aging. In SD rats, this produced a greater number of days in estrus, but F-344 rats responded with an elevated accession of progesterone rather than estrus, and an increased number of estrus days. Because estrous response is known to penetrate the appearance of age-related constant estrus in rats (cf. Nafolin, *et al.*, *Biol. Reprod.*, 1990), it seems plausible that chronic chlorotriazine feeding may be capable of enhancing a premature senescence in the reproductive system of female Sprague-Dawley animals.

324 EARLY EXPOSURE TO DELTA-9-TETRAHYDROCANNABINOL (THC) AND DEVELOPMENT OF REPRODUCTIVE FUNCTION IN THE FEMALE RAT. P. S. Campbell and J. A. Swanson*, Department of Biological Sciences, The University of Alabama in Huntsville, AL.

Rats were exposed to 100 mg/kg of neonatally by subcutaneous injection of THC in pregnant rats [F0] to pregnant females daily during days 14-18 of gestation (20 mg/kg) or injecting newborn pups on day 1 or day 3 of life (2 mg/kg). Controls received an equal volume of the THC vehicle. Effects upon subsequent reproductive function were assessed in the postnatal rat by evaluating the following parameters: a) uterine growth response (estradiol bioassay), b) estradiol-stimulated glucose oxidation, c) estradiol negative and progesterone feedback (gonadotropin-releasing hormone and progesterone-induced ovulation in the neonate rat), d) hCG-induced superovulation, e) uterine decidual response, f) uterine, pituitary, hypothalamic, and adrenal gland weight, data were recorded. Biologically important differences were noted between control and THC-treated rats in any of the parameters listed above. Furthermore, early THC exposure did not appear to affect the behavior of females, induced by previous puberty by DM treatment. Thus, it is concluded that pharmacologic exposure to THC in utero or in infancy does not result in overt or subtle effects upon the female reproductive system that might compromise subsequent reproductive function. Based upon the neonate rat model used in this study, we predict that reproductive cycling, ovulation, estrus, the preparation of uterine endometrium for implantation, and placental maturation should not be impaired or affected by a consequence of maternal or juvenile THC exposure, supported by NIH Grant RR2261-01.



II CONGRESO NACIONAL DE
GENÉTICA
DEL 23 AL 27 DE SEPTIEMBRE DE 1991



SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro



CONACYT

EFFECTO DE LA CAFEINA SOBRE LA FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS Y EL CICLO CELULAR EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON PENTOXIDO DE VANADIO *in vitro*. Foidan, R.E. y Altamirano, L.M. Laboratorio de Citogenética y Mutagenesis, Campo-11, Bioterio, ENEP-ZARAGOZA, UNAM.

Resultados previos demostraron que el pentóxido de vanadio no incrementa la frecuencia de ICH *in vitro*, aunque sí altera el ciclo celular. Por otro lado diversos estudios han mostrado que la cafeína es capaz de interferir con el proceso de reparación del ADN, potencializando los efectos genotóxicos de otros agentes como las radiaciones y los agentes alquilantes. Debido a lo anterior en el presente trabajo se decidió estudiar el efecto de la cafeína sobre la inducción de ICH en cultivos de linfocitos humanos. En los cultivos tratados con vanadio (2.4 o 6 $\mu\text{g/ml}$) o cafeína (20 $\mu\text{g/ml}$) aplicada desde las 0, 24 o 48 horas) la frecuencia de ICH no se modificó con respecto al testigo. Cuando la cafeína se combinó con el vanadio los resultados obtenidos mostraron que al aplicar la cafeína a las 0 horas no modificó la frecuencia de ICH, sin embargo cuando la cafeína es aplicada a las 24 horas o a las 48 horas la frecuencia de ICH's en los tratamientos con vanadio 4 μg (7.64 \pm 0.59) para el primer caso y para vanadio 4 μg (7.60 \pm 0.46) y 6 μg (8.50 \pm 0.63) para el segundo caso se incrementa significativamente con respecto al testigo (5.88 \pm 0.21). A excepción del tratamiento con cafeína a las 48 horas (28.84 \pm 0.44; P:0.05 "t" de Student) y cafeína 48 horas más vanadio 4 μg (31.80 \pm 1.41; P:0.05 "t" de Student) la TPL no se modificó en ninguno de los otros casos al compararlos con el testigo (25.68 \pm 1.34).

ANÁLISIS DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y DE C-METAFASES EN RAICES DE Vicia faba EXPUESTAS A DIVERSOS TIPOS DE DETERGENTES Y A DICROMATO DE POTASIO. Ana Rosa Flores-Márquez, Rafael Villalobos-Pietrini y Sandra Gómez-Arroyo. Laboratorio de Citogenética y Mutagenesis Ambientales. Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, Coyoacán 04510 D.F. México.

Se ha demostrado que el cromo, especialmente en su forma hexavalente, produce efectos genotóxicos y por otro lado que los detergentes solubilizan las membranas biológicas. En los ríos donde hay descargas industriales existen mezclas de metales y surfactantes que afectan a los organismos que viven en ellos y en algunos casos se describen efectos más que aditivos. En este trabajo se evaluó el daño citogenético ocasionado por tres detergentes: alquil aril sulfato de sodio (aniónico, contenido en el detergente comercial roma), Tritón X-100 (no iónico) y E (mezcla de no-iónicos), así como también por dicromato de potasio y la mezcla de ambos en las células meristemáticas de la raíz de Vicia faba. Las raíces se expusieron a las diferentes sustancias en diversas concentraciones durante 4 horas y se dieron 2 horas de recuperación, posteriormente se tñieron con el reactivo de Schiff; el análisis de las alteraciones se efectuó en la etapa de anafase. En los resultados obtenidos con los detergentes no se notó incremento de las anafases anormales ni de las aberraciones cromosómicas observadas en los testigos, mientras que concentraciones de 5X10⁻⁷ ppm de dicromato de potasio las elevaron significativamente (P < 0.001), lo que también sucedió cuando se aplicó este compuesto con los tres surfactantes. Con respecto al daño provocado sobre el huso mitótico, que se manifestó como C-metafases, éstas se presentaron con el detergente E y también con la mezcla de los tres y el cromo. Los datos experimentales muestran que los detergentes no facilitaron la penetración del metal.

**"Mutagenic and Teratogenic Effects of Vanadium Pentoxide
on Mice in vivo"**

**Enviado a la revista ARCHIVES OF ENVIRONMENTAL HEALTH.
June 27, 1992**