

29
24



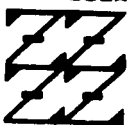
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

“GENOTOXICIDAD INDUCIDA In vitro POR SALES DE
VANADIO EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS
HUMANOS”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
JUAN JOSE RODRIGUEZ MERCADO

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUBIERON EN
SU NUESTRA COLECCION

DIRECTOR DE TESIS: M. en IBSH. ELIA ROLDAN REYES

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE 1995

FALLA DE ORIGEN



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.

**A MI MADRE, DOLORES MERCADO SALAS CON
INFINITA GRATITUD, RESPETO, CARIÑO Y TODO
MI AMOR.**

**A MIS HERMANOS Y SOBRINOS, Y A MI FAMILIA
CON RESPETO, APRECIO Y CARIÑO.**

**A MIS PROFESORES, A MIS COMPAÑEROS Y A
MIS AMIGOS, DE QUIENES TANTO HE
APRENDIDO.**

**EN MEMORIA DE QUIENES YA NO ESTÁN JUNTO
A MI.**

**EN DISTINTIVO A ALEJANDRA H. G., POR TODO LO COMPARTIDO.
"SOLO QUIERO QUE TE ENTERES DE ALGO UNA VEZ MÁS, TE AMO"**

Esta tesis fue realizada en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. En la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción (UIBR), dentro del Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, encabezado por Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano. Tesis dirigida por la M. en IBSH. Elia Roldán Reyes.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de la DGAPA como becario en el proyecto 1N-202593 en el periodo 1994-1995.

El asesoramiento estadístico (ANDEVA-Tukey) estuvo a cargo de la M. en C. María José Dos Santos.

ÍNDICE

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	
<i>Contaminación y su Impacto en la Salud</i>	1
<i>Genética Toxicológica</i>	3
<i>Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH's)</i>	6
<i>Metales</i>	9
<i>Vanadio (V)</i>	10
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODO	
<i>Compuestos Químicos</i>	25
<i>Cultivos</i>	25
<i>Tratamientos</i>	25
<i>Tinción Diferencial</i>	26
<i>Evaluaciones</i>	26
<i>Análisis Estadístico</i>	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS	49

RESUMEN

El vanadio es un elemento que se ha acumulado gradualmente en el ambiente y en los organismos, sus compuestos tienen actividad fisiológica cuando se presentan como V^{5+} , V^{4+} y V^{3+} . Se puede detectar en el aire, suelo y agua. Su amplio uso y liberación, ha recibido la atención como contaminante ambiental, y ha permitido clasificar a este metal y algunos de sus compuestos como peligrosos por su elevada capacidad toxicológica.

La información relacionada con la toxicidad de sus compuestos y en particular los de valencia $4+$ y $3+$ es limitada, por eso en el presente estudio se evaluó el efecto citotóxico y genotóxico de dos sales, el tetrafluoruro de vanadio y el tricloruro de vanadio (VF_4 y VCl_3), en cromosomas de linfocitos humanos expuestos *in vitro*.

Cuando los cultivos fueron tratados con 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$, ambas sales disminuyen el índice mitótico (IM). El VF_4 abate el IM de 1.80% del testigo a 1.23% y 1.13% en las concentraciones de 8 y 16 μg ($P < 0.05$), mientras que el VCl_3 lo modifica en todas sus aplicaciones de 2.18% de su testigo a 1.61% para 2 μg ($P < 0.05$), 1.37% para 4 μg , 1.35% para 8 μg y 1.08% para 16 μg ($P < 0.01$). Los resultados en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH's) por célula muestran un incremento en el grupo tratado con el VF_4 en las dosis de 2, 4, 8 y 16 μg con valores promedio de 5.88, 6.03, 5.93 y 6.12, respectivamente ($P < 0.05$ para 2 μg ; $P < 0.01$ para 4, 8 y 16 μg), en comparación a 5.33 del testigo, en tanto que el VCl_3 no modificó significativamente este parámetro y sin acentuar tampoco una diferencia en la distribución de ICH's para ambos compuestos. Además se observó que tanto el VF_4 como el VCl_3 alargan el tiempo promedio generacional (TPG) en las concentraciones de 8 y 16 μg con una diferencia en horas de 3.33 y 6.73 para el VF_4 y de 3.13 y 4.48 para el VCl_3 de acuerdo a cada concentración y comparado con su testigo, de manera que sólo el VF_4 en la dosis más alta resultó significativo ($P < 0.01$). Con respecto a la respuesta dosis-efecto no se observó una correlación lineal, para ambos compuestos en ninguno de los parámetros evaluados. Estos resultados indican que las sales de vanadio tetravalente y trivalente son citotóxicas y modifican el proceso normal de división celular, y el vanadio en forma de VF_4 puede ser considerado como un agente potencialmente genotóxico.

INTRODUCCIÓN

Contaminación y su Impacto en la Salud.

Las constantes emisiones de sustancias y partículas liberadas sobre el ambiente, por la gran actividad antropogénica y el uso de combustibles como fuente de energía en la vida cotidiana y en la industria, así como sus residuos sólidos, líquidos o gaseosos, y en menor grado la actividad microbiana y en general la natural, inducen a que muchos compuestos rebasen el límite tolerable sobre los ecosistemas convirtiéndose en contaminantes ambientales.

Actualmente la interacción de estos contaminantes, los cuales pueden pertenecer a diversos agentes biológicos, físicos y sustancias químicas, con la flora y fauna, y en particular con el humano, ha adquirido una gran importancia en el terreno de la salud, debido a que numerosas investigaciones ponen en evidencia una gran cantidad de sustancias que son tóxicas y producen daño en los organismos.

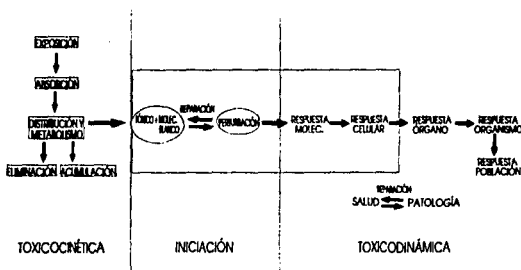
Algunos de los daños causados por contaminantes ambientales son: efectos teratogénicos, carcinogénicos y mutagénicos, afecciones que inciden en la reproducción, en el sistema nervioso, aparato respiratorio, tejido tegumentario, sistema urogenital y sistema cardiovascular, además de provocar abortos espontáneos, muerte fetal, muerte neonatal y anormalidades en el desarrollo. Entre los agentes que pueden causar este tipo de alteraciones tenemos a los plaguicidas, asbestos, benceno, arsénico, hidrocarburos, metales pesados, luz ultravioleta y micotoxinas, etc., como los de mayor incidencia en las poblaciones humanas (Bravo, 1987; Friberg & Nordberg, 1986; Ortiz Monasterios et al., 1987).

De acuerdo a la naturaleza del contaminante, las sustancias tóxicas al contacto con los organismos pasan por un proceso toxicológico. En los organismos superiores éste proceso principia con la exposición a un agente, delimitado por la ruta de ingreso inmediata al interior ya sea vía respiratoria, gastrointestinal o por piel y mucosas. Seguida por la absorción, que equivale al paso del agente a través de las membranas celulares (favorecida por la solubilidad de las sustancias en los lípidos y fluidos celulares) y a la circulación sistémica, donde se puede unir a células y/o proteínas sanguíneas y distribuirse a los tejidos corporales por la circulación tisular,

donde puede ser metabolizado y/o biotransformado, para de esta manera tender a una acumulación en un tejido u órgano específico, y finalizar con la eliminación de la sustancia (Duffus, 1983; Ortiz Monasterios et al., 1987; Frazier, 1992).

Las sustancias metabolizadas, pueden formar metabolitos cuyos efectos dañinos pueden ser minimizados, o bien, pueden convertirse en productos altamente tóxicos que a su vez tienen la capacidad de interactuar con alguna molécula blanco y ocasionar una perturbación, la cual puede ser reparada o irreversible. La reacción entre las macromoléculas y el tóxico fijan una secuencia de eventos que inicia con una respuesta molecular, celular, de órganos, de organismo y hasta de una de población (Figura 1) (Frazier, 1992).

FIGURA 1. PROCESO TOXICOLÓGICO.



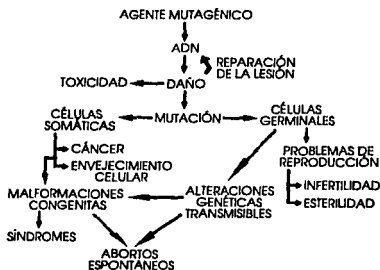
Frazier, 1992

Particularmente en el humano varios agentes son potencialmente tóxicos y pueden producir lesiones en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Si la lesión es visible (macrolesiones) puede determinarse mediante el análisis citogenético de los cromosomas, y si es no visible (microlesiones), el cual ocurre a nivel de nucleótidos por una sustitución, adición, delección o algún cambio en la secuencia lineal de pares de bases, puede determinarse por análisis bioquímicos y moleculares (Brusick, 1984; Brusick, 1987). Sin embargo, todas las células desde procariontes hasta eucariontes tienen la capacidad de reparar el daño causado en el ADN por los agentes

biológicos, físicos o químicos (Zambrano, 1982; Brusick, 1984), pero si la lesión se fija, se produce una mutación que altera el orden correcto de las bases y conduce a una deficiencia en la lectura de la información y a una incorrecta expresión de las características individuales (Brusick, 1984; Altamirano, 1992).

Las mutaciones si no son reparadas se transmiten a las generaciones subsecuentes durante la división celular, y si son letales, producen la muerte celular y/o del organismo. Si la mutación ocurre en células somáticas la alteración puede manifestarse como envejecimiento celular, cáncer o malformaciones congénitas, que pueden ser o no compatibles con la vida y conducir a abortos espontáneos, y si ocurre en células germinales, el daño generalmente se manifiesta en la descendencia con la aparición de enfermedades hereditarias, malformaciones congénitas, abortos espontáneos y problemas en la reproducción (Figura 2) (Brusick, 1984; Brusick, 1987; Altamirano, 1992).

FIGURA 2. POSIBLES CONSECUENCIAS DE DAÑO AL ADN.



Altamirano, 1992

Genética Toxicológica.

La importancia de elucidar el daño que puedan causar los agentes ambientales sobre el ADN, y las consecuencias derivadas para el futuro inmediato de las células y en general de la

especie, es estudiado por la Genética Toxicológica (Moutschen, 1985; Brusick, 1987). El hecho de que la naturaleza del material genético sea esencialmente la misma en todos los organismos, ha permitido el uso de modelos biológicos de prueba para obtener información del potencial mutagénico y carcinogénico que puedan tener dichos agentes, para de esta manera dar un parámetro de evaluación de riesgo a las poblaciones humanas (Prival, 1980; Hoffman, 1981; Moutschen, 1985).

Los modelos biológicos son numerosos, abarcan una gran diversidad de organismos, se utilizan desde una célula, un órgano o sistema hasta el organismo completo. Según Moutschen (1985), en base a su potencial y tipo de daño, que sean capaces de expresar en el material genético, los modelos se separan en cuatro grupos:

Grupo I: Son pruebas diseñadas para detectar lesiones en el ADN a nivel molecular. Permiten clasificar a los agentes como mutágenos potenciales .

Grupo II: Pruebas que detectan mutaciones a nivel celular, de manera directa o indirecta, ya sea *in vivo* o *in vitro*.

Grupo III: Incluye todos aquellos sistemas que permiten estimar el daño causado sobre los cromosomas, efectos mutagénicos y clastogénicos, ya sea *in vivo* o *in vitro*.

Grupo IV: Son sistemas a largo plazo que permiten observar el efecto en los organismos completos y en su descendencia.

Entre los diferentes sistemas de prueba utilizados, los sistemas *in vitro* ocupan el eje central en el proceso toxicológico (indicado por el recuadro en la figura 1) (Frazier, 1992). Las fallas en los componentes moleculares y celulares, pueden ser estudiados con sistemas ideales como el cultivo de células de mamífero, en donde se pueden evaluar efectos citogenéticos de sustancias químicas de actividad mutagénica o carcinogénica (Maher & McCormick, 1982; Natarajan & Obe, 1982).

De los sistemas *in vitro*, los linfocitos humanos son uno de los más usados tanto para estudios citogenéticos como estudios de diagnóstico genético clínico (Lerner & Dixon, 1973), y por las bondades que presentan al cultivo al ser estimulados con un mitógeno como la fitohemaglutinina (mucoproteína de origen vegetal, PHA-M) (Natarajan & Obe, 1982; Klein, 1990).

Los linfocitos son parte del sistema hematopoyético. Inmunológicamente, nacen a partir de una célula pluripotencial proveniente de la médula ósea, la cual da origen a dos linajes, la línea de células linfoides y la de células mieloides. La línea linfóide origina a los linfocitos tipo T (timo-dependientes), responsables de la inmunidad celular, a los linfocitos tipo B (dependientes de la médula ósea) responsables de la inmunidad humoral y a las células asesinas de defensa tumoral o viral. La línea mielóide origina a los neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y plaquetas (Boggs & Winkelstein, 1985; Abbas et al., 1991; Burrell et al., 1992).

En individuos normales la concentración de linfocitos por mm^3 varía con respecto a la edad. En adultos de 21 años se estima que el promedio de linfocitos en sangre periférica es de $2500/\text{mm}^3$, con valores máximos en recién nacidos que es más del doble, $5500/\text{mm}^3$, y en niños que es superior a $7300/\text{mm}^3$ (Natarajan & Obe, 1982; Boggs & Winkelstein, 1985; Carrano & Natarajan, 1988). En adultos, cerca del 60-70% de los linfocitos son de tipo T y del 10-15% pertenecen al tipo B (Carrano & Natarajan, 1988), con aproximadamente 10^{12} linfocitos totales y una tasa de producción de 10^9 linfocitos generados en la médula ósea y cerca del mismo número de linfocitos muertos día a día (Klein, 1990).

Para la evaluación de mutágenos, el sistema *in vitro* de linfocitos humanos ofrece grandes ventajas como: representan una parte del cuerpo en exposición; el núcleo ocupa el 90% del volumen celular; presentan una vida media de 2-4 años, lo que permite observar lesiones en su ADN por exposiciones crónicas a bajas dosis (Latt et al., 1981; Carrano & Moore, 1982; Natarajan & Obe, 1982; Boggs & Winkelstein, 1985; Klein, 1990); presentan una actividad de reparación baja en comparación con otras que ciclan normalmente; la mayoría de los linfocitos están en fase de G_0 del ciclo celular, y en cultivo estimulados con un mitógeno con o sin activación metabólica, permite analizar aberraciones cromosómicas de G_0 ó G_1 y aberraciones cromatídicas de S ó G₂ del ciclo celular, intercambio de cromátidas hermanas (ICH's), cinética de ciclo celular (CCC) y

asociaciones de satélites en células en mitosis, y micronúcleos en células en interfase (Latt et al., 1981; Ivett & Tice, 1982; Natarajan & Obe, 1982; Moutschen, 1985; Carrano & Natarajan 1988), así como modificaciones en número de células que pasan por mitosis (Sharma & Talukder, 1987), mutaciones puntuales e infidelidad en la síntesis de ADN (Prival, 1980; Natarajan & Obe, 1982; Moutschen, 1985).

De los parámetros arriba mencionados, uno de los más empleados para detectar daño en los cromosomas es el intercambio de cromátidas hermanas, los cuales pueden ser observados mediante la técnica de tinción diferencial, en cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica, por ser un indicador altamente sensible para estimar daño inducido al ADN por los agentes químicos y su posible impacto biológico en el hombre.

Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH's).

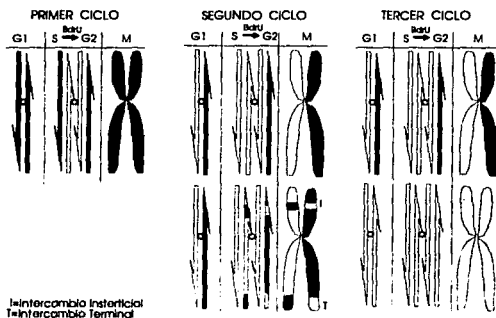
Como su nombre lo indica, los intercambios de cromátidas hermanas (ICH's) son transposiciones simétricas y equivalentes del ADN entre las cromátidas de un mismo cromosoma, involucran rupturas de doble cadena en locus homólogos de ambas cromátidas con su posterior unión y reparación, las rupturas tienen una nueva localización dentro del cromosoma en las que se mantienen su polaridad sin alterar la morfología cromosómica (Taylor, 1958; Latt, 1979; Latt et al., 1981; Mudry et al., 1981; WHO, 1985).

La ocurrencia de este fenómeno, fue reportada después de tener las primeras evidencias de la estructura molecular del ADN propuesta por Watson y Crick (1953). Taylor (1958), demostró que las células en cultivo de *Bellevalia romana* mediante el análisis autorradiográfico en presencia de timidina tritiada (^3HdT) durante el primero de dos ciclos de replicación continuos, sólo una de las cromátidas se marcaba y que además había intercambios de segmentos entre las cromátidas hermanas. Sin embargo, a causa de la poca resolución de los métodos autorradiográficos y la necesidad de un análisis inequívoco, se encaminó a implementar nuevas técnicas. En la década de los 70's se describieron técnicas basadas en la incorporación de un análogo de base como lo es la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), la cual sustituye a la timina dentro del ADN y, revelados ya sea por el método de fluorocromo Hoechst 33258 (Latt, 1973), por combinación de fluorescencia más Giemsa (Wolff & Perry, 1974) o únicamente con Giemsa. Así el patrón de tinción diferencial

obtenido, nos permite detectar los ICH's sin el uso de isótopos radiactivos tanto en sistemas *in vitro* como sistemas *in vivo* (Latt, 1973; Latt, 1974; Wolff & Perry, 1974; Morales, 1980; Latt et al., 1981; Perry & Thomsom, 1984).

Actualmente la técnica empleada en el cultivo de linfocitos humanos, consiste en la aplicación de BrdU durante al menos dos ciclos de síntesis y división, revelado por fotólisis con luz ultravioleta y teñidos con Giemsa (Altamirano, 1987). De la misma manera las células que incorporen BrdU por un primer ciclo de síntesis, quedaran con cromátidas monofilamente sustituidas y presentaran cromosomas con una tinción homogénea de color oscuro, mientras las que pasen por un segundo ciclo de replicación, contendran una cromátida monofilamente sustituida y otra bifilamente sustituida, sus cromosomas presentaran la tinción diferencial de cromátidas hermanas, con la primera cromátida oscura y la siguiente clara, y en donde pueden observarse o no los ICH's (Figura 3) (Perry & Wolff, 1974). Las células que pasan por un tercer

FIGURA 3. INCORPORACIÓN DE BrdU EN LA TINCIÓN DIFERENCIAL DE CROMÁTIDAS HERMANAS CON INTERCAMBIOS.



ciclo (o más) de división, contendrán en parte cromosomas idénticos a los de segundo ciclo y cromosomas con cromátidas bifilarmente sustituidas y/o con segmentos monofilamente sustituidos, con una tinción en gran parte clara y/o segmentos oscuros (Schvatzman & Tice, 1982) que expresan un cambio entre las cromátidas (Figura 3). El origen de los cambios en células que pasan por tres o más ciclos se puede precisar también, y consiste en la incorporación de BrdU aplicada en diferentes tiempos (Morales, 1988).

El revelado de la tinción diferencial permite evaluar aspectos genotóxicos expresados como ICH's, así como también, determinar los efectos citostáticos y citotóxicos (tiempo promedio generacional TPG, cinética de ciclo celular CCC), de los agentes químicos a partir del análisis de células en primera, segunda y tercera o sucesivas divisiones (Ivett & Tice, 1982).

Los ICH's son inducidos por sustancias que forman puentes covalentes con el ADN o precursores metabólicos o de reparación que interfieren con el material genético. (WHO, 1985). Son formados durante la fase de síntesis "S" (Wolff et al., 1974), y se producen durante o inmediatamente después de que se ha formado la horquilla de replicación del ADN (Kato, 1980), la frecuencia de aparición de los ICH's se incrementa en S y decrece rápidamente conforme progresa este período (Schvatzman & Gutiérrez, 1980). Se sugiere que la síntesis del ADN sigue el modelo de replicación semiconservativa e involucra cambios de doble hebra de ADN (Latt, 1973; Latt & Schreck, 1980), la unión de las sub-unidades cromatídicas no es al azar por lo que se mantiene su polaridad en el proceso de cambio (Kato, 1977; WHO, 1985).

El promedio de inducción de los ICH's difiere del de mutaciones, por cada agente, se sugiere que cada tipo de lesión formada es procesada de diferente manera por la célula, una formando ICH's u otra formando mutaciones (WHO, 1985), o que la lesión esté formando una mutación y después las mutaciones formen ICH's (Schvatzman & Gutiérrez, 1980; WHO; 1985).

El mecanismo de intercambio aún no es conocido, pero, se sabe que pueden ocurrir en forma espontánea independiente del sistema de prueba usado (Kato, 1974; Tice & Schneider, 1976; Gutiérrez et al., 1983), además de que no hay una correlación entre la localización de ICH's y de los agrupamientos de bases adenina-timina (A-T) en los cuales existe una mayor incorporación de BrdU por lo que su distribución es más al azar que selectiva (Thus & Ronne, 1982).

Los valores basales de ICH's son diferentes respecto al sistema empleado, dependen directamente del tipo celular, de las condiciones del medio, la realización del experimento ya sea *in vivo* o *in vitro*, el tamaño del genoma, la presencia de virus, de la concentración y forma de administración de la BrdU (Kato, 1974; Tice & Schneider, 1976; Kato, 1977; Gutiérrez et al., 1983; Schwartzman & Tice 1982; Perry & Thomson, 1984). En poblaciones humanas los valores espontáneos de ICH's en linfocitos dependen además de la edad, el sexo, la raza y el estilo de vida (Waksvik et al., 1981; Margolin & Shelby, 1985).

Los ICH's son muy útiles para evaluar agentes genotóxicos puesto que: se utilizan concentraciones de 10-100 veces menores que las usadas para detectar aberraciones cromosómicas, detectan agentes que producen aductos en el ADN, se pueden emplear tanto en células somáticas como germinales, requiere o no activación metabólica por lo que puede usarse tanto *in vivo* como *in vitro*, el conteo es relativamente rápido y se puede usar en el monitoreo de agentes genotóxicos ambientales en una gran variedad de organismos (Latt, 1974; Latt et al., 1981; Perry & Thomson, 1984; WHO, 1985).

Metales.

De los 109 elementos químicos cerca de 80 son considerados como metales. Los metales se definen de acuerdo a sus propiedades físicas en estado sólido, como la reflexión, conductividad eléctrica, conductividad térmica, sus propiedades mecánicas, magnéticas y su estructura cristalina (Vercruyse, 1984; Vouk, 1986). Sus propiedades químicas dependen de su configuración electrónica que origina diferentes estados de oxidación, los cuales le permiten formar una gran variedad de compuestos, entre los que encontramos compuestos inorgánicos (p.e. sales), orgánicos y complejos (Vouk, 1986).

Entre las propiedades químicas de más importancia tenemos la solubilidad y densidad. Desde el punto de vista toxicológico, la solubilidad de los compuestos metálicos esta en relación a la presencia de iones H^+ en los solventes que generalmente son agua, lípidos u otro tipo de fluido biológico, que transportan los iones y favorecen la absorción de estos elementos en los tejidos (Duffus 1983; Vercruyse, 1984; Vouk, 1986). De acuerdo a su densidad los metales se clasifican

en pesados y ligeros, los pesados son elementos cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor a la del agua, es decir mayor a 5 g/cm^3 , mientras los ligeros presentan densidades menores (Duffus, 1983; Bolaños, 1990).

Muchos metales son esenciales para efectuar funciones bioquímicas y fisiológicas vitales, formando generalmente complejos con otras moléculas. Por ejemplo, el magnesio en la molécula de clorofila, el cobalto en la molécula de la cianocobalamina (vitamina B12), el zinc y el cobre en las metaloenzimas que incorporan uno o más átomos de estos elementos en su estructura (Lenhinger, 1980; Vouk, 1986), o el vanadio necesario para la fijación de nitrógeno en bacterias *Azotobacter sp.* (Rehder, 1991). Sin embargo, un gran número de metales y en particular los metales pesados son considerados como los de mayor probabilidad de causar daño conforme a sus propiedades, tanto para la Agencia de Protección Ambiental (EPA), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), como por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y entre los que figuran el cobre, cadmio, mercurio, zinc, estaño, arsénico, plomo, vanadio, litio, selenio, telurio, cromo, molibdeno, magnesio, cobalto, y níquel, ya que la mayoría en ciertas concentraciones son tóxicos (Ortiz Monasterios et al., 1987; Sharma & Talukder, 1987; Bolaños, 1990; Friber & Nordberg, 1986).

Vanadio (V).

Uno de los metales que se ha acumulado gradualmente en el ambiente y en los organismos es el vanadio. Su amplio uso y liberación ha recibido la atención como contaminante ambiental, y por su elevado potencial toxicológico ha sido considerado como peligroso (Baroch, 1983; Phillips et al., 1983; Lagerkvist et al., 1986; Carson et al., 1987; Alessio et al., 1988; Elinder et al., 1988; WHO, 1988; Léonard & Gerber, 1993).

El vanadio es miembro del grupo V-B y primer elemento de la serie de transición de la tabla periódica, seguido del niobio y el tántalo. Es un metal de color grisáceo, con densidad de 6.11 g/cm^3 (Baroch, 1983), ocurre en dos formas en la naturaleza como isótopo ^{50}V y ^{51}V , sus estados de oxidación van de V^- , V^0 , V^{2+} , V^{3+} , V^{4+} y V^{5+} , de estos, los tres últimos son los más comunes y el V^{4+} es su forma más estable y el V^{3+} en forma de sales es fuertemente reductor. Se disuelve en

agua, ácidos y forma vanadatos con bases (Lagerkvist et al., 1986; Carson et al., 1987; WHO, 1988).

El vanadio se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre con una abundancia de 0.014% (Rehder, 1991), y con cerca de 0.07% en la litósfera. Se conocen cerca de 70 aleaciones con otros metales principalmente con hierro, uranio, titanio y aluminio. Se encuentra formando parte de materiales de tipo fósil, en roca bituminosa, en sedimentos de roca caliza, en minerales como roscoelita, vanadita, descolozita, cuprodescolozita, carnotita y titanferromagnetita (Baroch, 1983; WHO, 1988).

Entre los usos de vanadio, encontramos que en la metalurgia del hierro de un 75 a 85% es usado como aditivo en aleaciones en varios tipos de acero. En la industria química orgánica e inorgánica, es usado como catalizador, donde el pentóxido de vanadio y los metavanadatos son de importancia especial en la producción de ácido sulfúrico, plásticos y en la oxidación de compuestos orgánicos (Stokinger, 1981; Baroch, 1983; Carson et al., 1987; WHO, 1988).

Se utiliza en la preparación de vidrio, de barnices, esmaltes para porcelana y alfarería. Es usado en la producción de lacas, pinturas, reveladores, sensibilizadores, agentes colorantes en fotografía y cinematografía, como mordiente en la coloración e impresión de algodón, para fijar anilina negra sobre la seda y en la elaboración de fungicidas e insecticidas. Es importante en la industria de la energía atómica, como moderador de neutrones en reactores atómicos, y en la construcción de maquinaria aérea, tecnología espacial (Stokinger, 1981; Baroch, 1983; Carson et al., 1987; WHO, 1988) y como elemento en materiales de super-conductividad (Kawai et al., 1989), así como también, es empleado en menor cantidad en otras industrias.

Recientemente el uso del vanadio se ha extendido. En la medicina ha adquirido una importancia en la aplicación terapéutica en el control de la diabetes tipo I (Heylinger, et al., 1985; Mongold, et al., 1990), por su semejanza con el mecanismo de la insulina en la que se obtiene un mejoramiento en la homeostasis de la glucosa (Brichard et al., 1988; Strout et al., 1989).

Es un elemento traza esencial, importante en el metabolismo del hueso, cartilago y en el proceso de crecimiento de mamíferos y aves. Juega un papel importante en la nutrición de varias formas de vida, y a pesar de que no existen datos de alteraciones producidas por deficiencia en humano, se piensa que puede estar involucrado en la regulación de procesos fisiológicos por su gran actividad bioquímica y farmacológica (Phillips *et al.*, 1982; Sabbioni *et al.*, 1983; Canalis, 1985; French & Jones 1993). Es necesario en elevadas concentraciones para el crecimiento, desarrollo y reproducción de organismos marinos de género *Ascidias sp.* y de setas terrestres del género *Amanita sp.*, e indispensable para las plantas verdes dentro de la producción de oxígeno en la fotosíntesis I y en la catálisis enzimática para la síntesis de clorofila II. Se acumula en grandes cantidades en haloperoxidasas, enzimas vanadio-dependientes y fisiológicamente activas en líquenes, algas y bacterias (Rehder, 1991; Michibata *et al.*, 1992).

Desde el punto de vista de contaminación ambiental, se ha estimado que cerca de 280 toneladas de vanadio son emitidas anualmente al medio. De las cuales 70 toneladas son de origen natural (erosión y emisiones volcánicas), 100 toneladas emitidas por la industria y 110 por la quema de combustible fósil (petróleo y carbón) y de algunos de sus productos (aceites) (Léonard & Gerber, 1994). Los principales países productores de vanadio en orden de importancia son: África del Sur, Ex-Unión de Repúblicas Sovieticas Socialistas, Estados Unidos de Norte América, Finlandia, China y Australia, con un consumo anual de 2.9×10^4 toneladas métricas en todo el mundo (Baroch, 1983; Léonard & Gerber, 1994).

La concentración de vanadio en el ambiente depende de la posición geográfica, el grado de urbanización y estación del año. En aire la concentración va de 0.5 a 24 ng/m^3 , detectandose valores de hasta 75 ng/m^3 en áreas rurales, mientras que en áreas urbanas superan los 450 ng/m^3 , de los cuales se considera que la industria de la metalurgia es la que libera más vanadio a la atmósfera con 30 kg de vanadio por tonelada de vanadio producida. Estudios en diferentes suelos muestran que las concentraciones varían en un espacio de 5 a 140 mg/kg y en suelos contaminados con cenizas alcanzan valores arriba de 400 mg/kg . En agua para beber se reportan valores promedio de 4.3 $\mu\text{g}/\text{l}$ con un máximo que no rebasa los 10 $\mu\text{g}/\text{l}$ (Phillips *et al.*, 1983; Lagerkvist *et al.*, 1986; WHO, 1988).

La cantidad de vanadio en plantas dependen de las concentraciones en el suelo. En alimentos se encuentra generalmente en estado de V^{4+} y V^{3+} . Algunos alimentos ricos en vanadio son setas, perejil y eneldo, otros como las frutas frescas, bebidas, cereales y productos del mar contienen cantidades más bajas. En alimentos refinados las cantidades detectables aumentan notablemente, la leche de vaca contiene un promedio de 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y la leche en polvo supera los 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, los granos de trigo contienen 3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y trigo procesado en harina alcanza los 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tabla 1) (WHO, 1988; Roldán, 1992; French & Jones, 1993).

TABLA 1. CONCENTRACIONES DE VANADIO EN ALGUNOS ALIMENTOS
($\mu\text{g}/\text{kg}$ peso húmedo).

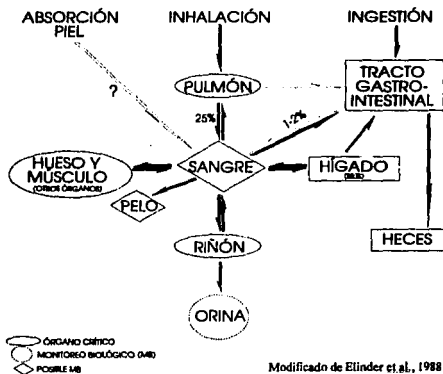
Setas	2000.0 (p. seco)
Fécula	33.0
Arroz blanco	12.3 - 21.0
Cereales	93.0
Fresa	31.4 (p. seco)
Rábano	52.0
Lechuga	21.0
Perejil	790.0; 1800.0 (p. seco)
Eneldo	40.0 - 431.0
Pollo y pescado	1.7 - 38.0
Langosta	5.0 - 43.0
Bacalao	28.0
Cerveza	3.2 - 11.0
Vino	3.2 - 11.0
Crema de cacahuete	44.0
Leche	1.1
Leche en polvo	25.0 (p. seco)
Huevo	0.2 - 3.6
Trigo	3.6
Harina de trigo	40.0 (p. seco)
Papas	1.0 - 6.0

Modificado de: WHO, 1988; Roldán, 1992; French & Jones, 1993.

El vanadio puede penetrar en los tejidos del cuerpo por dos vías, ya mencionados, el medio y la dieta. El medio incluye la absorción cutánea y transpulmonar la cual contribuye a la mayor parte de entrada, y en la dieta la ruta de absorción es por medio de la ingesta de nutrientes esenciales.

La cantidad de vanadio que se absorbe por piel o vía pulmón es directamente proporcional a la concentración en el ambiente. Se estima que cerca de 25% del vanadio soluble e inhalado se absorbe a través de pulmón, y del 5 a 10% de vanadio ingerido se absorbe por el tracto gastrointestinal, aun que algunos autores sugieren que es el 1 a 2% y el restante es eliminado con las heces (Figura 4) (Elinder et al., 1988; French & Jones, 1993).

FIGURA 4. CINÉTICA DEL VANADIO.



El metabolismo del vanadio no está del todo claro, se sabe que el tamaño de la partícula y la solubilidad de sus compuestos determinan la entrada al organismo y que tiempo después de la absorción se puede encontrar distribuido uniformemente en la mayoría de los tejidos blandos y en sitios blanco de almacenamiento a largo plazo como hueso, músculo y pulmón (Figura 4, Tabla 2) (Sharma et al., 1987; Alessio et al., 1988; Elinder et al., 1988; French & Jones 1993).

El vanadio absorbido es transportado en el suero unido a la albúmina y más eficientemente a la transferrina: los órganos blanco inmediatos de gran acumulación son hígado, riñón y hueso. La disminución de este elemento en sangre y tejido graso se debe a que es rápidamente transferido a

los sitios de almacenamiento y el resto excretado por la bilis, el pelo y principalmente por la orina (Figura 4, Tabla 2) (Byrne & Kosta 1978; Sharma et al., 1987; Elinder et al., 1988; Rehdner, 1991; French & Jones, 1993). Además la cantidad que se acumula no se ve afectada por la valencia de sus compuestos ni por el ion acompañante (Witkowska et al., 1986; Sharma et al., 1987).

TABLA 2. NIVELES DE VANADIO EN TEJIDOS BLANCO
(peso húmedo).

Nivel relativo	Humano ⁽¹⁾ (0.4-40 µg/kg)	Diferentes mamíferos ⁽²⁾ (1-40 µg/g)	Rata ^(3) 4** 5**) *(1-2194 ng/g) **(0.01-14 µg/g)
Alto	Pulmón/Hígado Riñón Cerebro Tiroides Corazón Músculo Grasa	Hueso Riñón Pulmón Hígado Músculo esquelético Plasma Corazón Grasa	Hueso Riñón corteza Riñón médula Hígado/Pulmón Bazo Músculo Testículo Corazón Sangre/Plasma Cerebro
Bajo		Médula ósea	

Elaborado de: (1) Byrne & Kosta, 1978; (2) Myron et al., 1977; (3) Bogden et al., 1982;
(4) Sharma et al., 1987; (5) Mongold et al., 1990.

Se ha demostrado ampliamente que el vanadio pentavalente (vanadato, VO_3^-) es reducido en el interior de la célula, *in vitro* e *in vivo*, a su estado tetravalente (como vanadilo, VO^{2+}). La reducción del vanadato se lleva acabo por el glutatión y en menor grado por otros agentes como el ácido ascorbico, el equilibrio entre ambos ($\text{VO}_3^- = \text{VO}^{2+}$) esta en relación al potencial de óxido reducción intracelular que a su vez se determina por el potencial de óxido reducción del glutatión y de los otros agentes (Sakurai et al., 1980; Nechay et al., 1986; Rehdner, 1991; Sakurai, 1994).

Se piensa que las uniones de átomos alrededor de vanadio en su estado reducido son oxígenos, característica que le permite unirse primordialmente a los fosfatos (ATP, ADP, AMP, CP y P_j), proteínas como transferrina (lactotransferrina en leche y ovotransferrina en huevo), albúmina y ferritina, así como carbopeptidasas y anhidrasa carbónica, en las que puede almacenarse temporalmente, o bien unirse a vitaminas (Sakurai et al., 1980; Nechay et al., 1986;

Rehder, 1991). La preferencia del vanadilo por los ligandos intracelulares, predominantemente los fosfatos, es un factor de entrada del vanadato a la célula (Nechay *et al.*, 1986).

Por otro lado el vanadio divalente puede oxidarse a estado trivalente o tetravalente por la transferencia de 1 ó 2 electrones en forma paralela por cistina (Kalatzis *et al.*, 1988) y el vanadio trivalente como sales puede reducir lentamente la molécula de agua y liberar iones H^+ y producir así vanadio tetravalente (Migliore *et al.*, 1993), además la presencia de oxígeno libre en sangre puede reoxidar parte de vanadilo a vanadato (Carns *et al.*, 1990).

La toxicidad del vanadio depende de la ruta de entrada, absorción, distribución y solubilidad de sus compuestos. Sus sales son las más usadas y las menos tóxicas, la dosis letal media (DL_{50}) en ratón es de 130 $\mu\text{g/g}$ para el trióxido de vanadio (V_2O_3), de 23 $\mu\text{g/g}$ para el tricloruro (VCl_3) y el pentóxido de vanadio (V_2O_5) y de 95.4 y 36.33 $\mu\text{g/g}$ para el sulfato de vanadilo (VSO_5) y el metavanadato de sodio ($NaVO_3$) respectivamente, mientras que la concentración tóxica media (CT_{50}) en células de hámster Chino del trióxido de vanadio, sulfato de vanadilo y metavanadato de amonio (NH_4VO_3) es de 25, 23 y 16 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Jones & Basinger 1983; Carson *et al.*, 1987; WHO, 1988; Owusu Yan *et al.*, 1990; Léonard & Gerber, 1994).

Algunos estudios reportan envenenamiento en roedores por vanadio trivalente (V_2O_3 y VCl_3) y pentavalente (V_2O_5 y NH_4VO_3) por inhalación o administración oral, con cambios en la concentración de albúmina, globulina, cloro sanguíneo y en los aminoácidos cisteína, arginina e histidina; irritación en mucosa intestinal, sangrados nasales, abscesos pulmonares, bronconeumonía, congestión capilar, pequeñas hemorragias internas, necrosis celular de hígado y efectos neurofisiológicos en conejo y perros (WHO, 1988). Otros estudios mostraron que el vanadio tetravalente (VSO_5) está relacionado con la aparición de tumores benignos y malignos en pulmón, hígado, y glándula mamaria de ratón (Stokinger, 1981). *In vitro* óxidos de vanadio alteran la integridad y función de macrófagos alveolares de conejos e incrementan su toxicidad conforme a la valencia de los compuestos ($V_2O_5 > V_2O_3 > VO_2$) (Waters *et al.*, 1974).

Personas expuestas a óxidos y otro tipo de sales en el ambiente laboral presentan irritación en ojos, nariz, mucosa oral, piel, y enfermedades como dermatitis, conjuntivitis, tos y bronquitis

crónica, bronconeumonía, traqueobronquitis, bronquiectasia, rinitis, laringitis, asma y enfisema, así como también anemia y necrosis pulmonar (Lagerkvist *et al.*, 1981; Carson *et al.*, 1987; WHO, 1988).

Son pocos los reportes de los efectos causados por los compuestos de vanadio sobre la reproducción. En ratas, el metavanadato reduce los niveles de glutatión en hígado y en testículo, e incrementa gradualmente la peroxidación de lípidos de ambos tejidos, efecto que se ve contrastado con la administración de α -tocoferol (vitamina E) (Sheriff, 1991). Por su parte el ortovanadato (Na_2VO_4) mostró inhibir la inducción de la hormona luteinizante por la acción del AMPc *in vitro* y el pentóxido de vanadio en ratas recién nacidas y hembras prepubescentes es capaz de incrementar el peso de vesículas seminales, de las glándulas submandibulares y del timo (Altamirano *et al.*, 1991), así como al administrarlo en machos incrementa la mortalidad espermática y en hembras preñadas se acumula en placenta y glándula mamaria (WHO, 1988).

Los efectos embriotóxicos, fetotóxicos y de toxicidad materna inducidos por este elemento y sus diferentes compuestos (NaVO_3 , V_2O_5 , NH_4VO_3 y VSO_3) son muy similares. Estudios en ratón, rata, hámster y cerdo por administración intraperitoneal u oral reportan, una disminución del peso fetal e incremento en el número de reabsorciones, muerte fetal y en la incidencia de paladar hendido y micrognatia, aumento en el porcentaje de fetos con dedos cortos, alteraciones en la osificación de la esternea y de las extremidades y lesiones en el sistema nervioso central (Villalobos, 1987; Gómez *et al.*, 1992; Bosque *et al.*, 1993; Altamirano *et al.*, 1993; Léonard & Gerber, 1994).

Bioquímicamente, se ha comprobado que el vanadio pentavalente y tetravalente tienen una acción múltiple en las células tanto *in vitro* como *in vivo*. Se conoce que es capaz de inhibir o estimular la actividad de enzimas, entre las que se incluyen las ATPasas de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} de varios sistemas de membranas (Cantley *et al.*, 1977 y 1978; Phillips *et al.*, 1982; Fuhrmann *et al.*, 1984; Mourek, 1987), la 2,6-biofosfatasa y 6-fosfofructuo-2-cinasa importantes en el metabolismo de la glucosa (Gil *et al.*, 1988), las fosfatasa y cinasa de tirosina involucradas en la recepción de insulina y en la transformación y proliferación celular (Inazu *et al.*, 1990), la fosfatasa alcalina la cual hidroliza esteres monofosfóricos (López *et al.*, 1976; Cantley *et al.*, 1977), 6-fosfogluconato deshidrogenasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la desoxinucleotidil transferasa, y ADN

polimerasa- α , enzimas claves en la síntesis de ácidos nucleicos (Sabbioni *et al.*, 1983; Carns & Scheble, 1990; Carns *et al.*, 1990), así como adenilato quinasa, escualeno sintetasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, co-enzima A, ribonucleasas, peroxidases, etc., entre otras muchas asociadas a ciclos vitales en las células (Carson *et al.*, 1987; WHO, 1988). Además de inhibir la síntesis de colesterol y aumentar la destrucción de cistina y cisteína de forma dosis dependiente (Carson *et al.*, 1987).

Estas alteraciones bioquímicas están relacionadas con aspectos secundarios inducidos por el vanadio. Los cambios enzimáticos y en particular en las ATPasa, estimulan la fosforilación, la peroxidación de los lípidos y la permeabilidad selectiva de K^+ (Siemon *et al.*, 1982; Donalson *et al.*, 1985), así como provocan disminución en la concentración de ácido ascórbico (Zaporowska, 1994) e inhiben la dimetilación oxidativa de sustancias dependientes del citocromo P-450 del sistema de monooxigenasas (Heide *et al.*, 1983).

La acción del vanadio no sólo se limita a inducir cambios en la función de proteínas enzimáticas, sino que puede intervenir en la composición estructural de otras por medio de la inhibición en la incorporación de leucina (Bracken & Sharma, 1985) y prolina dentro de las proteínas esenciales (Canalis, 1985), así como también puede inhibir la degradación intracelular de proteínas de vida corta como lo son la leuceoptina y pestantina (Vargas *et al.*, 1989).

Por otro lado, desde el punto de vista mutagénico, el vanadio tiene un impacto biológico importante en el banco genético de los individuos. Estudios moleculares revelan que este elemento en concentraciones micromolares (μM) inhibe o estimula la incorporación de timidina dentro del ADN, provoca cambios en la reparación e induce fuertemente infidelidad en la síntesis del mismo, así como modifica la actividad de la regulación de la división celular de forma dosis dependiente (Carpenter, 1981; Jackson & Linskens, 1982; Smith, 1983; Canalis, 1985).

En cultivos de fibroblastos humanos, en células inactivas 3T3 y 3T6 de ratón Suizo, y en otros sistemas de prueba, el vanadato y vanadilo incrementan la tasa de división celular en concentraciones menores a $40 \mu M$ y concentraciones superiores muestran efectos opuestos, de tal manera que se bloquea la incorporación de timidina y nucleótidos dentro del ADN de forma

irreversible (Carpenter, 1981; Sabbioni et al., 1983; Smith, 1983; Canalis, 1985; Bracken & Sharma, 1985).

La actividad del vanadio sobre las enzimas y el poder modificar la síntesis de ADN, ácido ribonucleico (ARN) y proteínas tiene una relación directa con la actividad de genes implicados en la expresión mitótica. A pesar de estas sospechas hay pocos estudios que confirman este hecho. El ion vanadato y vanadilo son capaces de inducir la conversión del gen mitótico TRP^r en células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Gilli et al., 1991) y en células C127 de ratón el vanadato incrementa la transcripción de los genes actina, c-Ha-ras y c-jun (este último sólo con la adición de agentes oxidantes y reductores), de los cuales los dos primeros son oncogenes que intervienen en la respuesta mitogénica (Yin et al., 1992).

Estudios citogénéticos en células vegetales como las de *Allium cepa* el vanadato provocó alteración en el huso mitótico, picnosis, pérdida de cromatina (Singh & Sharma, 1980) e inhibición de en la formación de la placa celular originando células binucleadas (Navas et al., 1986). Del mismo modo concentraciones menores a 100 µM inhiben el movimiento de los cromosomas durante la anafase y la elongación del huso mitótico en células epiteliales, PtK₁ de rata (Cande & Wolniak, 1978), mientras que concentraciones de 0.17 a 6.4 µg/g en células de médula ósea de ratón y 2, 4 y 6 µg en cultivo de linfocitos humanos incrementan la frecuencia de micronúcleos y poliploidías respectivamente (WHO, 1988; Roldán & Altamirano, 1990) y en *Saccharomyces cerevisiae* en concentraciones de 4 a 10 mM el vanadato y vanadilo inducen aneuploidías (Gilli et al., 1991).

El hecho de que el vanadio origine alteraciones en la segregación de los cromosomas, ha permitido determinar que actúa en la polimerización de los microtúbulos por lo que es considerado como un potente antitubulinico y aneuploidógeno (Cande & Wolniak, 1978; Roldán & Altamirano, 1990; Gilli et al., 1991; Zong et al., 1994).

Ensayos en procariontes, demuestran que el vanadato y el vanadilo (V₂O₅, NH₄VO₃ y VOCl₂), con la prueba rec en *Bacillus subtilis* fueron ligeramente positivos y con la prueba de fluctuaciones *Salmonella thyphymurium* TA1535 el metavanadato mostró ser fuertemente mutagénico, pero el pentóxido, en las cepas TA1535, TA1537, TA89 y TA90 dio resultados

negativos (WHO,1988; Léonard & Gerber 1994). En *Saccharomyces cerevisiae* el vanadato induce mutaciones puntuales revertantes, efecto que se reduce por el tratamiento con la fracción microsómica hepática S9 o en cultivos con altos contenidos de citocromo P-450 (Gilli et al., 1991).

En *Drosophilla melanogaster*, larvas transheterocigas *flr/mwh* tratadas con V_2O_5 en exposición aguda incrementa la frecuencia de manchas chicas y totales en la aplicación de 32.63 y 125 ppm, en exposición subcrónica sólo incrementa la frecuencia de las manchas totales con 250 y 500 ppm y en tratamientos crónicos es altamente tóxico (Abundis & Ramos, 1994).

En cultivos de células de ovario de hámster Chino, el vanadato incrementa la frecuencia de mutaciones en los locus *hprt* de la línea V79 y del gen bacterial *gpt* transgénico en células G12 (Cohen et al., 1992). Otros estudios en el mismo sistema muestran que sales de este elemento de valencia V^{3+} , V^{4+} y V^{5+} incrementan de forma dosis-dependiente las aberraciones cromosómicas estructurales con o sin la adición de la fracción S9, en las concentraciones de 12-18 μg para el V_2O_5 , de 6-24 μg para el SVO_5 y 4-16 μg para NH_4VO_3 , e incrementan de forma independiente los intercambios de cromátidas hermanas en las concentraciones de 0.5-4, 0.5-6 y 0.1-1 μg respectivamente (Owusu Yaw et al., 1990), del mismo modo el V_2O_5 modifica significativamente la frecuencia de micronúcleos con 3 μg y disminuye la frecuencia de células binucleadas inducidas por citocalacina B al incrementar la concentración del compuesto desde 1 hasta 12 μg , sin encontrar diferencia en el índice de replicación ni en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (Zong et al., 1994), mientras que en células de médula ósea de ratón no modifica la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas ni el tiempo promedio generacional, pero sí el índice mitótico en 11.5 y 23.0 $\mu g/g$ (Altamirano et al., 1993).

Los resultados de la genotoxicidad del vanadio son poco concluyentes y hasta cierto grado contradictorios y los estudios en linfocitos humanos no excluyen esta ambigüedad. Linfocitos humanos tratados *in vitro* con V_2O_5 en concentraciones de 2, 4 y 6 μg , incrementan significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas (poliploidías) y la de asociaciones de satélites por célula y por cromosoma, incrementa el tiempo generacional promedio y disminuyen el índice mitótico, pero no la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales e intercambios de cromátidas hermanas (Roldán & Altamirano, 1990).

Sin embargo, el V_2O_5 aplicado en combinación con cafeína, en diferentes ciclos de replicación, las mismas concentraciones del pentóxido, incrementan la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas cuando la cafeína es aplicada a las 24 y 48 horas de iniciados los cultivos en las concentraciones de 6 y 4-6 μg respectivamente (Roldán, 1992), y en la concentración de 6 cuando se aplica el mutágeno a las 0 horas y cafeína a las 48 horas (Roldán et al., 1994).

Otros estudios en linfocitos humanos muestran que el V_2O_5 en 10^{-3} y 10^{-5} M induce células hiperploides con tres o más zonas de hibridación en núcleos interfásicos (Ramírez et al., 1994). El vanadio como NH_4VO_3 , $NaVO_3$ y Na_3VO_4 en tratamientos de 2.5-160 μM no modifica la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales ni el índice de proliferación pero en las concentraciones de 40-80, 20-80 y 80 μM respectivamente incrementa la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, de aberraciones cromosómicas numéricas (hipoploidías), de asociaciones de satélites por célula y la de micronúcleos con centrómero positivo (Migliore et al., 1993). Al aplicar vanadio tetravalente en este sistema en forma de SVO_5 de 40-80 μM se incrementa la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas numéricas pero no las estructurales, mientras que el V_2O_5 en concentraciones de 4, 6 y 8 μg incrementa la frecuencia de rompimientos sencillos y gaps, y ambos pueden acrecentar las asociaciones de satélites por célula y cromosoma (Migliore et al., 1993; Roldán et al., 1995).

JUSTIFICACIÓN

El vanadio, al igual que otros metales, ha adquirido una importancia especial como contaminante por su amplio uso y liberación en el ambiente. A pesar de que algunos metales son elementos traza esenciales, en elevadas concentraciones muestran tener efectos adversos en la salud. La exposición a estos elementos en el medio, originan un contacto casi permanente con la vida y favorece el poder ser absorbidos, metabolizados, y causar de esta manera daños, los cuales si no son reparados ponen en peligro la integridad de la célula, del órgano, del organismo o de una población y a sus futuras generaciones.

El poder toxicológico del vanadio esta bien documentado y ha permitido clasificar este metal y algunos de sus compuestos como potencialmente peligroso. Sin embargo, los estudios de sus efectos citotóxicos y mutagénicos son escasos y poco concluyentes. La información relacionada con la genotoxicidad de sus compuestos de valencia 4+ y 3+ es limitada, por lo que en la presente investigación se decidió evaluar el efecto de las sales, tetrafluoruro de vanadio y tricloruro de vanadio sobre los cromosomas de linfocitos humanos *in vitro*.

HIPÓTESIS

Los compuestos de vanadio tienen actividad fisiológica cuando se presentan como V^{5+} , V^{4+} y V^{3+} , sin embargo, su forma $5+$ ha sido la más estudiada toxicológica y mutagenicamente (no así los compuestos de valencia $4+$ y $3+$) por representar la fuente de mayor riesgo laboral y de toxicidad para los organismos. Por lo tanto, si aplicamos tetraflúoruro de vanadio (VF_4) y tricloruro de vanadio (VCl_3) a linfocitos humanos *in vitro*, ambas sales alterarán el proceso de división celular e inducirán daño al ADN.

OBJETIVOS

General:

Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del tetrafluoruro de vanadio (V^{4+}) y tricloruro de vanadio (V^{3+}) sobre los cromosomas de linfocitos humanos expuestos *in vitro*.

Particulares:

Evaluar el Índice mitótico en linfocitos humanos expuestos a las sales de vanadio *in vitro*.

Evaluar la cinética de ciclo celular, el tiempo promedio generacional, y la frecuencia y distribución de intercambio de cromátidas hermanas, en cromosomas de linfocitos humanos expuestos a las sales de vanadio *in vitro*.

Establecer la relación dosis-efecto de las sales de vanadio con respecto al índice mitótico, intercambios de cromátidas hermanas y tiempo promedio generacional.

MATERIAL Y MÉTODO

Compuestos Químicos:

Se utilizó tetrafluoruro de vanadio (VF_4), de valencia 4+, y tricloruro de vanadio (VCl_3), de valencia 3+ (Aldrich Chem. Co. Inc. USA), disueltos por separado en agua destilada y esterilizados por filtración con una membrana Millipore de 0.22 μm .

Cultivos:

A partir de donadores clínicamente sanos del sexo masculino, de entre 25-30 años de edad, se extrajeron 10 ml de sangre periférica, con una jeringa heparinizada. Se hicieron cultivos, con 0.5 ml de sangre en 5 ml de medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina y $NaHCO_3$ (SIGMA, USA) y activado con 5 $\mu g/ml$ de fitohemaglutinina (PHA-M) (SIGMA, USA), en tubos cónicos para cultivo de polipropileno (de 15 ml. Nunc, Inc.), y se incubaron durante 72 horas a 37°C en la oscuridad. A las 24 horas después de la siembra se adicionó, a cada cultivo, 5 $\mu g/ml$, de BrdU (SIGMA, USA) y se realizaron los diferentes tratamientos con los compuestos de vanadio.

Cumplidas las 71 horas, se agregó a cada cultivo, 4 $\mu g/ml$ de Colchicina (GIBCO, USA) y se dejaron completar las 72 horas. Todas las manipulaciones se efectuaron en condiciones estériles. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se sometió a un choque hipotónico con una solución 0.075 M de cloruro de potasio (KCl) y se dejó reposar 15 minutos a temperatura de incubación. Transcurrido este periodo se centrifugaron nuevamente y el botón celular se fijo con metanol-ácido acético fresco y frío, en una proporción 3:1; se realizaron tres cambios de 15, 10 y 5 minutos, con centrifugación y eliminación del sobrenadante por cambio, respectivamente. Al terminar la fijación se hicieron las preparaciones por goteo, las laminas se flamearon y el secado se completo al aire.

Tratamientos:

A las 24 horas de iniciados los cultivos, se efectuaron los diferentes tratamientos con el tetrafluoruro y tricloruro de vanadio. En todos los casos por cada concentración utilizada, los cultivos se hicieron por duplicado y con tres repeticiones del mismo. Las concentraciones usadas se

determinaron mediante ensayos preliminares. Los grupos quedaron distribuidos de acuerdo a la siguiente tabla:

TABLA 3. DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS DE LOS COMPUESTOS DE VANADIO EN ESTUDIO.		
Grupo	Concentración VF ₄ (µg/ml)	Concentración VCl ₃ (µg/ml)
A	0 (Testigo)	0 (Testigo)
B	2	2
C	4	4
D	8	8
E	16	16

Tinción Diferencial:

Una vez obtenidas las preparaciones, se irradiaron con luz ultra violeta y luz negra simultáneamente a una distancia de 15 centímetros, en medio acuoso, durante 20 minutos al término de los cuales se pasaron a un baño de solución citrato salina (2xSSC) a 60°C, en donde reposaron 20 minutos más. Finalmente las preparaciones se enjuagaron con agua corriente y se tificaron con una disolución de Giemsa (SIGMA, México) en agua destilada (1:16), eliminando el exceso de colorante al chorro de agua y se dejaron secar al aire.

Evaluaciones:

Para determinar el índice mitótico (IM) se contaron 1000 células y se aplicó la siguiente fórmula (Dean & Danford, 1984):

$$IM = \frac{ncd}{nct} \times 100$$

donde:

ncd = número de células en división.

nct = número de células totales.

Para calcular la cinética de ciclo celular (CCC) se observaron un promedio de 100 células en metafase, para lo cual se cuantificarán células en primera, segunda y tercera ó sucesivas divisiones. A partir de los datos de la CCC se calculó el tiempo promedio generacional (TPG) de acuerdo con Ivett y Tice (1982), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{T BrdU} \\ \text{TGP} = \frac{\text{-----}}{1(\text{I}) + 2(\text{II}) + 3(\text{III})} \times 100$$

donde:

T BrdU= tiempo de permanencia de los cultivos en 5-bromo-2'-desoxiuridina (48 horas).

I, II y III= número de células en primera, segunda y tercera ó sucesivas divisiones respectivamente.

La frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH's) se determinó mediante el análisis de 50 células en metafases de segundo ciclo de división, por un conteo de intercambios terminales como uno e intericiales como dos (Carrano & Natarajan, 1988). Para la distribución de ICH's se formaron grupos de dos en dos a partir de células con un intercambio hasta células con más de dieciséis intercambios.

En todos los casos las células analizadas se seleccionaron al azar y las evaluaciones se hicieron por cultivo, en un microscopio óptico (NIKON), a doble ciego.

Análisis Estadístico:

Se realizó mediante un análisis de varianza de un factor seguido de una prueba de rangos múltiples (ANDEVA-Tukey) para todos los parámetros, con el uso del programa Statgraphics versión 5.0, excepto en la comparación de distribución de ICH's por célula en la que se empleó la prueba para diferencia de proporciones "Z" (Marques, 1988). En el análisis de la relación dosis-efecto se evaluó mediante una regresión lineal con el mismo programa.

Los resultados se expresan como el promedio más-menos el error estándar (0.00 ± 0.00), donde la significancia se da con $P < 0.05$ ó $P < 0.01$, según sea el caso, haciéndose mención en el texto o en las figuras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

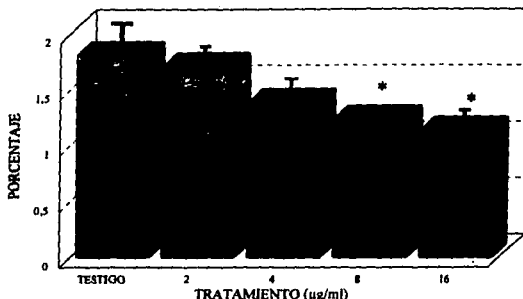
La citotoxicidad y genotoxicidad de los compuestos que contienen iones metálicos dependen de varios factores que determinan una respuesta final. La expresión de sus efectos están relacionados directamente con la dosis, la forma y vehículo de administración, de sus propiedades químicas, el sistema empleado, su distribución y retención en cualquier tejido o célula de modo que pueda ser metabolizado e interactuar con una molécula blanco, y de esta manera ocasionar perturbaciones a diferentes niveles (Duffus, 1983; Sharma & Talukder, 1987; Scott *et al.*, 1991).

La citotoxicidad se mide por cambios indirectos al ADN, es decir, sobre enzimas, membranas, estructuras proteicas, lisosomas, entre otros, que nos conducen a una inhibición del crecimiento o alteración de la actividad mitótica y muerte celular. Por otra parte la genotoxicidad se da por cambios directos sobre la molécula de ADN, como el inducir rompimientos (efecto clastogénico) o alterar la estructura de la molécula de ADN por medio de mutaciones, o bien por cambios indirectos como son: el modificar la síntesis de proteínas (Sharma & Talukder, 1987; Scott *et al.*, 1991).

En mamíferos, algunos de los compuestos con iones de metales pesados provocan en la actividad mitótica un abatimiento, al incrementar el número de anomalías cromosómicas, y la actividad clastogénica generalmente se ve incrementada, de acuerdo con la tabla periódica y por familia, por el peso atómico, electropositividad y solubilidad, así como ambas se incrementan con la formación de enlaces covalentes y covalentes coordinados de los metales con las macromoléculas biológicas (Sharma & Talukder, 1987).

En el presente estudio se dan de evidencias del potencial citotóxico y genotóxico de compuestos inorgánicos de vanadio en el sistema de linfocitos humanos *in vitro*, en concentraciones de 2 a 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La citotoxicidad se evaluó mediante el porcentaje de células que entran en mitosis en base a el IM. Los resultados obtenidos al aplicar las sales de vanadio, tetravalente y trivalente como tetrafluoruro y tricloruro de vanadio (VF_4 y VCl_3), muestran que el V^{4+} no modifica el IM en las concentraciones de 2 y 4 μg con $1.70 \pm 0.13 \%$ y $1.38 \pm 0.16 \%$ respectivamente, pero sí lo disminuye significativamente en las dosis más altas, de 8 y 16 μg con $1.23 \pm 0.06 \%$ y $1.13 \pm 0.16 \%$ con respecto a el testigo que fue $1.80 \pm 0.26 \%$ ($P < 0.05$) (Figura 5).

FIGURA 5. EFECTO DEL VF₄ SOBRE EL IM EN LINFOCITOS HUMANOS In vitro.



* P<0.05; Con Prueba de ANDEVA-Tukey

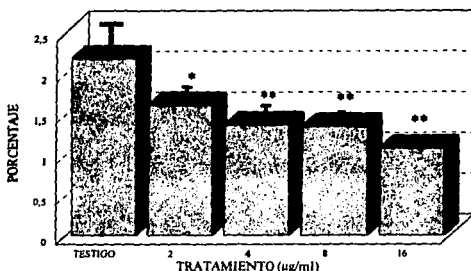
En cuanto a los datos observados con el V³⁺ este abate el IM en todas las concentraciones, teniendo 1.61 ± 0.13 % para 2 µg, mientras que en las concentraciones de 4, 8 y 16 µg se abate a 1.37 ± 0.14 %, 1.35 ± 0.09 % y 1.08 ± 0.02 %, respectivamente, contra 2.18 ± 0.36 % del testigo, acentuando su significancia en las dosis de 8 y 16 µg (P < 0.05 para 2 µg, P < 0.01 para 4, 8 y 16 µg) (Figura 6).

Aunque se puede apreciar una ligera tendencia a disminuir el IM conforme aumenta la dosis (Figuras 5 y 6), la correlación dosis-efecto para el IM en ambas sales de vanadio no muestra un comportamiento lineal, donde el coeficiente de correlación (r) para la VF₄ es $r = -0.6593$ y un valor de $Y = 1.6962 - 0.0410 X$, y para el VCl₃ $r = -0.6723$ con $Y = 1.9443 - 0.0633 X$.

Las variaciones encontradas en el IM concuerdan con la mayoría de los reportes de citotoxicidad citados en la literatura. Compuestos que contienen iones de vanadio en forma de vanadato (VO₃, vanadio 5+), vanadilo (VO²⁺, vanadio 4+) y vanadico (VO⁺, vanadio 3+) muestran ser citotóxicos e interferir con el proceso de división celular. Waters y sus colaboradores (1974), son de los primeros en reportar que óxidos de vanadio reducen en un 50% la viabilidad de macrófagos

alveolares de conejo tratados *in vitro* con 13 y 21 μg de V_2O_5 y V_2O_3 respectivamente, y sugirieron que el daño a la integridad y función celular puede inducir necrosis en el epitelio alveolar por exposiciones a polvos de estos compuestos.

FIGURA 6. EFECTO DE VCl_4 SOBRE EL IM EN LINFOCITOS HUMANOS *In vitro*.



* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ Con Prueba de ANDEVA-Tukey

Recientemente Owusu Yan (1990), en cultivos de células de hámster Chino (CHO), obtuvieron una gran toxicidad por sales de vanadio, en concentraciones de 4-6 μg para NH_4VO_3 , 6-24 μg para SVO_5 y de 12-18 μg V_2O_3 . Sabbioni y colaboradores (1991), encontraron que el NH_4VO_3 , NaVO_3 y VSO_5 inducen una disminución en la proliferación en la línea de células BALB/3T3, en dosis de 5×10^{-6} a 5×10^{-5} M, de manera dosis-dependiente con una acentuada toxicidad en los compuestos de valencia 5+.

Por otro lado, Zhong *et al.*, (1994) al aplicar V_2O_5 en la línea celular V79 de hámster Chino, observó que este compuesto disminuyó el número de células binucleadas en presencia de citocalacina B al incrementar la dosis, de 1-12 μg , lo que indica que el vanadio inhibe el evento de la mitosis a bajas dosis, mientras que, *in vivo* al aplicar el mismo compuesto, en tratamiento agudo en ratones, dosis de 11.5 $\mu\text{g/g}$ peso húmedo estimula el IM y en dosis de 23.0 $\mu\text{g/g}$ lo disminuye (Altamirano *et al.*, 1993).

Estudios efectuados en el modelo de cultivo de linfocitos humanos reportan un abatimiento en el IM, Roldán y Altamirano (1990) encontraron que el V_2O_5 en las concentraciones de 4 y 6 μg disminuye el IM, de igual manera se reporta que el vanadio aplicado como V_2O_4 modifica fuertemente este parámetro en concentraciones de 4, 6 y 8 μg (Roldán et al., 1995).

Hay evidencias de que la toxicidad del vanadio depende del estado de oxidación, donde a mayor número de oxidación del metal mayor efecto citotóxico (Waters et al., 1974; Sharma & Talukder, 1987; Sabbioni et al., 1991). Sin embargo nuestros resultados contrastan este hecho, ya que se observó una alta positividad del VCl_3 a bajas dosis en comparación al VF_4 que mostró ser más tolerable por las células. El efecto puede deberse a que el vanadio como VCl_3 es una especie más tóxica, o que posiblemente el ion acompañante (Cl^-) ejerza un efecto sinérgico que ocasione cierta toxicidad, o bien que el mecanismo de acción de inducción de citotoxicidad sea semejante al producido por el vanadato o vanadilo, que son de los que se tienen algunos reportes, pero llevando su efecto tóxico a un espectro más reducido y más eficiente.

La toxicidad expresada por las sales de vanadio (VF_4 y VCl_3) se encuentra relacionada directamente por la distribución y acumulación del vanadio en el interior de las células como es la mitocondria y el núcleo (Sakurai, 1994) y por la reducción intracelular de VO_3^- a VO^{2+} *in vitro* (Sakurai et al., 1980; Nechay et al., 1986; Rheder, 1991) e *in vivo* (Sakurai, 1994). Sin encontrar indicios de transformación (oxidación) a vanadilo cuando se aplica en forma trivalente como VCl_3 (Sakurai, 1994). Además si consideramos la preferencia del vanadilo por los enlaces de las macromoléculas biológicas lo cual es un factor de entrada del vanadato a la célula que es el que se sospecha que produce una toxicidad acentuada, en comparación con el vanadilo aplicado en el mismo sistema y en las mismas concentraciones, motivo por el que se considera la forma pentavalente como la de mayor acción citotóxica (Nechay et al., 1986; Sabbioni et al., 1991) y razón que nos conduce a pensar que el vanadio como VCl_3 tiene un mecanismo de acción de citotoxicidad más específico. Por otra parte, si comparamos la DL_{50} probadas en ratón de compuestos pentavalentes, como el V_2O_5 de 23 $\mu\text{g/g}$ y $NaVO_3$ de 36.33 $\mu\text{g/g}$, tetravalentes, como SVO_3 de 95.40 $\mu\text{g/g}$, y trivalentes, como el V_2O_3 de 130 $\mu\text{g/g}$ y el VCl_3 de 23 $\mu\text{g/g}$ (Jones & Basinger, 1983; Carson et al., 1987; WHO, 1988; Léonard & Gerber, 1994), observamos que se requiere una dosis menor de

tricloruro que de tetraóxido de vanadio y la misma del pentóxido para producir la misma letalidad, estudios que respaldan nuestra idea.

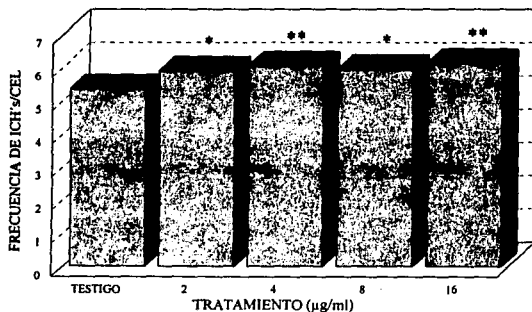
Se han investigado, también, los efectos de algunos metales en la división celular que incluyen alteraciones en el huso, células arrestadas en metafase, que se produzca un periodo estático de división celular conocido como "stathmokinesis", formación de diplocromosomas, cromosomas rezagados y poliploidías (Sharma & Talukder, 1987). De aquí que el vanadio puede incluirse en la lista de los metales que ocasionan las alteraciones anteriores. El vanadio en vegetales produce alteraciones en la formación de la placa celular, pincosis y pérdida de cromatina (Sing & Sharma, 1980; Navas *et al.*, 1986), en levaduras y células de mamífero interviene en la elongación y polimerización del huso acromático lo que resulta en la inducción de micronúcleos, aneuploidías, poliploidías, y diplocromosomas e hiperploidías (Cande & Wolniak, 1978; Roldán & Altamirano, 1990; Gilli *et al.*, 1991; Migliori *et al.*, 1993; Ramírez *et al.*, 1994; Zhong *et al.*, 1994), y abate el IM con varios de sus compuestos en los que incluimos el VF₄ y VCl₃. Algunas de estas respuestas son atribuidas a la gran afinidad de los metales por los enlaces disulfuro y consecuentemente a las proteínas del huso (Cherian 1985). Por tales motivos no puede descartarse esta otra posibilidad de acción del vanadio sobre la división celular.

Si bien los efectos del vanadio son amplios el poder establecer un mecanismo de acción sobre el índice mitótico es muy difícil. Sin embargo otra posibilidad para esclarecer el mecanismo de citotoxicidad se muestra en estudios realizados en los últimos años, en los cuales un blanco de acumulación inmediato de este metal es la mitocondria (Sakurai, 1994), organelo en el que ejerce grandes daños. En 1988 se reporta que el vanadio reduce fuertemente la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos precursores del acetil co-enzima A (WHO, 1988), indispensable en el metabolismo oxidativo en la mitocondria, y en 1991 Younes y colaboradores, encuentran que hay una reducción en el consumo de oxígeno en las células de hígado de rata, tratadas con vanadato, lo que indica que hay un efecto tóxico directo en la conservación de la energía y una muerte por hipoxia celular.

Dentro de los parámetros para evaluar daño cromosómico, se cuenta con la técnica de tinción diferencial que muestra los intercambios de cromátidas hermanas (ICH's). Los ICH's son un indicador altamente sensible para detectar daño en el ADN. Un incremento en su frecuencia se ha considerado como un hecho de persistencia de daño sobre el material genético y puede determinar si

una sustancia es genotóxica o no. La inducción de ICH's por compuestos metálicos esta ampliamente documentada, pero los reportes de compuestos con iones de vanadio son limitados y poco concluyentes. En la figura 7, se nota que el VF_4 es capaz de incrementar la frecuencia de ICH's por célula en todos los tratamientos (2, 4, 8 y 16 μg), con una frecuencia 5.88 ± 0.17 , 6.03 ± 0.19 , 5.93 ± 0.15 y 6.12 ± 0.20 en cada caso, en comparación a 5.33 ± 0.16 del testigo ($P < 0.05$ para 2 y 8 μg , y $P < 0.01$ para 4 y 16 μg). Con respecto al VCl_3 , figura 8, en ninguna de las concentraciones aplicadas se modificó significativamente la frecuencia de ICH's en base al testigo, ya que dio valores de 6.02 ± 0.17 para 2 μg , 6.38 ± 0.25 para 4 μg , 6.29 ± 0.20 para 8 μg y 6.36 ± 0.23 para 16 μg , contra 5.69 ± 0.17 del grupo testigo.

FIGURA 7. FRECUENCIA DE ICH 's POR CÉLULA EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS In vitro TRATADOS CON VF_4 .

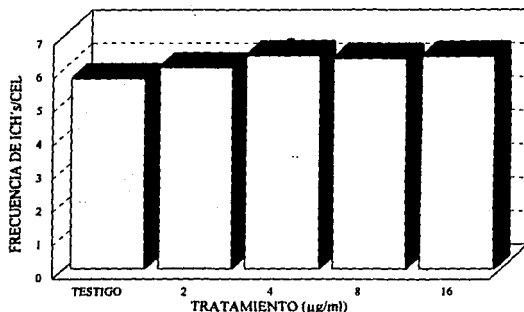


* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ Con Prueba de ANDEVA-Tukey

El análisis de correlación dosis-efecto de los datos de la frecuencia de ICH's no describe un comportamiento lineal, lo que se esperaba de acuerdo a sus frecuencias, tanto para el tetrafluoruro como para tricloruro de vanadio, con una pendiente cercana a cero y un valor de r muy bajo. Los resultados son $r = 0.0672$ y $Y = 5.6594 + 0.0353 X$ para la forma tetravalente, y $r = 0.0639$ con $Y = 5.9299 + 0.0367 X$ para la forma trivalente.

Se ha reportado, que los iones de vanadio pentavalente son más tóxicos que los trivalentes, y considerados como los de mayor influencia genotóxica en mamíferos y otros animales, puesto que estos iones entran con gran facilidad y rápidamente en las células (Jhonson *et al.*, 1974; Sharma & Talukder, 1987; WHO, 1988; Migliore *et al.*, 1993; Léonard & Gerber, 1994). Recientes investigaciones demuestran que la genotoxicidad del vanadio no solo depende de su valencia sino del compuesto de el que forme parte (Owusu Yaw *et al.*, 1990; Migliore *et al.*, 1993; Léonard & Gerber, 1994).

FIGURA 8. FRECUENCIA DE ICH 's POR CÉLULA EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS In vitro TRATADOS CON VCl_3



Los resultados no obstante de que en ciertos casos parezcan contradictorios, nos dan pauta para esclarecer el comportamiento de este metal en los diferentes sistemas de prueba. Owusu Yaw y colaboradores (1990), obtuvieron un incremento de forma independiente de la dosis en la frecuencia de ICH's al aplicar sales de vanadio en forma de VO_3^- , VO^{2+} y VO^+ en presencia o ausencia de la adición de la fracción hepática S9 en células CHO, donde el vanadio como NH_4VO_3 con 0.1-1.0 μg , SVO_3 con 0.5-6.0 μg y V_2O_3 0.5-4.0 μg causaron un incremento en estas concentraciones, lo que

muestra la sensibilidad de este sistema en comparación al de linfocitos humanos, y que concuerdan con nuestros resultados por el incremento de ICH's en las diferentes aplicaciones del VF_4 en comparación al SVO_5 , ambos con la misma valencia. Por otro lado el VCl_3 no modificó esta frecuencia comparado con el V_2O_3 el cual la incrementa en concentraciones tan bajas como las que induce el SVO_3 en las células CHO.

Estudios más recientes *in vivo*, en células de médula ósea de ratón, no observaron alteraciones en la frecuencia de ICH's al aplicar V_2O_3 en tratamiento agudo (dosis de 5.75, 11.5 y 23.0 $\mu\text{g/g}$), resultados justificados primero por el tiempo de exposición que posiblemente no fue el suficiente para que el metal fuese transportado a la fracción nuclear pues tarda ocho días en migrar (Altamirano, 1992; Altamirano *et al.*, 1993) y segundo porque no hay evidencias que el vanadio como pentóxido induzca ICH's en otros sistemas como el cultivo de linfocitos humanos y células V79 de hámster Chino (Roldán & Altamirano, 1990; Zhong *et al.*, 1994).

Otros estudios en cultivos de linfocitos humanos muestran que el V_2O_5 tampoco induce ICH's en concentraciones de 2, 4 y 6 μg (Roldán & Altamirano, 1990). Sin embargo, en combinación con cafeína suministrada en diferentes ciclos de replicación, las mismas concentraciones del pentóxido, incrementa la frecuencia de este parámetro: específicamente al suministrar la cafeína a las 24 y 48 horas de iniciados los cultivos en las dosis de 6 y 4-6 μg cuando el vanadio se aplica a las 24 horas, respectivamente, y en las dosis más altas cuando el compuesto metálico se aplica en el momento de la siembra y la cafeína a las 48 horas después. El uso de cafeína que actúa como inhibidor de la reparación muestra que el pentóxido necesita al menos de un ciclo de división para poder manifestar el daño al ADN y lo coloca como un agente mutagénico débil (Roldán, 1992; Roldán *et al.*, 1994).

Por su parte Migliore y colaboradores (1993), encontraron que compuestos de vanadio incrementan la frecuencia de intercambios de cromátidas de manera dosis dependiente, vanadatos como el NH_4VO_3 , NaVO_3 y Na_3VO_4 en las concentraciones de 40-80, 20-40-80 y 80 μM (que equivalen a 4.68-9.36 $\mu\text{g NH}_4\text{VO}_3/\text{ml}$, 2.44-4.88-9.75 $\mu\text{g NaVO}_3/\text{ml}$ y 14.71 $\mu\text{g Na}_3\text{VO}_4/\text{ml}$), los dos primeros incrementan este parámetro de forma independiente de la dosis, y el tercero de forma dependiente, mientras que el vanadilo como SVO_5 incrementa los ICH's en dosis que van de 40-80 μM también de forma dosis-dependiente (equivalente a 6.40-12.80 $\mu\text{g SVO}_3/\text{ml}$), que coloca a los

vanadatos de sodio y amonio, y al sulfato de vanadilo como agentes fuertemente genotóxicos, y donde se nota que el vanadilo induce intercambio de cromátidas a partir de dosis moderadamente bajas de manera semejante al VF_4 de nuestros resultados, a pesar de no mostrar tendencia a incrementarse de acuerdo a la dosis (Figura 7).

De lo dicho anteriormente, podemos resumir, que la genotoxicidad de los compuestos de vanadio no sólo esta en relación a la valencia del metal, sino también el efecto que puede estar ejerciendo el ion acompañante y la valencia de cada uno de los componentes del ion, ya que el daño manifestado como ICH's se puede acentuar o disminuir dependiendo del conjunto de elementos químicos que esten constituyendo al ion del que se trate. El caso particular del VF_4 , si observamos la composición química, en peso, de cada elemento (Tabla 4), podemos percatarnos que la equivalencia en μg del metal es menor que la del ion acompañante, por lo que el efecto genotóxico

TABLA 4. EQUIVALENCIA DE LOS IONES EN LOS COMPUESTOS DE VANADIO EN ESTUDIO.					
Compuesto y sus iones	Concentración del compuesto y equivalencia de iones ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				Peso molecular
VF_4	2.00	4.00	8.00	16.00	126.94
V^{4+}	0.80	1.60	3.21	6.42	50.94
F^-	1.20	2.40	4.79	9.58	19.00
VCl_3	2.00	4.00	8.00	16.00	157.30
V^{3+}	0.65	1.30	2.59	5.18	50.94
Cl^-	1.35	2.70	5.41	10.82	35.45

manifestado nos conduce a pensar que el anion F^- intervenga en la inducción de ICH's por separado o sinérgicamente con el V^{4+} . Aunque nuestro estudio no nos provee de información suficiente para determinar el efecto del ion acompañante, en este caso el anion flúor (F^-), a continuación la discusión la desviaremos a estudios realizados con flúor con la finalidad de aceptar o descartar la posibilidad de que el halógeno este causando alteraciones en el ADN.

Es amplio el interés por establecer la genotoxicidad del flúor. Estudios demuestran que el NaF no fue mutagénico en *Salmonella tiphimurium* con y sin activación metabólica (Li et al., 1987;

Sharma & Talukder 1987). En *Bacillus subtilis* los resultados son contradictorios Matsui (1980) encontró efecto negativo con NaF y Kanematsu (1985) reporta a el NaF y KF como fuertemente positivos (citados en Zeiger et al., 1993); diferencias que pensamos pueden deberse al uso de los diferentes protocolos. Y en *Sacharomyces cereviciae* el NaF no es inductor de mutaciones puntuales o conversión de genes (Zeiger et al., 1993).

In vitro, en células de mamífero, el NaF y KF muestran ser mutagénicos y tóxicos de entre 100-500 µg con y sin fracción S9 en linfoma L518Y TK⁺ de ratón (Caspary et al., 1987; Cole et al., 1986). En linfocitos humanos el NaF produce mutaciones en el locus tk de 400-600 µg y en el hgprt con 600 µg por 28 horas de exposición y en el locus tk cuando las células son tratadas por 20 días con 65 µg. En contraste, no se observó mutagenicidad en los locus hgprt en células epiteliales de hígado de rata con 160 µg durante 72 horas, o en el locus tk en la línea V79 de hámster Chino en concentraciones de 10-400 µg durante 24 horas por NaF (Zeiger et al., 1993).

En cultivos de CHO y de embrión de hámster Sirio (SHE), el NaF incrementa las aberraciones cromosómicas (AC) de 25-100 µg (Aardema et al., 1989) y de 12.6 µg en células de venado rojo, pero no muestra incremento de aberraciones en células de hígado de hámster Chino en dosis de 50 mg de NaF o por 500-4000 mg de Na₂FPO₄. En cultivo de fibroblastos y linfocitos humanos el NaF induce AC con 20-40 µg, y en leucocitos con 1-132 µg, principalmente rompimientos cromosómicos, cromatídicos, gaps y deleciones. En contraste se reporta que el KF no induce AC en linfocitos humanos en dosis de hasta 193 µg. *In vivo*, con 10-40 µg/g de NaF incrementan las AC y micronúcleos en médula ósea de ratón (Zeiger et al., 1993).

En cuanto a los ICH's, estos no se inducen por NaF en cultivos de células CHO en dosis de 160-265 µg (Li et al., 1987), pero si en células SHE con 20-80 µg sin fracción S9, y con 160 µg en células de venado rojo. En células de linfocitos humanos *in vitro* no induce ICH's como NaF con 2-160 µg ni como KF con 4.2-420 µg (Zeiger et al., 1993).

Conforme a la información anterior, se sugiere que el fluor puede ser genotóxico a concentraciones mayores a 10 µg/ml. Sin embargo, *in vitro*, en el sistema de linfocitos humanos no es capaz de inducir ICH's como NaF o como KF en aplicaciones de 20 µg, si consideramos que es la dosis mínima que sí induce AC, y hasta 420 µg, equivalente de 9.05 a 190.04 µg del anion F⁻ para el

NaF y de 18.99 a 137.39 μg de F^- como KF. Equivalencias que al ser comparadas con el contenido de flúor del VF_4 , apenas alcanzan una semejanza a la concentración máxima aplicada (16 μg) el cual tiene un contenido de 6.42 μg de V^{4+} y 9.58 μg de F^- (Tabla 4). Por estos motivos proponemos que el efecto genotóxico expresado en los cultivos de linfocitos humanos como ICH's por el VF_4 puede estar inducido principalmente por el vanadio, sin descartar el posible efecto sinérgico del ion flúor debido a que tiene un gran espectro de acción.

Los ICH's son una manifestación citológica de rompimiento y reunión, en sitios homólogos entre las dos cromátidas de un mismo cromosoma, el rompimiento involucra a las cuatro hebras del ADN (2 dobles hélices) y se requiere que estos eventos ocurran simultáneamente. Para poder precisar la formación de ICH's es necesario suponer que el ADN duplex no contiene ningún entrecruzamiento y que su replicación sea semiconservativa (Taylor, 1958; Latt, 1973; Latt, 1979; Latt et al., 1981; Carrano & Natarajan, 1988).

La mayoría de los modelos propuestos para explicar la formación de los ICH's, relacionan de manera directa el sitio de una lesión en el ADN y el sitio en que se produce un intercambio (Schvatzman et al., 1984). Algunos modelos proponen que la inducción de ICH's es por daño directo al ADN, otros por inhibición del proceso de síntesis de ADN o inhibición de enzimas involucradas en la síntesis, o bien por enzimas involucradas en la reparación del mismo (Latt et al., 1984; Lindahl & Shall, 1984).

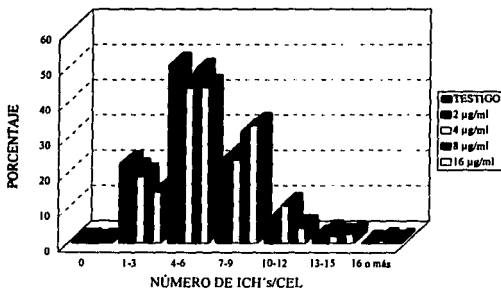
No obstante de ser uno de los grupos más estudiados, el mecanismo de mutagenesis de los metales no esta completamente entendido. Se ha observado como paso inicial la formación de enlaces covalentes de un catión metálico a los sitios nucleofílicos del ADN, a las proteínas cromosómicas, a las ADN-polimerasas ó a las moléculas precursoras de nucleótidos, interacción que puede afectar la fidelidad de la replicación de material genético e inducir alteraciones en la reparación afectando de esta manera la expresión génica (Montaldi et al., 1985).

Estudios *in vitro*, revelan que el vanadio aplicado en su forma pentavalente o tetravalente produce cambios en las concentraciones de grupos sulfhidrilo y de cisteína, provoca alteraciones en la formación de aminoácidos ricos en azufre e induce cambios en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, lo cual nos puede explicar la fuerte inducción de infidelidad en la replicación del ADN

encontrado en células de polen y los cambios en las actividades de enzimas cromosómicas involucradas en la reparación (Carpenter, 1981; Jackson & Linskens, 1982; Smith, 1983; Sabbioni et al., 1983; Bracken & Sharma, 1985; Canalis, 1985; WHO, 1988), eventos que están relacionados con la genotoxicidad del metal y proveen de herramientas para dar una respuesta importante del papel del vanadio en la expresión del aumento significativo de ICH's inducidos por el VF₄.

La distribución de las frecuencias de ICH's en células de linfocitos humanos *in vitro* tratados con VF₄ y VCl₃, se describen en las figuras 9 y 10. El análisis de la distribución, ofrece otro panorama de la acción de los compuestos químicos sobre los cromosomas, permite observar el comportamiento de las frecuencias de ICH's a lo largo de un plano horizontal, en donde la variable ICH's se encuentra distribuida normalmente. En las figuras se parte de cero intercambios hasta un intervalo final de 16 o más intercambios por célula, y donde se nota un porcentaje máximo de 4 a 6 intercambios, en ambas gráficas; tanto para el testigo como para las diferentes concentraciones aplicadas en cada grupo de acuerdo con la tabla 3.

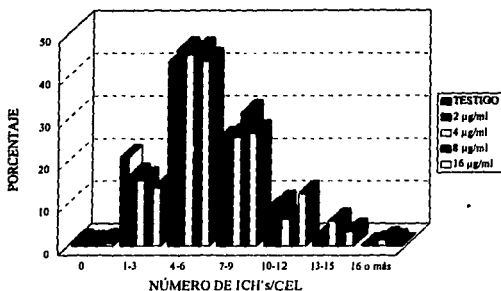
FIGURA 9. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE ICH's EN LINFOCITOS HUMANOS *in vitro* TRATADOS CON VF₄.



Los resultados de las distribuciones de la frecuencia de ICH's no presentan diferencias, con respecto al testigo, para ninguna de las dos sales. Sin embargo, las variaciones entre el testigo y los

diferentes tratamientos no pueden excluir la posible acción genotóxica sobre las células de los linfocitos expuestos, principalmente para el VF_4 (Figura 9), donde se nota un incremento marcado en la serie de 7 a 9 intercambios y particularmente en las dosis de 8 y 16 μg lo cual puede explicar el aumento en la frecuencia de ICH's encontrados y descritos en la figura 7.

FIGURA 10. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE ICH's EN LINFOCITOS HUMANOS *In vitro* TRATADOS CON VCl_3 ,



A pesar de que los resultados de las distribuciones no son significativos, podemos advertir que en la serie de 1 a 3 intercambios se presenta un fenómeno similar en las gráficas de ambas sales, donde a las concentraciones más altas, de 8 y 16 μg , hay una disminución en el porcentaje de células y en donde la concentración de 8 μg muestra el menor valor, datos que posiblemente no son compensados a lo largo de los otros valores en el resto de los intervalos, lo cual puede tener una relación directa con la disminución observada en las figuras 7 y 8 (frecuencia de ICH's para el VF_4 y VCl_3 respectivamente), y que por un lado nos da la disminución en la significancia esperada en 8 μg de acuerdo a las dosis de 4 y 16 μg en el caso de VF_4 , y por el otro nos puede estar indicando que el vanadio es el que está ejerciendo el mayor efecto genotóxico, independientemente de la valencia y del ion acompañante.

La cinética de proliferación de células de cualquier órgano o tejido, es una constante que nos permite entender la duración en tiempo del ciclo celular, y es un punto alternativo para detectar posibles alteraciones sobre el ADN causado por xenobióticos, drogas o cualquier otro agente.

La exposición a agentes ambientales, en particular a sustancias químicas, y la evaluación de su acción genotóxica ha adquirido gran importancia en las dos últimas décadas. El uso de indicadores de crecimiento celular como la viabilidad o el IM dan información para determinar la acción citotóxica; y la necesidad de evaluar aspectos citostáticos llevó a la determinación de la cinética de ciclo celular (CCC), parámetro genotóxico que permite detectar alteraciones en la velocidad de replicación de una célula. La CCC puede ser referida como tiempo promedio generacional (TPG), el cual depende del número de células que se han dividido una, dos, tres o más veces, aunque también puede ser referida como índice de replicación (IR) (Lazutka, 1991); la diferencia radica en que este índice no se da en tiempo.

La CCC se analizó mediante el patrón de tinción diferencial (Figura 3), por medio del porcentaje de células en metafase que se encontraron en primera (Figura 11a), segunda (Figura 11b) y terceras o subsecuentes divisiones (Figura 11c). A partir de los datos de este parámetro se determinó el tiempo, en horas, requerido para que una población de células pueda dividirse (TPG).

Las evaluaciones de TPG se aprecian en las figuras 12 y 13. Nuestros resultados muestran que en los linfocitos tratados con las sales de vanadio, sólo se incrementa el TPG significativamente en la dosis más alta de 16 $\mu\text{g/ml}$ del vanadio aplicado en forma de VF_4 , en el cual se precisa 29.28 ± 1.77 horas para cumplir un ciclo celular completo, 6.73 horas más comparado a su testigo que requiere 22.55 ± 0.44 ($P < 0.01$), mientras que en las dosis de 2, 4 y 8 μg los resultados son 22.32 ± 0.56 , 25.22 ± 0.58 y 25.88 ± 1.27 en cada caso y de acuerdo al testigo (Figura 12). Los datos de el TPG para el VCl_3 muestran que este compuesto no modifica estadísticamente el tiempo de división en ninguna de las aplicaciones dado por 22.55 ± 0.71 para 2 μg , 23.10 ± 1.10 para 4 μg , 26.05 ± 1.08 para 8 μg y 27.50 ± 2.75 para 16 μg , contra 22.92 ± 0.30 del testigo (Figura 13).

La respuesta dosis-efecto no observo una correlación lineal en el TPG, para ninguna de las sales, a pesar de describir una ligera tendencia a alargar el tiempo de división al aumentar la dosis (Figura 12 y 13). El valor de r para el vanadio tetravalente es igual a 0.6463 y para el vanadio

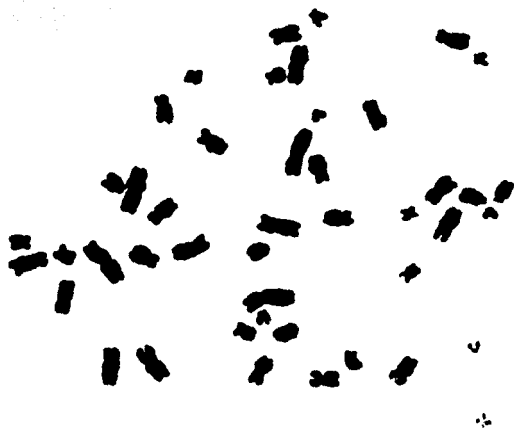


FIGURA 11a. FOTOMICROGRAFÍA DE CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS EN METAFASE, DE PRIMER CICLO DE DIVISIÓN (100 X).

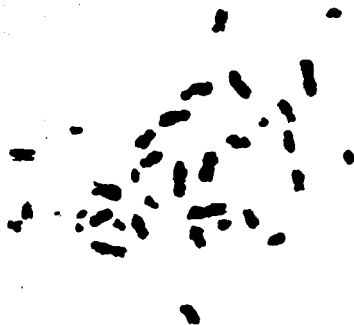
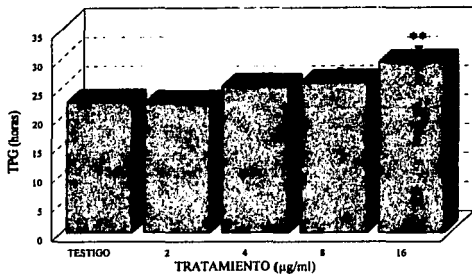


FIGURA 11b. FOTOMICROGRAFÍA DE CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS EN METAFASE, DE SEGUNDO CICLO DE DIVISIÓN (100 X).



FIGURA 11c. FOTOMICROGRAFÍA DE CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS EN METAFASE, DE TERCER CICLO DE DIVISIÓN (100 X).

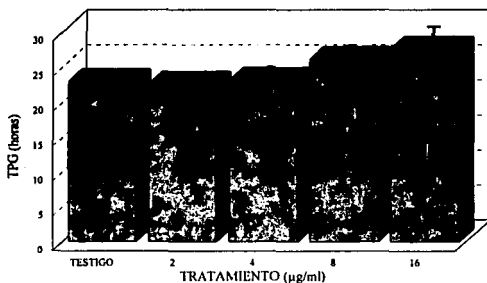
FIGURA 12. EFECTO DEL VF, SOBRE EL TPG EN LINFOCITOS HUMANOS In vitro.



**P<0.01 Con Prueba de ANDEVA-Tukey

trivalente es de 0.4868, mientras que la ecuación de la recta es de $Y=22.4359 + 0.4353 X$ en el caso del primero y de $Y=22.4366 + 0.3335 X$ para el segundo

FIGURA 13. EFECTO DEL VCI, SOBRE EL TPG EN LINFOCITOS HUMANOS In vitro.



Investigaciones recientes observan que el V_2O_5 no modifica el TPG en dosis de 5.75, 11.5 y 23.0 $\mu\text{g/g}$ en células de médula ósea de ratón (Altamirano et al., 1993), mientras *in vitro* en la línea de células V79 de hámster Chino el mismo compuesto en concentraciones de 1, 2 y 3 $\mu\text{g/ml}$ reflejan una tendencia a disminuir el IR pese a que los resultados no son significativamente diferentes, dando valores de 1.75, 1.70 y 1.40, de acuerdo a cada concentración, contra 2.18 del testigo (Zhong et al., 1994).

En cultivo de linfocitos humanos Migliore y colaboradores (1993), encontraron que vanadatos de sodio y amonio, y vanadilo como sulfato, disminuyen el IR de tal manera que tiende a decrecer conforme aumenta la dosis, a pesar de que no son estadísticamente significativos, en concentraciones que van de 5 a 80 μM para todos los compuestos y con una disminución acentuada en las aplicaciones de 40 a 80 μM ; equivalencias de 4.68 a 9.36 $\mu\text{g.NH}_4\text{VO}_3/\text{ml}$, 4.88 a 9.75 $\mu\text{g NaVO}_3/\text{ml}$, 7.36 a 14.71 $\mu\text{g Na}_3\text{VO}_4/\text{ml}$ y 6.40 a 12.80 $\mu\text{g/ml}$ para SVO_3 . Por otro lado el V_2O_5 en el mismo sistema de linfocitos humanos modifica fuertemente el TPG en concentraciones de 4 y 6 μg con una diferencia en horas con respecto al testigo de 6.68 para la primera y de 4.75 para la segunda y en dosis de 2 μg no muestra ser genotóxico (Roldán & Altamirano 1990).

Retomando lo anterior, la posibilidad de daño causado por el VF_4 en las concentraciones de 4 y 8 μg de nuestros resultados, no debe ser excluido, ya que la diferencia en horas, 2.67 y 3.33, es suficiente para considerar un retraso en el ciclo pese a que no sean estadísticamente diferentes. De igual manera los valores en las aplicaciones de 8 y 16 μg del vanadio aplicado como tricloruro, los cuales no son diferentes contra su testigo, tampoco deben ser apartados y no ser considerados como no genotóxicos pues sus diferencia en horas son de 3.13 y 4.48, tiempo suficiente en el cual las células se ven parcialmente detenidas en alguna parte del ciclo.

Este aspecto es importante ya que en otros estudios se propuso una correlación de los efectos *in vitro* e *in vivo* de un compuesto de vanadio aplicado como VO_3^- (V_2O_5), donde se observo un TPG más largo, con un retraso de 3.74 y hasta 5.71 horas, en cultivo de linfocitos humanos, en relación a una menor talla (en peso) de fetos de ratón al nacimiento, los cuales a su vez presentaron acortamiento de miembros (fetos de hembras tratadas con 8.5 mg/g de peso, del día 6 al 15 de gestación). En estas investigación se propone que los efectos *in vitro*, de interferencia del vanadio con el huso mitótico y retraso en el TPG, los cuales ocasiona que la división se efectue de manera

más lenta y de forma defectuosa, podría estar sucediendo *in vivo*, reflejando por una disminución en el número celular y consecuentemente un peso más bajo y un menor desarrollo de los miembros (Roldán & Altamirano 1990; Roldán, 1992).

La expresión de la cinética de división celular en los cultivos depende también, de la respuesta de funciones bioquímicas cruciales para las células. Se sabe que el vanadio tiene una gran afinidad por los enlaces fosfato (Nechay *et al.*, 1986) y puede inhibir o estimular las ATP-ases de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Cantley *et al.*, 1977 y 1978; Phillips *et al.*, 1982; Fuhrmann *et al.*, 1984; Mourek, 1987), de la 2,6-biofosfatasa y 6-fosfofructuo-2-cinasa (Gil *et al.*, 1988), e inhibir la síntesis de colesterol (Carson *et al.*, 1987) y de otras muchas proteínas asociadas a ciclos importantes para mantener la funcionalidad e integridad de las células y que de alguna manera permiten relacionar dichos efectos con el retraso en la capacidad proliferativa del linfocito.

Otros estudios revelan que tanto el vanadato como el vanadilo en cultivo de fibroblastos humanos, cultivo de calvaria de rata, en células 3T3 y 3T6 de ratón Suizo y Madin Darby de riñón de bovino, en concentraciones de 40 μM pueden inhibir la síntesis de ADN, detectada por medio de la incorporación de [^3H]timidina (Carpenter, 1981; Smith, 1983; Bracken & Sharma, 1985; Canalis, 1985) y cantidades superiores bloquean la incorporación de timidina de forma irreversible. Por otro lado, se ha demostrado que el vanadio inhibe la actividad catalítica de la ADN polimerasa- α de mamíferos, y a bajas dosis, de entre 10^{-7} a 10^{-6} M, aumenta la incorporación de nucleótidos dentro del ADN y dosis mayores, de 10^{-5} M, inhiben la actividad enzimática; de la misma manera bloquea fuertemente la actividad de otras enzimas que modulan los requerimientos de otras enzimas intermediarias pero esenciales en la síntesis de ácidos nucleicos (Sabbioni *et al.*, 1983; Carns & Schelble 1990; Carns *et al.*, 1990). Investigaciones que proveen de herramienta para dar una explicación parcial en el retraso en la división de los linfocitos expuestos a las sales de vanadio de valencia 4+ y 3+, debido posiblemente a su acción de bloqueo enzimático o por inhibición en la síntesis de ADN, ARN o proteínas.

CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

Los resultados obtenidos muestran que el tricloruro de vanadio (VCl_3) es más citotóxico que el tetrafluoruro de vanadio (VF_4), ya que disminuye el IM en todas las concentraciones empleadas, mientras que el VF_4 solo en las concentraciones más altas.

El VF_4 aumento la frecuencia de ICH's por célula en todas las concentraciones usadas, sin modificar su distribución, lo que nos sugiere una acción genotóxica por parte de este compuesto. Contrariamente el VCl_3 no modifico las frecuencias ni su distribución de ICH's, en ninguna de las dosis, por lo cual, podemos decir que no tiene efecto genotóxico expresado como ICH's.

Con base en nuestros datos y a los antecedentes citados para el flúor, proponemos que la acción genotóxica del VF_4 esta dada principalmente por el catión vanadio (V^{4+}), sin descartar el efecto sinérgico por parte del anión flúor (F^-).

De las dos sales empleadas el VF_4 modifico el TPG, induciendo un retraso en el tiempo normal de división, lo cual enfatiza por un lado su acción citotóxica y por otro su acción genotóxica. Sin embargo no podemos descartar el retraso en el TPG inducido por el VCl_3 puesto que éste es comparable con otros estudios (con V_2O_5) en los cuales se vio alterada la cinética de división.

Con respecto a la respuesta dosis-efecto no se observo una correlación lineal, para ambos compuestos en ninguno de los parámetros evaluados.

REFERENCIAS.

Aardema, M.J., D.P. Gibson & R.A. LeBoeuf (1989) Sodium fluoride-induced chromosome aberrations in different stages of the cell cycle: a proposed mechanism. *Mutat. Res.* 223:191-203.

Abbas, A.K., Lichtman, H.A. & J.S. Pober (1991) Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company. Harcovit Brace Jovanovich, Inc. Philadelphia, USA. Cap. 2.

Abundis, H.M. & P. Ramos (1994) Efecto del tiempo de exposición en la genotoxicidad del pentóxido de vanadio (V_2O_5) en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Resúmenes, 2º Congreso Latinoamericano de Genética y 3º de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental. Pto. Vallarta, Jalisco, México. No. 282.

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

Altamirano, L.M. (1987) Tinción diferencial de cromátidas hermanas sin Hoechst 33258. Memorias de la IV Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Genética. UNAM, México. Pag. 23-26.

Altamirano, M., M. E. Ayala, A. Flores, L.Morales and R. Dominguez (1991) Sex differences in the effects of vanadium pentoxide administration to prepubertal rats. *Med. Sci. Res.* 19:825-826

Altamirano, L.M. (1992) Efectos mutagénicos y alteraciones del ciclo celular reproductivo del ratón producidos por pentóxido de vanadio. Tesis Doctoral. UNAM, México.

Altamirano, L.M., B.L. Alvarez & E.R. Roldán (1993) Cytogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Med. Sci. Res.* 21:711-713.

Baroch, E.F. (1983) Vanadium and vanadium alloys. En: Encyclopedia of chemical technology. Jhon Wiley & Sons, NY. Cap. 23.

Bogden, J.D., H. Higashino, M.A. Lavenhar, J.W. Bauman, F.W. Kemp & A. Aviv (1982) Balance and tissue distribution of vanadium after short-term ingestion of vanadate. *J. Nutr.* 112:2279-2285.

Boggs, D.R. & A Winkelstein (1985) El leucocito, El manual Moderno. México. Cap 1, 2 y 5.

Bolaños, F. (1990) El impacto biológico: problema ambiental contemporáneo. UNAM, México. Cap. 5 y 7.

Bosque, M.A., J. Domingo & J.M. Llobert (1993) Variability in the embryotoxicity and fetotoxicity of vanadate with the day of exposure. *Vet. Hum. Toxicol.* 35:1-3.

Bracken, M.W. & P.R. Sharma (1985) Cytotoxicity-related alterations of selected cellular functions after *in vitro* vanadate exposure. *Biochem. Pharmacol.* 34:2465-2470.

Bravo, A.H. (1987) *La contaminación del aire en México*. Universo Veintiuno, México. Cap. 4 y 6.

Brichard, S.M., W. Okitolonda & C. Henquin (1988) Long term improvement of glucose homeostasis by vanadate treatment in diabetic rats. *Endocrinology* 123:2048-2053.

Brusick, D. (1984) Consequences of genotoxic effects. En: *Carcinogenesis and mutagenesis testing*. (Eds) J.F. Douglas. Human Press, Inc. USA. Cap. 3.

Brusick, D. (1987) *Principles of genetic toxicology*. Plenum Press, NY. Cap. 1-3.

Burrell, R., & D.K. Flaherty & L.J. Savers (1992) *Toxicology of the immune system: a human approach*. Van Nostrand Reinhold. NY. Cap. 2 y 3 .

Byrne, A.R. & L. Costa (1978) Vanadium in foods and in human body fluid and tissue. *Sci. Total Environm.* 10:17-30

Canalis, E. (1985) Effect of sodium vanadate on deoxyribonucleic acid and protein synthesis in cultured rat Calvarie. *Endocrinology.* 116:855-862.

Cande, W.Z. & S.M. Wolniak (1978) Chromosome movement in lysed mitotic cells inhibited by vanadate. *J. Cell. Biol.* 79:573-580.

Cantley, L.C., L. Josephson, R. Warner, M. Yanagisawa, C. Lechene & G. Guidotti (1977) Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* 252:7421-7423.

Cantley, L.C., M.D. Resh & G. Guidotti (1978) Vanadate inhibits the red cell (Na⁺,K⁺) ATPase from the citoplasmic side. *Nature* 272:552-554.

Carns, D.C. & S.M. Schelble (1990) Vanadate dimer and tetramer both inhibit glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochemistry* 29:6698-6706.

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

Carrano, A.V. & D.H. Moore (1982) The rationale and methodology for quantifying sister chromatid exchange in humans. En: *Mutagenicity: New horizons in Genetic Toxicology*. (Eds) J.A. Heddle. Acad. Press. NY. Cap. 10.

Carrano, A.V. & A.T. Natarajan (1988) Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.* 204:379-406.

Carpenter, G. (1981) Vanadate epidermal growth factor and the stimulation of DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Common.* 102:1115-1121.

Carson, B.L., H.V. Ellis & J.L. McCann (1987) **Toxicology and biological monitoring of metals in humans**. Lewis Publishers, Inc. Pag. 276-289.

Caspary, W.J., B. Myhr, L. Bowers, D. McGregor, C. Richar & A. Brown (1987) **Mutagenic activity of fluorides in mouse lymphoma cells**. *Mutat. Res.* 187:165-180.

Cherian, G. (1985) **Metallothionein and metal toxicity**, CRP Press, Boca Raton, FL.

Cohen, M.D., C.B. Klein & M. Costa (1992) **Forward mutations and DNA-protein crosslinks induced by ammonium metavanadate in cultured mammalian cells**. *Mutat. Res.* 269:141-148

Cole, J. W.J. Muriel & B.A. Bridges (1986) **The mutagenicity of sodium fluoride to L5178Y-TK⁺ mouse lymphoma cells**. *Mutagenesis* 1:157-167.

Dean, B.J. & N. Danford (1984) **Assay for the detection of chemically induced chromosome damage in cultured mammalian cell**. En: **Mutagenicity testing**. (Eds) S. Venitt & J.M. Parry. IRL Press, Oxford. Cap. 7.

Donalson, J., R. Hemming & F. LaBella (1985) **Vanadium exposure enhances lipid peroxidation in the kidney of rats and mice**. *J. Physiol. Pharmacol.* 63:196-199.

Duffus, J.H. (1983) **Toxicología ambiental**. Omega, Barcelona España.

Eliander, C.G., L. Gerhardsson & G. Oberdoerster (1988) **Biological monitoring of toxic metals- overview**. En: **Biological monitoring of toxic metals**. (Eds) Clarkson W. T., Friberg L. Nordberg F. & Sanger R., Plenum Press. NY. pag. 1-72.

Frazier, J.M. (1992) **Scientific perspectives on the role of *in vitro* toxicity testing in chemical safety evaluation**. En: ***In vitro* methods in toxicology**. (Eds) G. Jolles & A. Cordier. Academic Press Ltd. Londres. Cap. 26.

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

Friberg, L. & G.F Nordberg (1986) En: **Handbook on the toxicology of metals**. (Eds) L. Friberg, G.F. Nordberg & V. Vouk. Elsevier Sci. Pub. Cap. 1.

Fuhrmann, G.F., J. Hüttermann & P.A. Knauf (1984) **The mechanism of vanadium action on selective K⁺-permeability in human erythrocytes**. *Biochim. Biophys. Acta.* 769:130-140.

Gil, J., M. Miralpeix, J. Carreras & R. Bartrons (1988) **Insulin-like effects of vanadate on glucokinase activity and fructose 2,6-biophosphate levels in the liver of diabetic rats**. *J. Biol. Chem.* 263:1868-1871.

Gilli, A., R. Vellosi, R. Fiorio, C. Della Croce, R. del Carratore, E. Morichetti, L. Giromini, D. Rosellini, & G. Bronzetti (1991) **Genotoxicity of vanadium compounds in yeast and cultured mammalian cell**. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 11:175-183.

Gómez, M., D.J. Sánchez, J.L. Domingo & J. Corbella (1992) Embryotoxic and teratogenic effects of intraperitoneally administered metavanadate in mice. *J. Toxicol. Environm. Health* 37:47-56.

Gutiérrez, C., G.G. González & P. Hernandez (1983) Analysis of baseline and BdrU-dependent SCEs at different BrdU concentrations. *Exp. Cell. Res.* 149:461-469.

Heide, M., W. Legrum, K.J. Netter & G.F. Fuhrmann (1983) Vanadium inhibits oxidative drug demethylation *in vivo* in mice. *Toxicology* 26:63-71.

Heylinger, C.E., A.G. Tahiliani & J.H. McNeill (1985) Effect of vanadium on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science* 227:1474-1477.

Hoffman, G.R. (1981) Overview of genetic toxicology. En: Genetic toxicology. Plenum Press. NY.

Inazu, T, T. Taniguchi, S. Yanagi & H. Yamamura (1990) Protein-tyrosine phosphorylation and aggregation of intact human platelets by vanadate with H₂O₂. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 170:259-263.

Ivett, J.L. & R.R. Tice (1982) Average generation time: a new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. *Environm. Mutagen.* 4:358.

Jackson, J.F. & H.F. Linskens (1982) Metal ion induced unscheduled DAN synthesis in *Petunia* pollen. *Mol. Gen. Genet.* 187:112-115.

Jhonson, J.L., H.J. Choen & K.V. Rajagopalan (1974) Studies of vanadium toxicity in the rat lack of correlation with molybdenum utilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56:940-946.

Jones, M.M. & M.A. Basinger (1983) Chelante antidotes for sodium vanadate and vanadyl sulfate intoxication in mice. *J. Toxicol. Environm. Health* 12:749-756.

Kalatzis, G., D. Katakis, E. Vrachnou & J. Konstantatos (1988) A mechanistic study of the reduction of cystine by vanadium(II) in the pH range from 7.5 to 12. *Inorg. Chim. Acta* 151:191-195.

Kato, H. (1974) Spontaneous sister chromatid exchanges detect by a BUdR-labeling method. *Nature* 251:70-73.

Kato, H. (1977) Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BUdR-labeling method. *Rev. Cytology* 49:55-97.

Kato, H. (1980) Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2:69-77.

Kawai, T., K. Seiji, T. Watanave, H. Nakatsuka & M. Ikeda (1989) Urinary vanadium as a biological indicator of exposure to vanadium. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 61:283-287.

Klein, J. (1990) Immunology Blackwell, Scientific Publications. Gran Bretaña. Cap. 3 y 11.

Lagerkvist, G., G.F. Nordberg & V. Vouk (1986) Vanadium. En: **Handbook the toxicology and metals**. Elsevier Science Publishing Co. Inc. Holanda. Vol. II. Cap. 27.

Latt, S.A. (1973) Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosome. *Proc. Nac. Acad. Sci. USA.* 70:3395-3399.

Latt, S.A. (1974) Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mytomicina C. *Proc. Nac. Acad. Sci. USA.* 8:3162-3166.

Latt, S.A. (1979) Sister chromatid exchanges. *Genetics* 92:83-95.

Latt, S. & R.R. Schreck (1980) Sister chromatid exchange analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 32:297-313.

Latt, S.A., J. Allen, S.E. Bloom, A. Carrano, E. Falke, D.Kram, E. Schneider, R. Schreck, R. Tice, B. Whitfield & S. Wolff. (1981) Sister-chromatid exchanges: a report of the gene-tox program. *Mutat. Res.* 87:17-62.

Latt, S.A., R.R. Schreck, A. D'Andrea, T.N. Kaiser, F. Schlesinger, S. Lester & K. Sakai. (1984) Detection, significance, and mechanism of sister chromatid exchange formation: past experiments, current concepts, future challenges. En: **Sister chromatid exchanges** (Eds) Tice, R.R. & A. Hollander. Plenum Pub. Co. NY. Pag. 11-39.

Lazutka, J.R. (1991) Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environm. Mol. Mutagen.* 17:188-195.

Léonard, A. & G.B. Gerber (1994) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mut. Res.* 317:81-88.

Lenhinger, A.L. (1980) **Bioquímica**, 2ª ed. Omega, Barcelona España. Cap. 8.

Lerner, R.A. & F.J. Dixon (1973) The human lymphocyte as an experimental animal. *Sci. Am.* 228:82-91.

Li, Y., N.A. Heerema, A.J. Dunipace & G.K. Stookey (1987) Genotoxic effects of fluoride evaluated by sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* 192:191-201.

Lindahl, K.K. & S. Shall (1984) DNA repair and sister chromatid exchanges. En: **Sister chromatid exchanges**. (Eds) Tice, R.R. & A. Hollander. Plenum Pub. Co. NY. Pag. 305-311.

López, V., T. Stevens & R.N. Lindquist (1976) Vanadium ion inhibition of alkaline phosphatase-catalyzed phosphate ester hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 175:31-38.

Maher, V.M. & J.J. McCormick (1982) Measurement of mutations in somatic cell in culture. En: **Mutagenicity: New horizons in genetic toxicology**. (Eds) J.A. Heddles. Acad. Press, NY. Cap. 8.

Margolin, B.H. & M.D. Shelby (1985) Sister chromatid exchanges: a reexamination of the evidence for sex and race differences in human. *Environm. Mutagen.* 4:63-72

Marques, M.J. (1988) *Probabilidad y estadística*. UNAM, México.

Michibata, H, J. Uchiyama, Y. Seki. T. Numakunai & T. Uyama (1992) Accumulation of vanadium during embryogenesis in the vanadium-rich Ascidian, *Ascidia gemmata*. *Biological Trace Element Res.* 34:219-223.

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

Mongold, J.J., G.H. Cros, L. Vian, A. Tep, S. Ramanadham, G. Siou, J. Diaz & J.H. McNeill (1990) Toxicological aspects of vanadyl sulphate on diabetic rats: effects on vanadium leveles and pancreatic B-cell morphology. *Pharmacol. Toxicol.* 67:192-198.

Montaldi, A., L. Zentilin, P. Venier, I. Gula, V. Bianchi, S. Paglialunga & A.G. Levis (1985) Interaction of nitrilotriacetic acid with heavy metals in the induction of sister chromatid exchanges in cultured mammalian cell. *Environmental Mutagenesis* 7:381-390.

Morales, P.R. (1980) Analysis *in vivo* of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. *Mutat. Res.* 74:61-69.

Morales, R.P. (1988) El daño a la información genética y los intercambios de cromátidas hermanas. *Ciencia y Desarrollo* 14:65-72.

Mourek, J. (1987) Effect of vanadium on $(Na^+ - K^+)$ -stimulated ATPase activity in the brain of rats of different ages. *Physiol. Bohemoslov* 36:341-346.

Moutschen, J. (1985) *Introduction to genetic toxicology*. John Wiley & Sons, NY. Cap. 1-5.

Mudry, M.D., M. Labal, I. Larripa, S. Brioux & O. Colillas (1981) Utilidad del método de intercambio de cromátidas hermanas en la detección de posibles agentes mutagénicos. *Medicina (Buenos Aires)* 41:173-176.

Myron, D.R., S.H. Givand & F.H. Nielsen (1977) Vanadium content of select food as determined by flameless atomic absorption spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 28:79-82.

Natarajan, A.T. & G. Obe (1982) Mutagenic testing with cultured mammalian cell. Cytogenetic assay. En: *Mutagenicity: New horizons in genetic toxicology*. (Eds) J.A. Heddle. Acad. Press, NY. Cap. 7.

Navas, P., A. Hidalgo & G. García Herdugo (1986) Citokinesis in onion roots: inhibition by vanadate and caffeine. *Experientia* 42:437-439.

- Nechay, B.R., L.B. Nanninga & S.E. Nechay (1986) Vanadyl (VI) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxyl, and amino ligand; calculations of cellular vanadium species distribution. *Arch. Biochem. Biophys.* 251:128-138.
- Ortiz Monasterios, P.F., C. Cortinas de Navas & Maffey García (1987) **Manejo de los desechos peligrosos industriales en México.** Universo Veintiuno, México. Cap. 1-3.
- Owusu Yaw, J., M.D. Choen, S.Y. Fernando & C.I. Wei (1990) An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicol. Lett.* 50:327-336.
- Perry, P. E. & E.F. Thomson (1984). The methodology of sister chromatid exchanges. En: **Handbook of mutagenicity test procedures.** (Eds) B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols & C. Ramel. Elsevier Sci. Pub. Holanda. Cap. 24.
- Perry, P. & S. Wolff (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251:156-158.
- Phillips, T.D., B.R. Nechay & N.D. Heidelbaugh (1983) Vanadium: chemistry and the kidney. *Fed. Proc.* 42:2969-2973.
- Phillips, T.D., B.R. Nechay, S.L. Neldon, L.F. Kubena, N.D. Heidelbaugh, E.C. Shepherd, A.F. Stein & A.W. Hayes (1982) Vanadium-induced inhibition of renal Na^+ , K^+ -adenosinetriphosphatase in the chicken after chronic dietary exposure. *J. Toxicol. Environm. Health* 9:651-661.
- Prival, M.J. (1980) Genetic toxicologic: regulatory aspects. *J. Environm. Patol. Toxicol.* 3:99-111.
- Ramírez, L., L. Vega, M.E. Gonsebatt & W.P. Ostrosky (1994) Estudios de la actividad aneuploidogénica del pentóxido de vanadio y arsenito de sodio por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en núcleos interfásico. Resúmenes, 2º Congreso Latinoamericano de Genética y 3º de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental. Pto. Vallarta, Jalisco, México. No.58.
- Rehder, D. (1991) The bioinorganic chemistry of vanadium. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30: 148-167.
- Roldán, R.E. (1992) **Efecto mutagénico y teratogénico del pentóxido de vanadio.** Tesis de Maestría. UNAM, México.
- Roldán, R.E., C. Aguilar & L.M. Altamirano (1994) Efecto de la cafeína y el pentóxido de vanadio aplicado en diferentes ciclos de replicación sobre el índice mitótico, intercambio de cromátidas hermanas y ciclo celular en linfocitos humanos *in vitro*. Resúmenes, 2º Congreso Latinoamericano de Genética y 3º de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental. Pto. Vallarta, Jalisco, México. No. 250.
- Roldán, R.E. & L.M. Altamirano (1990) Chromosomal Aberrations, sister chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellites association in human lymphocytes culture exposed to vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 245:61-65.

Roldán, R.E., S.H. Hernández & L.M. Altamirano (1995) Genotoxicity of vanadium tetraoxide (V₂O₄) in human lymphocyte cultures. *Environm. Molec. Mutagen. Suplemento*, 25:45.

Sabbioni, E., A. Brazzelli, & L. Clerici (1983) Different effects of vanadium ions on some DNA-metabolizing enzymes. *J. Toxicol. Environm. Health* 12:737-748.

Sabbioni, E., G. Pozzi, A. Pintar, L. Casella & S. Garattini (1991) Cellular retention, cytotoxicity and morphological transformation by vanadium(IV) and vanadium(V) in BALB/3T3 cell lines. *Carcinogenesis* 12:47-52.

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

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

Schwartzman, J.B., V.J. Goyanes & R.R. Tice (1984) DAN damage persistence and site specificity in SCE formation. En: *Sister chromatid exchanges*. (Eds) Tice, R.R., & A. Hollaender. Plenum Pub. Co. NY.

Schwartzman, J.B. & C. Gutiérrez (1980) The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of a damaging treatment in provoking the formation of sister-chromatid exchanges. *Mutat. Res.* 72:483-489.

Schwartzman, J.B. & R.R. Tice (1982) 5-Bromodeoxyuridine and its role in the production of sister chromatid exchanges. En: *Sister chromatid exchange*. (Eds) Alan R. Liss, Inc. NY. 8:123-134.

Scott, D., S.M. Galloway, R.R. Marshall, M. Ishidate, D. Brusick, J. Ashby & B.C. Myhr (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions. *Mutat. Res.* 257:147-204.

Sharma, R.P., J.S. Flora, D.B. Drown & S.G. Oberg (1987) Persistence of vanadium compounds in lungs after intracheal instillation in rats. *Toxicol. Industrial Health* 3:321-329.

Sharma, A. & G. Talukder (1987) Effects of metals on chromosomes of higher organisms. *Environm. Mutagen.* 9:191-226.

Sheriff, D.S. (1991) Effect of vanadium on rat liver and testicular glutathione (GSH) and lipid peroxide levels. *Reprod. Toxicol.* 5:513-515.

Simon, H., H. Schneider & G.F. Fuhrmann (1982) Vanadium increases selective K⁺ permeability in human erythrocytes. *Toxicology* 22:271-278.

Singh, O.P. & A. Sharma (1980) Effects of certain metallic pollutants in plants genetic systems: a review. *Nucleus* 23:15-19.

Smith, J.B. (1983) Vanadium ions stimulate DNA synthesis in Swiss mouse 3T3 and 3T6 cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8:6162-6166.

Stokinger, H.E. (1981) The metals. En : *Patty's industrial hygiene and toxicology*, 3^a Ed. Vol. IIA. Clayton, G.D. & Clayton, F.E. Eds. Jhon Wiley and Sons, NY. Cap. 29

Strout, H.V., P.P. Vicario, R. Saperstein & E.E. Slater (1989) The insulin-mimetic effect of vanadate is not correlated with insulin receptor tyrosine kinase activity nor phosphorylation in mouse diaphragm *in vivo*. *Endocrinology* 123:1918-1924.

Taylor, H.J. (1958) Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics* 43:515-529.

Thus, R. & M. Ronne (1982) Localization of SCEs and their possible relationship to dA-dT of dG-dC clusters, respectively, in Chinese hamster V79-E chromosomes. *Hereditas* 96:295-298.

Tice, R. & E.L. Schneider (1976) Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges *in vivo*. *Exp. Cell. Res.* 102:426-429.

Vargas, J.L., F. Anieto, J. Cervera & E. Knecht (1989) Vanadate inhibits degradation of short-lived, but not of long-lived, proteins in L-132 human cells. *Biochem. J.* 258:33-40.

Vercruyse, A. (1984) Metals in human toxicology. En: Hazardous metals in human toxicology. (Eds) A. Vercruyse. Elsevier Sci. Pub. Parte B. Holanda. pag. 3-15.

Villalobos, H.E.A. (1987) Vanadium's teratogenic effects in pig. *Rev. Latin. Genet.* 1:54-58.

Vouk, V. (1986) General chemistry of metals. En: Handbook on the toxicology of metals. (Eds) L. Friberg, G.F. Nordberg & V. Vouk. Elsevier Sci. Pub. Cap. 1.

Waksvik, H., P. Magnus & K. Berg (1981) Effects of age, sex and genes on sister chromatid exchange. *Clin. Genet.* 20:449-454.

Waters, M.D., D.E. Gardner & D.L. Coffin (1974) Cytotoxic effects of vanadium on rabbit alveolar macrophages *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 28:253-263.

Watson, J.D. & F.H.C. Crick (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171:737-738.

WHO. (1985) Guidelines for the study of genetic effects in human populations. IPCS. Environmental Health Criteria. No. 46. World Health Organization, Génova.

WHO. (1988) Environmental Health Criteria, No. 81. Vanadium. Génova.

Witkowska, D., R. Oledzka & B. Pietrzyk (1986) Influence of intoxication with vanadium compounds on the intestinal absorption of calcium in the rat. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 37:899-906.

Wolff, S., J. Bodycote & R. B. Painter (1974) Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells to pass through S. *Mutat. Res.* 25:73-81.

Wolff, S. & P. Perry (1974) Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Cromosoma* 48:341-363.

Yin, X., A.J. Davison & Siu-Sing-Tang (1992) Vanadate-induced gene expression in mouse C127 cells: roles of oxygen derived active species. *Molec. Cell. Biochem.* 115:85-96.

Younes, M., E. Kayser & O. Strubelt (1991) Effect of antioxidants on vanadate-induced toxicity towards isolated perfused rat livers. *Toxicology* 70:141-149.

Zambrano, A.F. (1982) Reparación del ADN: daños por agentes físicos y químicos. *Ser. Biol.* 1:163-175.

Zaporowska, H. (1994) Effects of vanadium on L-ascorbic acid concentration in rat tissues. *Gen. Pharmacol.* 25:467-470.

Zeiger, E., M.D. Shelby & K.L. Witt (1993) Genetic toxicity of fluoride. *Mutat. Res.* 21:309-318.

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